

Tesis Doctoral

Rol del receptor activado por proliferadores peroxisomales gama sobre la alteración folicular temprana inducida por exceso de andrógenos. Acción de la pioglitazona como tratamiento

Velez, Leandro Martin

2017-03-30

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:

Velez, Leandro Martin. (2017-03-30). Rol del receptor activado por proliferadores peroxisomales gama sobre la alteración folicular temprana inducida por exceso de andrógenos. Acción de la pioglitazona como tratamiento. Facultad de Ciencias Exactas y Naturales. Universidad de Buenos Aires.

Cita tipo Chicago:

Velez, Leandro Martin. "Rol del receptor activado por proliferadores peroxisomales gama sobre la alteración folicular temprana inducida por exceso de andrógenos. Acción de la pioglitazona como tratamiento". Facultad de Ciencias Exactas y Naturales. Universidad de Buenos Aires. 2017-03-30.

EXACTAS UBA

Facultad de Ciencias Exactas y Naturales



UBA

Universidad de Buenos Aires



Universidad de Buenos Aires
Facultad de Ciencias Exactas y Naturales

“Rol del receptor activado por proliferadores peroxisomales gama sobre la alteración folicular temprana inducida por exceso de andrógenos. Acción de la pioglitazona como tratamiento”

Tesis presentada para optar al título de Doctor de la Universidad de Buenos Aires en el área de Ciencias Biológicas

Lic. Leandro Martin Velez

Directora de Tesis: Dra. Alicia Beatriz Motta

Consejero de estudios: Dr. Matías Pandolfi

Lugar de trabajo: Centro de Estudios Farmacológicos y Botánicos,
Laboratorio de Fisiopatología Ovárica, Facultad de Medicina, Universidad de Buenos Aires.

Fecha de Entrega: 30/03/17

**“Rol de los receptores activados por proliferadores peroxisomales (PPAR)
gama sobre la alteración folicular temprana inducida por exceso de andrógenos.
Acción de la pioglitazona como tratamiento”**

Resumen

El exceso de andrógenos es uno de los desórdenes endocrinos más frecuentes en mujeres en edad reproductiva y está fuertemente asociada a una reducción en la fertilidad o a infertilidad. En mujeres con esta condición, la administración de glitazonas (como la pioglitazona o rosiglitazona) mejora el perfil androgénico y la función ovárica. La pioglitazona ejerce su acción actuando como ligando del receptor nuclear activado por proliferadores peroxisomales gama (PPARG). Sin embargo, se desconoce el mecanismo por el cual el sistema PPARG regula la función ovárica. En este trabajo, en una primera etapa nos planteamos investigar cómo el exceso de andrógenos altera la función ovárica temprana. Encontramos que el hiperandrogenismo indujo una regulación negativa sobre el sistema PPARG y alteró el desarrollo folicular temprano, la vía de la esteroidogénesis folicular estableció un ambiente pro inflamatorio en ovario e incrementó el estrés oxidativo (EO) sistémico. En una segunda etapa nos propusimos investigar si la administración de un ligando de PPARG, la pioglitazona (PGZ,) modificaba o prevenía las alteraciones inducidas por el estado hiperandrogénico. Encontramos que la PGZ activó al sistema PPARG, evitando así la regulación negativa del hiperandrogenismo sobre el sistema PPARG. La activación de PPARG también previno las alteraciones del hiperandrogenismo sobre el desarrollo folicular temprano y la vía de esteroidogénesis folicular, sobre el estado pro-inflamatorio y sobre el EO sistémico. Colectivamente, nuestros resultados indican que la activación del sistema PPARG en ovario de animales expuestos al exceso de andrógenos mejora la función ovárica temprana, ya que previno las alteraciones sobre la esteroidogénesis folicular, el estatus inflamatorio del ovario y el balance oxidativo sistémico.

Palabras clave: Foliculogénesis, hiperandrogenismo, receptor activado por proliferadores peroxisomales gama, ovario, Pioglitazona, fertilidad.

“Role of the peroxisome proliferator-activated receptor gamma (PPARG) in the regulation of early follicular alteration induced by androgen excess. Action of pioglitazone as treatment”

Abstract

Androgen excess is one of the most common endocrine disorders in women in the reproductive age and is strongly associated with a reduction in fertility or infertility. In women with this condition, the administration of glitazones (such as pioglitazone or rosiglitazone) improves the androgenic profile and ovarian function. Pioglitazone (PGZ) exerts its action by acting as a exogenous ligand of the peroxisome proliferator –activated receptor gamma (PPARG). However, the precise mechanism by which the PPARG system regulates ovarian function is unknown. We first investigated how androgen excess alters early ovarian function. We found that hyperandrogenism induced a downregulation of the PPARG system along with alterations on early follicular development, the follicular steroidogenesis pathway, and established a pro-inflammatory environment in ovary and a systemic oxidative stress state. Then, we investigated whether administration of a PPARG ligand, pioglitazone (PGZ), modified or avoided the alterations induced by the hyperandrogenic state. We found that PGZ activated the PPARG system, avoiding the hyperandrogenism-induced downregulation of the PPARG system. Activation of PPARG also prevented the hyperandrogenic alterations on early follicular development and the follicular steroidogenesis pathway, on the pro-inflammatory state and on systemic oxidative stress. Collectively, our results indicate that the activation of the PPARG transcriptional system in the ovary of animals exposed to an excess of androgens improves the early ovarian function, since PGZ avoided alterations on follicular steroidogenesis, ovarian inflammatory status and systemic oxidative balance.

Key words: Ovarian folliculogenesis, Hyperandrogenism, Peroxisome proliferator – activated receptor gamma, pioglitazona, fertility.

Parte de los resultados presentados en esta Tesis dio origen a la siguiente publicación científica:

“Effect of hyperandrogenism on ovarian function”

Velez Leandro Martin, Heber Maria Florencia, Ferreira Silvana Rocio, Abruzzese Giselle
Adriana, Reynoso Roxana Maria, Motta Alicia Beatriz.
Reproduction 149 (6) 577-585, doi: 10.1530/REP-15-0041 first published online 12 March
2015

El presente trabajo ha sido financiado por:

La Agencia Nacional de Promoción Científica y Técnica (ANPCyT):

Beca Inicial 2012-2015
Subsidio: PICT 2010 N°71

El Consejo Nacional de Investigaciones Científicas y Técnicas (CONICET):

Beca Interna de Finalización de Doctorado 2015-2017

Agradecimientos

Quisiera agradecer a muchas personas e instituciones, por permitirme no solo realizar mi doctorado, sino también por permitirme poder crecer tanto académicamente como personalmente. En primer lugar quiero agradecer a mi novia, Magdalena Gantuz, por ser mi sostén diario desde que nos conocimos, allá por el 2008, cuando aún cursábamos la licenciatura en Cs. Biológicas en Exactas. Que pueda haber primero terminado la licenciatura, y luego comenzado y terminado esta tesis es en parte gracias a ella.

A mi directora, Alicia Motta, no solo por brindarme la posibilidad de realizar un doctorado en un momento en el que no tenía muchas expectativas de poder realizarlo, sino también por su buena onda y apoyo continuo desde el comienzo al fin del doctorado, y por brindarme un espacio en su laboratorio en el que pude trabajar con total libertad.

A mi familia, que sin ellos no podría siquiera haber comenzado la licenciatura. A mis viejos, Stella y Rodolfo, por apoyarme siempre para que continúe estudiando, a pesar de las crisis económicas y la dificultad de vivir tan lejos de la facultad. ¡A ustedes, mil gracias viejos! También a mis hermanos, Rulo, Gus, Leo, Sil y Emi, simplemente por estar y compartir muchos momentos conmigo, con eso solo ya me ayudaron a transitar estos años de doctorado.

No quiero olvidarme de mi Facultad, la FCEN, por ayudarme casi ininterrumpidamente desde los comienzos de la carrera de la licenciatura mediante diferentes tipos de becas, las cuales fueron claves para que pueda continuar y finalizar mis estudios de grado. También quiero agradecer al Mincyt y al Conicet, por haberme otorgado primero una beca para los primeros 3 años de doctorado, y luego por la beca para finalizar el doctorado.

A mis compañeras de labo: Flor, Gise y Sil, por la buena onda y por haberme ayudado y estado siempre ahí presente. A los chicos del piso 17: Eric, Rocio, Clau, Bel, Dai, Nella, ¡a todos! ¡Voy a extrañar esos Afterlabs!

También quiero mencionar a mis amigos, esos amigos de toda la vida que me acompañaron siempre: Lachi, Juan y el enano Mauro. También a amigazos como Fede, Pablito, Mauro el Griego, Dani, Facu. A todos gracias por estar.

Ahh, y no menos importantes, mis mascotas: mis gatos Damon y Teresa, ellos inconscientemente me ayudaron y siempre están ahí para solicitar un mimo que los reconforte, al igual que a mí (aunque también se quejan con maullidos molestos a veces, es verdad). Los últimos agradecimientos para mascotas: a Hugo, Felipe, Ramona, Eva, Poli, Grisel y Quitina. Todos ellos para mí son un factor anti estrés importantísimo.

*A todos los que de una manera u otra
están, estuvieron y/o seguirán estando para
apoyarme y ser parte de mi vida.*

¡Gracias!

Índice

1.	Introducción.....	13
1.1.	Foliculogénesis ovárica	13
1.2.	Esteroidogénesis ovárica y el modelo de “2 Células, 2 gonadotropinas”	15
1.3.	Atresia folicular y apoptosis ovárica	20
1.4.	Ciclo ovárico.....	21
1.5.	Ciclo estral en la rata	25
1.6.	Rol fisiológico de los andrógenos y efecto del hiperandrogenismo en la función ovárica.....	26
1.7.	Hiperandrogenismo y esteroidogénesis en el ovario.	28
1.8.	Hiperandrogenismo, inflamación y función ovárica.....	29
1.8.1.	TNFA.....	30
1.8.2.	Vía de las ciclooxigenasas.....	32
1.8.3.	Vía de las lipooxigenasas	33
1.8.4.	SOP e inflamación	34
1.9.	Hiperandrogenismo, estrés oxidativo y función ovárica.	36
1.9.1.	Roles fisiológicos de las especies reactivas del oxígeno, antioxidantes y función ovárica	36
1.9.2.	Estrés oxidativo e hiperandrogenismo.....	37
1.10.	Receptores Nucleares Activados por Proliferadores Peroxisomales (PPARs).....	38
1.11.	Ligandos de PPARs.....	40
1.12.	PPARG y su función en el ovario.....	41
1.13.	Hiperandrogenismo, PPARG y desordenes asociados	43
1.14.	Modelo animal de función ovárica temprana e hiperandrogenismo	44
2.	Hipótesis y Objetivos	47
2.1.	Objetivo General	47
2.2.	Objetivos específicos.....	47
	Materiales y Métodos	49
3.	Materiales y Métodos	50
	Tipo De Diseño De Investigación Y Métodos	50
3.1.	Modelo experimental.....	50
3.2.	Estudios histológicos e inmunohistoquímicos.....	51
3.3.	Caracterización de la morfología ovárica.....	53
3.4.	Determinaciones de los niveles de ARN mensajero	54

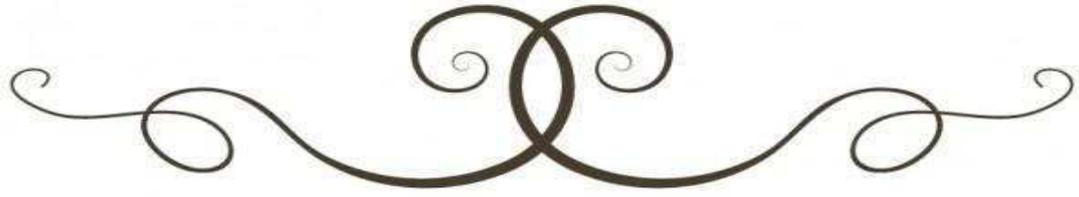
3.5.	Determinación de los niveles proteicos.....	55
3.6.	Cuantificación del estrés oxidativo.....	56
3.7.	Cuantificación por Radioinmunoensayo: Estradiol, Testosterona y Prostaglandina E	57
3.8.	Análisis Estadístico	58
	Resultados	59
4.	Resultados, Primera Parte: Efecto del exceso de andrógenos sobre la funcionalidad ovárica.....	60
4.1.	Efecto del exceso de andrógenos sobre la morfología del ovario.	60
4.1.1.	Observación cualitativa de los ovarios	60
4.1.2.	Composición folicular:	61
4.2.	Efecto del exceso de andrógenos sobre el sistema PPARG	63
4.2.1.	Inmunolocalización de PPARG.....	63
4.2.2.	Regulación del sistema PPARG: Expresión de PPARG, PGC-1, NcOR.....	63
4.3.	Efecto del exceso de andrógenos sobre la esteroidogénesis folicular durante la foliculogénesis temprana.	65
4.3.1.	Inmunolocalización de StAR	65
4.3.2.	Expresión de las enzimas esteroidogénicas.....	66
4.4.	Efecto del exceso de andrógenos sobre las hormonas esteroideas circulante y la enzima aromatasas ovárica.....	68
4.5.	Efecto del hiperandrogenismo sobre los mediadores inflamatorios durante la foliculogénesis temprana.	69
4.6.	Efecto del hiperandrogenismo sobre la vía de la apoptosis ovárica.	72
4.7.	Efecto del hiperandrogenismo sobre el balance oxidativo durante la foliculogénesis temprana.	74
4.8.	Resumen Resultados Primera Parte.....	75
5.	Resultados, Segunda Parte: Rol de la PGZ sobre las alteraciones causadas por el hiperandrogenismo.....	76
5.1.	Rol de la PGZ sobre la morfología del ovario.....	76
5.1.1.	Observación cualitativa de los ovarios	76
5.1.2.	Composición folicular	77
5.2.	Efecto de la PGZ sobre la alteración del hiperandrogenismo sobre el sistema PPARG	78
5.2.1.	Inmunolocalización de PPARG.....	78
5.2.2.	Regulación del sistema PPARG: Expresión de PPARG, PGC-1, NcOR.....	79
5.3.	Rol de la PGZ sobre las alteraciones en la esteroidogénesis folicular provocadas por el hiperandrogenismo.	80

5.3.1.	Inmunolocalización de StAR	80
5.3.2.	Expresión de las enzimas esteroidogénicas.....	81
5.4.	Rol de la PGZ sobre la alteración del hiperandrogenismo sobre las hormonas esteroides circulantes y la expresión ovárica de la enzima aromatasa.....	83
5.5.	Efecto de la PGZ sobre la alteración del hiperandrogenismo sobre los marcadores inflamatorios del ovario	84
5.6.	Efecto de la PGZ sobre las alteraciones hiperandrogénicas en la apoptosis ovárica.....	86
5.7.	Efecto de la PGZ sobre la alteración en el balance oxidativo sistémico causado por el hiperandrogenismo.	88
5.8.	Resumen Resultados Segunda Parte.....	89
	Discusión.....	90
6.	Discusión.....	91
6.1.	Caracterización histológica del ovario, poblaciones foliculares y atresia folicular: Rol del exceso de andrógenos y la pioglitazona	92
6.2.	Expresión en ovario de PPAR γ y correguladores: efecto del exceso de andrógenos y administración del ligando Pioglitazona.....	96
6.3.	Esteroidogénesis folicular, exceso de andrógenos y activación del sistema PPAR γ	99
6.4.	Marcadores inflamatorios y de la apoptosis en ovario, exceso de andrógenos y activación del sistema PPAR γ	103
6.5.	Estrés oxidativo sistémico, exceso de andrógenos y activación del sistema PPAR γ	107
	Conclusiones	110
7.	Conclusiones	111
	Referencias	113
8.	Referencias	114

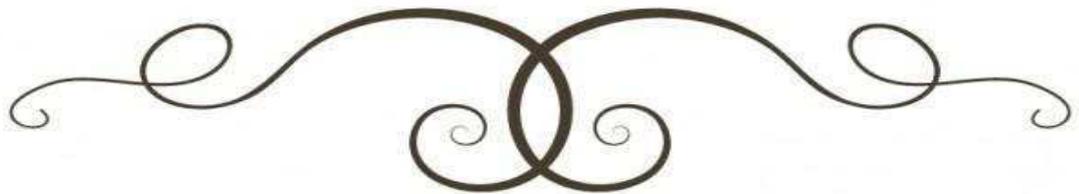
Abreviaturas

3BHSD: 3-beta hidroxisteroide deshidrogenasa.
12-LOX: 12 lipooxigenasa
17BHSD: 17-beta hidroxisteroide deshidrogenasa
ADN: Ácido Desoxirribonucleico.
ADNc: Ácido Desoxirribonucleico copia.
AF: Folículo antral
AMPc: Adenosin-monofosfato cíclico.
AMPK: Quinasa Dependiente de AMP.
ARNm: Ácido Ribonucleico mensajero.
ATP: Adenosin Trifosfato
BAX: Proteína X asociada a BCL2.
BSA: Albúmina Bovina Sérica,
BCL2: Linfoma 2 de célula B.
CGP: Células Germinales Primordiales.
CL: Cuerpo lúteo.
COX2: Ciclooxygenasa 2.
CYP17A: 17 α -idroxilasa/17,20- liasa.
CYP19A: P450 aromatasa.
DHEA: Dehidroepiandrosterona.
DHT: Dihidrotestosterona.
dNTPs: deoxi-nucleótidos trifosfato.
DTNB: 5'5-ditiobis-2-ácido nitrobenzóico.
E2: Estradiol.
eCG: Gonadotrofina Coriónica equina.
ESHRE/ASRM: European Society of Human Reproduction and Embryology/American Society for Reproductive Medicine.
FSH: Hormona folículo estimulante.
GC: Células de la granulosa.
GnRH: Hormona liberadora de gonadotrofinas.
GPx: Glutación peroxidasa.
GR: Glutación reductasa.
GSH: Glutación.
GSHt: Glutation total.
GSSG: Glutation oxidado.
H2O2: Peróxido De Hidrógeno
hs: Horas.
HHG: Hipófisis-hipófisis-gónadas
IMC: Índice de Masa Corporal.
Ip: Intraperitoneal.
LDL: Lipoproteína de Baja Densidad.
LH: Hormona luteinizante.
MDA: Malondialdehido.
mg: miligramos.

MMLV: virus Maloney de leukemia murino.
NcOR: Correpresor nuclear
P4: Progesterona.
P450sc: citocromo P450 de corte de cadena lateral.
PCR: Reacción en Cadena de la Polimerasa.
PF: Folículos primordiales
PG: Prostaglandina.
PGC1A: Coactivador de PPARG 1A.
PGE: prostaglandina E.
PGF: Prostaglandina F
PPAR: Receptores nucleares activados por agentes proliferadores peroxisomales.
PPARG: PPAR gama
PrF: Folículos primarios
R.: Radical Libre.
RIA: Radioinmuno Ensayo.
ROS: Especies Reactivas de Oxígeno.
RT: Retro transcripción.
sc: Subcutánea.
SF: Folículo secundario
SOD: Superoxido Dismutasa.
SOP: Síndrome de Ovario Poliquístico.
StAR: Proteína reguladora de la esteroidogénesis aguda.
T: Testosterona.
TBA: Ácido Tiobarbitúrico.
TC: Células de la teca.
TNFA: Factor de necrosis tumoral alfa
Ug: Microgramos
UI: Unidades Internacionales.
WB: Western Blot.



Introducción



1. Introducción

1.1. Foliculogénesis ovárica

La gónada femenina, el ovario, tiene como funciones primarias la producción y liberación de gametos así como ser la fuente mayoritaria de hormonas sexuales. Durante el desarrollo embrionario, las células germinales primordiales (CGP), las cuales dan origen tanto a los oocitos como a los espermatozoides, son identificadas en el mesodermo extraembrionario como pequeños “clústeres” de células positivas para fosfatasa alcalina. Estas células migran hacia la porción anterior de la línea primitiva (Ginsburg, Snow y col. 1990, McLaren 2003) y se desplazan en un movimiento activo directamente al endodermo del intestino posterior (Anderson, Copeland y col. 2000). Posteriormente en el desarrollo las CGP migran activamente desde el eje dorsal del intestino posterior hacia las crestas genitales en desarrollo (Molyneaux, Stallock y col. 2001) y proliferan rápidamente durante esa migración (Ginsburg, Snow y col. 1990). En roedores, las CGPs continúan proliferando hasta formar los denominados “nidios”, luego estas células entran en meiosis, conformándose los oocitos (Jagarlamudi y Rajkovic 2012). Los oocitos continúan en meiosis hasta diplotene de la profase I, y hacia el final del desarrollo embrionario los “nidios” se rompen para dar lugar a la formación de los folículos primordiales (*primordial follicles*, PFs), en un proceso acompañado por una pérdida masiva de células germinales (Pepling y Spradling 2001, Menke, Koubova y col. 2003).

Cada PF contiene un oocito arrestado en profase y rodeado por células aplanadas denominadas células pre-granulosas las cuales se diferenciarán en células de la granulosa (*granulosa cells*, GCs). Estos PF constituyen la reserva ovárica quiescente. A partir de esta reserva, los folículos serán reclutados hacia el pool de folículos en crecimiento. La transición desde un PF hacia un folículo primario (*primary follicle*, PrF) se caracteriza por un cambio morfológico en las GCs que pasan de su forma aplanada a una cuboidal. Durante el subsiguiente crecimiento hacia el folículo secundario (*secondary follicle*, SF), el oocito continua creciendo, así como las capas de GCs, y se forma una capa adicional de células de la teca (*theca cells*, TCs) por sobre las GCs, separándose por la membrana basal y rodeando el folículo. Estas etapas del crecimiento se denominaron clásicamente “independientes de gonadotrofinas”, pero requieren una compleja interacción bidireccional entre el oocito y las células somáticas (Eppig 2001, Edson, Nagaraja y col. 2009). Es más, diversos estudios demostraron que aunque la presencia de la hormona folículo estimulante (*follicle stimulating hormone*, FSH) no es esencial en esta etapa del crecimiento folicular esta tiene un efecto

estimulador sobre la foliculogénesis, reduce la atresia folicular y mejora la calidad tanto de los folículos como de los oocitos (McGee, Perlas y col. 1997, Hsueh, Kawamura y col. 2015, Dewailly, Robin y col. 2016). Además de estas hormonas peptídicas, las hormonas sexuales (principalmente estradiol (E2) y testosterona (T)) también cumplen roles esenciales en el control intra ovárico de la foliculogénesis actuando a través de sus receptores citoplasmáticos (Hsueh, Kawamura y col. 2015).

En las etapas subsecuentes de la foliculogénesis se forman pequeñas cavidades con fluido dentro del folículo, que devienen en la formación de una única cavidad conocida como “antro”, formando así el folículo antral (*antral follicle*, AF). El antro define dos poblaciones distintivas de GC: las GC del cúmulus, que se ubican adyacentes al oocito, y las GC murales que rodean la pared folicular y son la mayor fuente de hormonas esteroideas (Edson, Nagaraja y col. 2009). Esta etapa de la foliculogénesis depende de la presencia de las gonadotrofinas FSH y luteinizante (*luteinizing hormone*, LH) (etapa “dependiente de gonadotrofinas”). La FSH es necesaria para la sobrevivencia de las GC, proliferación, producción de las hormonas sexuales, y expresión del receptor para LH (Edson, Nagaraja y col. 2009). La mayoría de los AFs van a degenerarse y sufrir atresia folicular, y solo una subpoblación de ellos continúa el desarrollo hasta el estadio preovulatorio o de Graaf. En estos folículos, las GC murales y las del cúmulus responden de forma diferente a las gonadotrofinas FSH y al LH, de esa forma haciéndolos receptivos al pico preovulatorio de LH, la cual activa una secuencia de eventos que culmina con la ovulación del (ej.: primates) o los folículos dominante (ej.: roedores). Estos eventos incluyen la reanudación meiótica del oocito, la expansión del cúmulus, la ruptura folicular y de la pared ovárica, y la liberación del complejo cumulo-oocito que contiene un oocito fecundable. Es tal la complejidad de todos estos eventos que hoy en día se desconoce el mecanismo en detalle, así también existe consenso en asimilar el proceso que culmina con la ovulación con un estado pro inflamatorio (Espey 1980, Espey 1994, Boots y Jungheim 2015), en el que intervienen no solo las hormonas sexuales, FSH y LH, sino también diferentes citoquinas y marcadores inflamatorios. Una vez que se libera el oocito, las GC y TC remanentes sufren una diferenciación celular que lleva a la formación del cuerpo lúteo (CL) (Edson, Nagaraja y col. 2009). El CL es esencial para el establecimiento y mantenimiento de la preñez, en caso que ocurra preñez, principalmente debido a la secreción de progesterona (P4). En la etapa inicial de la formación del CL pueden distinguirse dos tipos celulares, unas células externas y pequeñas y otras internas. Estas últimas constituyen la mayor parte del CL y presentan un mayor tamaño. En caso que no ocurra la preñez, el CL degenera (Stocco,

Telleria y col. 2007). En la figura 1, que se muestra a continuación, se representa al ovario y su morfología, con los diferentes tipos foliculares y estructura generalizada.

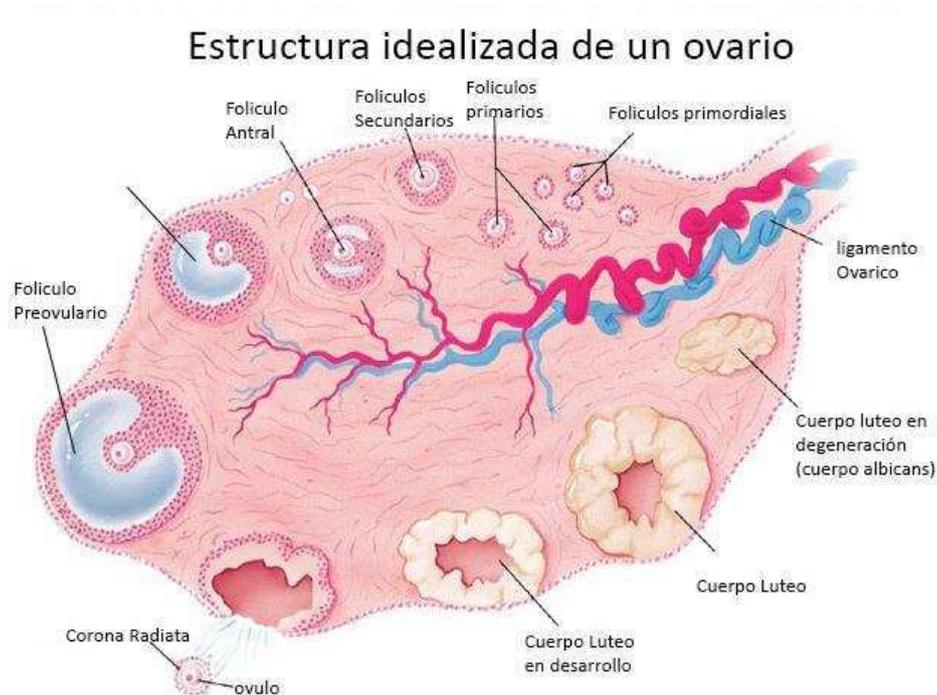


Figura 1: Foliculogénesis ovárica: antes de llegar al estadio ovulatorio, el folículo ovárico se desarrolla pasando por los estadios primordial (en reposo), primario, secundario (pre-antral), antral, y finalmente el estadio de folículo pre-ovulatorio o de Graaf. Adaptado de Byer, Shainberg y Galliano "Dimensions of Human Sexuality". Copyright The Mc Graw Hill Companies, Inc. All Rights Reserved 1999

1.2. Esteroidogénesis ovárica y el modelo de "2 Células, 2 gonadotropinas"

En el ovario dos de las responsabilidades fisiológicas más importantes son la liberación periódica de gametos y la producción de hormonas sexuales. Ambas actividades se integran en un proceso repetitivo y continuo de desarrollo folicular, ovulación y formación-regresión del CL.

El ovario sintetiza hormonas esteroideas como lo hacen otras glándulas endocrinas con las que comparte enzimas (suprarrenales, testículos y tejido adiposo): usando como sustrato bioquímico al colesterol que transporta la lipoproteína LDL y manteniendo la estructura básica del ciclopentano-perhidrofenantreno (Jamnongjit y Hammes 2006).

Las hormonas sexuales femeninas producidas en el ovario son fundamentalmente los andrógenos, estrógenos y progesterona (P4) (Payne y Hales 2004). Así como varias

hormonas no esteroideas como la inhibina, relaxina y algunos factores locales (Hudson, John y col. 1984, Mason, Niall y col. 1986, Medan, Watanabe y col. 2003).

La diferencia entre el ovario y las otras glándulas estriba en la expresión enzimática de sus células especializadas (la figura 2 muestra un esquema general de la esteroidogénesis): primero porque carecen de actividad 21-hidroxilasa o 11 β -hidroxilasa y no sintetizan glucocorticoides; pero fundamentalmente a que se trata del lugar de la anatomía femenina con mayor capacidad aromatizante (Stocco 2008). A grandes rasgos, las hormonas sexuales proceden de la acción catalítica de un grupo de enzimas especializadas, particularmente la superfamilia de la citocromo P450 (P450c17 o CYP17A, la P450 aromatasa o CYP19A y la P450scc o CYP11A), pero también la 3 β hidroxiesteroide-deshidrogenasa (3BHSD) y la 17 β hidroxiesteroide-deshidrogenasa (17BHSD). La entrada de LDL-colesterol en las mitocondrias es esencial para la esteroidogénesis (Miller y Bose 2011) (Figura 2).

En el ovario la síntesis de las hormonas sexuales procede de la secreción de las TCs y las GCs (Jamnongjit y Hammes 2006), aunque también hay un aporte menor de producción de hormonas sexuales en células del estroma ovárico (Qiu, Quan y col. 2013) (Figura 3). La producción de estas hormonas es un proceso complejo y sumamente regulado que involucra diferentes vías de señalización actuando en diferentes tipos de células. En un folículo ovárico típico de mamíferos podemos distinguir al menos 4 tipos celulares. Cada folículo contiene un oocito rodeado de GC del cúmulus, al cual lo rodean las GC murales, las que a su vez están rodeadas de TC (Wood y Strauss 2002). Esa disposición se hace evidente recién en el estadio antral. En estos folículos de la mayoría de los mamíferos, incluyendo humanos y roedores, la esteroidogénesis ocurre según la hipótesis más extendida actualmente: el “modelo de 2 células, 2 gonadotropinas” (Hillier, Whitelaw y col. 1994, Jamnongjit y Hammes 2006). Según este modelo (Figura 3), los andrógenos son sintetizados a partir del colesterol en las TC estimuladas por LH, y seguidamente los andrógenos son convertidos a estrógenos en las GC estimuladas por FSH. Hay que resaltar que primariamente en las TC se expresan los receptores para LH y la enzima CYP17A, la cual convierte pregnenolona y P4 en dehidroepiandrosterona (DHEA) y androstenediona, respectivamente. Mientras que en las GC se expresan primariamente los receptores para FSH y la aromatasa, la cual convierte los andrógenos en estrógenos. Notablemente, los receptores para LH no son exclusivos de las CT, ya que su expresión en las GC murales se incrementan en respuesta a FSH justo antes del pico de LH (Piquette, LaPolt y col. 1991). También es importante mencionar que tanto las GC como las TC expresan la proteína reguladora de la esteroidogénesis aguda (StAR), CYP11A y 3BHSD,

por lo que ambos tipos celulares son capaces de sintetizar pregnenolona y P4 a partir de colesterol (Andersen y Ezcurra 2014). Sin embargo, durante la fase folicular las GC están pobremente vascularizadas y por ende limitadas de la disposición de colesterol y oxígeno, entonces las cantidades de esteroides producidas es mucho menor. Esa situación se revierte previo a la ovulación, cuando ocurre la “luteinización” de las GC y se vascularizan, por lo que son capaces de sintetizar grandes cantidades de P4 a partir de colesterol (Wood y Strauss 2002). Esta producción de P4 tiene un rol clave durante la maduración final del oocito y especialmente en el proceso de ovulación, facilitando la ruptura folicular (Conneely, Mulac-Jericevic y col. 2002). Finalmente, es importante remarcar que el modelo “2 células, 2 gonadotrofinas” tiene amplia relevancia pero concierne solamente a AFs en los que sus poblaciones foliculares están bien diferenciadas, por lo que la regulación de la esteroidogénesis en folículos preantrales o antrales tempranos permanece pobremente dilucidada (Dewailly, Robin y col. 2016).

Enfocándonos un poco más secuencialmente en la vía esteroidogénica, esta comienza con el transporte del colesterol desde el citoplasma, siendo este el principal paso limitante, desde las membranas mitocondriales por la acción de la proteína StAR (Lin, Sugawara y col. 1995). Allí comienza la biosíntesis esteroidea, y el siguiente paso limitante es la producción de pregnenolona, catalizada por una enzima que corta la cadena lateral del colesterol, la enzima citocromo P450 de corte de cadena lateral (P450_{scc} o CYP11A). La pregnenolona (21 carbonos, o C21) es transportada al citoplasma, donde puede ser transformada directamente a P4 mediante la acción de la 3BHSD. Por otro lado, la pregnenolona también puede sufrir la acción consecutiva de las enzimas CYP17A y 3BHSD formándose 17-hidroxiprogesterona y DHEA, para luego formar androstenediona. Estos últimos son andrógenos, esteroides de 19 carbonos (C19), los cuales serán transformados a T. Finalmente, en las GC y por acción de la aromatasa, los andrógenos se aromatizarán a estrógenos, como el 17-estradiol (E2) y la estrona (E1), que son esteroides de 18 carbonos (C18) (Figura 2 y 3).

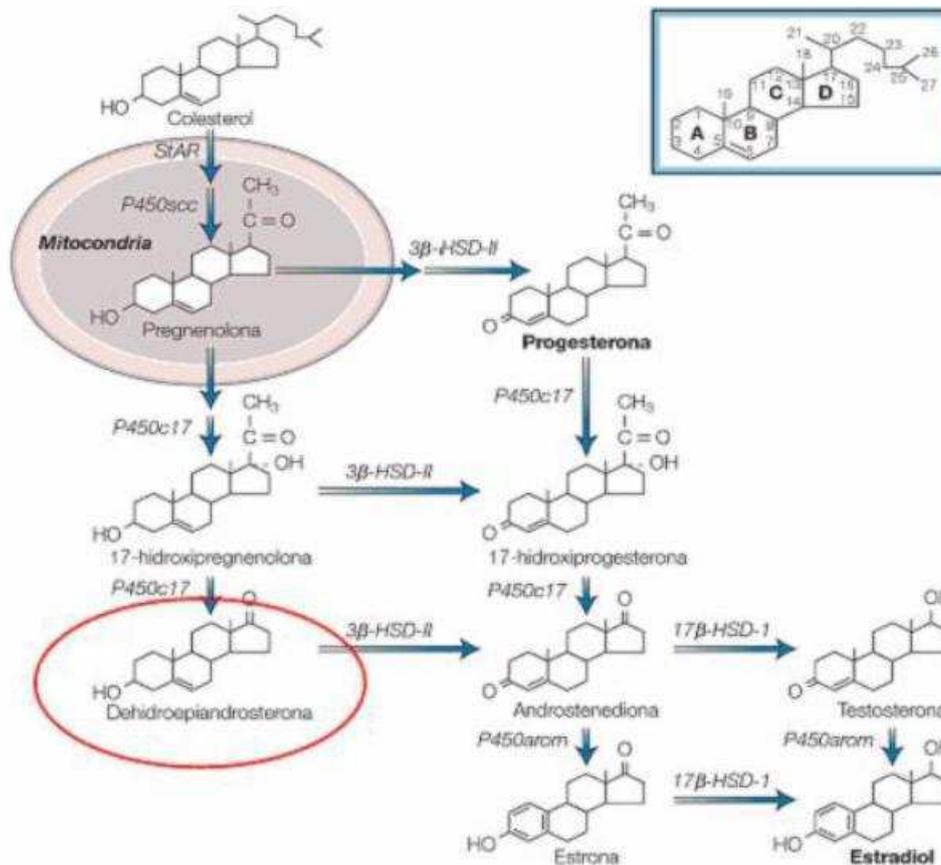


Figura 2. Vía de la esteroidogénesis en el ovario, marcando la posición de la DHEA. Los cuatro anillos de las moléculas de colesterol se identifican con las 4 primeras letras del alfabeto y los carbonos se enumeran en la secuencia que se muestra en la representación. Adaptado de Kronenberg (Kronenberg 2009).

En la regulación de la esteroidogénesis participan no solo FSH y LH, sino que se postula que los sensores energéticos jugarían un rol importante como moduladores de la esteroidogénesis y foliculogénesis ovárica (Dupont, Reverchon y col. 2012). Estos sensores, junto a otras hormonas y péptidos producidas por las TC y GC modulan la esteroidogénesis por mecanismos para/auto/intra- crinos. Las hormonas no esteroideas y péptidos producidas por el ovario incluyen a las inhibinas, activinas y folistatinas, las cuales modulan la secreción de FSH y LH y controlan la foliculogénesis (Findlay 1993, Wu, Chen y col. 2004, Messinis 2006); la hormona antimulleriana (AMH), la cual inhibe la meiosis del ovocito y la mitosis de las GC (Chang, Klausen y col. 2013); y el factor de necrosis tumoral alfa (TNFA), el cual induce la apoptosis de las GC y es un marcador inflamatorio que participa de la ovulación (Kaipia, Chun y col. 1996), entre otros.

Algunos puntos clave de la esteroidogénesis para comprender la fisiología del ciclo ovárico:

- Las GC tienen receptores para la FSH (RFSH).
- La FSH estimula la síntesis de sus propios receptores.
- Las TC tienen receptores para la LH (RLH).
- Las GC también expresan RLH hacia el final del desarrollo folicular.
- Las GC expresan la enzima aromatasa y convierten T en E2.
- La esteroidogénesis ovárica está regulada no solo por FSH y LH, sino también por sensores energéticos y hormonas no esteroideas.
- El modelo “2 Células, 2 gonadotropinas”, si bien es muy relevante en mamíferos, sólo se aplica a partir de folículos antrales bien diferenciados.

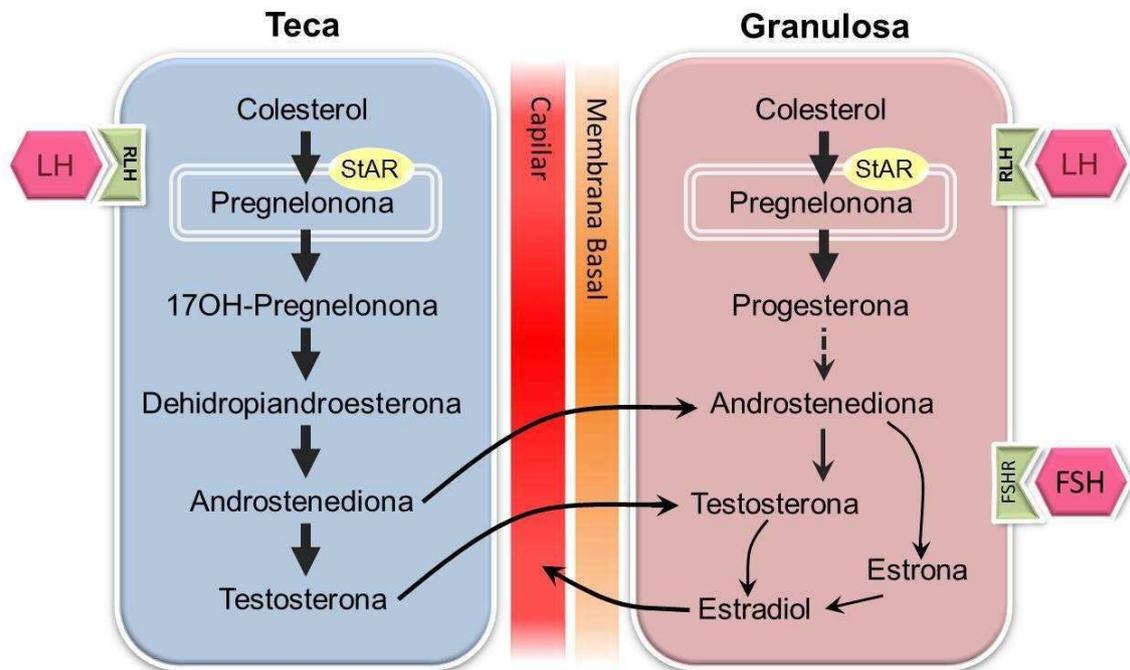


Figura 3. Modelo “2 células, 2 gonadotropinas”. Solo las GC son capaces de ser activadas por la FSH, mientras que la acción de la LH se extiende a la teca y las células del estroma a parte de las mismas células granulosas. La expresión de los receptores para la LH es dependiente de la etapa de desarrollo del folículo, las células de la teca adquieren dichos receptores temprano en su desarrollo, mientras que las células granulosas solo expresan los dos receptores tarde en su desarrollo. Adaptado de *Griffin y Ojeda “Textbook of endocrine physiology” 2nd Ed. Oxford University, New York, 1992*

Por último, y para remarcar: la esteroidogénesis ocurre de manera paralela, y regula, al proceso de maduración folicular. Durante el mismo se producen una serie de cambios hormonales, por un lado se sintetiza el E2 en forma creciente hasta el momento de la ovulación, disminuyendo sus niveles plasmáticos en el momento de la misma y elevándose los niveles de P4 plasmática, gracias a la contribución del CL en la segunda fase del ciclo.

Por otro lado, también se producen ciertos niveles de andrógenos los cuales cumplen un rol fisiológico clave durante la foliculogénesis temprana (Prizant, Gleicher y col. 2014), disminuyendo sus niveles hacia el final del ciclo folicular (Dewailly, Robin y col. 2016). De esta forma es evidente que hay un balance entre las hormonas que varía según el estadio del ciclo, el cual es necesario y clave para un desarrollo normal de la función ovárica.

1.3. Atresia folicular y apoptosis ovárica

En el desarrollo folicular en el ovario de mamíferos solo un número limitado de folículos maduran y son ovulados. Por el contrario, la gran mayoría de los folículos detiene su desarrollo en algún punto y sufren atresia folicular. La atresia folicular es un proceso que ocurre cíclicamente en el ovario y por el cual la mayoría de los folículos en desarrollo degenera y son reabsorbidos durante la fase folicular del ciclo estral (o menstrual en la mujer). Típicamente solo uno de los folículos de la cohorte de AFs rescatados por gonadotrofinas es ovulado (en la mujer), y el resto sufre atresia folicular en cada ciclo. Ese folículo luego de ser ovulado también da origen al CL. Además, la atresia es un proceso apoptótico que está controlado hormonalmente (Kaipia y Hsueh 1997), y ocurre principalmente por apoptosis en las GCs. Esta información remarca el papel esencial que juega la atresia y la apoptosis en el desarrollo folicular y la función ovárica.

Los mecanismos moleculares que controlan la atresia/apoptosis folicular están conformados por diversos factores pro y anti apoptóticos (Hussein 2005). Algunas de estas moléculas clave son los miembros de la familia BCL, como BCL2 (*B-cell lymphoma 2*) y BAX (*BCL2 associated X protein*), y también péptidos como TNFA (*tumor necrosis factor alpha*) y gonadotrofinas (Tilly, Tilly y col. 1995, Manabe, Goto y col. 2004, Hussein 2005). Mientras que BCL2 se encuentra primariamente en folículos en desarrollo, BAX lo hace primariamente en folículos atrésicos (Van Nassauw, Tao y col. 1999). Esta expresión está relacionado con los niveles de gonadotrofinas, ya que altos niveles de gonadotrofinas (principalmente FSH) incrementa la expresión de BCL2 y reduce la de BAX (Sugino, Suzuki y col. 2000). Más aún, la relación entre BCL2 y BAX ayuda a determinar y comprender el alcance de la apoptosis de un tejido (Oltvai, Milliman y col. 1993). El importante rol de BCL2 y BAX en la apoptosis ovárica se sostiene por diversos estudios que muestran (i) bajos números de folículos en ratones deficientes de BCL2 (Ratts, Flaws y col. 1995) (ii) alta expresión de BCL2 lleva a la reducción de la atresia y apoptosis folicular (Hsu, Lai y col. 1996, Morita y Tilly 1999)(iii) ratones deficientes en BAX contienen

folículos anormales con un número excesivo de GCs (Perez, Robles y col. 1999) y (iv) la expresión de BAX es alta en folículos atrésicos comparado a folículos sanos (Kugu, Ratts y col. 1998).

Por otro lado, TNFA es una citoquina, que además de su rol en la inflamación y el estrés oxidativo (EO), es capaz de inducir apoptosis en diversos tipos celulares (Chu 2013). En el ovario, TNFA se puede localizar en oocitos (Marcinkiewicz, Krishna y col. 1994) y GCs (Roby y Terranova 1989). Allí, TNFA estimula la apoptosis y la atresia folicular en AFs, lo que evidencia el rol de TNFA como regulador intraovárico de la atresia folicular (Kaipia, Chun y col. 1996). Además del rol regulador sobre la atresia folicular, TNFA cumpliría un papel importante en el mecanismo de ovulación (Brannstrom, Bonello y col. 1995, Terranova 1997), cuestión que ampliaremos más adelante cuando nos referiremos a los mecanismos inflamatorios en la función ovárica.

1.4. Ciclo ovárico

El ciclo ovárico es la expresión repetida de la función del sistema hipotálamo-hipófisis-ovario, donde cada ciclo culmina, en la mujer, con una hemorragia y cuyo primer día se acepta como el punto de referencia que indica el comienzo de un nuevo ciclo.

El hipotálamo es el encargado de la regulación neurológica del ciclo ovárico, mientras que la hipófisis juega un rol importante como mediador. Las gonadotrofinas hipofisarias, la hormona FSH y la LH sirven como vínculo entre el hipotálamo y los ovarios, existiendo una estrecha comunicación con los esteroides sexuales a lo largo del ciclo (Fig. 4).

Para que exista un ciclo normal se requiere la liberación pulsátil y periódica de la hormona liberadora de gonadotrofinas (*gonadotropin releasing hormone*, GnRH) desde el hipotálamo. En la parte anterior de la hipófisis se encuentran los receptores de GnRH, en un tipo celular denominado gonadotrofos. La unión de esta hormona con sus receptores induce una serie de respuestas hipofisarias que culminan con la síntesis y secreción de LH y la FSH. Los receptores para gonadotrofinas se encuentran en el ovario y se ha demostrado que los receptores para FSH se expresan en las GC de los PF y preantrales, mientras que en las TC solo lo hacen los receptores para LH. Conforme el folículo madura, las GC comienzan a expresar receptores para LH. Ambas gonadotrofinas, LH y FSH, inducen la foliculogénesis ovárica, y con ella, la esteroidogénesis (Uilenbroek y Richards 1979).

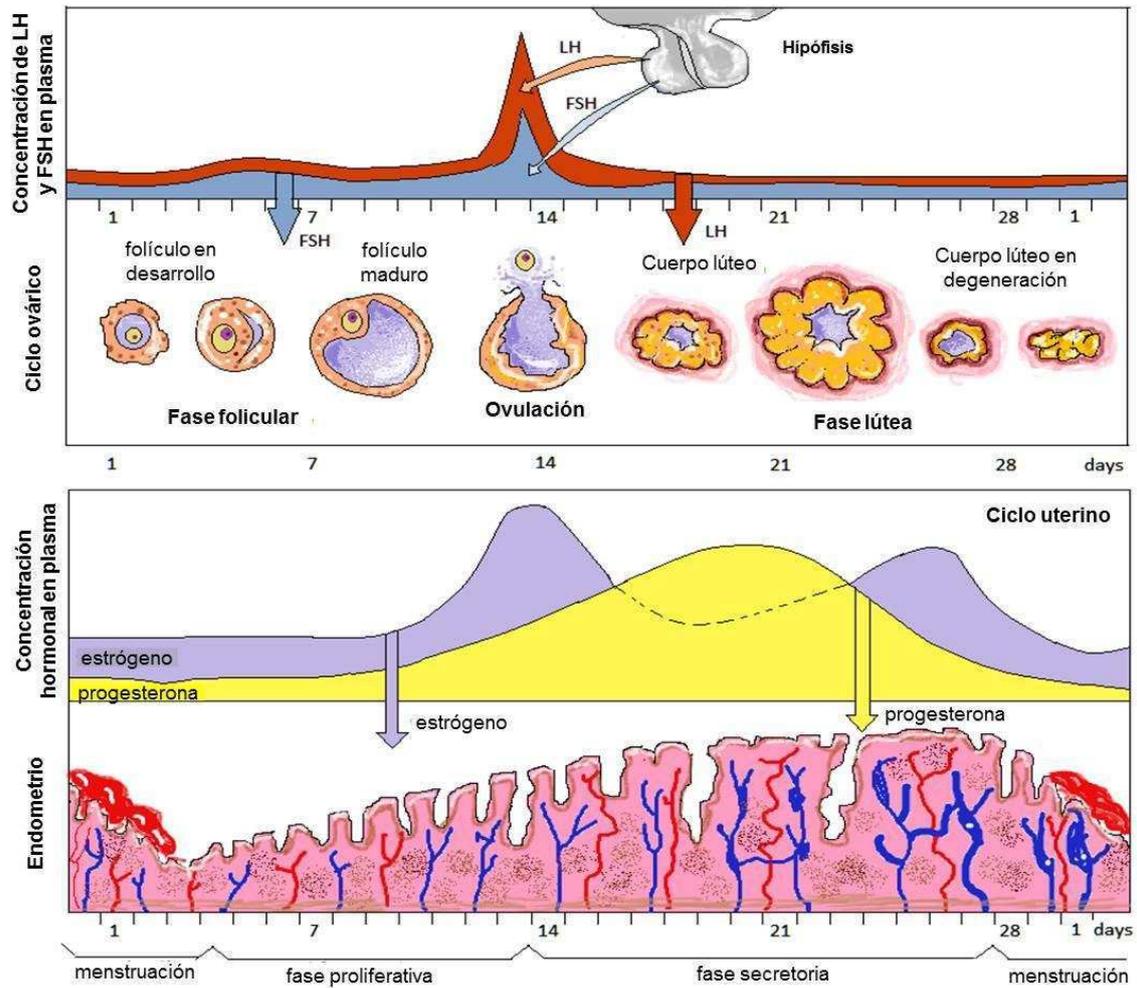


Figura 4: Ciclo ovárico y fases foliculares. La hipófisis anterior secreta FSH y LH, las células foliculares comienzan el crecimiento. Las células de la granulosa secretan estrógenos, las células de la teca expresan androstenediona y se convierten en estrógenos en la granulosa. Altos niveles de estrógenos ejercen una retroalimentación negativa y suprime la secreción de FSH y LH. Las células de la granulosa también secretan hormonas no esteroideas como la inhibina, la cual inhibe la secreción de FSH. Igualmente, luego de transcurrido el gran pico de estrógeno secretado por la granulosa, este ejerce una retroalimentación positivo y entonces se incrementan nuevamente FSH y LH. FSH aumenta un poco ya que aún inhibina la inhibe. LH aumenta a altos niveles, lo que se denomina “el pico de LH”, y es cuando se libera el oocito durante la ovulación (día 14 en humanos). En la fase proliferativa del ciclo uterino, el estrógeno es un factor importante que induce la formación de la nueva capa endometrial. Luego de la ovulación, comienza la fase lútea en ovario: FSH y LH inducen la transformación del folículo en el CL, el cual comienza a secretar grandes cantidades de P4, la que cumple roles claves en la última fase del ciclo y si la reproducción es exitosa. Adaptado de *Scott Gilbert “Developmental Biology. Tenth Edition” Chapter 17. Sunderland, Sinauer Associates. 2013*

El ciclo ovárico consta de una fase folicular, en la cual se suceden una serie de eventos en cascada que propician un número adecuado de folículos para la ovulación, y una fase lútea, en la que, luego de la ovulación, comienza la formación del CL.

Durante la fase folicular, ocurren eventos caracterizados por la mayor o menor influencia de las gonadotrofinas. Uno de estos grandes eventos es el reclutamiento folicular, el cual posee dos etapas: el reclutamiento inicial (I reclutamiento), clásicamente llamado “independiente de gonadotrofinas” (aunque ya mencionaremos algo del papel que juega acá las gonadotrofinas), y el reclutamiento secundario (II reclutamiento), “dependiente de gonadotrofinas” (McGee y Hsueh 2000). Durante el reclutamiento inicial, los PFs comienzan a crecer estimulados por factores intraováricos, aunque la presencia de gonadotrofinas y de hormonas esteroideas estimula ese reclutamiento (McGee y Hsueh 2000). El oocito en estos folículos se encuentra arrestado en la profase I de la meiosis. Aquellos PFs que no respondan permanecen en estado quiescente. Los mecanismos que controlan este inicio del crecimiento folicular son difíciles de estudiar, siendo una de las principales dificultades la baja tasa de crecimiento sobre un largo periodo de tiempo que atraviesan estos folículos pequeños (Hirshfield 1989). Sin embargo, llegados a cierto estadio no son capaces de mantener este desarrollo folicular y, aquellos que no respondan al estímulo de FSH, caerán en atresia, dando comienzo a la segunda etapa del reclutamiento, o reclutamiento secundario. En esta etapa solo aquellos folículos que sean capaces de responder a FSH seguirán creciendo y madurando. Por lo que una de las principales funciones de la FSH sobre los folículos en crecimiento es el rescate folicular, permitiendo que sigan madurando y comiencen a sintetizar y secretar E2. La FSH también induce la expresión de receptores de LH en las GC. Poco después del rescate folicular, la hipófisis comienza a secretar LH, y en respuesta a la LH se rompe el arresto de la meiosis en los folículos rescatados y se reinicia la primera división meiótica del oocito. Un set de cromosomas se mantiene dentro del oocito y el otro se ubica en el llamado “cuerpo polar”, y ambos son rodeados por la zona pelúcida sintetizada por el oocito. En estos folículos si bien existe un efecto de retroalimentación positiva del E2 sobre la secreción de FSH, luego de un tiempo, los altos niveles de E2 comienzan a inhibir la secreción de FSH debido a un efecto de retroalimentación negativa. Por lo tanto, solo aquel folículo que tenga la suficiente cantidad de receptores de FSH podrá continuar con su crecimiento. Este evento es conocido como selección, y aquellos folículos que sobrevivan se convertirán en dominantes, pasando a la etapa de dominancia, mientras que el resto de los folículos reclutados caerán en atresia (McGee y Hsueh 2000). Simultáneamente comienza a darse el

pico de LH (Figura 4). En este último proceso, el folículo que va a ser ovulado continúa desarrollándose, propiciando un ambiente que condiciona la supresión de los otros folículos que estén en desarrollo.

Aunque el mecanismo detallado de la ovulación no está completamente dilucidado, la expulsión física del oocito maduro de los folículos parece ser el resultado de incrementos mediados por LH en la colagenasa, el activador de plasminógenos y las prostaglandinas (PGs) dentro del folículo (Espey 1994, Boots y Jungheim 2015). De esa forma el proceso de ovulación ha sido comparado con un proceso inflamatorio (Espey 1994, Boots y Jungheim 2015). Las PGs pueden causar contracciones localizadas en fibras musculares del ovario y también incrementar el flujo de agua desde los capilares, de esa forma incrementado la presión en el antro (Sirois, Sayasith y col. 2004). Tal es la importancia de las PGs, que si se inhibe su síntesis la ovulación no ocurre (Sirois, Sayasith y col. 2004). Además, la colagenasa y los plasminógenos digieren la matriz extracelular del folículo (Downs y Longo 1983), y hay un aumento de muerte celular programada (apoptosis) en el sitio de ovulación. El resultado final entonces es que a partir del incremento en LH se incrementa la presión folicular acoplada a la degradación de la pared ovárica y folicular, se forma una abertura denominada estigma en el folículo y se rompe la pared ovárica, por donde se libera el oocito junto a las GC del cúmulus.

Luego de la ovulación, la fase lútea del ciclo comienza. Las células remanentes del folículo ovulado dan lugar a la formación del CL, bajo la influencia de la LH. Este CL secreta más estrógeno, pero predominantemente secreta P4. Esta hormona circula hacia el útero, donde completa la preparación del tejido uterino para la implantación del blastocisto, estimulando el crecimiento de la pared uterina y vasos sanguíneos (Figura 4). El bloqueo del receptor de P4 con antagonistas exógenos detiene el desarrollo de la pared uterina y de esa forma previene la implantación del blastocisto (Couzinet, Le Strat y col. 1986). La P4 también inhibe la producción de FSH, de esa forma evitando la maduración de más folículos (por eso se ha utilizado una combinación de P4 y estrógeno como pastillas anticonceptivas, ya que el crecimiento y maduración de nuevos folículos se previene mientras FSH este inhibida).

Si el ovocito no es fecundado, el CL se degenera, la secreción de P4 cesa y la pared uterina se degenera. Con la baja en los niveles séricos de P4 la hipófisis secreta nuevamente FSH y el ciclo comienza nuevamente. Sin embargo, si la fecundación ocurre, interacciones complejas entre el CL, el endometrio y el blastocisto y posterior embrión permiten que el CL se mantenga activo y siga secretando altos niveles de P4 (Robinson, Hammond y col.

2008). Entonces y para finalizar, el ciclo menstrual asegura la maduración periódica y la ovulación de los oocitos y promueve en el útero el desarrollo periódico de un órgano capaz de soportar el desarrollo de un nuevo organismo por 9 meses (en el humano).

1.5. Ciclo estral en la rata

En la rata los PFs se forman al tercer día de edad postnatal y el primer grupo que llegará al estadio antral lo hará a partir de la tercera semana de edad. Luego y a partir del séptimo día a partir del nacimiento se pueden encontrar SFs bien desarrollados. En la rata, la pubertad o primer estro, periodo en el cual la hembra está dispuesta a recibir al macho, ocurre alrededor del día 34 luego del nacimiento, y continua regularmente hasta aproximadamente 10-12 meses de edad, momento en el cual los animales entran en ciclos irregulares. El tiempo que lleva el desarrollo de los PFs hacia folículos preovulatorios es alrededor de 60 días o 15 ciclos estrales (Uilenbroek y Richards 1979). Dentro de este período se necesitan más de 30 días para que los PFs se desarrollen en SFs e igual cantidad de tiempo tarda el desarrollo de los SFs al estadio en el cual serán ovulados. El período anterior al estro (momento de la ovulación) se lo denomina proestro y se caracteriza por el momento en el cual el animal entra en celo. En ausencia de concepción, el estro es seguido por el metaestro. Al periodo siguiente se lo denomina diestro y es el tiempo durante el cual la secreción ovárica prepara a los tejidos reproductivos para la recepción del óvulo fertilizado luego del coito durante el estro. El diestro dura 1-2 días determinando que el ciclo estral tenga una duración de 4-5 días. Si la fertilización no ocurre, el animal vuelve al período de proestro y un nuevo ciclo se inicia. Los distintos estadios pueden determinarse según el tipo y predominancia de distintas células en el extendido vaginal, bajo el microscopio óptico. La rata es un mamífero no estacional, de ovulación espontánea y poliéstrica, esto quiere decir que el ciclo ovárico ocurre durante todo el año y la ovulación no depende del estímulo de la cópula. Dichas características, sumadas a su fácil reproducción y mantenimiento en el bioterio, hacen que sea un buen modelo para el estudio de la fisiología ovárica gonadal. Los cambios mencionados en las distintas fases del ciclo estral a nivel del ovario, útero y vagina en ratas se presentan resumidos en la tabla 2.

FASE	OVARIO	UTERO	VAGINA	CONDUCTA
Proestro	Crecimiento rápido de folículos. Degeneración de los cuerpos lúteos del ciclo previo.	Útero distendido con fluido aumentando su tamaño.	Epitelio grueso. Células epiteliales superficiales. Frotis vaginal con abundancia de células epiteliales.	Estado receptivo a la copulación hacia el final de proestro
Estro	Maduración de folículos. Ovulación.	Máxima distensión. Inicio de degeneración vacuolar del epitelio uterino.	Epitelio grueso. Capa de células cornificadas en superficie. Frotis vaginal con abundancia de células escamosas.	Receptividad máxima Lordosis. Copulación. Máxima probabilidad de fertilización.
Metaestro	Formación de cuerpos lúteos.	Alguna degeneración vacuolar, pero también regeneración.	Descamación del epitelio cornificado. Epitelio delgado. Invasión de leucocitos. Frotis vaginal con abundancia de células escamosas y	No hay receptividad.
Diestro	Crecimiento de los cuerpos lúteos. Folículos de varios tamaños.	Regeneración del epitelio uterino.	Epitelio delgado. Regeneración del epitelio. Frotis vaginal con abundancia de leucocitos y células epiteliales.	No hay receptividad.

Tabla 2: Resumen de los cambios a nivel del ovario, útero, epitelio vaginal y conducta en las distintas fases del ciclo estral de la rata. Adaptado de *De la Cruz, R. y Pásaro, R. "Control endocrino del ciclo reproductor en la rata: una experiencia docente utilizando un método de caracterización citológico" Revista de enseñanza universitaria, pp. 545-554, 1998*

1.6. Rol fisiológico de los andrógenos y efecto del hiperandrogenismo en la función ovárica.

Recientemente ha ido en aumento el interés acerca del rol de los andrógenos en la regulación del desarrollo folicular y la fertilidad femenina (Gleicher, Weghofer y col. 2011). De hecho, hubo un cambio importante acerca del concepto general acerca del efecto de los andrógenos sobre la foliculogénesis y fertilidad. Tradicionalmente se consideraba a los andrógenos perjudiciales en la función ovárica y asociados con la infertilidad, sin embargo diversos estudios vienen mostrando que ciertos niveles de andrógenos actuando a través del receptor de andrógenos (AR) son necesarios para el desarrollo folicular normal y la función ovárica (Gervasio, Bernuci y col. 2014, Prizant, Gleicher y col. 2014). En la figura 5 se describen y postulan efectos de los andrógenos sobre la funcionalidad ovárica. Continuando con los efectos estimuladores de los andrógenos sobre el desarrollo folicular, varios estudios demostraron que en roedores el tratamiento con andrógenos aumenta el desarrollo folicular pre antral y mejora la respuesta ovulatoria con un incremento en las GC y disminución de la atresia folicular (Wang, Andoh y col. 2001, Sen, Prizant y col. 2014). Además, en cultivos *in vitro* de folículos de ratón la adición de andrógenos aumentó el

diámetro folicular y el desarrollo de los folículos preantrales (Sen, Prizant y col. 2014). Por otro lado, en grandes mamíferos se ha mostrado que la administración *in vivo* de T estimula la transición de folículos desde el estadio de primarios a secundarios (Hampton, Manikkam y col. 2004, Yang y Fortune 2006).

Consecuentemente, se hace evidente que existe un balance crítico de los andrógenos para un desarrollo folicular normal y que un desbalance como el que ocurre en condiciones hiperandrogénicas tiene efectos perjudiciales sobre el desarrollo folicular y la regulación de la fertilidad femenina (Dewailly, Robin y col. 2016). Mientras que un exceso de andrógenos aumenta el desarrollo folicular temprano y promueve una malformación de los AFs que puede conducir al desarrollo del Síndrome del Ovario Poliquístico (SOP)(Jonard y Dewailly 2004), bajos niveles de andrógenos se asocian con disminución de la reserva ovárica e insuficiencia ovárica (Gleicher, Weghofer y col. 2011, Lebbe y Woodruff 2013).

El SOP es la causa más frecuente de anovulación e infertilidad, ya que afecta a entre el 5-10% de las mujeres en edad reproductiva (Azziz, Carmina y col. 2009). Las características sobresalientes del SOP son el hiperandrogenismo, la oligo-anovulación y la posible formación de quistes ováricos (Bozdog, Mumusoglu y col. 2016), y a pesar de los esfuerzos realizados hasta ahora, la fisiopatología del SOP continúa pobremente dilucidada. El peso de la evidencia sugiere que las anormalidades centrales del SOP son primariamente ováricos. Más específicamente, el hiperandrogenismo sería el “centro” del SOP y una de las primeras consecuencias sería la alteración de la foliculogénesis (Catteau-Jonard y Dewailly 2013). Por razones no esclarecidas, pero presumiblemente de origen tanto ambientales como genéticas y epigenéticas, las TC están particularmente sobre activadas (Nelson, Legro y col. 1999), de esa forma creando un exceso de andrógenos intra-ovárico. Teniendo en cuenta eso y lo que mencionamos previamente acerca de la importancia de los andrógenos en el crecimiento folicular temprano, entonces ese hiperandrogenismo intra-ovárico se postula como la causa principal del exceso folicular temprano que caracteriza al SOP (Jonard y Dewailly 2004). Ese exceso de folículos característico del síndrome cumple un rol por sí mismo en la oligo-anovulación, a través de un mecanismo que no está dilucidado completamente pero que ocurriría independientemente de influencias sistémicas (Jonard y Dewailly 2004). Interesantemente, existe una correlación negativa entre el número de folículos pequeños (preantrales y antrales iniciales) respecto a los antrales en mujeres con SOP, sugiriendo un rol inhibitorio de estos folículos pequeños sobre el desarrollo de los antrales (Dewailly, Catteau-Jonard y col. 2007), a través de interacciones folículo a folículo

que estarían exacerbadas en mujeres con SOP. En definitiva, la hipótesis plantea que mientras más folículos pequeños existan más arrestado el crecimiento folicular posterior, y menos chances de ovulación (Dewailly, Robin y col. 2016). Ese exceso de folículos pequeños producto del hiperandrogenismo alteraría la liberación y el balance de factores locales intraováricos necesarios para un desarrollo folicular normal (Hsueh, Kawamura y col. 2015).

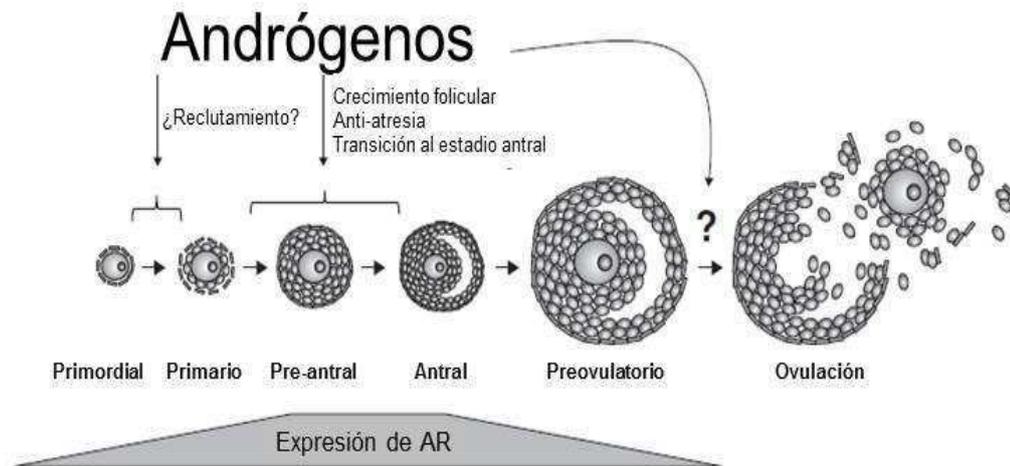


Figura 5: roles fisiológicos propuestos para los andrógenos en las diferentes transiciones foliculares, y su relación con la expresión del receptor de andrógenos (AR). Adaptado de *Prizant, Gleicher y Sen "Androgen actions in the ovary: balance is key" J Endocrinol 222 (3) R141-R151, 2014*

1.7. Hiperandrogenismo y esteroidogénesis en el ovario.

La excesiva biosíntesis de andrógenos es el diagnóstico clave en desordenes androgénicos como el SOP, y esa excesiva circulación de andrógenos tiene origen primariamente ovárico (Carmina 2006). A pesar que la glándula adrenal también produce grandes cantidades de andrógenos, el peso de la evidencia sugiere que en la mayoría de los desordenes androgénicos es el ovario el principal contribuyente del exceso en la secreción androgénica (Carmina 2006, Magoffin 2007). En el ovario de mujeres con SOP las TC están incrementadas, y además tienen una capacidad esteroidogénica aumentada (Nelson, Legro y col. 1999). Esa capacidad esteroidogénica aumentada es producto de una expresión aumentada de las enzimas esteroidogénicas. Los principales andrógenos producidos en la mujer son DHEA-sulfato (DHEA-S), DHEA, androstenediona, T y dihidrotestosterona (DHT). A medida que aumenta la potencia de un andrógeno en particular, la concentración sérica del mismo disminuye, de esta manera DHEA-S y DHEA son los de mayor

concentración sistémica pero los menos potentes como andrógenos (Rivera-Woll, Papalia y col. 2004). El SOP está caracterizado fisiopatológicamente por un hiperandrogenismo ovárico funcional caracterizado por un aumento en las TC de 17-hidroxiprogesterona, P4, androstenediona y T, tanto a nivel basal como en respuesta a LH (Nelson, Legro y col. 1999). Esta desregulación de la esteroidogénesis ovárica de la teca está dada por un aumento en la actividad enzimática de 17BHS, CYP17A y la 3BHS (Nelson, Legro y col. 1999). Además, en los ciclos anovulatorios típicos de mujeres SOP, el desarrollo folicular está arrestado en el estadio antral en el que la enzima aromatasa de la granulosa normalmente comienza a expresarse, por lo que la expresión de la aromatasa en mujeres SOP está disminuida (Jakimiuk, Weitsman y col. 1998). Muy importante es el hecho que la enzima reguladora de la esteroidogénesis aguda, StAR, se encontró aumentada tanto en TC como en GC de mujeres SOP (Jakimiuk, Weitsman y col. 2001). En cuanto a la regulación de la esteroidogénesis ovárica, se han descrito diversas moléculas reguladoras además de las gonadotropinas, que tienen el potencial para contribuir a la desregulación de las TC y GC y de esa forma alterar la esteroidogénesis en mujeres con desordenes como el SOP (Magoffin 2007), cuestión que retomaremos más adelante.

1.8. Hiperandrogenismo, inflamación y función ovárica.

Ya mencionamos algo del papel fundamental de la inflamación en la función ovárica normal, particularmente su participación en el proceso de ovulación, y que este último es un componente esencial de la reproducción en mamíferos y separa el ciclo estral en dos partes: foliculogénesis y luteinización. Para que la ovulación ocurra, el tejido ovárico normal debe romperse para permitir la expulsión del oocito maduro, y ahora sabemos que el proceso inflamatorio inducido por gonadotropinas cumple un rol preponderante, creando una debilidad en la pared ovárica con la consecuente ruptura posterior (Espey 1980, Espey 1994, Boots y Jungheim 2015). El pico de LH induce la producción de adenosin monofosfato cíclica (AMPc), la esteroidogénesis, y la liberación de histaminas así como otros mediadores inflamatorios. Uno de estos importantes mediadores, y que actúa sinérgicamente con el pico de LH para promover la ovulación es el factor TNFA (Terranova 1997). Este factor actúa junto a otros importantes mediadores inflamatorios, particularmente los relacionados con la vía del ácido araquidónico (AA), como las PGs, predominantemente la variante E2 (PGE2), y eicosanoides, los cuales se incrementan en respuesta al pico de LH que ocurre previo al momento de ovulación (Davis, Lennard y col.

1999). Las PGs aumentan la reacción inflamatoria y activan los fibroblastos de la teca. Además, la liberación de enzimas proteolíticas producto del pico de PGs promueve la angiogénesis e hiperemia y aumento de colagenasas, las cuales degradan el tejido conectivo folicular y provocan la ruptura folicular y consecuentemente la expulsión del ovocito (Espey 1994).

Otra de las vías metabólicas del AA con funciones importantes en la función ovárica es la vía de las lipooxigenasas (LOX). La participación de la vía de las LOX en el proceso de ovulación fue sugerida por primera vez durante la década de 1980 (Reich, Kohen y col. 1983), cuando se demostró que la inhibición de LOX disminuía la respuesta ovulatoria en ratas. Por otro lado, los procesos inflamatorios están involucrados en numerosas patologías, y condiciones pro-inflamatorias pueden impactar negativamente en la dinámica folicular del ovario. Ejemplos de patologías en el que existe una producción crónica de marcadores pro-inflamatorias incluye a la obesidad y al SOP (Schmidt, Weijdegard y col. 2014). Ambas patologías impactan negativamente en la función ovárica y la ovulación (Gonzalez 2012, Luzzo, Wang y col. 2012, Blair, Kyaw-Tun y col. 2013). Además, el aumento en la síntesis de andrógenos por el ovario está íntimamente asociado con un aumento en la inflamación (Orvieto, Fisch y col. 2005). A continuación discutiremos las diferentes vías mencionadas y su relación con desordenes hiperandrogénicos como el SOP, y su impacto en la función ovárica y la dinámica folicular.

1.8.1. TNFA

El factor TNFA es una citoquina fundamental, que desde su descubrimiento es extensamente estudiada por sus roles tanto en procesos fisiológicos como patológicos (Aggarwal, Gupta y col. 2012). TNFA regula diversas funciones celulares críticas, como la proliferación celular, supervivencia, diferenciación y apoptosis (Chu 2013). En cuanto al mecanismo de acción, se sabe que TNFA dispara la activación de las vías del factor de transcripción nuclear kappa B (*nuclear factor kappa beta*, NFkB) y la proteína activadora 1 (AP-1), las cuales son esenciales para la expresión de citoquinas pro-inflamatorias (Chen y Goeddel 2002, Nakao, Ogtata y col. 2002), además de inducir la cascada de la proteína mixta de dominio tipo quinasa (*mixed lineage kinase domain-like*, MLKL), la cual es crítica para la generación de especies reactivas del oxígeno (*reactive oxidative species*, ROS) en respuesta a TNFA y que está involucrada en la inducción de la apoptosis y necrosis (Wang, Sun y col. 2014). A su vez, la producción alterada de TNFA y de la vía del receptor de TNFA se ha asociado con la patogénesis de diversas enfermedades, incluyendo la diabetes, la

aterosclerosis y la obesidad (Aggarwal, Gupta y col. 2012). Tal es la importancia de TNFA en la producción de citoquinas inflamatorias, que se la postula como un “regulador maestro” de la producción de citoquinas (Sedgwick, Riminton y col. 2000, Dagna, Corti y col. 2012). En cuanto a sus roles en la reproducción y la función ovárica, se demostró que TNFA también se expresa en el ovario (Marcinkiewicz, Krishna y col. 1994, Morrison y Marcinkiewicz 2002). A nivel ovárico se ha descrito su influencia en la atresia folicular y esteroidogénesis (Montgomery Rice, Limback y col. 1999, Morrison y Marcinkiewicz 2002). La acción de TNFA en el ovario se da por un lado alterando la acción estimuladora de las gonadotropinas sobre la esteroidogénesis, esto ocurre en folículos previo al estadio preovulatorio (Emoto y Baird 1988, Adashi, Resnick y col. 1989). Específicamente, en las TCs TNFA inhibe la producción inducida por LH de P4, androsterona y androstenediona. Y en GCs TNFA inhibe la acumulación de P4 y E2 inducida por FSH y LH (Terranova 1997). Por otro lado, en folículos preovulatorios TNFA promueve la secreción de P4, la cual cumple importantes roles en la ovulación (Brannstrom, Wang y col. 1993, Brannstrom, Bonello y col. 1995). Además, se ha reportado la presencia de TNFA en fluido folicular (Fedorcsak, Raki y col. 2007). Finalmente, la producción exacerbada de TNFA se correlaciona con baja calidad oocitaria y alta apoptosis (Darbon, Oury y col. 1989, Kaipia, Chun y col. 1996), y se encontraron altos niveles de TNFA en pacientes con desordenes reproductivos como el SOP (Araya, Aguirre y col. 2002, Thathapudi, Kodati y col. 2014) y endometriosis (Wu y Ho 2003). En el SOP, además de contribuir al estado pro inflamatorio asociado al hiperandrogenismo, TNFA estaría alterando el mecanismo de apoptosis en el ovario, contribuyendo de esa forma también a la disfunción ovárica (Terranova 1997, Morrison y Marcinkiewicz 2002). Por otro lado, se demostró que altos niveles de TNFA aumentan la producción de la proteína C-reactiva (*C-reactive species*, CRP) (Steel y Whitehead 1994). La importancia de CRP para la función ovárica se explica por el hecho que se ha observado que los niveles de CRP fluctúan en el ciclo menstrual normal con un pico cerca del momento de la ovulación, y se demostró que la alteración en la fluctuación de CRP afecta la dinámica folicular (Clancy, Baerwald y col. 2013), como podría ocurrir en el SOP. Finalmente, y a pesar de lo expuesto, poco se sabe acerca de la relación entre el efecto temprano del hiperandrogenismo y la expresión de marcadores inflamatorios como TNFA en el ovario, cuestión que expondremos en este trabajo.

1.8.2. Vía de las ciclooxigenasas

Frente a diversos estímulos tales como citoquinas, factores de crecimiento o trauma mecánico, la forma citosólica de la fosfolipasa A2 (*citosolic phospholipase A2*, cPLA2) libera AA de los fosfolípidos de membrana, que será luego oxidado y reducido por las COXs. Se conocen dos isoformas de la COX: COX1 y COX2 (Vane, Bakhle y col. 1998, Smith, DeWitt y col. 2000) aunque se ha descrito una tercer isoforma, conocida como COX3, pero se ha descrito que ésta es solo una variante de la COX1 (Chandrasekharan, Dai y col. 2002). Mientras que la expresión de COX1 es constitutiva y media funciones fisiológicas, la COX2 es inducible por factores de crecimiento, citoquinas, oncogenes y estímulos inflamatorios (Smith y Dewitt 1996, Vane, Bakhle y col. 1998). Las COXs catalizan la conversión de AA en prostaglandina H₂ (PGH₂) (Figura 6). Esta servirá subsecuentemente como sustrato para las PG sintasas (PGS) para la generación de las cuatro PGs: PGD₂, PGE₂, PGF₂ y PGI₂. En cuanto a su función, las PGs son potentes mediadores de la homeostasis local, y cumplen un amplio rango de efectos incluyendo la estimulación de la contractilidad del musculo liso y el útero, activación del sistema inmune, regulación de la permeabilidad vascular y la agregación plaquetaria. Las PGs pueden ejercer efectos tanto autocrinos como paracrinos, al unirse a receptores específicos que están acoplados a proteínas G que tienen siete dominios transmembrana (Jabbour y Sales 2004). Las PGs, particularmente la 15-Deoxy- Δ 12,14-prostaglandina J₂ (15d-PGJ₂), también pueden unirse a los receptores nucleares como los receptores nucleares activados por proliferadores peroxisomales gama (*Peroxisome proliferator-activated receptor gamma*, PPAR γ) y regular, por ejemplo, procesos inflamatorios (Willis, White y col. 1999) y modular diversas respuestas fisiológicas y patológicas en el tracto reproductor. Más aún, PPAR γ puede regular directamente la síntesis de PGs controlando la expresión de COX2 (Subbaramaiah, Lin y col. 2001). Respecto a la función de las PGs, al ser factores vaso activos, estas cumplen importantes funciones en la reproducción en mamíferos, particularmente en la foliculogénesis y ovulación (Duffy y Stouffer 2001, Sirois, Sayasith y col. 2004, Broughton, Rule y col. 2009), funcionalidad del cuerpo lúteo (Armstrong 1981, Kurusu, Jinno y col. 2009), implantación del blastocisto (Lim, Gupta y col. 1999, Kennedy, Gillio-Meina y col. 2007), establecimiento del embarazo (Jabbour y Sales 2004, Kennedy, Gillio-Meina y col. 2007, Waclawik 2011) y durante el parto (Lee, Romero y col. 2010). En mamíferos, incluidos roedores y humanos, el pico de LH provoca un aumento en la producción folicular de PGs, particularmente PGE₂ y PGF₂ previo a la ovulación, con la mayor concentración de estas al momento de la ovulación (Bauminger y Lindner 1975). Además,

se demostró que la inhibición de la síntesis de PGs afecta la función folicular y bloquea la ovulación (Orczyk y Behrman 1972, Kurusu, Jinno y col. 2009), mientras que una producción crónica de PGs está asociado con la disfunción ovárica en desordenes androgénicos como el SOP (Navarra, Andreani y col. 1996, Amalfi, Velez y col. 2012).

1.8.3. Vía de las lipooxigenasas

Las LOXs son una familia de enzimas citosólicas que incorporan una molécula de oxígeno en la estructura molecular del AA. La actividad LOX fue descrita inicialmente en plantas como la soja (*Glycine max*) de la cual se han llegado a caracterizar hasta 8 LOXs diferentes (Brash 1999). En mamíferos existen, mayoritariamente, tres LOXs que oxidan el AA a la altura del carbono 5 (5-LOX), 12 (12-LOX) o 15 (15-LOX) (Figura 6). Los principales productos de la 5-LOX son los leucotrienos, mientras que la 12- y la 15-LOX producen hidroperóxidos lipídicos (HPETEs): 5-HPETE, 12-HPETE y 15-HPETE (Corbett y Akin 1994). Los hidroperóxidos son altamente inestables y reactivos. Son transformados por la glutatión peroxidasa a los correspondientes ácidos hidroieicosatetraenóicos (HETE) que son los primeros compuestos derivados de las LOXs con actividad biológica (Funk 2001). Se sabe que pueden mediar sus efectos uniéndose como ligando de PPARG (Limor, Sharon y col. 2008). El rol de las LOX en el ovario fue sugerido por primera vez por Reich y col, quienes demostraron que la inhibición de las LOX disminuye la respuesta ovulatoria en ratas bajo protocolo de inducción ovulatoria con gonadotrofinas (Reich, Kohen y col. 1983). A partir de allí, diversos estudios apoyaron esta hipótesis, enfatizando la importancia de las LOX al momento de la ovulación (Downey, Mootoo y col. 1998, Kurusu, Jinno y col. 2009). Por el contrario, no existen estudios acerca de la función e importancia de las LOX durante la función ovárica temprana.

12-LOX

Existen 3 isoformas de la 12-LOX, denominadas según el tipo celular en el que fueron inicialmente caracterizadas: plaquetaria, leucocitaria y epidérmica (Yoshimoto y Takahashi 2002). La forma leucocitaria de la 12-LOX en mamíferos se encuentra ampliamente distribuida aunque la distribución tisular varía entre especies, mientras que las formas plaquetaria y epidérmica sólo se expresan en un número limitado de tipos celulares (Yoshimoto y Takahashi 2002). En cuanto a los principales mediadores lipídicos de la

actividad 12-LOX, estos son sus productos finales: el 12-HPETE, que es muy inestable, y el 12-HETE para el cual se han caracterizado posibles receptores específicos en células de Langerhans humanas así como en una línea de carcinoma pulmonar (Yoshimoto y Takahashi 2002). Además de sus receptores específicos, se ha descrito que tanto 12- como 15-HETE pueden unirse también a receptores PPAR γ y modular, de ese modo, diversos mecanismos (Li, Cheon y col. 2004).

Respecto a la función de la 12-LOX debemos mencionar que se encontró que tanto la 12- como la 15-LOX poseen especificidad dual y ambas enzimas pueden generar tanto 12- como 15-HETE, por lo que las enzimas pueden referirse como 12/15-LOX (Dailey y Imming 1999, Li, Cheon y col. 2004). Aquí mantendremos la nomenclatura y vamos a referirnos a 12-LOX, aunque teniendo en cuenta la especificidad mencionada. En general, tanto la 12- como el 15-HETE antagoniza la respuesta inflamatoria y contrarresta el efecto pro inflamatorio (Conrad 1999). Pero en lo que respecta a la función en el ovario, se demostró que en ratas bajo inducción de la ovulación la expresión de la 12-LOX aumenta en TCs y GCs de folículos preovulatorios, donde se postula que promueve la ovulación (Kurusu, Jinno y col. 2009), sugiriéndose que el aumento de la expresión de la 12-LOX está relacionado al pico de LH. Además, en útero se demostró que si se inhiben las enzimas 12- y 15-LOX se produce la disminución de la tasa de implantación, mientras que la administración de rosiglitazona (ligando sintético de PPAR γ) restaura la tasa de implantación (Li, Cheon y col. 2004). A nivel fisiopatológico, la 12-LOX se ha visto asociada a diferentes patologías como enfermedades mieloproliferativas (Schumacher y Kos 1982) y en el tracto reproductor como en el cáncer de ovario (Guo, Liu y col. 2011).

1.8.4. SOP e inflamación

A pesar del amplio espectro del fenotipo SOP, la presencia de inflamación se propuso como una característica unificadora en mujeres SOP (Repaci, Gambineri y col. 2011). La inflamación también se asocia con aspectos claves del SOP como el hiperandrogenismo e insulino resistencia (Repaci, Gambineri y col. 2011, Gonzalez 2012). Además, los ovarios de mujeres SOP se caracterizan por un alto número de folículos en estadios tempranos, y se demostró un aumento en mujeres SOP de marcadores pro inflamatorios como la proteína CRP, leucocitos, citoquinas, y especies reactivas del oxígeno (ROS) (Duleba y Dokras 2012). En el mismo sentido, diversos estudios han mostrado cambios en la expresión de genes inflamatorios en el ovario. Citoquinas como interleuquina 8 (IL8), IL1 β y enzimas como la óxido nítrico sintasa (*nitric oxide synthase 2*, NOS2) y COX2

se expresan normalmente en las GCs, pero se cree que la expresión temprana de estos marcadores inflamatorios puede inducir un flujo prematuro de leucocitos dando como resultado una maduración folicular alterada y una interrupción de la ovulación (Schmidt, Weijdegard y col. 2014). Además, se sabe que la leucocitosis tiene mayor prevalencia en mujeres SOP respecto a mujeres con ciclos normales (Duleba y Dokras 2012).

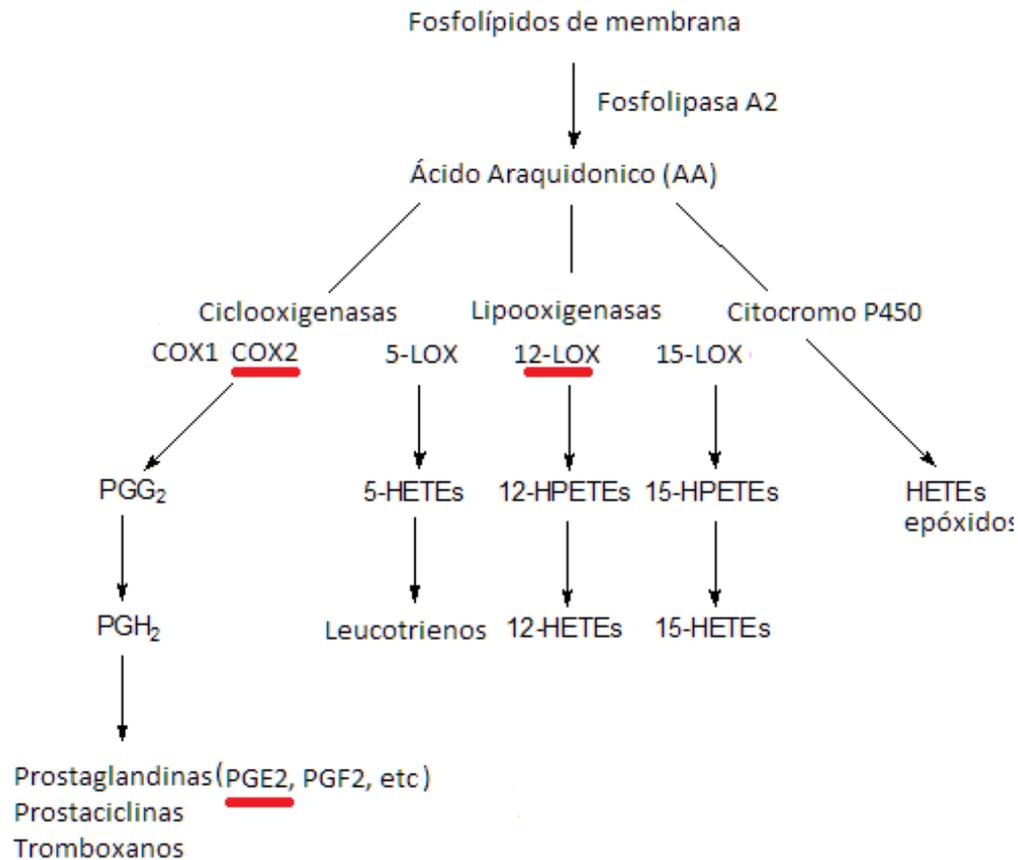


Figura 6: La figura simplificada muestra las rutas más importantes para la formación de eicosanoides. El primer paso en su biosíntesis es la producción de ácido araquidónico libre a partir de fosfolípidos de membranas, reacción catalizada por la enzima fosfolipasa A2. Hay 3 rutas enzimáticas principales para la formación de eicosanoides, incluyendo las ciclooxigenasas COX1 y COX2, las lipooxigenasas como la 5-, 12- y 15-LOX y las enzimas de la familia de la citocromo P450. La vía de las COX (COX1 y COX2) produce las prostaglandinas PGG2 y PGH2, las cuales a su vez son convertidas en prostaglandinas como la PGE2, PGF2, prostacilinas y tromboxanos. A su vez, hay diferentes lipooxigenasas que actúan sobre diferentes posiciones del ácido araquidónico, principalmente sobre el carbono 5-, 12- y 15-, para producir ácidos hidroxiperoxieicosatetraenoico (HPETEs) y a partir de estos ácidos hidroxieicosatetraenoico (HETEs) y otros productos. Por ejemplo, a partir de 5-HETE se producen leucotrienos. La vía de epoxigenasas del citocromo P450 produce HETEs y epóxidos. En rojo se señala COX2, 12-LOX y PGE2.

1.9. Hiperandrogenismo, estrés oxidativo y función ovárica.

El estrés oxidativo (EO) ocurre cuando se produce un desbalance entre pro-oxidantes y antioxidantes (Al-Gubory, Fowler y col. 2010). Este balance se puede alterar por incremento de los niveles de especies ROS o especies reactivas del nitrógeno (*reactive nitrogen species*, RNS), o por una disminución en el mecanismo de las defensas antioxidantes (Cindrova-Davies, Yung y col. 2007, Ruder, Hartman y col. 2009, Burton y Jauniaux 2011). Es importante mencionar que una cierta cantidad de ROS es necesaria para las funciones celulares normales (Agarwal, Gupta y col. 2005), a la vez que una producción excesiva de ROS puede sobrepasar el sistema natural de defensa antioxidante, creando así un ambiente no adecuado para un desarrollo normal de los eventos fisiológicos femeninos (Al-Gubory, Fowler y col. 2010). Este desbalance a largo plazo puede estar relacionado a diversas patologías reproductivas, entre las que se incluyen la endometriosis, el SOP, y la infertilidad sin causas conocidas (Gupta, Agarwal y col. 2006, Harlev, Gupta y col. 2015, Papalou, Victor y col. 2016, Zuo, Zhu y col. 2016).

1.9.1. Roles fisiológicos de las especies reactivas del oxígeno, antioxidantes y función ovárica

Con respecto a las funciones fisiológicas de ROS, podemos mencionar que el reinicio de la meiosis 1 en los oocitos seleccionados y más aún en el que será dominante (en primates) esta estimulado por niveles moderados de ROS, y se inhibe por antioxidantes. A su vez, la progresión hacia meiosis 2 es promovida por antioxidantes, sugiriendo que hay una relación compleja entre ROS, antioxidantes y la función ovárica (Behrman, Kodaman y col. 2001). A su vez, los ROS producidos por el folículo pre ovulatorio son considerados importantes inductores de la ovulación (Ruder, Hartman y col. 2009). La ausencia de oxígeno estimula la angiogénesis folicular, la cual es importante para el adecuado crecimiento y desarrollo del folículo ovárico. Además, la ROS folicular promueve la apoptosis, mientras que GSH y FSH contrarresta ese efecto en el folículo en crecimiento. El estrógeno se incrementa en respuesta al FSH, disparando la generación de catalasa en el folículo dominante y disminuyendo la apoptosis (Behrman, Kodaman y col. 2001). Además, se sabe que las gonadotropinas pueden regular directamente la actividad antioxidante en ovario de rata. Por ejemplo, Laloraya y col. (Laloraya, Pradeep y col. 1988) mostraron que un análogo de LH induce la actividad de la dismutasa en ovario. Además, Tilly y Tilly (Tilly y Tilly 1995) observaron que las gonadotropinas aumentan la expresión génica de la dismutasa mientras que suprimen la apoptosis de GCs y la atresia folicular. Por

su parte, otros autores (Tsai-Turton y Luderer 2006) reportaron que la FSH estimula la síntesis de GSH. Estos ejemplos remarcan la importancia fisiológica de bajos niveles de ROS y antioxidantes, a su vez que hacen evidentes las alteraciones producto del establecimiento del EO. Por otra parte, poca información hay disponible acerca del efecto de la inducción de la función ovárica temprana y su impacto sobre los niveles de ROS y antioxidantes.

1.9.2. Estrés oxidativo e hiperandrogenismo

Con respecto al EO y el SOP, podemos mencionar que el SOP está asociado con la disminución en la concentración de antioxidantes (Fenkci, Fenkci y col. 2003, Blair, Kyaw-Tun y col. 2013) y es por eso que algunos consideran al SOP asociado directamente a un estado pro oxidante y pro inflamatorio (Palacio, Iborra y col. 2006, Murri, Luque-Ramirez y col. 2013, Papalou, Victor y col. 2016). Varios autores mostraron que en mujeres con SOP los niveles del antioxidante glutatión (GSH) están disminuidos (Sabuncu, Vural y col. 2001, Dinger, Akcay y col. 2005), a la vez que el marcador de peroxidación lipídica malondialdehído (MDA) se encuentra aumentado en estas mujeres (Sabuncu, Vural y col. 2001, KuşÇU y Var 2009). La disminución del O_2 mitocondrial y los niveles de GSH junto al aumento de las ROS explican la disfunción mitocondrial en pacientes con SOP (Victor, Rocha y col. 2011). González *et al* sugirió que la mujeres con SOP son particularmente susceptibles en la inducción del ROS (Gonzalez, Nair y col. 2012). Las ROS disparan una reacción en cadena de marcadores inflamatorios, como el marcador TNFA y consecuentemente NFkB, el cual media la insulina resistencia. El estado OS resultante crea un ambiente pro inflamatorio que contribuye al hiperandrogenismo (Gonzalez, Rote y col. 2006). De esta forma se destaca la asociación de la inflamación con el OS, y el OS se ha mostrado que induce inflamación, con lo cual se sugiere un ciclo perpetuo. Además, la generación del EO se correlaciona con disfunción mitocondrial, deficiencia en la formación del huso mitótico y desarreglos en el ordenamiento cromosómico, las cuales incrementan el riesgo de aneuploidia del oocito junto a una alteración general de los folículos (Luzzo, Wang y col. 2012). Uno entonces puede hipotetizar que tanto la inflamación crónica como la generación de ROS contribuyen a la tasa incrementada de desordenes reproductivos en mujeres con SOP. Nuevamente, hay muy poca información sobre alteraciones en los niveles oxidantes/antioxidantes luego de una exposición temprana a andrógenos, y menos aún como impactaría esa alteración en el desarrollo folicular y parámetros ováricos.

1.10. Receptores Nucleares Activados por Proliferadores Peroxisomales (PPARs)

Las funciones reproductivas dependen de la disponibilidad de recursos energéticos. Además, los mecanismos fisiológicos que controlan el balance energético están recíprocamente vinculados a aquellos relacionados con el control de la reproducción, y juntos estos mecanismos deben garantizar el “éxito” en el proceso reproductivo bajo condiciones metabólicas cambiantes (Loucks 2003, Chan, Tsoulis y col. 2015). Actualmente sabemos que el cerebro y las estructuras hipotalámicas reciben señales metabólicas y endocrinas que proveen información sobre el *status* nutricional y el grado de de los depósitos grasos (Hill, Elmquist y col. 2008), y en el ovario las señales derivadas del *status* nutricional modulan la función ovárica (Butler 1998, Chan, Tsoulis y col. 2015). Por eso se postulan diversos candidatos para actuar como ese “link” entre el estado nutricional y el funcionamiento de las diversas estructuras del ovario (Scaramuzzi, Brown y col. 2010). Uno de esos candidatos a actuar como sensores energéticos son los PPARs. Los PPARs pertenecen a la superfamilia de receptores nucleares, muchos de los cuales actúan vinculando la disponibilidad de glucosa/lípidos a la adaptación metabólica a largo plazo. La estructura de los PPARs contienen los dominios clásicos de otros receptores nucleares (Komar 2005), como son los dominios de transactivación independiente de ligando (AF-1) y de unión al ADN (*DNA binding domain*, DBD) en el extremo N terminal y los dominios de unión a ligando y dimerización (*ligand binding domain-dimerization*, LBD-Dim) y de activación dependiente de ligando (AF-2) en el extremo C terminal (Komar 2005) (Fig. 7). Los PPARs se unen específicamente al ADN en la secuencia denominada de respuesta a PPARs (*PPAR response element*, PPRE), exactamente la secuencia AGGTCANAGGTA, y lo hacen como heterodímeros junto al receptor de ácido 9-cisretinoico, Receptor X retinoide (RXR) (Fig. 8). En contraste con otros receptores nucleares (como los receptores esteroideos), el complejo PPAR/RXR se puede activar por la unión de un ligando a cada receptor y la unión simultánea de ambos ligandos es más eficiente en la activación (Fig. 8).

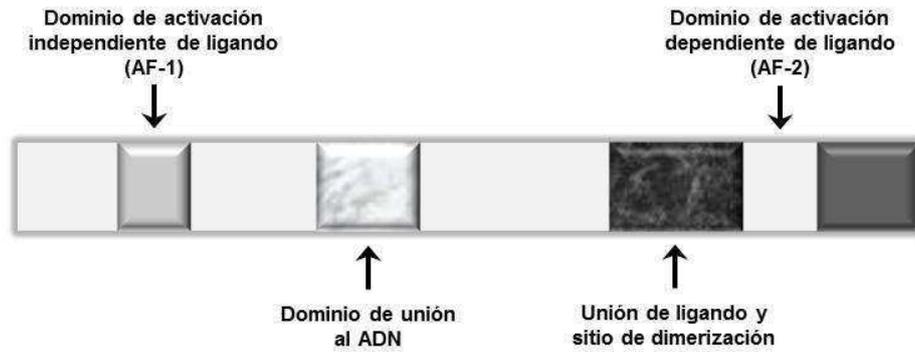


Figura 7: Estructura general esquemática de los PPARs. Adaptado de *Velez, Abruzzese y Motta "The biology of the peroxisome proliferator-activated receptor system in the female reproductive tract" Curr Pharm Des, 25 4641-6 2013*

La familia de los PPAR se compone de PPAR alfa (PPARA), beta/delta (PPARB/D) y gama (PPARG). El primero en descubrirse fue PPARA, durante la búsqueda de compuestos que incrementaran la proliferación de peroxisomas (organelas en eucariotas responsables de remover las sustancias tóxicas y la ruptura de ácidos grasos) en células de hígado de ratón (Issemann y Green 1990). Los 3 isotipos de PPAR se codifican en diferentes genes y de cada uno de ellos existen variantes producto de *splicing* alternativo y de uso de distintos promotores (Komar 2005). Además, se identificó la presencia de PPARs en diversas especies, incluyendo la rata y el humano (Huang 2008).

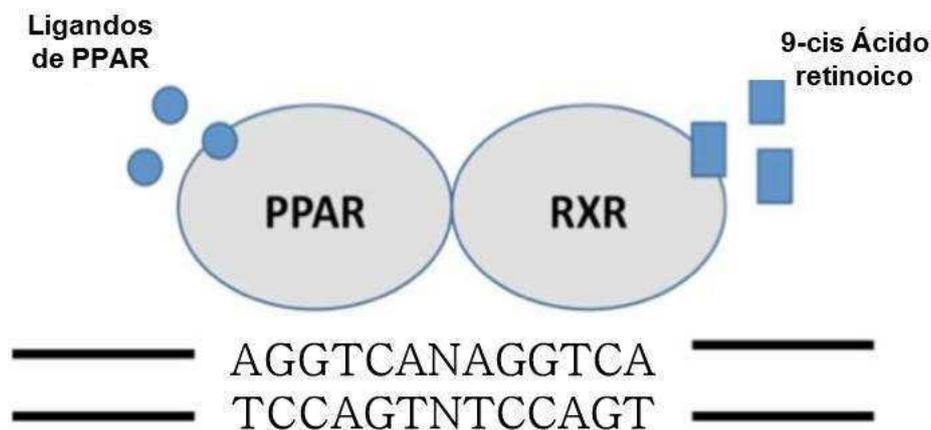


Figura 8. Esquema simplificado de unión de PPARs al ADN y su heterodimerización con el receptor RXR. RXR, receptor X retinoide. Se indica la secuencia de ADN target de PPARs, también llamada elementos PPARE. Adaptado de *Velez, Abruzzese y Motta "The biology of the peroxisome proliferator-activated receptor system in the female reproductive tract" Curr Pharm Des, 25 4641-6 2013*

1.11. Ligandos de PPARs

Un amplio número de compuestos incluyendo fosfolípidos, eicosanoides y ácidos grasos (AG) del tipo omega 3 y 6 actúan como ligandos de PPAR endógenos. Algunos de estos ligandos son específicos de cada subtipo de PPAR, mientras que otros activan en más de un subtipo (Komar 2005, Huang 2008). Entre los ligandos de PPARA se cuentan los AG no saturados, saturados, leucotrienos y ácido hidroxieicosatetraenoico (HETE); entre los de PPARB/D los AG saturados e insaturados y componentes de lipoproteínas de baja densidad; y entre los ligandos de PPARG se incluyen AG saturados e insaturados, AG oxidados y nitrados, 15-deoxi $\Delta^{12,14}$ prostaglandina J₂ (15d-PGJ₂), 15-HETE, entre otros (Komar 2005). En la Tabla 1 se listan los ligandos más importantes, su origen y especificidad. Diferencias en las estructuras de los dominios de unión de los diferentes PPARs explicarían la especificidad diferencial (Xu, Lambert y col. 2001). Además, estos ligandos actúan en diferentes tipos celulares o tejidos enriquecidos con PPARs e interactúan con diferentes correguladores de PPARs (Evans, Barish y col. 2004). El análisis de cada ligando de PPAR se dificulta dado la diversa distribución anatómica y las combinaciones en la que ocurren, dependiendo de la condición metabólica en la que se encuentre el organismo (ej., diabetes, cáncer o aterosclerosis). Por otro lado, además de los ligandos endógenos existen ligandos sintéticos como fibratos (usados para tratar la dislipidemia) y tiazolidinonas (TZDs, usadas para tratar la diabetes) y también activadores inesperados como herbicidas y plásticos industriales. Cabe mencionar que los compuestos sintéticos usados como ligandos de PPARs provocan efectos secundarios que son un problema a resolver, y ese hecho determina que haya programas que busquen compuestos sintéticos con capacidad de activar diferencialmente a los PPARs y de esa forma evitar efectos indeseados (Tabla 3).

Ligandos Endógenos	Especificidad
AGs insaturados	PPAR α , PPAR β , PPAR γ
AGs saturados	PPAR α , PPAR β
Leucotrieno B4	PPAR α
8-HETE	PPAR α
Componentes VLDLs	PPAR β
AGs oxidados y nitrados	PPAR γ
15d-PGJ2	PPAR γ
15-HETE	PPAR γ
9-HODE	PPAR γ
13-HODE	PPAR γ
Componentes OxLDLs	PPAR γ
Ligandos Sintéticos	Especificidad
NSAIDs	PPAR α , PPAR β , PPAR γ
Fibratos	PPAR α , PPAR γ
TZDs	PPAR γ
Herbicidas	PPAR γ
Plásticos Industriales	PPAR α , PPAR γ

Tabla 3: Ligandos endógenos y sintéticos de PPARs. AGs, ácidos grasos. HETE, ácido hidroxieicosatetraenoico. VLDLs, lipoproteína de muy baja densidad. 15d-PGJ2, prostaglandina J2 15d. HODE, ácido hidroxioctadecadienoico. OxLDLs, lipoproteínas de baja densidad oxidadas. Adaptado de *Velez, Abuzzi y Motta "The biology of the peroxisome proliferator-activated receptor system in the female reproductive tract" Curr Pharm Des, 25 4641-6 2013*

1.12. PPARG y su función en el ovario

Previamente mencionamos que existe un “link” entre el estado energético y el funcionamiento de los órganos reproductivos (Scaramuzzi, Brown y col. 2010). Indicamos que los PPARs son candidatos a actuar como esos “links”, y particularmente en el ovario la isoforma gama (PPARG) se encontró que censa el *status* nutricional en los folículos (Froment, Fabre y col. 2003). PPARG está involucrado en la regulación del mecanismo de la glucosa y el metabolismo lipídico, en parte mediante la regulación de la transducción de la insulina. Más específicamente, la activación de PPARG altera la expresión génica y aumenta la sensibilidad de los tejidos (como el músculo y adiposo) a la insulina y disminuye la intolerancia a la glucosa. Más aún, en células del ovario se demostró que la activación de PPARG exhibe efectos directos, tanto a través de la vía de la insulina como independientes de la insulina (Seto-Young, Paliou y col. 2005). PPARG actuaría en el desarrollo de los

folículos ováricos y su habilidad para procurar un desarrollo y maduración normal del oocito (Komar 2005). Más específicamente, PPARG se observa en el pasaje de PrF o SF a folículos preovulatorios, y su expresión se incrementa a medida que avanza el desarrollo folicular. Luego del pico de LH, el ARNm que codifica para PPARG disminuye (Komar 2005), sugiriendo una ciclicidad junto con las hormonas reguladoras del ciclo femenino. Relacionado a esto, se encontró que PPARG regula negativamente a marcadores inflamatorios como COX2, los cuales aumentan durante la ovulación. La activación de PPARG en GC modula la producción de hormonas sexuales y es por eso que se indica que está involucrado en la proliferación de las GC, la esteroidogénesis y la maduración del oocito (Schoppee, Garmey y col. 2002). El hecho que la delección del gen que codifica para PPARG provoca subfertilidad avala fuertemente esta hipótesis (Cui, Miyoshi y col. 2002). Acerca del mecanismo de acción de PPARG, podemos mencionar que la activación de PPARG por ligandos tanto endógenos como sintéticos modula su actividad transcripcional incrementado el reclutamiento de coactivadores, entre los que se cuenta el coactivador 1 alfa de PPARG (PGC1A) (Puigserver, Wu y col. 1998), a la vez que promueven el “despeje” de correpresores, como el corepresor nuclear (NcOR), el cual regula negativamente la actividad de PPARG (Yu, Markan y col. 2005). Luego de activarse, PPARG ejerce su acción sobre el metabolismo energético (Curti, Jacob y col. 2011) y también la respuesta inflamatoria (Celinski, Dworzanski y col. 2012, Rezvanfar, Ahmadi y col. 2012), mientras que en el ovario mencionamos que regularía la esteroidogénesis y la proliferación celular (Komar y Curry 2002, Froment, Gizard y col. 2006, Huang 2008). Por lo explicado anteriormente proponemos que alteraciones en el desarrollo folicular pueden estar relacionados a una disrupción de la expresión de PPARG en ovario. Vinculado a esto entonces surge la posibilidad de la modulación del sistema transcripcional PPARG y evaluar la reversión en la alteración folicular. La activación de PPARG con ligandos exógenos se ha utilizados para inducir la ovulación en mujeres con SOP (Azziz, Ehrmann y col. 2001, Ehrmann 2005, Fattah, Al Mohammady y col. 2014). Más aún, la evidencia indica que el mecanismo de acción de PPARG en la restauración de la función ovárica implica tanto acciones sistémicas a través de la sensibilización de la insulina como efectos directos moduladores directamente en el ovario (Froment, Gizard y col. 2006). Sin embargo, se desconoce el mecanismo exacto de regulación mediado por PPARG en las funciones reproductivas, así como su uso terapéutico en el tratamiento de la infertilidad y los posibles efectos colaterales.

Para finalizar, PPAR α no solo actúa sobre la función ovárica, sino que durante la preñez se ha observado que PPAR α es necesario durante la fase en la cual el embrión debe anclarse al endometrio, y además PPAR α se requiere para el correcto desarrollo y funcionalidad de la placenta (Barak, Nelson y col. 1999). La expresión de PPAR α también se detectó en el trofoectodermo de blastocitos (Mohan, Malayer y col. 2002), y la inactivación del mismo lleva a la reabsorción embrionaria (Barak, Nelson y col. 1999). Colectivamente, esta funcionalidad de PPAR α sobre la preñez, sumado a la información sobre la función ovárica, resalta la importancia de PPAR α como regulador de la funcionalidad reproductiva general, a la vez que la posibilidad de activar su expresión por ligandos exógenos resulta una importante herramienta a la hora de revertir un cuadro negativo en la función reproductiva.

1.13. Hiperandrogenismo, PPAR α y desordenes asociados

El proceso reproductivo es un evento de suma complejidad, y particularmente en la fisiología reproductiva femenina ocurren interacciones complejas entre factores hormonales, metabolitos energéticos, regulaciones epigenéticas, y factores intra y extra ováricos entre otros, y estas interacciones modulan y coordinan el desarrollo sucesivo de los gametos femeninos. Los sensores energéticos, como por ejemplo los metabolitos (ej.: glucosa, ácidos grasos y aminoácidos) y hormonas (ej.: T, FSH, LH, insulina) están involucrados en la regulación de la fertilidad a cada nivel del eje hipotálamo-hipófisis-gonadal (Froment, Gizard y col. 2006). Cuando alguno de esas interacciones falla la consecuencia puede ser la pérdida parcial o total de la fertilidad, un fenómeno muy recurrente en la salud femenina mundial (Inhorn y Patrizio 2015), destacándose entre esos fenómenos el SOP (Azziz, Carmina y col. 2009). Además, la presencia de hiperandrogenismo se considera un componente fundamental a la hora de diagnosticar el SOP (Rotterdam 2004, Magoffin 2007). En mujeres con SOP se pierde la “ciclicidad” en la función ovárica, lo que produce que en el ovario el número de folículos pequeños sea excesivo, y consecuentemente no se genere el folículo dominante (Dewailly, Robin y col. 2016). Aunque no se conoce exactamente el mecanismo por el cual no se genera el folículo dominante en mujeres SOP, una de las hipótesis más fuertes propone que las alteraciones mencionadas en la foliculogénesis ocurren presumiblemente por la presencia de hiperandrogenismo a nivel intra-ovariano (Jonard y Dewailly 2004), estimulando un desarrollo excesivo de folículos que inhibiría la selección del folículo dominante (Chang, Laufer y col. 1983, Catteau-Jonard y Dewailly 2013). En mujeres con esta patología, la

administración de glitazonas (tal como la pioglitazona y troglitazona) produce una mejoría en el hiperandrogenismo y en la regularización de la función ovárica y consiguiente ovulación (Iuorno y Nestler 1999, Seli y Duleba 2004, Koo, Shin y col. 2007, Fattah, Al Mohammady y col. 2014). El sistema PPAR γ , una vez activado, modula la transcripción de genes ligados al control de los niveles de glucosa y del metabolismo lipídico (Smith 2001, Curti, Jacob y col. 2011) y la respuesta inflamatoria (Celinski, Dworzanski y col. 2012, Rezvanfar, Ahmadi y col. 2012), mientras que durante la foliculogénesis ovárica el sistema PPAR γ modula la esteroidogénesis y la proliferación celular (Froment, Gizard y col. 2006, Huang 2008). Se ha demostrado que el bloqueo del sistema PPAR γ en ovario conlleva a subfertilidad femenina (Cui, Miyoshi y col. 2002). Además, la administración de glitazonas previene la inactivación de PPAR γ (Choi, Banks y col. 2010, Kono, Ahn y col. 2012). Dado el rol importante del sistema PPAR γ como modulador de las vías endocrinas, metabólicas y reproductivas, el estudio de PPAR γ representa una herramienta fundamental para entender procesos fisiológicos y patológicos.

Además de las alteraciones en la foliculogénesis, el hiperandrogenismo induce el establecimiento de un estado pro-inflamatorio mediado por el sistema prostaglandinas en ovario, en ratones (Elia, Sander y col. 2006) y ratas (Amalfi, Velez y col. 2012). Interesantemente, se ha reportado que la activación de PPAR γ regula negativamente la expresión de COX2 y otros marcadores inflamatorios (Subbaramaiah, Lin y col. 2001, Rezvanfar, Ahmadi y col. 2012)

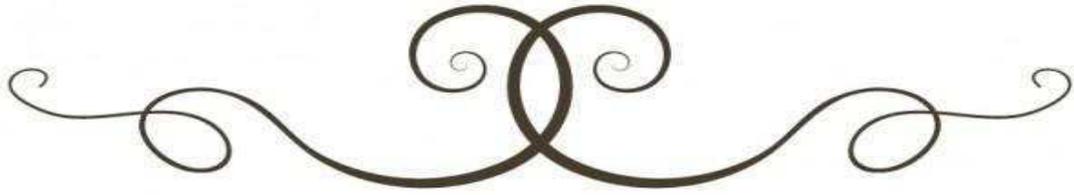
Con respecto a los mecanismos oxidantes y antioxidantes, el hiperandrogenismo también induce un desbalance a favor de la producción de especies reactivas del oxígeno, de esa forma alterando el balance oxidante-antioxidante (Luchetti, Solano y col. 2004, Diamanti-Kandarakis y Economou 2006, Elia, Sander y col. 2006), y ya hemos mencionado los efectos negativos de la generación de un ambiente EO en la funcionalidad ovárica. Además, resulta interesante evaluar el rol que tiene la activación de PPAR γ sobre el balance oxidante-antioxidante durante la foliculogénesis temprana, y en condiciones hiperandrogénicas.

1.14. Modelo animal de función ovárica temprana e hiperandrogenismo

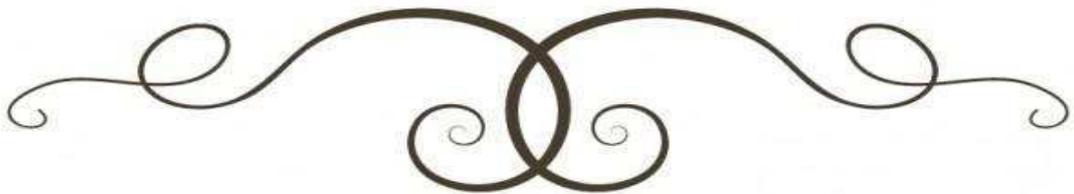
Los regímenes de inducción de la función ovárica en roedores utilizando inyecciones de gonadotrofinas fueron utilizados por primera vez en la década de 1940 (Runner 1947). Y utilizando secuencialmente eCG para promover la foliculogénesis y posteriormente hCG para promover la ovulación, se logró ya en la década de 1950 (Fowler y Edwards 1957) el

nacimiento del primer mamífero (ratón) vivo a través de la sincronización con gonadotrofinas. Hoy sabemos que la administración de eCG promueve la foliculogénesis y esteroidogénesis a tiempos tan tempranos como 8 hs (Irusta, Parborell y col. 2003), aunque no se conoce en detalle la dinámica y desarrollo de las diferentes poblaciones foliculares luego de una estimulación temprana de la función ovárica.

Por otro lado, los roedores son los animales más utilizados para estudiar desordenes hiperandrogénicos como el SOP (Shi y Vine 2012), siendo estos muy útiles debidos a su tamaño, corto tiempo de vida, alta tasa de reproducción y la existencia de diferentes cepas. Además, ya hace 30 años que se reportó por primera vez que concentraciones elevadas de andrógenos circulantes en roedores afectan la maduración folicular y promueven la formación de quistes (Parker y Mahesh 1976). Los andrógenos más utilizados para inducir una condición SOP en ratas incluyen a la DHEA, propionato de T (TP) y 5-alfa-dihidrotestosterona (DHT). Particularmente, DHEA es el primer andrógeno en aumentar, en el periodo peri puberal femenino (Apter, Butzow y col. 1994). Además, se demostró que más del 50% de la T sintetizada en los folículos ováricos puede derivar de la DHEA circulante (Haning, Hua y col. 1994), y un alto porcentaje de pacientes SOP tienen niveles supra normales de DHEA circulantes (Azziz, Carmina y col. 2009). Por último, en ratas la DHEA se utilizó por primera vez hace mas de 50 años para inducir SOP en ratas (Roy, Mahesh y col. 1962). Típicamente las ratas se inyectan diariamente con DHEA durante algunas semanas, y luego del tratamiento las ratas se vuelven acíclicas y anovulatorias (Knudsen, Costoff y col. 1975). De esta forma se sustenta el uso de DHEA en los modelos animales de hiperandrogenismo. Por último, se ha demostrado que ya una única exposición temprana a andrógenos promueve alteraciones en la foliculogénesis ovárica y la función ovárica (Vendola, Zhou y col. 1998). Debido a lo explicado anteriormente, nuestra intención es utilizar un modelo murino y vincular los efectos tempranos de la estimulación de la función ovárica con la administración de un exceso de andrógenos, y generar un ambiente hiperandrogénico y así poder estudiar la dinámica folicular temprana en presencia del exceso de andrógenos. Más adelante explicaremos en detalle el modelo de estimulación temprana de la función ovárica y exceso de andrógenos que utilizamos en este trabajo de tesis, en la sección de materiales y métodos.



Hipótesis y Objetivos



2. Hipótesis y Objetivos

A raíz de lo explicado anteriormente, en este trabajo de Tesis nos planteamos las siguientes hipótesis:

“El hiperandrogenismo impacta en la función ovárica temprana alterando la esteroidogénesis folicular, el estado inflamatorio del ovario y el estrés oxidativo sistémico. Además, el hiperandrogenismo modula negativamente al sistema transcripcional PPARG en el ovario. Todas esas alteraciones impactan negativamente en el desarrollo folicular incrementando la apoptosis.

La administración de PGZ activa al sistema PPARG revirtiendo las anomalías producidas por el exceso de andrógenos”

La demostración de esta hipótesis de trabajo es de suma importancia a la hora de evaluar el papel que juega la activación del sistema PPARG con PGZ en la funcionalidad ovárica temprana en condiciones hiperandrogénicas.

2.1. Objetivo General

Nos proponemos investigar las alteraciones provocadas por el exceso de andrógenos sobre la función ovárica y la foliculogénesis temprana, particularmente en lo que refiere a la modulación de la esteroidogénesis folicular, el estado inflamatorio, el balance oxidativo y la apoptosis folicular. También investigaremos cómo afecta el exceso de andrógenos a la expresión de PPARG y finalmente evaluaremos el rol que cumple la activación de PPARG sobre las alteraciones producto del exceso de andrógenos.

2.2. Objetivos específicos

* Estudiar el efecto del exceso de andrógenos sobre la morfología ovárica durante la foliculogénesis temprana.

* Estudiar la expresión génica y proteica en tejido ovárico de los receptores PPARG, del coactivador PGC1A y del correpresor NcOR durante la foliculogénesis temprana y en un ambiente con exceso de andrógenos.

*Analizar la expresión génica y proteica de las enzimas involucradas en la esteroidogénesis ovárica: StAR, 17BHS, CYP17A, 3BHS, aromatas y de las hormonas

esteroideas T y E2 durante la foliculogénesis temprana y en un ambiente con exceso de andrógenos.

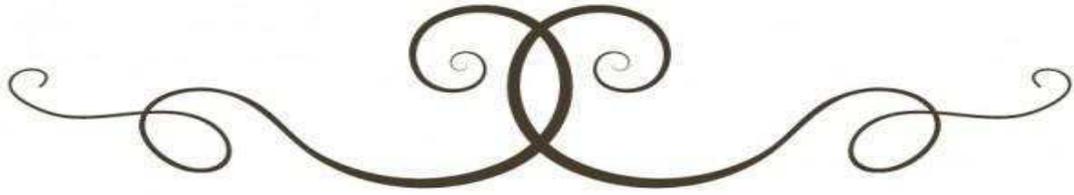
* Investigar la expresión de los mediadores inflamatorios TNFA, COX2, 12-LOX y los niveles de PGE2 durante la foliculogénesis temprana y en un ambiente con exceso de andrógenos.

* Estudiar el estado oxidativo sistémico durante la foliculogénesis temprana y en un ambiente con exceso de andrógenos, evaluado a través de los niveles de MDA como indicador de peroxidación lipídica y, como respuesta antioxidante los niveles del metabolito GSH.

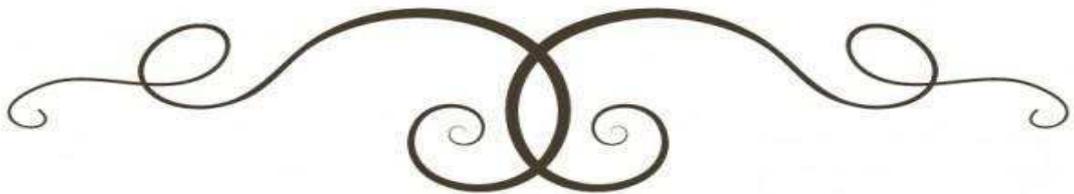
* Evaluar el mecanismo de apoptosis durante la foliculogénesis temprana mediado por la expresión de BAX y BCL2, y en un ambiente con exceso de andrógenos.

Y finalmente:

* Estudiar el efecto de la administración del ligando de PPARG, PGZ, sobre los parámetros mencionados anteriormente.



Materiales y Métodos



3. Materiales y Métodos

Tipo De Diseño De Investigación Y Métodos

3.1. Modelo experimental

En este trabajo de tesis se emplearon ratas hembras Sprague-Dawley (SD) prepúberes (22-25 días de edad), los cuales fueron mantenidas bajo condiciones controladas de temperatura (23 ± 2 °C) y luz (14 h luz: 10 h oscuridad, luces encendidas a las 7:00 am) y tuvieron acceso *ad-libitum* a comida y agua. Todos los procedimientos que involucraron animales fueron llevados a cargo de acuerdo con la “Guía para el cuidado y uso de animales de laboratorio” (Conicet, 1996).

Para el estudio de la foliculogénesis temprana utilizamos un modelo de inducción de la foliculogénesis aguda en ratas SD prepúberes con administración de gonadotropina coriónica equina (eCG). Por otra parte, indujimos la foliculogénesis en una condición hiperandrogénica por administración de DHEA conjuntamente con eCG. Finalmente, evaluamos la activación de PPAR γ por administración de PGZ (PGZ). A continuación detallamos la conformación de los grupos:

Grupo eCG:

En hembras prepúberes inyectamos 25 UI intraperitoneal (ip) de gonadotropina coriónica equina (eCG) (Novormon) por rata para inducir foliculogénesis (Irusta, Parborell y col. 2003).

Grupo control (de foliculogénesis):

El grupo control de foliculogénesis está representado por animales que solo recibieron solución fisiológica (vehículo) ip.

Grupo eCG+HA:

Este grupo de animales fue inyectado con 25 UI ip de eCG/rata e hiperandrogenizado con una inyección subcutánea (sc) de 3 mg de DHEA disuelto en 100 μ l de aceite de maíz por rata. La dosis de DHEA inyectada para inducir el hiperandrogenismo fue aquella utilizada previamente en nuestro laboratorio y por otros grupos (Lee, Anderson y col. 1991, Henmi, Endo y col. 2001, Faut, Elia y col. 2011).

Grupo eCG+HA+PGZ:

Los animales fueron inyectados con 25 UI ip de eCG/rata, más con 3 mg de DHEA disuelto en 100 ul de aceite de maíz/rata sc y administrado vía oral con una solución acuosa de PGZ (Diaben P, Pioglitazona, pastillas de 30 mg, *ELEA*), a una concentración final de (3 mg/kg peso rata). Esta dosis de PGZ se encuentra dentro de un rango utilizado en otros estudios en ratas (Srinivasan, Patole y col. 2004, Toblli, Ferrini y col. 2009).

Grupo eCG+PGZ:

Finalmente, para analizar posibles efectos *per se* de la PGZ, un grupo de animales recibió 25 UI ip de eCG/rata y fue administrado vía oral con PGZ (Diaben P, Pioglitazona, pastillas de 30 mg, *ELEA*) (3 mg/kg peso rata).

Utilizamos un total de 20 animales por grupo experimental. Los experimentos se realizaron por duplicado.

En este modelo de foliculogénesis temprana, se evaluó previamente en el laboratorio el tiempo de máxima actividad folicular tomando como parámetro los niveles de P4 sérica post inducción con eCG, y obtuvimos la máxima secreción de P4 a las 8 hs post inducción con eCG (Faut, Elia y col. 2011). Entonces, 8 hs luego de los tratamientos los animales se anestesiaron en una cámara saturada de dióxido de carbono (CO₂) y fueron sacrificados por decapitación. Se colectó la sangre y se separó el suero por centrifugación a 1000 g durante 15 minutos, también se separaron los ovarios, y luego se almacenaron todas las muestras a -80 °C hasta su utilización, excepto las muestras de tejido ovárico destinadas al estudio histológico e Inmunohistoquímico, las cuales fueron inmediatamente colocadas luego de la disección en una solución de paraformaldehido al 4% V/V.

3.2. Estudios histológicos e inmunohistoquímicos

Para los análisis histológicos, 10 ovarios de cada grupo experimental y diferentes animales fueron fijados en paraformaldehido al 4% (w/v) y deshidratados previamente a la inclusión en parafina. En forma resumida, los tejidos se sumergieron en etanol al 70% (EtOH) 3 veces x 10 minutos cada vez a temperatura ambiente (RT), luego en EtOH 90% 2 veces x 20 minutos cada vez a RT, y en EtOH 100% 3 veces x 30 minutos cada una a RT. Luego, se sumergieron en xileno 3 veces x 20 minutos cada uno a RT, y posteriormente embebidos en parafina a 58 °C.

A continuación, las muestras en parafina fueron cortadas consecutivamente (5 μm de espesor) y colocadas en portavidrios gelatinizados (Biobond, British Biocell International, Cardiff, UK) y secado al aire por 2 horas. En total se obtuvieron 200 secciones por ovario, destinándose 190 secciones para los análisis morfológicos y 10 secciones para los análisis inmunohistoquímicos.

Para los análisis morfológicos, los cortes consecutivos (aproximadamente 10 cortes por portavidrios, 19 portavidrios promedio) de cada ovario fueron rehidratados y lavados en buffer fosfato (PBS; 137 mmol/l NaCl, 2,7 mmol/l KCl, 4,3 mmol/l Na₂HPO₄·7H₂O, 1,4 mmol/l KH₂PO₄, pH 7.3) y posteriormente teñidos con hematoxilina/eosina (DAKO Corporation, Carpintería, CA, USA). Por medio de la tinción de hematoxilina-eosina clasificamos los distintos tipos foliculares así como la atresia folicular.

Para los análisis inmunohistoquímicos, las proteínas PPARG y StAR (Santa Cruz Biotechnologies, Inc., USA) fueron inmunolocalizadas en el tejido ovárico. Brevemente, los cortes fueron desparafinados y rehidratados. Los portavidrios se sumergieron en buffer citrato de sodio (citrato de sodio 10 mM pH 6.0) a 95°C durante 45 minutos para la recuperación antigénica. Luego se anuló la actividad de peroxidasa endógena en una solución 3% de peróxido de hidrogeno durante 30 minutos, y luego los cortes se bloquearon con buffer albúmina (BSA al 1%) en PBS durante 30 minutos. Se aplicó una gota de la solución del anticuerpo para PPARG o StAR (diluciones 1:100 en buffer PBS) e incubo overnight (ON) toda la noche a 4 °C. Luego, se retiró el anticuerpo, se realizaron lavados en PBS e incubaron con el anticuerpo secundario proteína recombinante del rábano (*horseradish recombinant secondary antibody*, HRP, dilución 1/200) (Santa Cruz Biotechnologies) durante 1 hora, lavado con PBS 0.05% Tween 20, y el inmunocomplejo se detectó luego de incubar los cortes con una solución de diaminobenzidina (DAB) (Vector). Se utilizó suero normal de conejo en lugar de los anticuerpos primarios como controles negativos de la inmunohistoquímica.

Los análisis morfológicos e inmunohistoquímicos se analizaron por 2 personas independientemente.

3.3. Caracterización de la morfología ovárica

Para caracterizar la morfología ovárica, se clasificarán los folículos en: folículos primordiales (*primordial follicles*, PF), folículos primarios (*primary follicles*, PrF), folículos secundarios (*secondary follicles*, SF) y folículos antrales (*antral follicles*, AF) siguiendo el siguiente criterio:

PF: Compuesto por pocas células de pre-granulosa pavimentosas, poco organizadas. Estos folículos están dispersos por toda la corteza ovárica, y pueden estar en gran proporción próximos al epitelio ovariano. Además, el núcleo del oocito es grande comparado al citoplasma.

PrF: Ya hay presencia de una camada de células de granulosa cuboides, con la zona pelúcida rodeando al oocito. Estos folículos suelen aparecer próximos a PFs. Observación: los PrF pueden presentar distintos tamaños, ya que el oocito comienza a crecer antes de que se produzca la multiplicación de las células de granulosa.

SF: Este folículo posee más de una camada de células de la granulosa. En este estadio ya hay formación de la camada de teca interna y membrana basal que delimita el espacio entre las células de la granulosa y la teca en proliferación.

AF: Se observan claramente las capas de células de granulosa y teca, y la membrana basal que las separa. El oocito está rodeado de células de granulosa y se observa la cavidad denominada antro (o antrum).

Para determinar la presencia de AFs atrésicos, utilizaremos el siguiente criterio:

- Presencia de 5% o más de cuerpos pignóticos (criterio predominante).
- Ausencia total o parcial de membrana basal.
- Ausencia o fragmentación del oocito.
- Presencia de meiosis reiniciada con presencia de corpúsculo polar.
- Presencia de vacuolas en oocito.
- Ausencia de contacto entre células de la granulosa y oocito.
- Contacto de líquido folicular con el oocito.
- Células de la granulosa desorganizadas (desprendidas).

- Hipertrofia de las células de la teca en contacto directo con las células de la granulosa. La hipertrofia está presente cuando las capas de la teca (principalmente la interna) proliferan y se tornan arredondeadas.

3.4. Determinaciones de los niveles de ARN mensajero

Los niveles de ARN mensajero (ARNm) se cuantificaron por PCR en tiempo real (*Real time* PCR). Se extrajo el ARNm total de tejido ovárico con RNazol RT (MRC gene, Molecular Research Center, Cincinnati, OH, USA), de acuerdo a las especificaciones del fabricante. A partir de 500 ng del ARNm extraído se sintetizó el ADNc utilizando como cebadores Random Primers. A partir de una dilución 1:10 del ADNc sintetizado se realizaron los análisis por *Real time* PCR utilizando la Mezcla Real B124-100 (Biodynamics SRL, USA) y los primers adecuados para cada gen analizado. Los productos amplificados se cuantificaron por fluorescencia en un Rotor Gene 6000 Corbette. Los resultados se expresaron en unidades arbitrarias y el gen ribosomal L32 (RPL32) fue utilizado como gen de referencia. A continuación se muestra la tabla con los primers utilizados en este trabajo de tesis.

Gene	Primer Forward (5' – 3')	Primer Reverse (5' – 3')
PPARG	TTT TCA AGG GTG CCA GTT TC	GAG GCC AGCATG GTG TAG AT
NCOR	TAT CGG AGC CAT CTT CCC AC	ACT TGG GTA TCCTGG GGT TG
PGC-1	AAT GCA GCG GTCTTA GCA CT	GTG TGA GGA GGG TCA TCG TT
STAR	GCA GGG GGA TTT CTG AAT TT	GTC TCC GTCTCT GTG GCT TC
CYP17a	TCT CAT TAC ACC CAC GCA GA	CGG GGC AGT TGT TTA TCA TC
3βHSD	GAC ACC CCT CAC CAA AGC TA	TTG TAA AAT GGA CGC AGC AG
17βHSD	TCT CAT TAC ACC CAC GCA GA	CGG GGC AGT TGT TTA TCA TC
CYP19	CCT GGCAAG CACTCC TTA TC	CCA CGT CTC TCA GCG AAA AT
TNFα	TCC CAG AAA AGC AAG CAA CC	TAG ACA GAA GAG CGT GGT GG
COX-2	ATG AGT ACC GCA AAC GCT TC	CCC CAA AGA TAG CAT CTG GA
BCL2	GGG ATG CCT TTG TGG AACTA	CTCACT TGT GGCCCA GGT AT
BAX	GAC AGG GGC CTT TTT GCT AC	GTCCAG TTC ATC GCC AAT TC
RPL32	TGG TCC ACA ATG TCA AGG	CAA AAC AGG CAC ACA AGC

Tabla 4: Lista de primers usados en la cuantificación del ARNm por *Real time* PCR

3.5. Determinación de los niveles proteicos

Se realizó el análisis por *Western Blot* del tejido ovárico para cuantificar los niveles proteicos. Se homogeneizó el tejido en buffer lisis (20 mM Tris-HCl, pH = 8,0, 137 mM NaCl, 1% Nonidet P-40 y 10% glicerol) suplementado con inhibidores de proteasas (0,5 mM PMSF, 0,025 mM N-CBZ-L-fenilalanina clorometil cetona, 0,025 mM N-p-tosil-lisina clorometil cetona y 0,025 mM L-1-tosilamida-2-fenil-etilclorometil cetona, todos los reactivos Sigma Co, USA) durante 20 min a 4 °C. El lisado luego fue centrifugado a 4 °C durante 10 min a 10.000 g y el pellet descartado. Se utilizó el sobrenadante, a partir del cual también se determinó la concentración de proteínas por el método de *Bradford* (Bradford 1976). Luego de calculadas las concentraciones proteicas totales, se calentaron las muestras en baño maría durante 5 min y se sembró 60 ug de proteína por cada muestra en un gel de poliacrilamida al 10% con SDS (condiciones desnaturalizantes). La electroforesis se llevó a cabo con un voltaje de 90 voltios durante 1,5 h. Se sembraron marcadores de peso molecular para identificar los pesos aproximados de las proteínas. Luego procedimos a transferir las proteínas del gel a membranas de nitrocelulosa, utilizando el buffer de transferencia (20% metanol, vol/vol; 0,19 M glicina; 0,025 M Tris-Base, pH = 8,3) durante 1 hora a 110 voltios. Luego se procede al bloqueo de los sitios no específicos de las membranas de nitrocelulosa mediante la incubación durante 1 h en buffer TBS (4 mM Tris-HCl, pH = 7.5, 100 mM NaCl) conteniendo leche libre de grasa (0,2%) a T ambiente. Se retira esa solución y se incuba con los anticuerpos primarios (PPARG, StAR, COX2, BCL2 y BAX, Santa Cruz Biotechnologies, Inc., USA) (1:200 ON). Se retira el anticuerpo primario, se realizan lavados en TBS Tween 1%, y las bandas se determinan por incubación con anticuerpo secundario HRP (dilución 1:1000) (Santa Cruz Biotechnologies) durante 1 h seguido por incubación con el sustrato para *Western Blotting ECL* (Thermo Scientific Pierce). La carga de proteína se evaluó tiñendo las membranas luego de la transferencia con solución de rojo Ponceau S. Para normalizar luego las mediciones e independizarse de la variación en la concentración de proteína por muestra utilizamos el anticuerpo Beta Actina (Sigma Co, USA) (dilución 1/1500). Las intensidades en las bandas (área x densidad) se analizaron y cuantificaron utilizando el software Image J (Schneider, Rasband y col. 2012). Se utilizaron 10 ratas por grupo experimental y los resultados se expresaron en unidades arbitrarias (UA).

3.6. Cuantificación del estrés oxidativo

Para cuantificar el EO se evaluaron los niveles de peroxidación lipídica en suero, cuantificando el MDA formado por la ruptura de los ácidos grasos poli insaturados de las membranas celulares (Motta, Estevez y col. 2001) y los niveles del antioxidante GSH sérico (Elia, Sander y col. 2006). El metabolito GSH es un importante componente detoxificante que actúa en la eliminación de radicales libres y detoxificación celular. Se utilizaron muestras de 10 ratas por grupo experimental.

Peroxidación lipídica: El fundamento de esta técnica es la cuantificación del estado oxidativo de las células por medición de las reacciones que involucran radicales libres formados los cuales actúan sobre los ácidos grasos de las membranas. Estas reacciones producen entre sus subproductos MDA. La técnica se basa en la capacidad del MDA en reaccionar con ácido tiobarbitúrico cuya reacción forma un reactivo de color que puede cuantificarse a 535 nm en espectrofotómetro (Buege y Aust 1978). Brevemente: 250 ul de suero se adicionaron 250 ul de TBA 0,5%, luego por centrifugación se separaron 350 ul de sobrenadante y fueron incubados con 650 ul de TBA 0,67 % (TCA 5% p/v, TBA 0,375 % p/v, HCl 0,25 N) por 20 minutos a 95°C en baño. La absorbancia la determinamos a 535 nm dentro de los siguientes 5 minutos y se comparó con una curva patrón de MDA. Los resultados se expresaron como nmolar MDA. Las técnicas correspondientes a la cuantificación del EO y de los agentes antioxidantes se determinan y son de rutina en nuestro laboratorio.

Glutación: El método utilizado es el de (Tietze 1969) y se basa en una reacción de óxido/reducción, mediante la cual, el ácido 5,5-ditiobis-2 nitro benzoico (DTNB) se reduce y el GSH reducido se oxida. Al reducirse, el DTNB forma compuestos coloreados, que es posible de cuantificar a 412 nm. Para medir el GSH total, se agrega glutación reductasa (GR) al medio, enzima que cataliza el pasaje de glutación oxidado (GSSG) a su forma reducida. Brevemente, se incubaron 100 ul de suero con 50 ul de NADPH, 20 ul del reactivo de Ellman (DTNB) y, en último lugar, 20 ul de GR. Se registró la absorbancia cada minuto durante los primeros 6 minutos a fin de determinar la pendiente de la reacción. Con el objeto de cuantificar el contenido de glutación, se comparó la pendiente de la reacción con una concentración de GSH conocida. Los resultados se expresaron como umolar GSH. Esta técnica también es llevada a cabo de rutina en nuestro laboratorio.

3.7. Cuantificación por Radioinmunoensayo: Estradiol, Testosterona y Prostaglandina E

Radioinmunoensayo de E2 y T en suero:

Los niveles de E2 y T fueron determinados por Radioinmunoensayo (RIA) específico, según se describió previamente en el laboratorio (Amalfi, Velez y col. 2012). Brevemente, muestras séricas de 10 ratas por tratamiento se extrajeron con el mismo volumen de dietil éter por 3 veces. Los extractos fueron colectados y evaporados en una bomba de vacío y almacenados a -80 °C hasta la realización del RIA. Luego, los reactivos y las muestras se reconstituyen en el Buffer de RIA (Tris HCl 0,05 M, NaCl 0,1 M, Gelatina 0,1 %, Azida Sódica 0,1%, pH 8). Tanto las muestras patrones como las muestras a ensayar (100 ul) se incubaron a 4 °C ON con 200 ul del anticuerpo anti-E2 o T y 100 ul del metabolito marcado con tritio-[2,4,6,7,16,17-³H] E2 o T, 250µCi, Amersham Corporation, Arlington Heights USA). Se utilizó para separar las uniones específicas una suspensión de carbón activado-dextrán (Carbón 1%, Dextrán 0,1 % en Buffer RIA) y centrifugación a 2000g por 15 minutos a 4°C en centrífuga refrigerada (Sorvall RC-5B). El sobrenadante de centrifugación fue recogido en viales conteniendo líquido de centelleo, y la radioactividad se cuantificó en un contador de centelleo líquido beta.

La sensibilidad del anticuerpo para E2 fue de entre 5–10 pg/tubo, y entre 2–5 ml de suero. Las variaciones intra e inter ensayo fueron de 5,0 and 10,0%, respectivamente. Los resultados se expresaron en ng E2/ml suero.

El rango de utilidad del ensayo de la T fue de 25–1600 pg. Las variaciones intra e inter ensayo fueron de 7,5 y 15,1 respectivamente, y la reacción cruzada entre T y DHEA es < 0,01 pg. Los resultados se expresaron como pg T/ml suero.

Radioinmunoensayo de prostaglandina E:

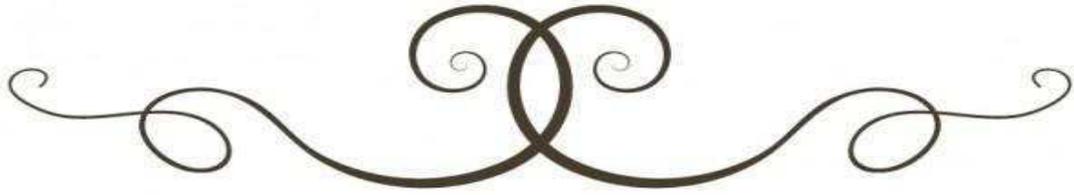
Se determinó el contenido de prostaglandina E (PGE) en el tejido ovárico por medio del ensayo RIA como fue previamente realizado en nuestro laboratorio (Motta, Estevez y col. 1999). En el tejido ovárico también se determinó la concentración de proteínas por el método de Bradford (Bradford 1976).

Para extraer la PGE2 del tejido ovárico se homogenizaron los tejidos con metanol (1:5, peso en volumen) y evaporados en una bomba de vacío, y almacenados a -80 °C hasta la realización del RIA. Se utilizó un anticuerpo específico par PGE2 (Sigma Chemical Co,

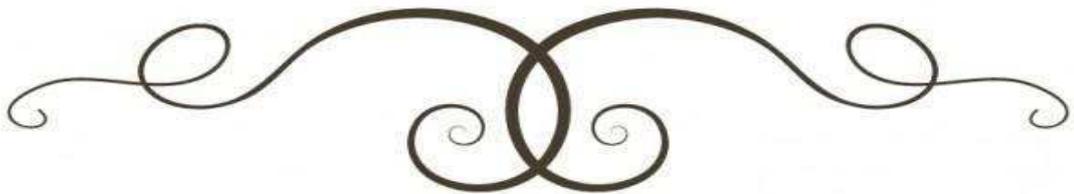
St. Louis, MO, USA) con una sensibilidad de 10 pg /tubo y una reactividad cruzada < 0.1 % con las otras PGs. Los trazadores para PGE2 eran compuestos tritiados. El método de separación de las uniones no específicas fue el de carbón-dextran (1% - 0.1% peso volumen). La radioactividad se determinó con mediante contador de centelleo líquido beta. Los resultados se expresaron como pg PGE2/ug proteína.

3.8. Análisis Estadístico

Se utilizó el programa GraphPad Prism para los test correspondientes (GraphPad software, San Diego, CA, USA). Se realizaron ANOVAs seguidos del test de Tukey para comparar todas las columnas entre sí. Se consideraron significativos los valores de $p < 0.05$.



Resultados



4. Resultados, Primera Parte: Efecto del exceso de andrógenos sobre la funcionalidad ovárica.

4.1. Efecto del exceso de andrógenos sobre la morfología del ovario.

4.1.1. Observación cualitativa de los ovarios

El análisis histológico de los ovarios, utilizando coloración con hematoxilina-eosina, mostró en el grupo control una apariencia normal para un ovario de rata prepuberal y no estimulada, en el que se observan mayormente PFs cercanos a la corteza del ovario (Fig. 1A, aumento: 400x). Cuando inducimos la foliculogénesis (grupo eCG) se observan PrF y folículos más desarrollados, como AFs en distintos estadios de desarrollo (Fig. 1B, aumento: 100x). En el grupo eCG también se observó una buena diferenciación de la membrana basal en los AFs, con la granulosa y la teca bien diferenciada (Fig. 1C, flechas negras). Cuando se estimuló la foliculogénesis con exceso de andrógenos (grupo eCG+HA) pudimos reconocer en los ovarios algunos AFs con morfología anormal (FA*) (Fig. 1C, aumento: 100x). Además, en ciertos folículos de estos animales androgenizados (grupo eCG+HA) no se observó una buena diferenciación de la membrana basal, de esta forma las células de la teca invaden la capa de células de granulosa (Fig. 1 E, flecha negra).

Estos resultados indican que una única administración de eCG estimuló el desarrollo folicular, y que el exceso de andrógenos alteró ese desarrollo promoviendo la formación de folículos anormales.

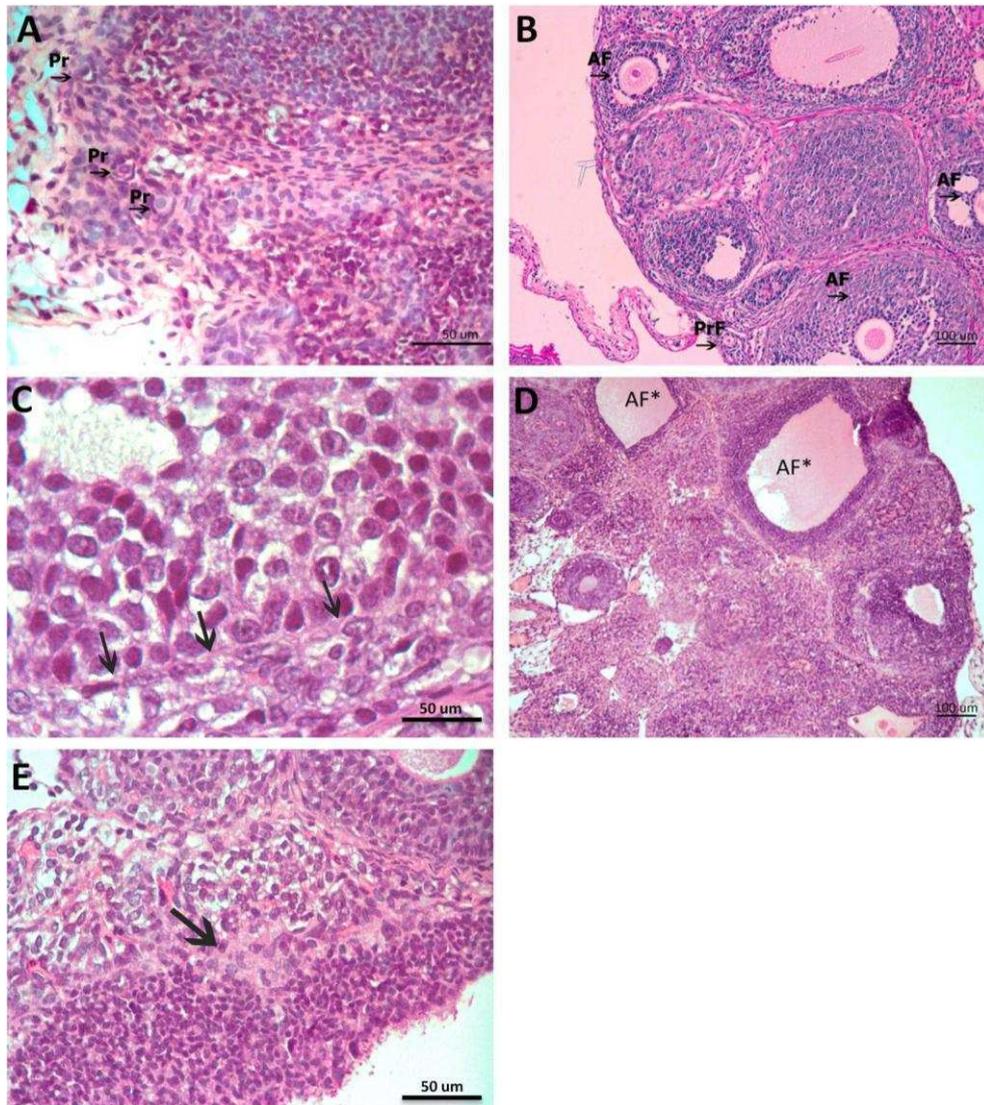


Figura 1: Análisis histológico de ovarios: (A) Sección de ovario correspondiente a animales del grupo control, (A: 400X). Se indica la presencia de PF. (B y C) Sección de ovario correspondiente a animales del grupo eCG, mostrando diferentes folículos (B, A: 100X) y el detalle de la membrana basal (flechas negras) separando teca de granulosa (C, A: 400X). (D y E) Sección de ovario de animales del grupo eCG+HA, mostrando folículos antrales con morfología anormal (D, A: 100X) y el detalle de la membrana basal (flecha negra) (E, A: 400X). PF: folículos primordiales, PrF: folículos primarios, AF: folículos antrales, AF*: folículos antrales con morfología anormal.

4.1.2. Composición folicular:

Posteriormente se analizó la composición folicular. Encontramos que la inducción de foliculogénesis aumentó significativamente el número total de folículos (grupo eCG vs Control), y además encontramos que el exceso de andrógenos no alteró ese número (eCG+HA vs eCG) (Fig. 2A). Posteriormente se clasificaron y cuantificaron los folículos ováricos en PFs, PrF, SF, y AFs (Fig. 2B). Se encontró un porcentaje más alto de PF en el

grupo eCG vs control, luego en el grupo eCG+HA el número de PF aumentó respecto a eCG (Fig. 2B). El número de PrF fue menor en el grupo eCG+HA comparado a eCG (Fig. 2B). Los demás tipos foliculares (SF y AF) no presentaron diferencias entre los diferentes grupos (Fig. 2B).

También analizamos el porcentaje de folículos atrésicos, y encontramos que ese porcentaje disminuyó en el grupo eCG vs control (Fig. 2C), mientras que en el grupo androgenizado (eCG+HA) el porcentaje de folículos atrésicos no se diferenció del grupo eCG (Fig. 2C).

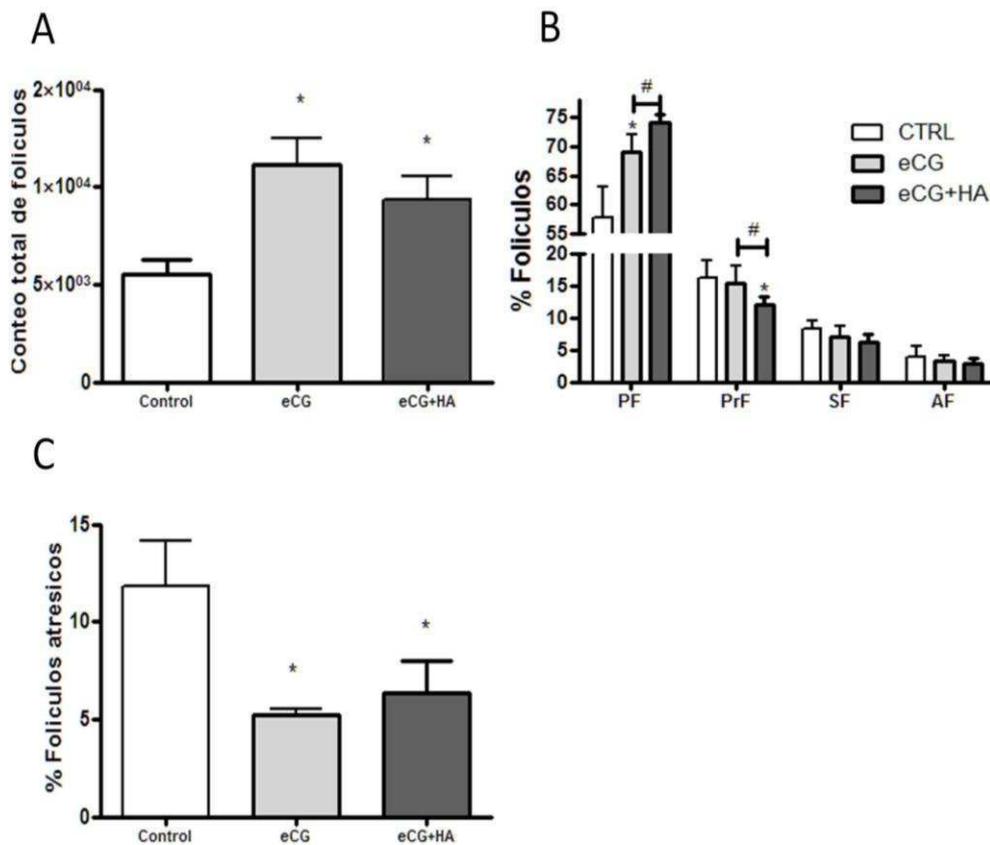


Figura 2. Composición folicular: (A) Número total de folículos visualizados en ovarios de animales control, eCG y eCG+HA. (B) Porcentaje de los diferentes folículos ováricos. Las diferencias estadísticas se evaluaron entre los diferentes tratamientos dentro de los tipos foliculares (PF, PrF, SF y AF). (C) Porcentaje de folículos atrésicos. PF: folículos primordiales, PrF: folículos primarios, SF: folículos secundarios, AF: folículos antrales. Cada columna representa la media \pm S.E.M. de 4 mediciones de diferentes animales. * $p < 0.05$ vs. Control. # $p < 0.05$ vs eCG+HA.

4.2. Efecto del exceso de andrógenos sobre el sistema PPARG

4.2.1. Inmunolocalización de PPARG

Se analizó la inmunolocalización de PPARG en el ovario. En la figura siguiente se puede apreciar que la tinción para PPARG se evidenció especialmente en las células de la granulosa de los folículos en desarrollo, en animales del grupo control (Fig. 3A), eCG (Fig. 3B) y eCG+HA (fig. 3C). No encontramos diferencias notables de marcación entre tratamientos.

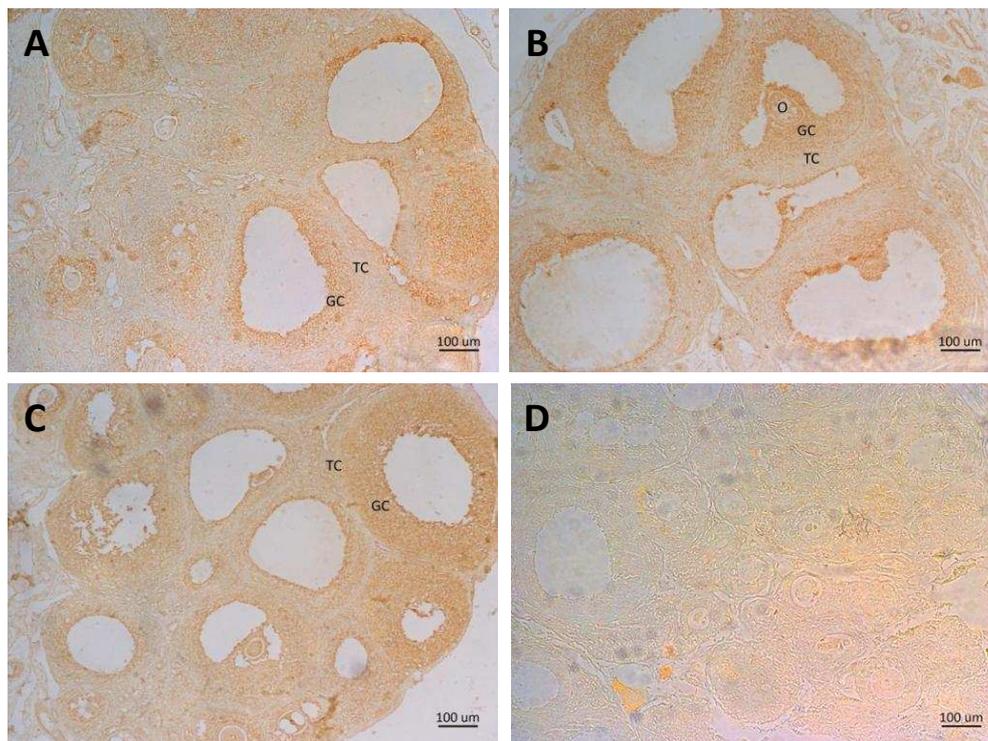


Figura 3. Inmunolocalización de PPARG. Cortes ováricos de animales de grupos control (A), eCG (B) y eCG+HA (C). Observar la coloración preferencialmente en la zona de la granulosa. El corte mostrado en D (control negativo) corresponde a una sección tratada con suero normal en lugar del anticuerpo específico para PPARG. Los tejidos se procesaron según se describe en materiales y métodos, y PPARG se identifica por la coloración amarroada del DAB. GC: células de la granulosa, TC: células de la teca, O: oocito. A: 100×.

4.2.2. Regulación del sistema PPARG: Expresión de PPARG, PGC-1, NcOR

Analizamos los niveles proteicos y de ARNm en ovario del sistema PPARG por medio de las técnicas *Western blot* y *Real time PCR*. Encontramos que cuando indujimos la foliculogénesis con eCG los niveles de ARNm y proteicos de PPARG aumentaron

respecto al control (Fig. 4A y B), mientras que los niveles de ARNm del coactivador PGC1A también aumentaron (Fig. 4C) y los del correpresor NcOR disminuyeron, respecto al control (Fig. 4D).

Cuando estimulamos la foliculogénesis en presencia de exceso de andrógenos (grupo eCG+HA), encontramos que los niveles de ARNm y proteínas de PPARG disminuyeron respecto al grupo eCG (Fig. 4A y 4B), así como también los niveles de ARNm de PGC1A (Fig. 4C) y por el contrario los niveles de ARNm de NcOR aumentaron, respecto al grupo eCG (Fig. 4D).

La inducción de la función ovárica temprana reguló positivamente al sistema PPARG, evidenciado por los niveles de expresión de PPARG, PGC1A y NcOR. El exceso de andrógenos evitó esa regulación positiva sobre el sistema PPARG.

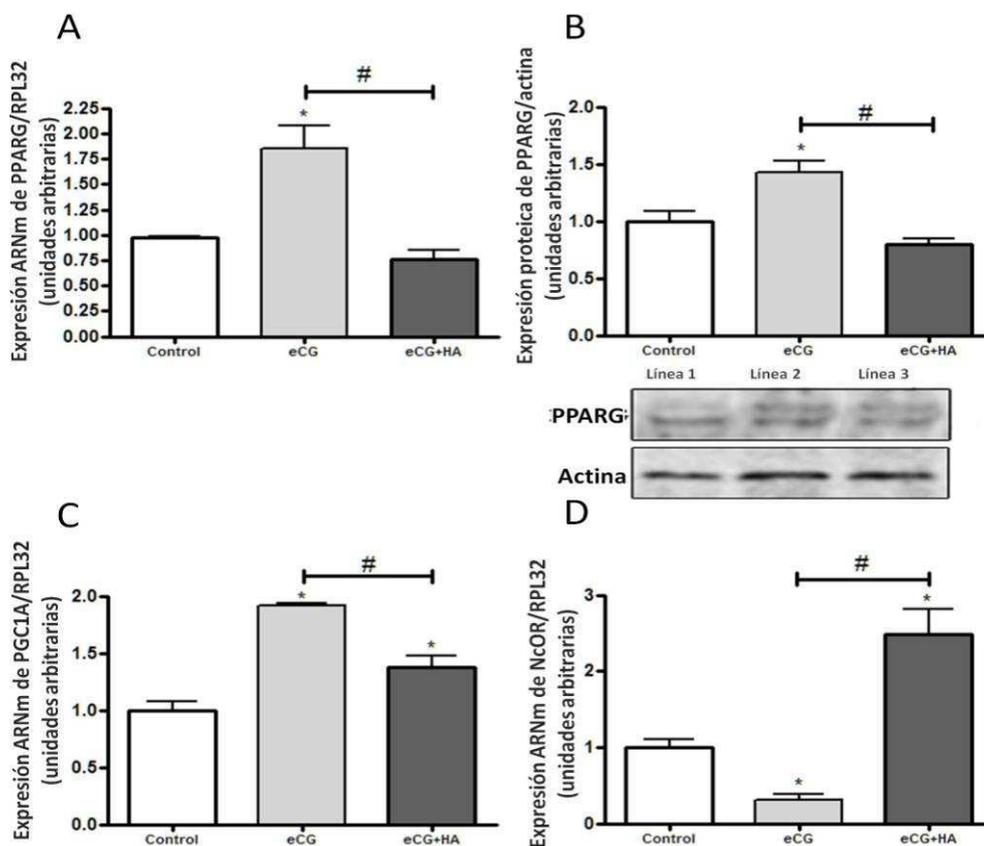


Figura 4. Efecto del exceso de andrógenos sobre el sistema PPARG. Niveles relativos de ARNm (A, C, D) y de proteínas (B y E) determinados por *Real time* PCR y *Western blot* respectivamente. A y B: niveles de ARNm y proteínas de PPARG. C: niveles relativos de ARNm del coactivador PGC1A. D: niveles relativos de ARNm del correpresor NcOR. Cada columna representa la media \pm S.E.M. de seis mediciones de diferentes animales. * $p < 0.05$ vs. Control. # $p < 0.05$ vs eCG+HA.

4.3. Efecto del exceso de andrógenos sobre la esteroidogénesis folicular durante la foliculogénesis temprana.

4.3.1. Inmunolocalización de StAR

Analizamos cualitativamente la inmunolocalización de StAR en el ovario en animales de los grupos control, eCG y eCG+HA. StAR fue localizado tanto en células de la granulosa como en las de la teca. En el grupo control la tinción fue localizada solo en algunos folículos (Fig. 5A), pero tanto en el grupo eCG (Fig. 5B) como en el androgenizado (grupo eCG+HA) (Fig. 5C) se observó una fuerte tinción de los folículos. Particularmente, podemos notar en los grupos eCG y eCG+HA que en los AFs más desarrollados (más grandes) la tinción se observa principalmente en células de la teca, mientras que en folículos con menor desarrollo la tinción se observa fuertemente en las células de la granulosa (flechas gruesas, flechas finas) (fig. 5B y C). No encontramos diferencias notables de tinción entre los grupos eCG y eCG+HA.

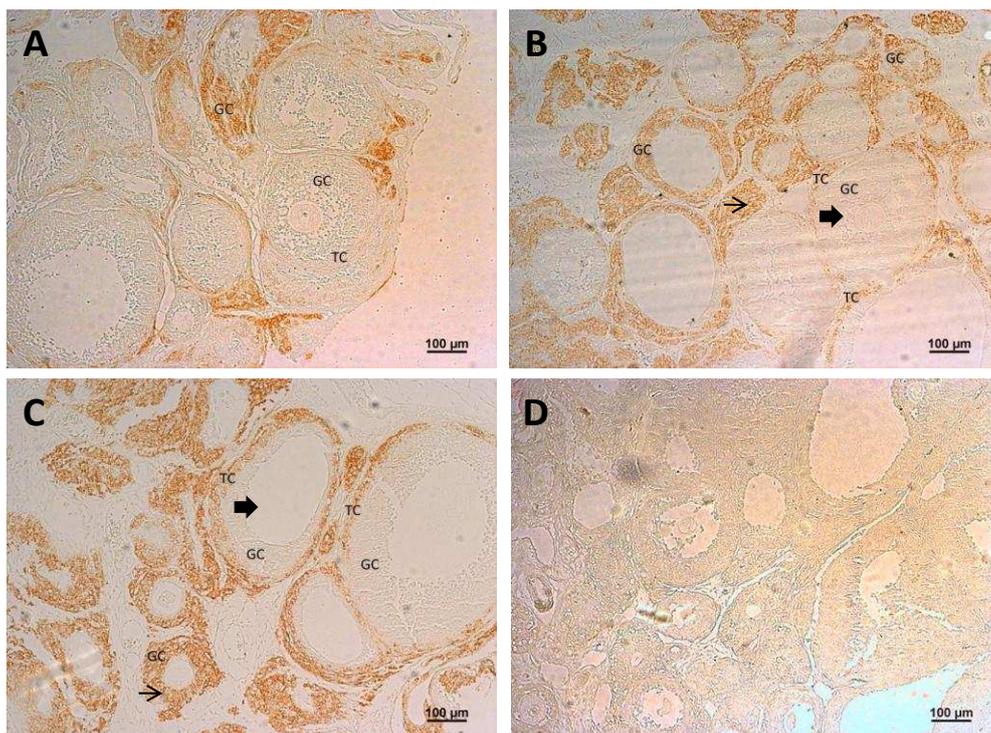


Figura 5. Inmunolocalización de StAR. Cortes ováricos de animales de grupos control (A), eCG (B) y eCG+HA (C). Observar la mayor tinción en los grupos eCG (B) y eCG+HA (C). El corte mostrado en D (control negativo) corresponde a una sección tratada con suero normal en lugar del anticuerpo específico para StAR. Los tejidos se procesaron según se describe en materiales y métodos, y StAR se identifica por la coloración amarroada del DAB. GC: células de la granulosa, TC: células de la teca, O: oocito. Flechas gruesas señalan folículos antrales grandes, flechas finas señalan folículos antrales menores. A: 100×.

4.3.2. Expresión de las enzimas esteroideogénicas.

Analizamos la esteroideogénesis folicular mediante la cuantificación de los niveles de ARNm y proteínas de la enzima limitante de la esteroideogénesis, StAR, y de los niveles de ARNm de las enzimas esteroideogénicas CYP17A, 3BHSD y 17BHSD. Encontramos que cuando estimulamos con eCG (grupo eCG) aumentaron los niveles de ARNm y proteínas de StAR respecto al control (Fig. 6A y 6B), aunque sin aumento significativo en los niveles de ARNm de las enzimas esteroideogénicas CYP17A (Fig. 6C), 3BHSD (Fig. 6D), y 17BHSD (Fig. 6E).

Cuando evaluamos la inducción de la foliculogénesis en presencia de exceso de andrógenos (grupo eCG+HA) encontramos que la esteroideogénesis se encuentra aumentada respecto al grupo eCG, ya que los niveles de ARNm y proteínas de la enzima StAR aumentaron (Fig. 6A y 6B), junto con un aumento en los niveles de ARNm de CYP17A (Fig. 6C), 3BHSD (Fig. 6D) y 17BHSD (Fig. 6E).

La inducción de la foliculogénesis sólo aumentó la expresión de StAR, indicando una moderada activación de la esteroideogénesis folicular. Mientras que en un ambiente con exceso de andrógenos aumentaron todas las enzimas esteroideogénicas evaluadas, evidenciando una activación de toda la vía esteroideogénica.

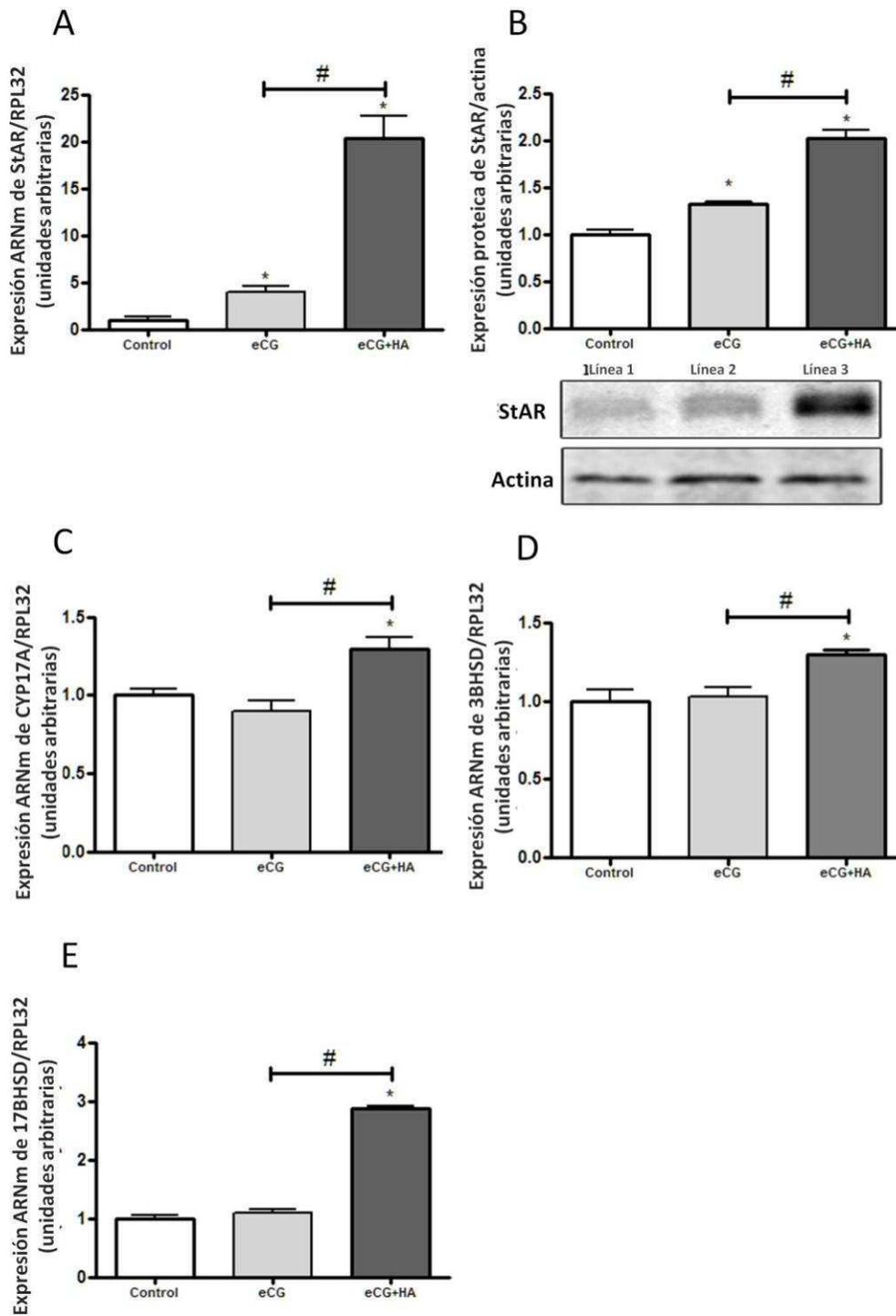


Figura 6. Efecto del exceso de andrógenos sobre la esteroidogénesis folicular. Niveles relativos de ARNm (A, C, D y E) y de proteínas (B) determinados por *Real time* PCR y *Western blot* respectivamente. (A y B) niveles de ARNm y proteínas de StAR. (C) niveles relativos de ARNm de la enzima esteroidogénica CYP17A. (D) niveles relativos de ARNm de la enzima esteroidogénica 3BHS. (E) niveles relativos de ARNm de la enzima esteroidogénica 17BHS. Cada columna representa la media \pm S.E.M. de seis mediciones de diferentes animales. * $p < 0.05$ vs. Control. # $p < 0.05$ vs eCG+HA

4.4. Efecto del exceso de andrógenos sobre las hormonas esteroideas circulante y la enzima aromatasa ovárica.

Para profundizar el estudio de la esteroidogénesis cuantificamos los niveles séricos de las hormonas esteroidogénicas E2 y T, como así también la relación entre E2 y T (E2/T), y además cuantificamos los niveles de ARNm de la enzima responsable de la conversión de T a E2, la aromatasa. Se ha reportado que una baja relación estrógenos/andrógenos está relacionada con una desregulación de la función ovárica. Encontramos que cuando estimulamos la foliculogénesis con eCG aumentaron tanto los niveles de E2, T y la relación E2/T (Fig. 7A, 7B y 7C respectivamente). Además, la inducción de la foliculogénesis (eCG) aumentó los niveles de ARNm de la enzima aromatasa, respecto al control (Fig. 7D).

En presencia de exceso de andrógenos (grupo eCG+HA) aumentaron respecto a eCG los niveles de E2 y T, (Fig. 7A-B) pero la relación E2/T disminuyó significativamente respecto a eCG (Fig. 7C). Respecto a los niveles de ARNm de la enzima aromatasa encontramos que en el grupo androgenizado (grupo eCG+HA) estos niveles aumentaron respecto al grupo eCG (Fig. 7D).

El exceso de andrógenos promovió un aumento en los niveles séricos de las hormonas esteroideas, como así también una disminución de la relación estrógenos/andrógenos y de la enzima que convierte E2 a partir de T, la aromatasa ovárica. Estos resultados evidencian el establecimiento de un estado hiperandrogénico, por lo que a partir de ahora nos referiremos al exceso de andrógenos como hiperandrogenismo.

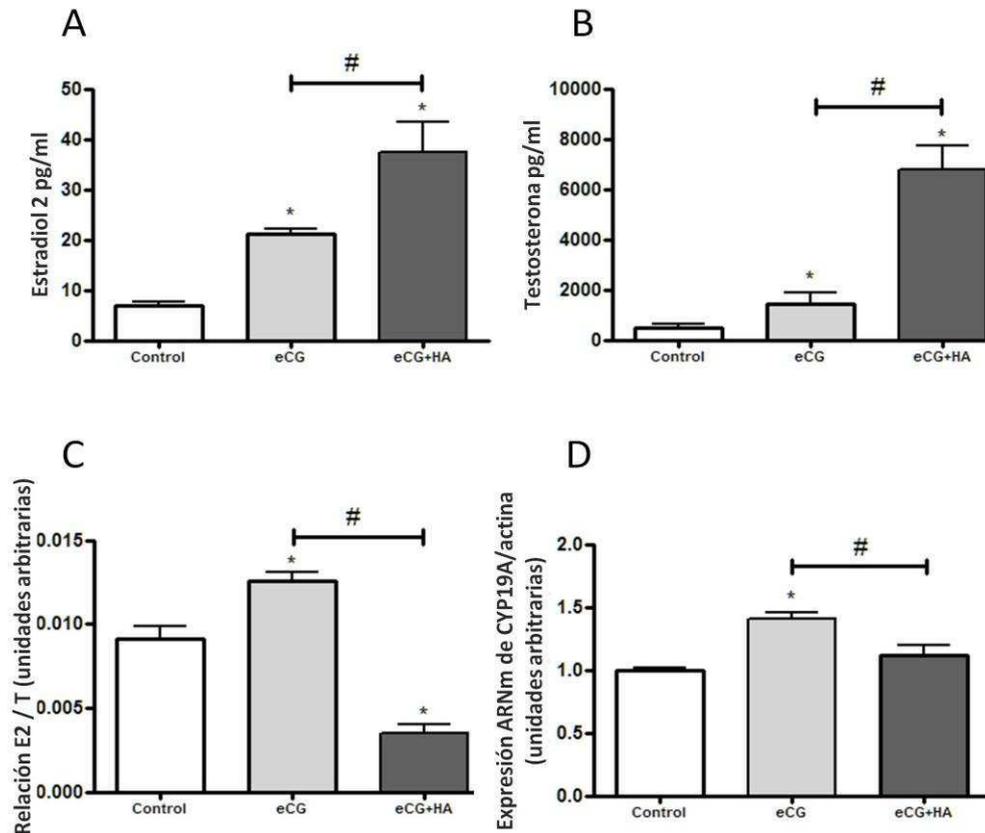


Figura 7: Efecto del exceso de andrógenos sobre los niveles de estradiol, testosterona, la relación estradiol/testosterona y los niveles de ARNm de la aromatasa (CYP19A). Niveles séricos de E2 (A), T (B), la relación E2/T (C) y los niveles relativos de ARNm de la enzima aromatasa (D). Cada columna representa la media \pm S.E.M. de seis mediciones de diferentes animales. * $p < 0.05$ vs. Control. # $p < 0.05$ vs eCG+HA.

4.5. Efecto del hiperandrogenismo sobre los mediadores inflamatorios durante la foliculogénesis temprana.

Analizamos la inflamación en ovario cuantificando los niveles de ARNm de la citoquina pro-inflamatoria TNFA, del sistema prostaglandinas cuantificando los niveles de ARNm y proteínas de la enzima COX2, y el contenido de prostaglandina E (PGE) ovárica. También evaluamos los niveles de ARNm en ovario de la lipooxigenasa 12-LOX

Encontramos que con la inducción de la foliculogénesis (grupo eCG) los niveles de ARNm de TNFA disminuyeron respecto al control (Fig. 8A), a la vez que se incrementaron los niveles de ARNm y proteínas de COX2 (Fig. 8B y 8C) y el contenido de PGE2 ovárica (Fig. 8D). Por último, los niveles de proteínas de la 12-LOX no se alteraron respecto al grupo control (Fig. 8E).

Cuando la foliculogénesis se indujo en una condición hiperandrogénica (grupo eCG+HA), los niveles de ARNm de TNFA aumentaron respecto a eCG (Fig. 8A), así como también los niveles de ARNm y proteínas de COX2 (Fig. 8B y C) y el contenido de PGE2 ovárica (Fig. 8D). Respecto a la enzima 12-LOX, los niveles proteicos disminuyeron respecto al grupo eCG (Fig. 4E).

El hiperandrogenismo durante la foliculogénesis temprana generó un estado pro-inflamatorio en el ovario, evidenciado por el aumento de los marcadores inflamatorios COX2, PGE2 y TNFA.

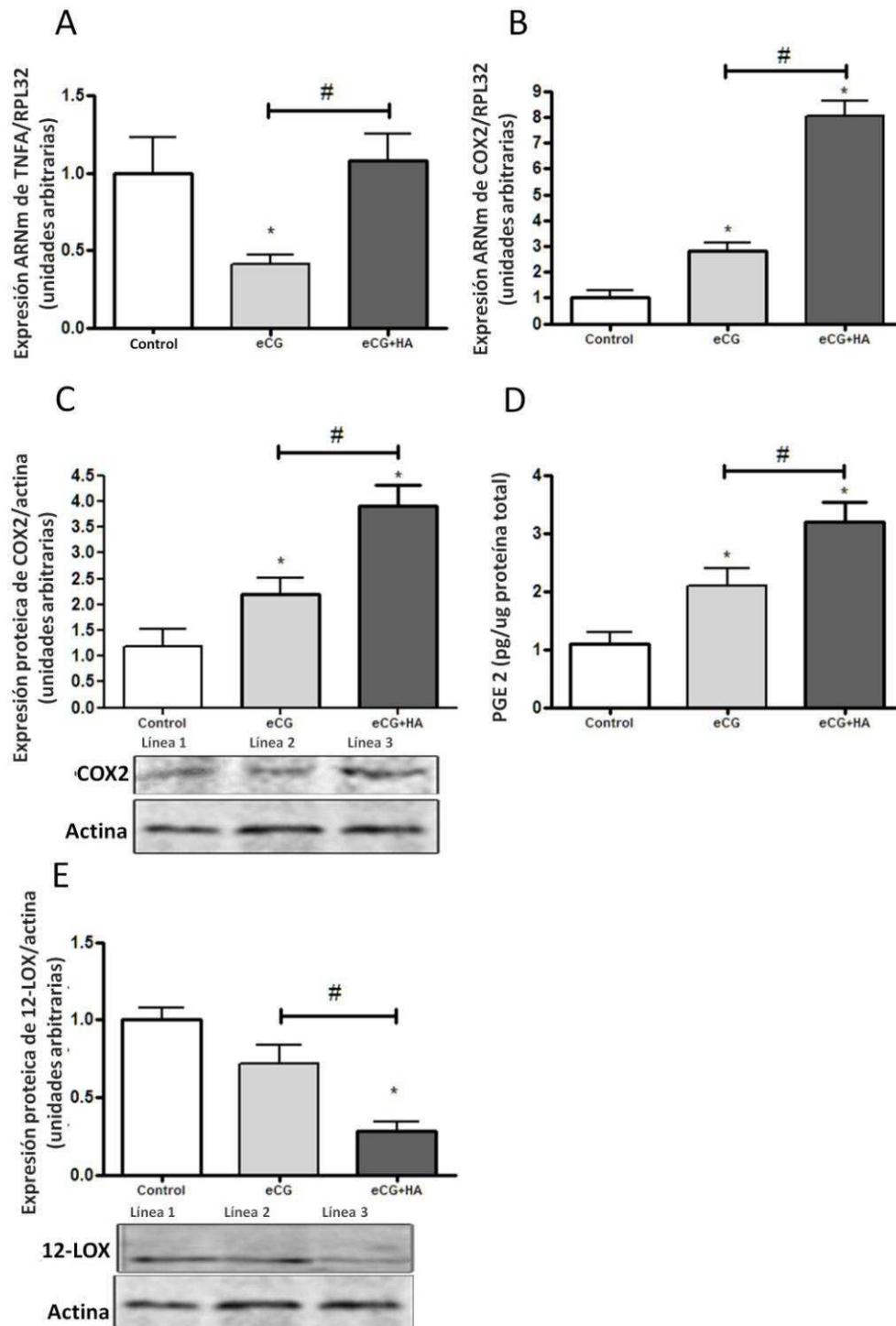


Figura 8. Efecto del hiperandrogenismo en los marcadores inflamatorios.

(A y B) Niveles relativos de ARNm y proteínas de la enzima COX2, respectivamente. (C) Contenido ovárico de PGE2 determinado por la técnica RIA, según se describe en materiales y métodos. (D) niveles relativos de ARNm de la proteína TNFA. (E) niveles relativos de la proteína 12-LOX. Se muestran bandas representativas de los niveles proteicos, según corresponda. Cada columna representa la media \pm S.E.M. de seis mediciones de diferentes animales. * $p < 0.05$ vs. Control. # $p < 0.05$ vs eCG+HA

4.6. Efecto del hiperandrogenismo sobre la vía de la apoptosis ovárica.

Evaluamos los niveles de ARNm y proteínas en el ovario de enzimas involucradas en la regulación de la apoptosis, la enzima anti-apoptótica BCL2 y la enzima pro-apoptótica BAX.

Los niveles de ARNm y de proteínas de la proteína BAX disminuyeron, mientras los niveles de ARNm de BCL2 aumentaron cuando se estimuló la foliculogénesis (grupo eCG) respecto al control (Figs. 9A-C). Aunque existe una tendencia al aumento, los niveles de proteínas de BCL2 no aumentaron con eCG respecto al control (Fig.9D). Cuando evaluamos la relación BAX/BCL2 encontramos que la foliculogénesis (eCG) disminuyó tanto la relación de ARNm como de proteínas, respecto a control (Figs. 9E y F).

Luego, cuando analizamos el efecto del hiperandrogenismo (grupo eCG+HA) encontramos que tanto los niveles de ARNm y proteínas de BAX (Fig. 9A y B) como los de BCL2 (Fig. 9C y D) no se vieron modificados respecto al grupo eCG. Interesantemente, la relación entre los mensajeros de BAX/BCL2 aumentó respecto al grupo eCG (Fig. 9E), mientras que la relación entre las proteínas BAX/BCL2 no se modificó respecto al grupo eCG (Fig. 9F).

La inducción de la foliculogénesis disminuyó la apoptosis en el ovario, evaluado por medio de un aumento de la proteína anti apoptótica BCL2 y una disminución en la relación BAX/BCL2. En condiciones hiperandrogénicas se produce una reversión parcial de ese efecto antiapoptótico, por un aumento en la relación entre los mensajeros BAX/BCL2.

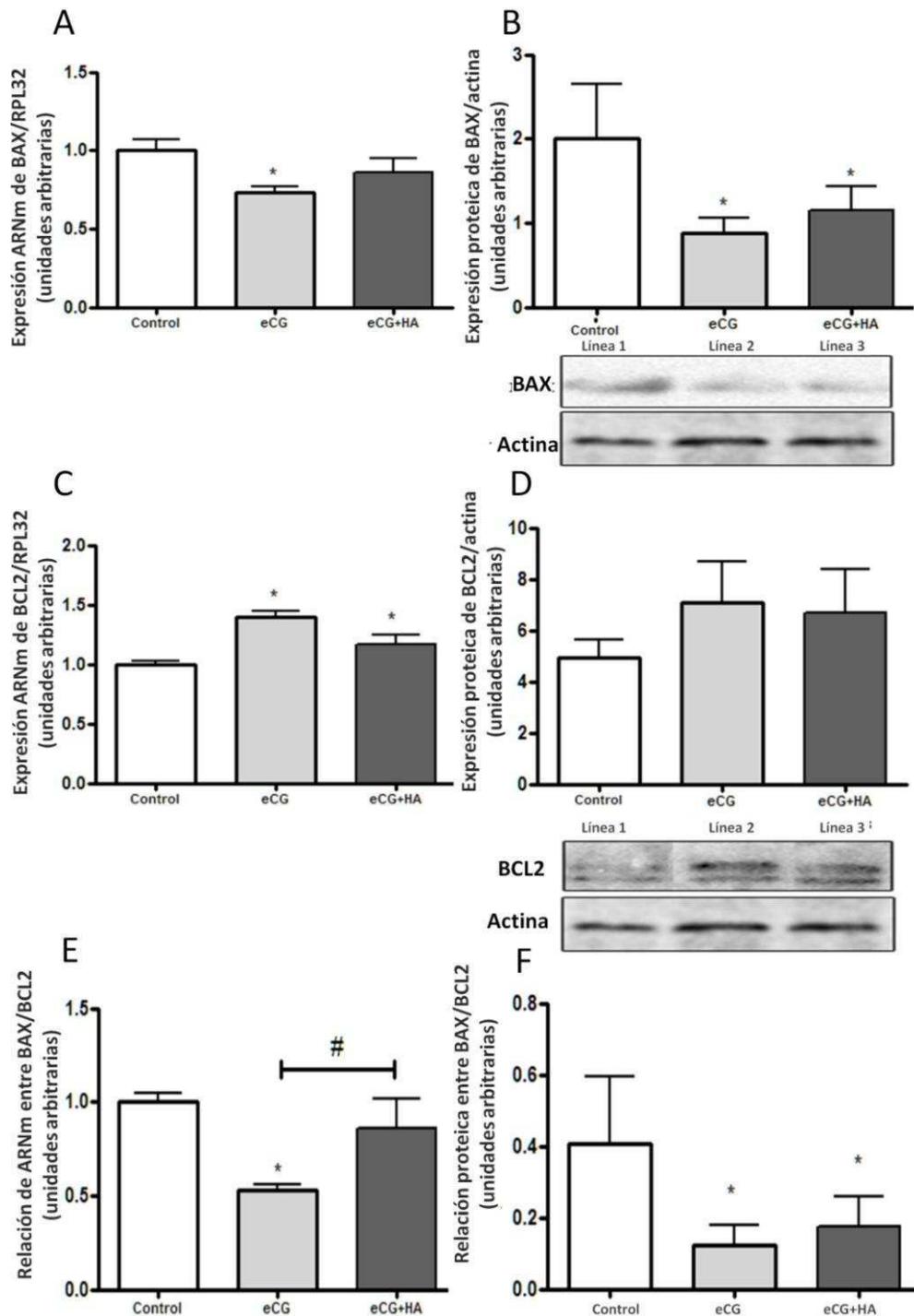


Figura 9. Efecto del hiperandrogenismo sobre la vía de la apoptosis ovárica. (A y B) Niveles relativos de ARNm y proteínas de la proteína pro apoptótica BAX, respectivamente. (C y D) Niveles relativos de ARNm y proteínas de la proteína anti apoptótica BCL2, respectivamente. Relación BAX/BCL2 para ARNm (E) y proteínas (F). Se muestra un *Western blot* representativo para cada medición de proteínas. Cada columna representa la media \pm S.E.M. de cuatro mediciones de diferentes animales. * $p < 0.05$ vs. Control. # $p < 0.05$ vs eCG+HA

4.7. Efecto del hiperandrogenismo sobre el balance oxidativo durante la foliculogénesis temprana.

Cuantificamos los niveles de peroxidación lipídica evaluando el MDA sistémico y los niveles séricos del antioxidante GSH, y encontramos que la inducción con eCG (grupo eCG) no alteró los niveles de MDA y GSH (Fig. 10A y B, respectivamente).

Sin embargo, en presencia de hiperandrogenismo junto a la inducción de la foliculogénesis (grupo eCG+HA) disminuyó el nivel de GSH (Fig. 10A) y aumentó el correspondiente de MDA (Fig. 10B).

La hiperandrogenización indujo un desbalance oxidativo, caracterizado por un aumento de la peroxidación lipídica evaluado por los niveles de MDA y una disminución del anti-oxidante GSH.

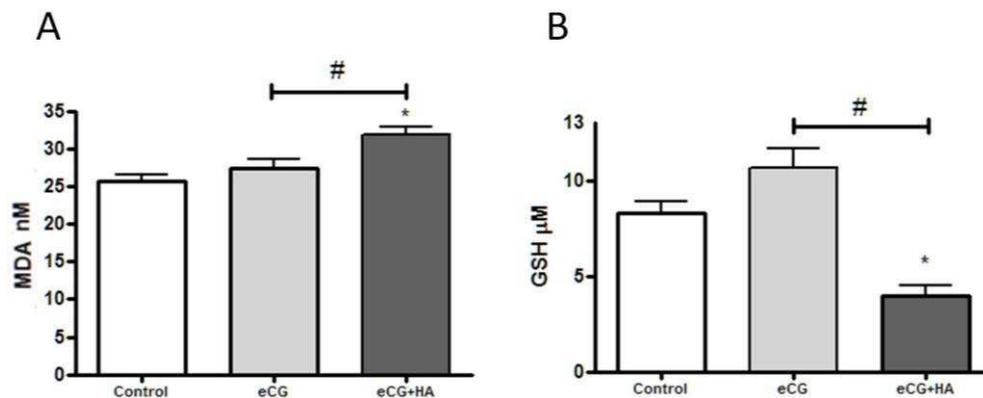


Figura 10. Efecto del hiperandrogenismo sobre el estrés oxidativo sistémico. (A) La peroxidación lipídica fue evaluada por los niveles de MDA y (B) la concentración del antioxidante fue evaluada por los niveles del metabolito GSH. Cada columna representa la media \pm S.E.M. de seis mediciones de diferentes animales. * $p < 0.05$ vs. Control. # $p < 0.05$ vs eCG+HA.

4.8. Resumen Resultados Primera Parte

- Una única administración de eCG estimuló el desarrollo folicular, y el exceso de andrógenos alteró ese desarrollo promoviendo la formación de folículos anormales y alterando los porcentajes de PFs y PrF.
- La estimulación de la foliculogénesis produjo una activación del sistema PPARG (evaluado por PPARG, PGC1A y NcOR), y el exceso de andrógenos reguló negativamente al sistema PPARG, evitando esa activación.
- El exceso de andrógenos promovió una estimulación en los niveles de la esteroidogénesis folicular y una desregulación de las hormonas esteroideas a favor de la T, como así también una baja de la relación E2/testosterona con una consecuente disminución de la enzima que convierte E2 a partir de T, la aromatasas. Se establece así un estado hiperandrogénico.
- El hiperandrogenismo durante la foliculogénesis temprana estableció un estado pro-inflamatorio, evidenciado por el aumento en los niveles de COX2, PGE2 y TNFA.
- La hiperandrogenización indujo un desbalance oxidativo, caracterizado por un aumento de la peroxidación lipídica evaluado por los niveles de MDA y una disminución del anti-oxidante GSH, sugiriendo el establecimiento de EO.
- La inducción de foliculogénesis temprana previene la apoptosis en el ovario, por medio de un aumento de la proteína anti apoptótica BCL2 y una disminución en la relación BAX/BCL2. En condiciones hiperandrogénicas se produce una prevención parcial de ese efecto, aumentando la expresión génica de BAX y aumentando la relación génica BAX/BCL2.

5. Resultados, Segunda Parte: Rol de la PGZ sobre las alteraciones causadas por el hiperandrogenismo.

5.1. Rol de la PGZ sobre la morfología del ovario.

5.1.1. Observación cualitativa de los ovarios

Cuando estimulamos la foliculogénesis junto a una hiperandrogenización seguida por la administración de PGZ (grupo eCG+HA+PGZ) observamos ovarios con una apariencia similar al grupo estimulado con la foliculogénesis (eCG), con predominancia de folículos normales y en distintos estadios de desarrollo (Fig. 11D), con una marcada diferencia respecto al grupo eCG+HA (Fig. 11C), en donde se observan folículos con desarrollo anormal. En el grupo estimulado con la foliculogénesis y PGZ, que utilizamos para evaluar efectos *per se* de la PGZ (grupo eCG+PGZ), la apariencia del ovario es similar a la del grupo donde se estimula la foliculogénesis (eCG) (Fig. 11A), en donde observamos folículos en distintos estadios de desarrollo (Fig. 11B).

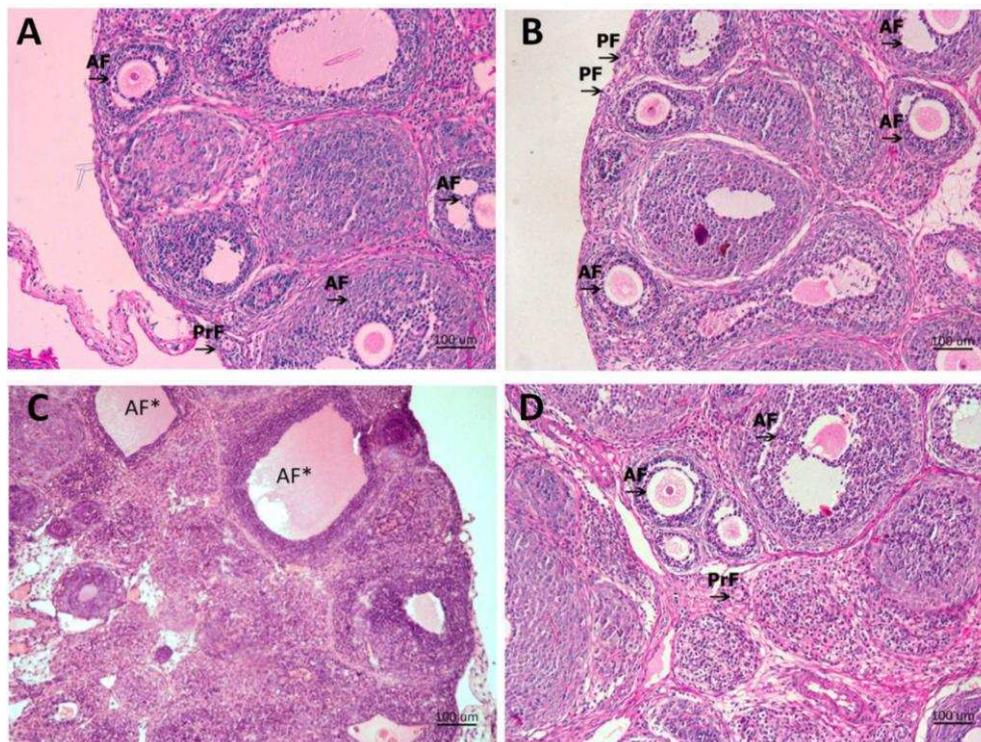


Figura 11: Análisis histológico de ovarios: (A) Sección de ovario correspondiente a animales del grupo eCG, (A: 100X). Se indican la presencia folículos en diferentes estadios. (B) Sección de ovario correspondiente a animales del grupo eCG+PGZ (A: 100X), con folículos en diferentes estadios de desarrollo. (C) Sección de ovario de animales hiperandrogenizados, mostrando folículos antrales con morfología anormal (C, A: 100X). (D) Sección de ovario correspondiente a animales hiperandrogenizados y tratados con PGZ (eCG+HA+PGZ). Se indican la presencia folículos en diferentes estadios. PF: folículos primordiales, PrF: folículos primarios, AF: folículos antrales, AF*: folículos antrales con morfología anormal.

5.1.2. Composición folicular

Encontramos que la administración del ligando PGZ no alteró el número total de folículos (eCG+PGZ y eCG+HA+PGZ) (Fig. 12A). En cuanto a los porcentajes de los tipos foliculares (Fig. 12B) la PGZ bloqueó parcialmente la alteración producto del hiperandrogenismo, ya que el porcentaje de PF y PrF no resultó diferente tanto del grupo eCG como del hiperandrogenizado (eCG+HA). En los demás tipos foliculares no hubo diferencias entre los grupos. En cuanto al porcentaje de folículos atrésicos, no observamos ninguna diferencia entre los grupos (Fig. 12 C).

Por último, no observamos ningún efecto de la PGZ *per se* (eCG+P) sobre los números totales de folículos, el porcentaje folicular y la atresia folicular.

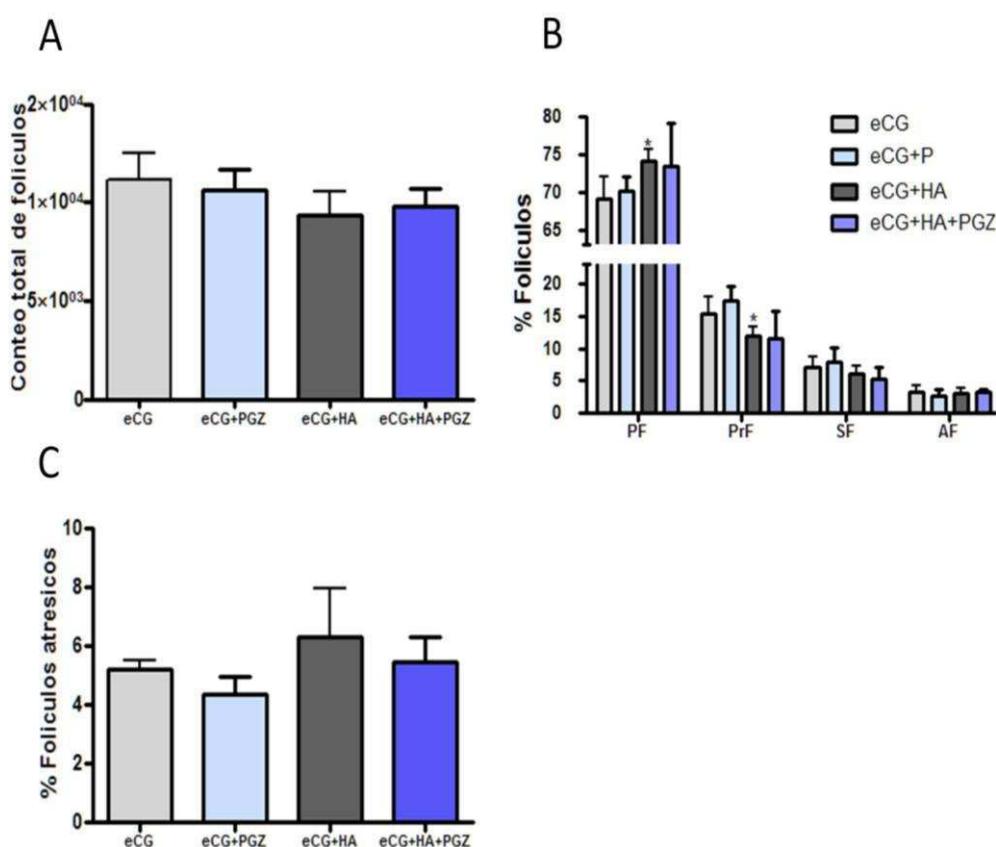


Figura 12. Composición folicular: Conteo, porcentaje folicular y atresia en animales eCG, eCG+P, eCG+HA y eCG+HA+PGZ. A: Número total de folículos visualizados en ovarios. B: Porcentaje de los diferentes tipos foliculares ováricos presentes. Las diferencias estadísticas se evaluaron entre los tratamientos dentro de cada tipo folicular (PF, PrF, SF y AF). C: Porcentaje de folículos atrésicos presentes. PF: folículos primordiales, PrF: folículos primarios, SF: folículos secundarios, AF: folículos antrales. Cada columna representa la media \pm S.E.M. de 4 mediciones de diferentes animales. * $p < 0.05$ vs. eCG. # $p < 0.05$ vs eCG+HA+PGZ.

5.2. Efecto de la PGZ sobre la alteración del hiperandrogenismo sobre el sistema PPARG

5.2.1. Inmunolocalización de PPARG

En la figura siguiente se puede apreciar la inmunolocalización de PPARG en el grupo con foliculogénesis estimulada, hiperandrogenizado y con administración de PGZ (grupo eCG+HA+PGZ) (Fig. 13D) y en el grupo con foliculogénesis estimulada y administración de PGZ (grupo eCG+PGZ) (Fig. 13B). Al igual que en la primera parte de resultados, observamos la marcación especialmente en las células de la granulosa de los folículos en desarrollo. En estos dos grupos se observa la inmunolocalización de PPARG, y no observamos diferencias cualitativas entre estos grupos y el estimulado la foliculogénesis (grupo eCG) (Fig. 13A) o el hiperandrogenizado (grupo eCG+HA) (Fig. 13C).

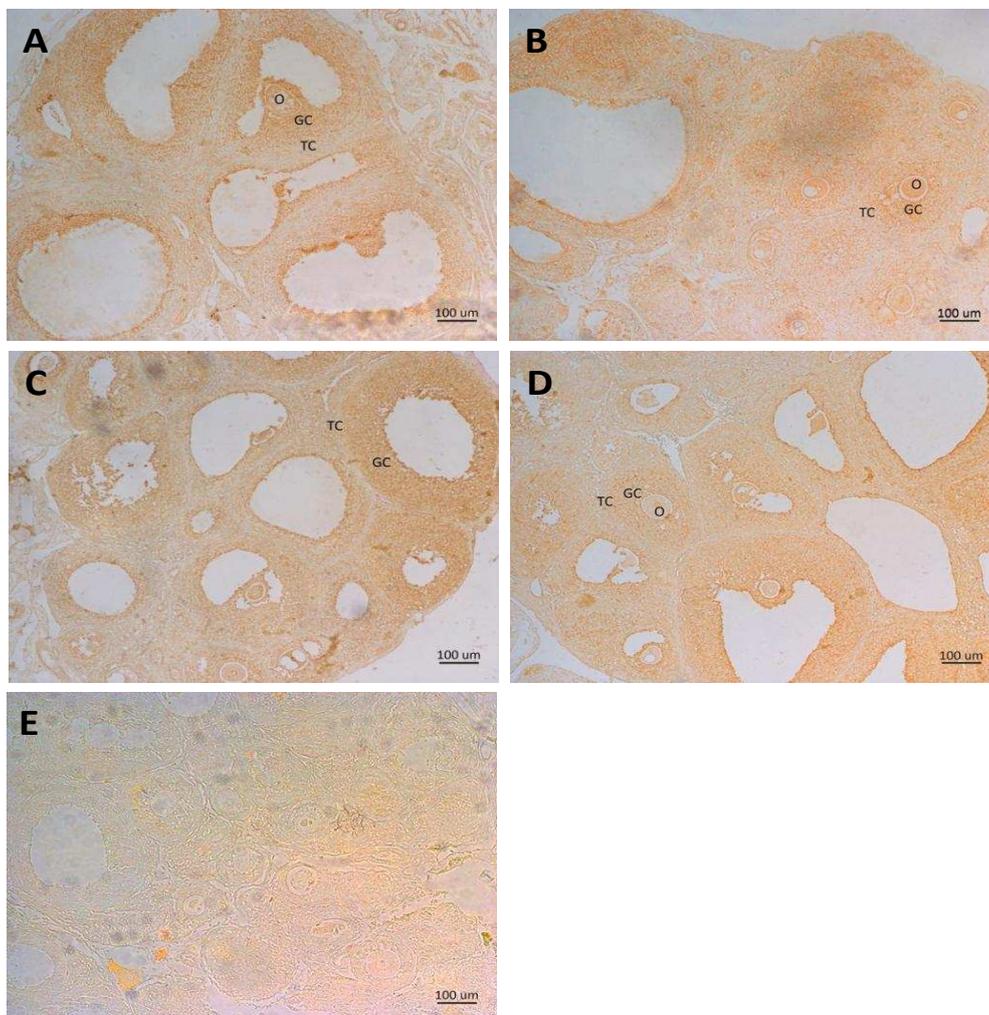


Figura 13. Inmunolocalización de PPARG. Cortes ováricos de animales de grupos eCG (A), eCG+PGZ (B), eCG+HA (C), eCG+HA+PGZ (D) y control negativo (E). Observar la coloración preferencialmente en la zona de la granulosa (GC). El corte mostrado en E (control negativo) corresponde a una sección tratada con suero normal en lugar del anticuerpo específico para PPARG. Los tejidos se procesaron según se describe

en materiales y métodos, y PPARG se identifica por la coloración amarronada del DAB. GC: células de la granulosa, TC: células de la teca, O: oocito. A: 100×.

5.2.2. Regulación del sistema PPARG: Expresión de PPARG, PGC-1, NcOR

Al analizar el efecto de la administración con PGZ sobre la foliculogénesis en presencia de hiperandrogenismo (grupo eCG+HA+PGZ), encontramos que la PGZ previno la inactivación del sistema PPARG observada en el grupo hiperandrogenizado (eCG+HA) (Fig. 14). Particularmente encontramos que los niveles de ARNm y proteicos de PPARG fueron mayores respecto al grupo hiperandrogenizado (Fig. 14A y B). Más aún, los niveles de ARNm del coactivador PGC1A aumentaron mientras que los del correpressor NcOR disminuyeron, respecto al grupo hiperandrogenizado (eCG+HA) (Fig. 14C y D).

Por último, no se observó un efecto *per se* de la PGZ sobre PPARG, PGC1A y NcOR (grupo eCG+PGZ) respecto al grupo eCG (Fig. 14A, B-D).

La administración de PGZ previno la desregulación del sistema PPARG (evaluada por la expresión de PPARG, PGC1A y NcOR) provocada por el hiperandrogenismo.

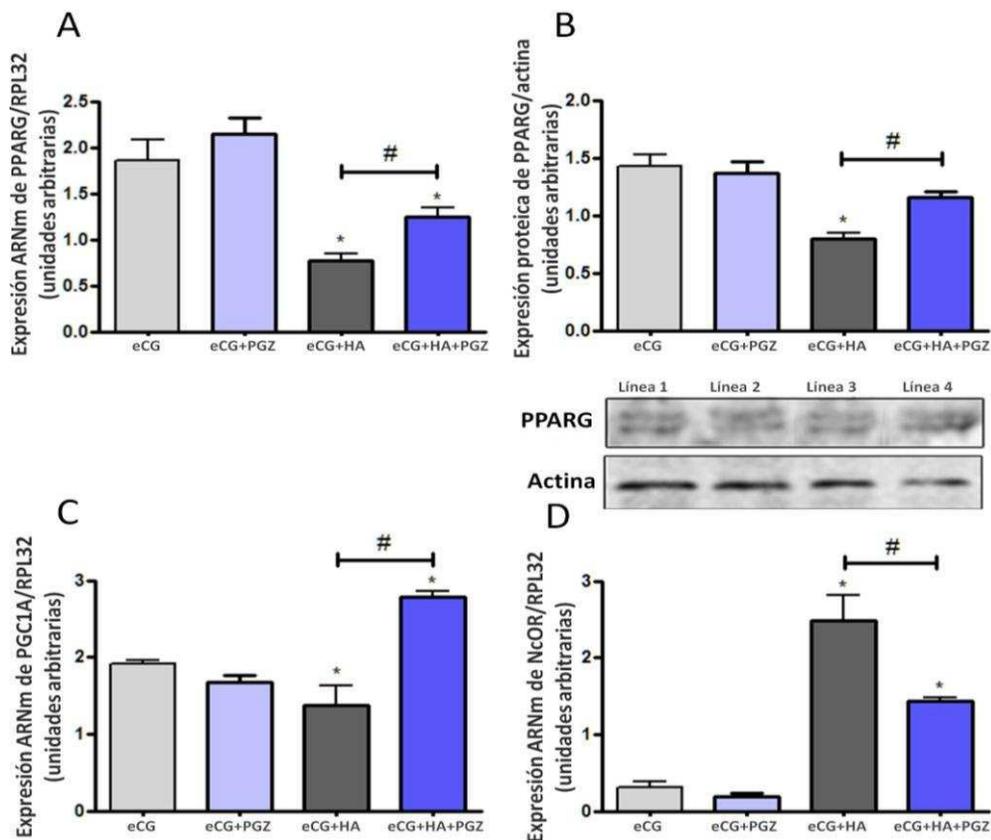


Figura 14. Efecto de la PGZ sobre la alteración del sistema PPARG. Niveles relativos de ARNm (A, C, D) y de proteínas (B y E) determinados por *Real time* PCR y *Western blot* respectivamente. A y B: niveles de ARNm y proteínas de PPARG. C: niveles relativos de ARNm del coactivador PGC1A. D: niveles relativos de ARNm del correpressor

NcOR. Cada columna representa la media \pm S.E.M. de seis mediciones de diferentes animales. * $p < 0.05$ vs. eCG. # $p < 0.05$ vs eCG+HA+PGZ

5.3. Rol de la PGZ sobre las alteraciones en la esteroidogénesis folicular provocadas por el hiperandrogenismo.

5.3.1. Inmunolocalización de StAR

Analizamos cualitativamente la inmunolocalización de StAR en el ovario. StAR fue localizado tanto en células de la granulosa como en las de la teca, al igual que en la primera parte de resultados. En el grupo con la foliculogénesis estimulada en condiciones hiperandrogénicas y con administración de PGZ (eCG+HA+PGZ) (Fig. 15D), y en el grupo PGZ *per se* (eCG+PGZ) (Fig. 15B) se observó una fuerte tinción de los folículos. Al igual que en los grupos con la foliculogénesis inducida (eCG) (Fig. 15A) e hiperandrogenizado (eCG+HA) (Fig. 15C), en los AFs más desarrollados (más grandes) la tinción se observó principalmente en células de la teca, mientras que en folículos con menor desarrollo la tinción se observó fuertemente en las células de la granulosa (flechas gruesas, flechas finas).

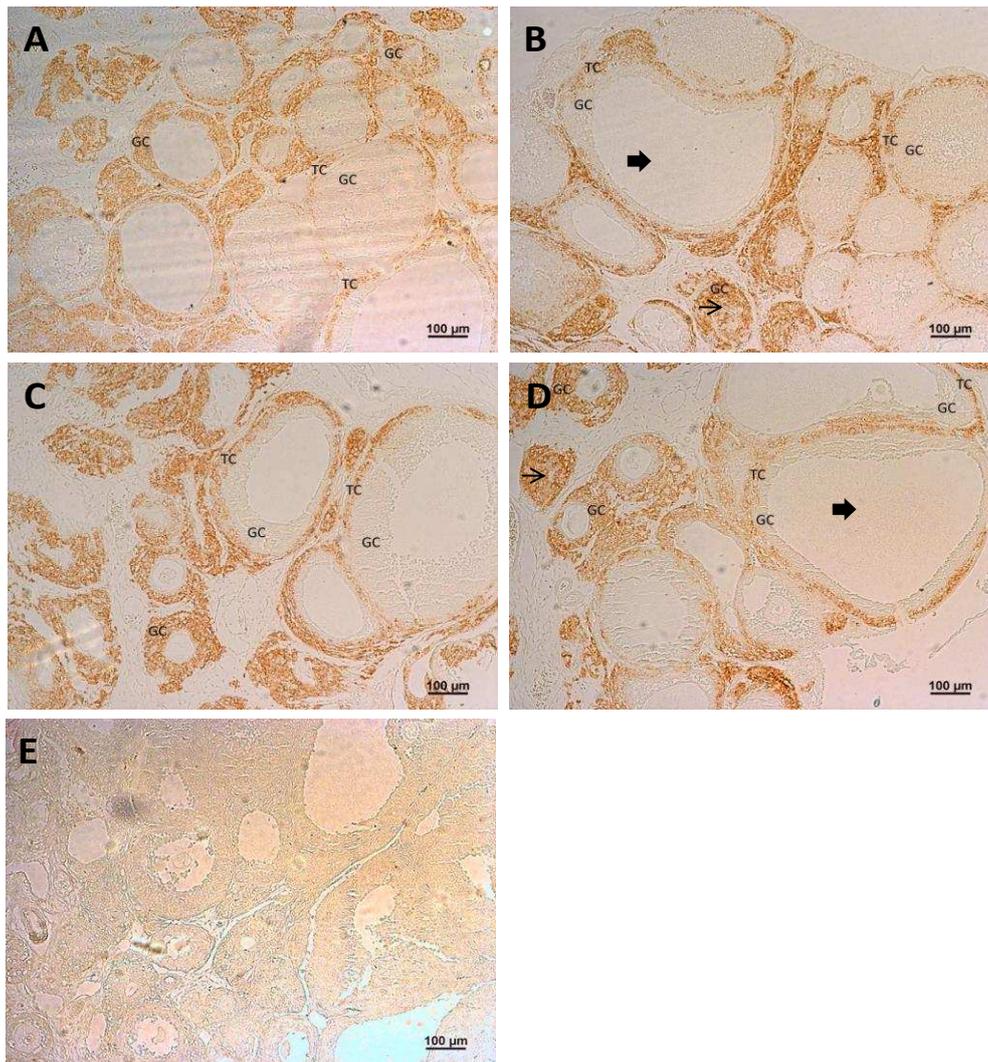


Figura 15. Inmunolocalización de StAR. Cortes ováricos de animales de grupos eCG (A), eCG+PGZ (B), eCG+HA (C) y eCG+HA+PGZ (D). El corte mostrado en E (control negativo) corresponde a una sección tratada con suero normal en lugar del anticuerpo específico para StAR. Los tejidos se procesaron según se describe en materiales y métodos, y StAR se identifica por la coloración amarronada del DAB. GC: células de la granulosa, TC: células de la teca, O: oocito. Flechas gruesas señalan folículos antrales grandes, flechas finas señalan folículos antrales menores. A: 100×.

5.3.2. Expresión de las enzimas esteroideogénicas.

Al analizar el efecto del tratamiento con PGZ sobre la foliculogénesis y el hiperandrogenismo (grupo eCG+HA+PGZ), encontramos que el tratamiento con PGZ revirtió el aumento en la esteroideogénesis observado en el grupo hiperandrogenizado (eCG+HA) (Fig. 16).

La administración de PGZ (grupo eCG+HA+PGZ) previno la alteración en los niveles de ARNm y proteínas de StAR observados en el grupo hiperandrogenizado (eCG+HA), al igual que previno la alteración en los niveles de ARNm en las enzimas esteroideogénicas CYP17A, 3BHSB y 17BHSB (Fig. 16C-E).

Finalmente, no encontramos un efecto *per se* de la PGZ (grupo eCG+PGZ) sobre las enzimas esteroidogénicas, con respecto al grupo eCG, excepto por una disminución significativa en los niveles de la enzima CYP17A (Fig. 16C).

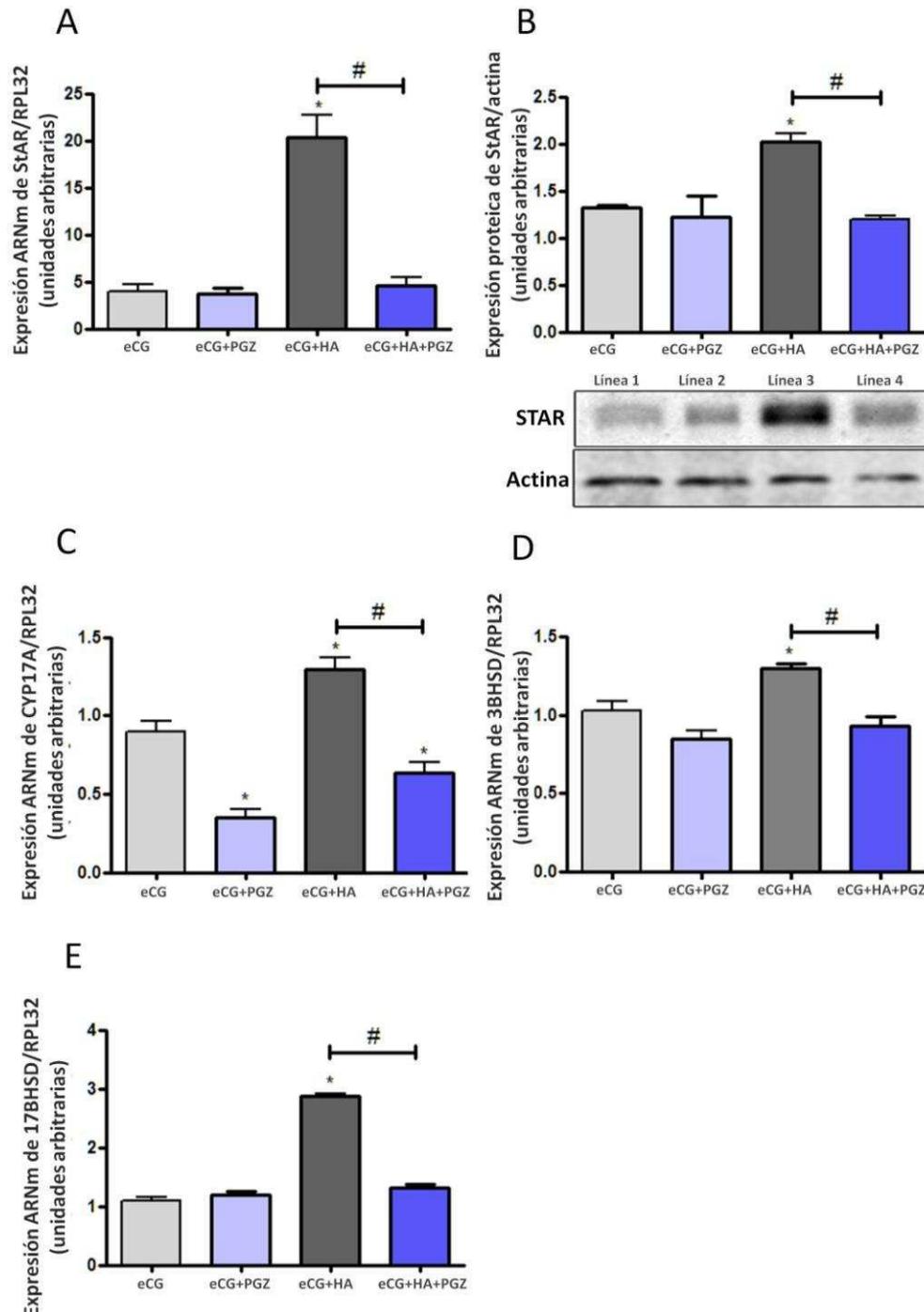


Figura 16. Efecto del hiperandrogenismo sobre la esteroidogénesis folicular. Niveles relativos de ARNm (A, C, D y E) y de proteínas (B) en ovarios, determinados por *Real time PCR* y *Western blot* respectivamente. (A y B) niveles de ARNm y proteínas de StAR, respectivamente. (C) niveles relativos de ARNm de la enzima esteroidogénica CYP17A. (D) niveles relativos de ARNm de la enzima esteroidogénica 3BHSD. (E) niveles relativos de la enzima esteroidogénica 17BHSD. Cada columna representa la media \pm S.E.M. de seis mediciones de diferentes animales. * $p < 0.05$ vs. eCG. # $p < 0.05$ vs eCG+HA+PGZ

5.4. Rol de la PGZ sobre la alteración del hiperandrogenismo sobre las hormonas esteroideas circulantes y la expresión ovárica de la enzima aromatasa.

Cuando cuantificamos los niveles circulantes de E2 y T en el grupo al cual administramos PGZ (eCG+HA+PGZ) encontramos aumentado los niveles de E2 comparado al grupo hiperandrogenizado (eCG+HA) (Fig. 17A), y una disminución en los niveles circulantes de T (Fig. 17B). En cuanto a la relación E2/T, encontramos que la PGZ (eCG+HA+PGZ) previno la disminución observada en el grupo hiperandrogenizado (eCG+HA) (Fig. 17C).

Además, la PGZ *per se* (eCG+PGZ) no tuvo ningún efecto sobre los niveles circulantes de E2 y T, y tampoco sobre la relación E2/T, respecto al grupo eCG (Fig. 17A-C).

Con respecto a los niveles de ARNm de la aromatasa encontramos que la PGZ (eCG+HA+PGZ) produjo un aumento respecto al grupo hiperandrogenizado (eCG+HA). Debido a que la aromatasa sintetiza E2 a partir de T, este resultado está de acuerdo con los niveles de T (Fig. 17B) y la relación E2/T (Fig. 17C) encontrados luego de la administración de PGZ (eCG+HA+PGZ) respecto al grupo hiperandrogenizado (eCG+HA).

Con respecto al efecto *per se* de la PGZ (eCG+PGZ) sobre las hormonas E2, T y E2/T y la aromatasa, no encontramos diferencias respecto al grupo eCG (Fig. 17A-D).

La administración de PGZ evitó la alteración en la relación E2/T observada en condiciones hiperandrogénicas, y además la PGZ aumentó los niveles de la aromatasa, favoreciendo entonces el aumento en la relación E2/T.

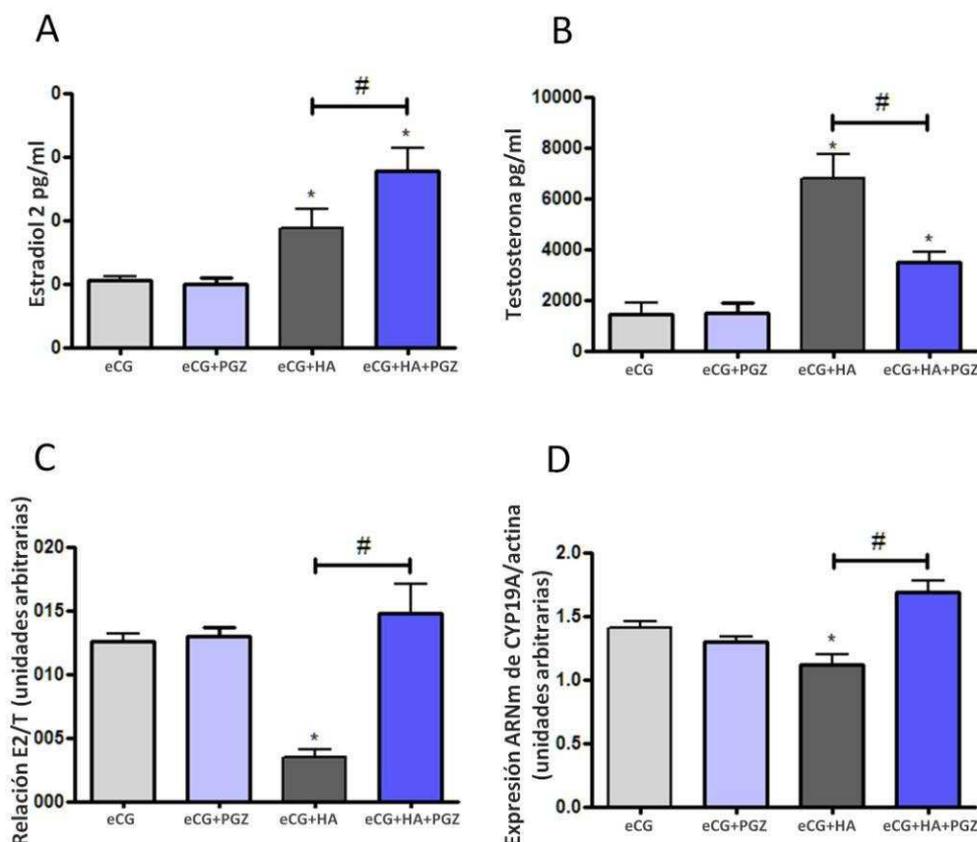


Figura 17: Efecto del hiperandrogenismo sobre los niveles sistémicos de estradiol, testosterona, la relación estradiol/testosterona y los niveles de ARNm de la enzima aromatasa (CYP19A). Niveles séricos de E2 (A), T (B), la relación E2/T (C), y los niveles relativos de ARNm de la aromatasa (D). Cada columna representa la media \pm S.E.M. de seis mediciones de diferentes animales. * $p < 0.05$ vs. eCG. # $p < 0.05$ vs eCG+HA+PGZ.

5.5. Efecto de la PGZ sobre la alteración del hiperandrogenismo sobre los marcadores inflamatorios del ovario

Encontramos que la administración de PGZ (eCG+HA+PGZ) evitó el aumento observado en condiciones hiperandrogénicas (eCG+HA) de los niveles de ARNm de TNFA (Fig. 18A), proteicos y de ARNm de COX2 (Fig. 18 B y C), como así también de los niveles de PGE2 ovárica (Fig. 18D).

La administración de PGZ (eCG+HA+PGZ) no modificó los niveles proteicos de la enzima 12-LOX respecto a lo hallado en el grupo hiperandrogenizado (eCG+HA).

Al evaluar el efecto *per se* de la PGZ (eCG+PGZ) sólo encontramos un efecto significativo sobre los niveles proteicos de COX2, ya que se encuentran disminuidos respecto al grupo eCG (Fig. 18B).

La administración de PGZ evitó el establecimiento del estado pro inflamatorio observado en condiciones hiperandrogénicas, evaluado por la expresión de COX2, los

niveles ováricos de PGE2 y la expresión génica de TNFA. A su vez, la PGZ no modificó el nivel de expresión proteica de 12-LOX observado en condiciones hiperandrogénicas.

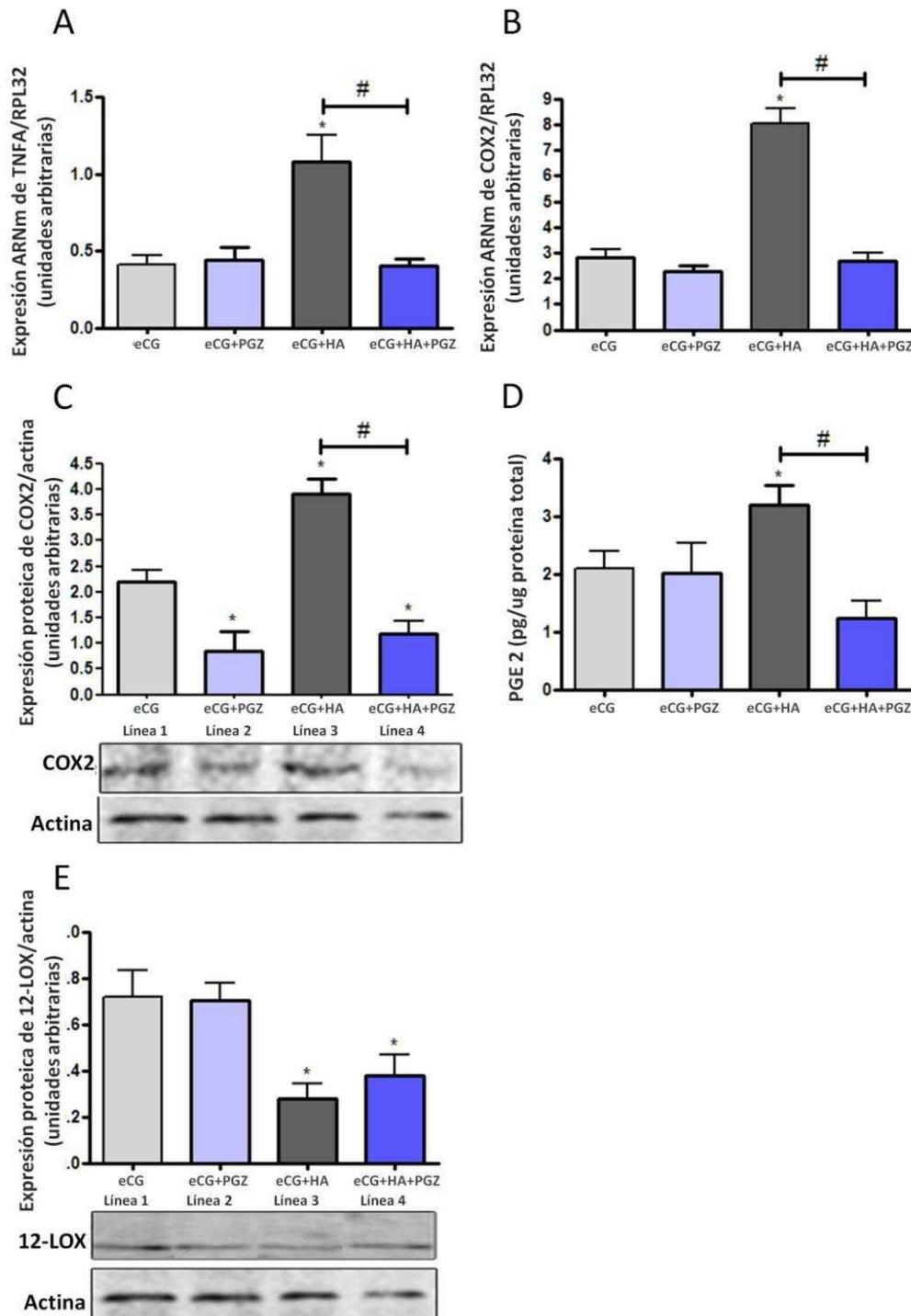


Figura 18. Efecto del hiperandrogenismo en los marcadores inflamatorios. (A y B) Niveles relativos de ARNm y proteínas de la enzima COX2; (C) Contenido ovárico de PGE2 (según se describe en materiales y métodos); (D) niveles relativos de ARNm de TNFA. (E) niveles relativos de la proteína 12-LOX. Cada columna representa la media \pm S.E.M. de seis mediciones de diferentes animales. * $p < 0.05$ vs. eCG. # $p < 0.05$ vs eCG+HA+PGZ.

5.6. Efecto de la PGZ sobre las alteraciones hiperandrogénicas en la apoptosis ovárica.

Evaluamos los niveles de ARNm y proteínas en el ovario de la enzima anti-apoptótica BCL2 y la enzima pro-apoptótica BAX.

Encontramos que la PGZ (grupo eCG+HA+PGZ) no modificó los niveles de ARNm y de proteínas de BAX (Fig. 20A y B) ni de BCL2 (Fig. 20C y D) observados en condiciones hiperandrogénicas (grupo eCG+HA) y tampoco respecto al grupo eCG, mientras que la PGZ (eCG+HA+PGZ) disminuyó la relación entre los mensajeros BAX/BCL2 respecto al grupo hiperandrogénico (eCG+HA) (Fig. 20E). Por otro lado, la PGZ (eCG+HA+PGZ) no modificó la relación entre las proteínas BAX/BCL2 observada en el grupo hiperandrogenizado (eCG+HA) y eCG (Fig. 20F).

Con respecto al efecto *per se* de la PGZ (eCG+PGZ), encontramos tanto un aumento en los niveles de ARNm de BAX (Fig. 20A) como de BCL2 (Fig. 20C), respecto al grupo eCG, aunque cuando analizamos la relación entre los mensajeros BAX/BCL2 no encontramos diferencias en el grupo eCG+PGZ respecto al grupo eCG (Fig. 20E).

La activación del sistema PPARG con PGZ revirtió la alteración entre los mensajeros BAX/BCL2 observada en condiciones hiperandrogénicas.

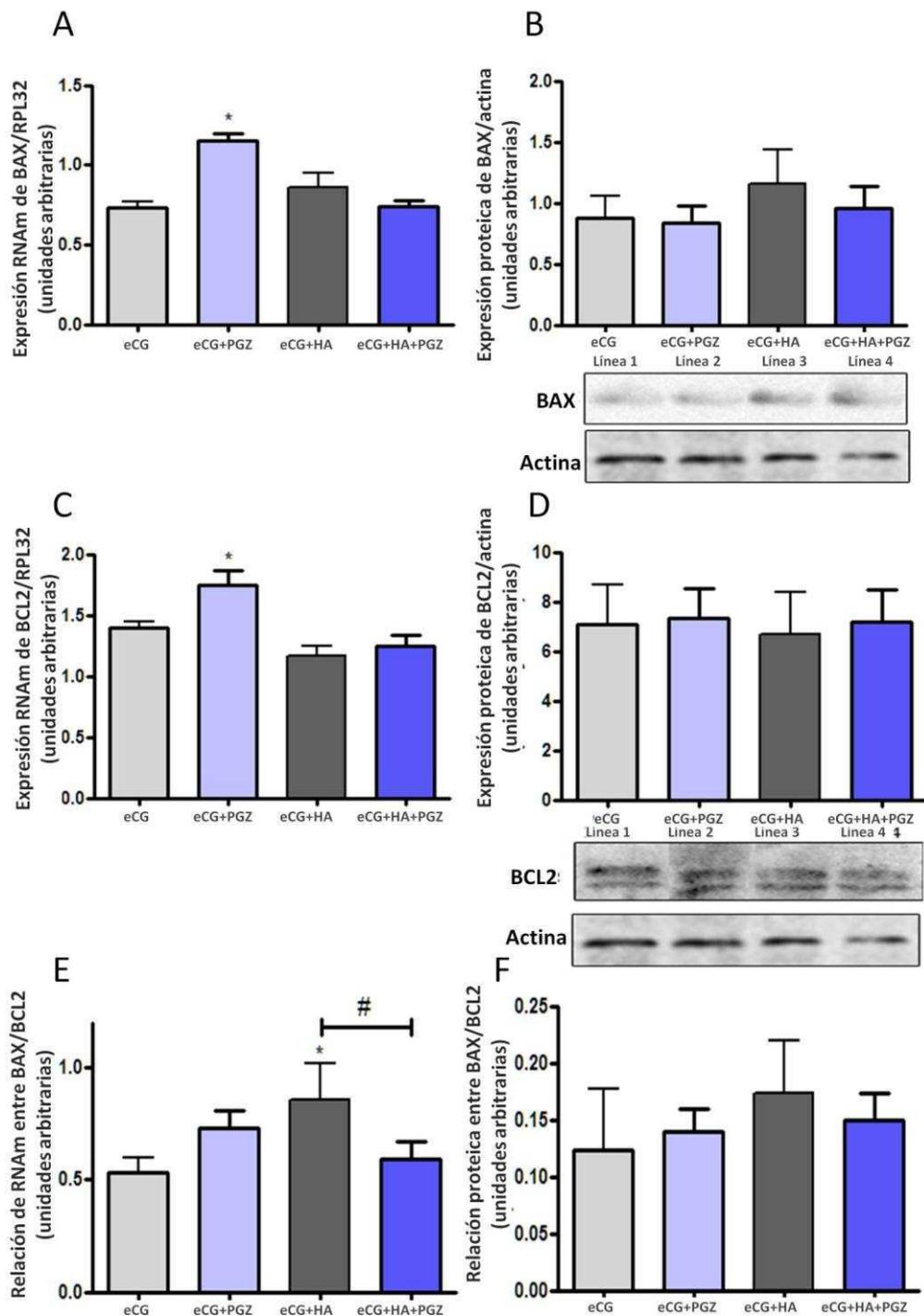


Figura 19. Efecto del hiperandrogenismo sobre la vía de la apoptosis ovárica. (A y B) Niveles relativos de ARNm y proteínas de la proteína pro apoptótica BAX, respectivamente; (C y D) Niveles relativos de ARNm y proteínas de la proteína anti apoptótica BCL2, respectivamente; (E) Relación BAX/BCL2 para ARNm y (F) proteínas. Se muestra un *Western blot* representativo para cada medición de proteínas. Cada columna representa la media \pm S.E.M. de cuatro mediciones de diferentes animales. * $p < 0.05$ vs. eCG. # $p < 0.05$ vs eCG+HA+PGZ.

5.7. Efecto de la PGZ sobre la alteración en el balance oxidativo sistémico causado por el hiperandrogenismo.

Encontramos que la PGZ (grupo eCG+HA+PGZ) evitó el aumento en los niveles de MDA observado en condiciones hiperandrogénicas (Fig. 20A). Con respecto al antioxidante GSH, la PGZ (eCG+HA+PGZ) también evitó la alteración observada en condiciones hiperandrogénicas (eCG+HA) (Fig. 20B).

No hubo un efecto *per se* de la PGZ (grupo eCG+PGZ) sobre MDA (Fig. 20A) y sobre GSH, respecto al grupo eCG (Fig. 20B).

La PGZ previno la alteración causada por la hiperandrogenización sobre el estado oxidativo, evitando el aumento en los niveles de MDA y la disminución del antioxidante GSH.

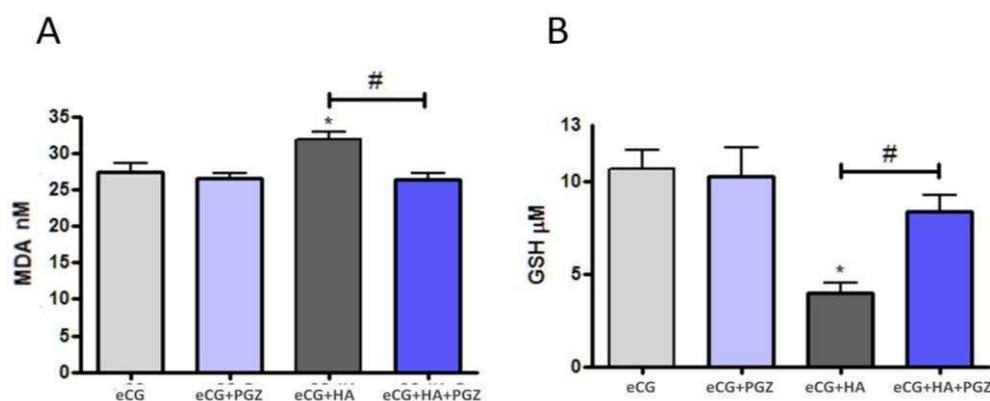
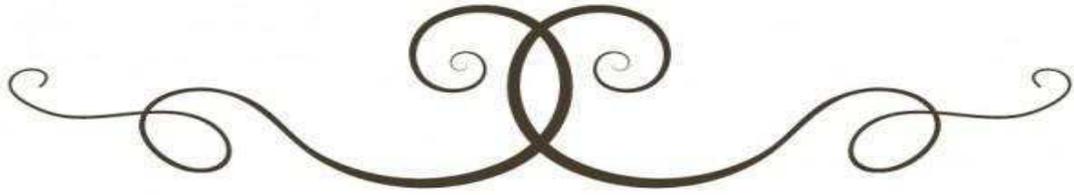


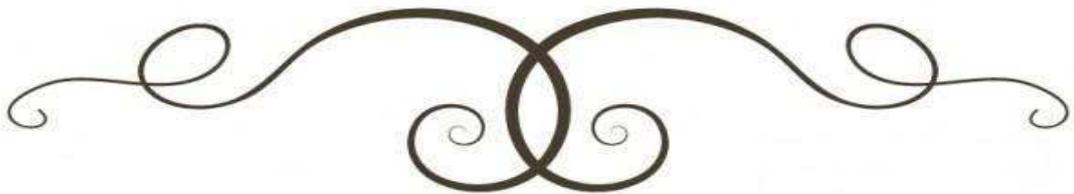
Figura 20. Efecto del hiperandrogenismo sobre el estrés oxidativo sistémico. (A) La peroxidación lipídica fue evaluada por los niveles MDA y (B) la concentración del antioxidante fue evaluada por los niveles del metabolito GSH. Cada columna representa la media \pm S.E.M. de seis mediciones de diferentes animales. * $p < 0.05$ vs. eCG. # $p < 0.05$ vs eCG+HA+PGZ

5.8. Resumen Resultados Segunda Parte

- La administración del ligando PGZ fue capaz de prevenir parcialmente las anormalidades en la morfología ovárica observadas cuando estimulamos la foliculogénesis en un ambiente hiperandrogénico.
- El ligando PGZ produjo la activación del sistema PPARG (evaluada por la expresión de PPARG, PGC1A, NcOR), evitando la regulación negativa del sistema PPARG provocada por el hiperandrogenismo.
- La activación del sistema PPARG con PGZ evitó la alteración en la esteroidogénesis ovárica y en la relación E2/T observada en condiciones hiperandrogénicas, y además la PGZ aumentó los niveles de la aromatasas, favoreciendo entonces el aumento en la relación E2/T.
- La activación del sistema PPARG evitó el establecimiento del estado pro inflamatorio observado en condiciones hiperandrogénicas, impidiendo la alteración en la expresión génica de TNFA, los niveles proteicos y génicos de COX2 y los niveles ováricos de PGE2.
- La activación del sistema PPARG previno la alteración hiperandrogénica sobre el balance oxidativo, evitando el aumento en los niveles de MDA y previniendo la disminución del antioxidante GSH.
- La activación del sistema PPARG previno parcialmente las alteraciones hiperandrogénicas sobre la vía de la apoptosis ovárica evaluada a través de BAX y BCL2.



Discusión



6. Discusión

El propósito principal de este trabajo de Tesis consistió en, por un lado, estudiar qué ocurría en las primeras etapas del desarrollo folicular en un ambiente con exceso de andrógenos, como ocurre en patologías como el SOP, poniendo énfasis en el estado del sistema PPARG y la esteroidogénesis ovárica, el estado inflamatorio, la apoptosis ovárica y el estrés oxidativo sistémico. Por otro lado, luego de describir las alteraciones por el exceso de andrógenos, investigamos el papel que juega la activación del sistema PPARG sobre esas alteraciones observadas, y si lograba impedir o modificarlas. La evidencia previa muestra que la activación de PPARG regula los niveles de andrógenos y restaura la función ovárica en desordenes hiperandrogénicos como el SOP. Para tales fines utilizamos un modelo murino de inducción de la función ovárica temprana por administración de gonadotropina coriónica equina, un agonista de FSH. En el modelo murino que empleamos, previamente en nuestro grupo de trabajo y en otros (Irusta, Parborell y col. 2003, Faut, Elia y col. 2011) observamos que luego de 8 horas post inyección de una única dosis del agonista de FSH la esteroidogénesis estaba aumentada, y tomamos ese parámetro como indicador de activación temprana de la función ovárica. Finalmente, en este trabajo de tesis y mediante el uso de este modelo (1) Describimos y analizamos histológicamente las diferentes poblaciones foliculares y la incidencia de la atresia folicular. (2) Analizamos la expresión en ovario de PPARG y de su coactivador PGC1A y del corepresor NcoR. En este trabajo nos referimos a estas 3 proteínas como integrantes clave del sistema PPARG. (3) Estudiamos en detalle la expresión en ovario de las enzimas de la esteroidogénesis y los niveles séricos de las hormonas esteroideas clave testosterona y estradiol. (4) Estudiamos el estatus inflamatorio del ovario mediante la cuantificación del marcador inflamatorio temprano TNFA y de la prostaglandina E, además de la enzima clave que sintetiza prostaglandinas, COX2. (5) Evaluamos la expresión de dos enzimas clave en la vía de la apoptosis ovárica: BCL2 y BAX. (6) Analizamos los niveles séricos de dos indicadores del balance oxidativo: glutatión y malondialdehído. A partir de estos indicadores evaluamos el estrés oxidativo.

Sobre todos estos parámetros mencionados evaluamos las alteraciones encontradas luego de generar un ambiente con exceso de andrógenos, y finalmente si la administración del agonista de PPARG pioglitazona evitaba o modificaba esas alteraciones.

6.1. Caracterización histológica del ovario, poblaciones foliculares y atresia folicular: Rol del exceso de andrógenos y la pioglitazona

Para comenzar con el análisis histológico, debemos mencionar que en ovarios de animales prepúberes y sin tratamiento alguno hay desarrollo y crecimiento activo de folículos. En roedores, por ejemplo, estudios desde la década del 1970 describen la dinámica de crecimiento folicular en animales prepúberes y en los que además se propusieron nomenclaturas para los distintos tipos de folículos (Hage, Groen-Klevant y col. 1978, Braw y Tsafriri 1980). En primates, incluyendo humanos, también durante esa década se publicaron trabajos en los que se mostraba que ya durante la etapa prenatal hay desarrollo y crecimiento folicular en el ovario (Peters, Byskov y col. 1978). Estos primeros estudios sobre la estructura y funcionamiento del ovario dieron por tierra la creencia hasta ese momento de que el ovario era un órgano “quiescente” en su etapa prepuberal. No obstante, debido a que el eje hipotálamo-hipófisis-gonadal (HHG) no está establecido, estos folículos están destinados a entrar en atresia en algún punto de su desarrollo. Particularmente hoy día sabemos que en animales prepúberes hay folículos en crecimiento desde preantrales a antrales, los cuales no se desarrollan más allá del estadio preovulatorio y entran en atresia en diferentes estadios. En estos animales se encontró que existen, aunque bajos, ciertos niveles de factores clave para el crecimiento folicular, como la hormona FSH, pero no está establecido el complejo mecanismo de ciclicidad ovárica que ocurre en la pubertad al formarse el eje HHG (Meijs-Roelofs, Uilenbroek y col. 1973). De acuerdo a lo esperado, en este trabajo de tesis encontramos en los ovarios de animales control folículos en diferentes estadios de desarrollo hasta antrales, y no observamos folículos preovulatorios. A su vez, en estos animales se encontró un alto porcentaje de folículos atrésicos. Además, se evidenció en los ovarios de estos animales cierta desorganización de las poblaciones foliculares, no distinguiéndose claramente la separación entre células de la granulosa y de la teca, resultado esperable debido a la ausencia del micro entorno adecuado que comienza a generarse en la pubertad.

Hasta hoy en día no muchos autores se enfocaron en analizar la regulación hormonal del crecimiento y desarrollo de folículos preantrales, incluyendo la activación de los folículos primordiales y desarrollo de folículos primarios y secundarios hasta el estadio antral temprano (Arendsen de Wolff-Exalto 1982, McGee y Hsueh 2000). Menos aún existen estudios de esa regulación en condiciones patológicas. Por ello en nuestro modelo, primero estimulamos el desarrollo folicular temprano mediante la administración de eCG y estudiamos la estructura y composición folicular, y encontramos que el número total de folículos fue mayor respecto al

control. Este resultado puede explicarse en gran parte por el mayor número observado de folículos primordiales luego de la administración con eCG. El mayor número de los folículos estaría relacionado al agonista de FSH utilizado, ya que aunque la presencia de FSH no sería esencial en las etapas tempranas de crecimiento folicular (la llamada “independiente de gonadotrofinas”), si sería importante en el mantenimiento cualitativo y cuantitativo de los folículos (Arendsen de Wolff-Exalto 1982, McGee, Perlas y col. 1997, McGee y Hsueh 2000). Más aun, en condiciones normales el número de folículos primordiales es máximo durante el desarrollo postnatal temprano (Peters 1969, Johnson, Canning y col. 2004), y luego ese número declina rápidamente con una pérdida masiva de folículos primordiales a causa de atresia (McGee y Hsueh 2000). En ese sentido, Allan y col. demostraron recientemente que FSH puede evitar esa pérdida masiva de folículos primordiales posiblemente vía reduciendo los niveles de atresia (Allan, Wang y col. 2006), aunque también existe la posibilidad que la FSH pueda estar implicada en el proceso de generación de folículos primordiales a partir de células germinales, ya que en mamíferos se demostró que hay renovación del “pool” folicular a partir de la diferenciación de células germinales en el ovario postnatal (Johnson, Canning y col. 2004), contrariamente al dogma establecido. Por último, no podemos descartar que en parte el alto número de folículos observados con el tratamiento con gonadotrofinas pueda deberse a que estas promovieron una mejor organización del ovario respecto al animal control, lo que permitió observar más claramente los folículos pequeños como primordiales y primarios.

A continuación evaluamos la atresia folicular a partir de folículos antrales, y encontramos que la atresia folicular también disminuyó significativamente con la administración de eCG, un resultado de acuerdo a lo esperado, ya que la FSH “rescata” folículos antrales iniciales que de lo contrario están destinados a sufrir atresia o a permanecer en estado latente (Braw y Tsafriri 1980, McGee y Hsueh 2000). Además, la administración de eCG permitió que se observe en el ovario una buena diferenciación de las poblaciones foliculares, tanto de las granulosa como de la teca, lo que favorecería la interacción granulosa-teca. A pesar de estar disminuida la atresia folicular, la administración de eCG no alteró significativamente los porcentajes de folículos primarios, secundarios o antrales, y eso se debe en gran parte a que la predominancia de folículos primordiales hace difícil la detección de diferencias significativas en los demás folículos. No obstante, la mejor organización de los ovarios de animales tratados con eCG evidenciado por la apariencia saludable de los ovarios más la baja en la atresia, sugieren cierta activación temprana de la función ovárica.

El siguiente paso fue estudiar si el exceso de andrógenos afecta la composición folicular y el estado general del ovario observado con la administración de eCG. Años atrás se sospechaba que los andrógenos aumentaban la atresia folicular (Billig, Furuta y col. 1993, Hsueh, Billig y col. 1994), pero estudios más recientes muestran por el contrario que los andrógenos tienen un efecto estimulador sobre el desarrollo folicular temprano (Vendola, Zhou y col. 1998, Yang, Zhang y col. 2010). Más aun, la evidencia actual sugiere que el incremento en la proporción de folículos que se observa en desórdenes androgénicos como el SOP ocurre durante la foliculogénesis temprana, y que el exceso de andrógenos sería el candidato de tal alteración (Webber, Stubbs y col. 2003, Maciel, Baracat y col. 2004). En este trabajo de tesis encontramos que el exceso de andrógenos no modificó los niveles de atresia observados luego de la administración de eCG, aunque sí observamos cierta desorganización en algunos folículos antrales. Además, no encontramos diferencia respecto al grupo eCG en cuanto al número de folículos totales, pero sí en cuanto al porcentaje de folículos preantrales, específicamente en lo que respecta a folículos primordiales y primarios. Este resultado concuerda con lo encontrado por otros autores, que muestran que los andrógenos no modifican la reserva total de folículos pero que sí alteran el desarrollo de los folículos preantrales (Dewailly, Robin y col. 2016). Nosotros encontramos que el porcentaje de folículos primordiales aumentó con el exceso de andrógenos. El aumento en los folículos primordiales a su vez concordó con un porcentaje menor de folículos primarios, resultado que sugiere un menor pasaje de primordiales a primarios. Esta inactivación del pasaje primordial a primario producto del exceso de andrógenos discrepa con lo descrito en algunos trabajos anteriores (Maciel, Baracat y col. 2004, Yang, Zhang y col. 2010), los cuales muestran que los andrógenos activan el pasaje de folículos primordiales a primarios y promueven la acumulación de folículos preantrales. En esos trabajos el efecto se observó a mayor tiempo de exposición de los andrógenos que en nuestro trabajo, por lo que una posible razón para explicar esta discrepancia es que en nuestro modelo el efecto de la inducción de función ovárica es muy temprano, y sería interesante observar el efecto del exceso de andrógenos sobre los folículos ováricos conforme se incrementa el tiempo de exposición. Además, ya que mencionamos que los andrógenos sensibilizan la acción de FSH aumentando sus receptores (Dewailly, Robin y col. 2016), una posibilidad es que a tiempos mayores en los cuales los folículos están sensibilizados para FSH (o su análogo eCG) estos comiencen a desarrollarse y entonces sí se observe un aumento en la proporción de folículos preantrales. Esta cuestión por lo tanto queda abierta a trabajos futuros. En resumen, nuestros resultados avalan la hipótesis de que los andrógenos son importantes moduladores del

desarrollo folicular temprano, en la etapa llamada “independiente de gonadotrofinas”, lo cual es muy discutido ya que la acción de los andrógenos sobre la foliculogénesis en esa etapa estaría mediada en parte por las gonadotrofinas, especialmente FSH (McGee y Hsueh 2000, Dewailly, Robin y col. 2016). Además, nuestros resultados evidencian una disfunción ovárica temprana producto del exceso de andrógenos, que podría explicar la disfunción ovárica crónica presente en mujeres con desórdenes hiperandrogénicos como el SOP.

En mujeres con SOP, la administración de ligandos de PPAR γ provoca una reducción en los niveles de andrógenos y además una mejora en los parámetros reproductivos y una consiguiente ovulación (Dunaif, Scott y col. 1996, Ehrmann, Schneider y col. 1997, Hasegawa, Murakawa y col. 1999, Mitwally, Kuscu y col. 1999). Debido al efecto estimulador de PPAR γ sobre la función ovárica (para una interesante revisión, ver (Minge, Robker y col. 2008)), decidimos estudiar si el ligando de PPAR γ pioglitazona administrado junto a la inducción ovárica temprana con eCG y/o el exceso de andrógenos afecta la estructura del ovario y su composición folicular, y si revierte el fenotipo observado con el exceso de andrógenos. En este trabajo encontramos que la pioglitazona previno parcialmente las alteraciones por el exceso de andrógenos en el porcentaje de folículos primordiales y primarios, ya que no hubo diferencias en esos porcentajes respecto al grupo con exceso de andrógenos ni tampoco respecto al grupo con la inducción ovárica. Este resultado indica que PPAR γ tiene un rol modulador del desarrollo folicular temprano, acorde a lo encontrado por otros autores, que mostraron que PPAR γ se expresa en las células de la granulosa de folículos en desarrollo (Froment, Fabre y col. 2003) donde cumpliría un importante rol modulador, como por ejemplo de la esteroidogénesis (Long, Sairam y col. 2009). También encontramos diferencias cualitativas, ya que observamos que la administración de pioglitazona previno la desorganización estructural observada en los folículos con el exceso de andrógenos, y no se observaron folículos con morfología anormal no atrésicos. Nuestros resultados muestran que la pioglitazona puede actuar como modulador del desarrollo temprano de folículos, y esa modulación podría estar mediada por la regulación en los niveles de andrógenos. Es importante destacar que en nuestro modelo estamos observando efectos muy tempranos durante la inducción ovárica. Más adelante ampliaremos la discusión del rol de PPAR γ y el exceso de andrógenos y la probable relación entre estos factores durante la inducción temprana de la función ovárica.

6.2. Expresión en ovario de PPARG y correguladores: efecto del exceso de andrógenos y administración del ligando Pioglitazona.

En esta etapa del trabajo nos propusimos analizar la localización de PPARG en el ovario, y además su expresión génica y proteica en el ovario. Ya que PPARG, como todo factor de transcripción, depende para su función de la presencia de correguladores, decidimos analizar también la expresión génica del coactivador PGC1A y del corepresor NcOR. Si bien existen diversos coactivadores y corepresores de factores nucleares como PPARG que forman un complejo transcripcional (Ricote y Glass 2007), elegimos a PGC1A como coactivador de PPARG por ser uno de los primeros coactivadores de PPARG descubiertos (Puigserver, Wu y col. 1998) y porque se asocia directamente a PPARG, aunque también se une a otras isoformas de PPARs (Lin, Handschin y col. 2005). Por otro lado, la elección de NcOR como corepresor se debe a que es uno de los más extensamente estudiados y para el cual se demostró una fuerte asociación con PPARG (Ricote y Glass 2007). Por lo tanto, consideramos a PPARG, PGC1A y NcOR como partes importantes del sistema transcripcional PPARG. Encontramos que PPARG localizó principalmente en las células de la granulosa de los folículos en crecimiento, y ya en animales control sin tratamiento alguno observamos la presencia de PPARG. Esto demuestra que en animales prepúberes, en los cuales hay desarrollo folicular a pesar de no estar establecido el eje HHG, la presencia de PPARG puede estar relacionada al desarrollo temprano de esos folículos, y este resultado concuerda con otros trabajos que localizan a PPARG en la granulosa de animales prepúberes (Long, Sairam y col. 2009). En este trabajo también encontramos que la localización e intensidad de PPARG no se alteró cualitativamente con la inducción de la función ovárica con eCG, y tampoco con el exceso de andrógenos. Aún mas, la administración del ligando Pioglitazona tampoco modificó el patrón de localización de PPARG.

A continuación profundizamos el estudio de PPARG en el ovario, para lo cual estudiamos tanto su expresión como la de sus correguladores PGC1A y NcOR. Encontramos que la inducción de la función ovárica con la gonadotrofina eCG aumentó tanto la expresión génica como proteica de PPARG en el ovario. Consideramos que es un resultado importante, ya que hay pocos trabajos que analicen la expresión en ovario de PPARG luego de administrar gonadotrofinas (Komar, Braissant y col. 2001). Recordamos que en nuestro trabajo la administración de gonadotrofinas aumentó el número total de folículos y que además PPARG se localizó en folículos en crecimiento, y además el mayor número de folículos coincidió con el aumento de la expresión génica y proteica de PPARG

luego de la inducción de la función ovárica. Además del aumento de PPARG, también encontramos aumentada la expresión génica del coactivador PGC1A mientras que la del corepresor NcOR disminuyó. Colectivamente, y considerando al factor nuclear PPARG formando un sistema transcripcional que depende de la presencia de ligando y de la interacción a coactivadores como PGC1A y de la liberación de correpresores como NcOR, entonces nuestros resultados estarían indicando una activación del sistema PPARG. Por esto decimos que la inducción ovárica temprana produjo una activación del sistema PPARG en ovario. Además, nuestros resultados refuerzan la idea del sistema PPARG como regulador de la función ovárica temprana.

Cuando evaluamos cómo afectó el exceso de andrógenos al sistema PPARG en ovario, encontramos que este reguló negativamente al sistema, ya que disminuyó tanto la expresión de PPARG como de PGC1A, a la vez que NcOR aumentó. Este análisis del sistema PPARG en ovario, estudiando tanto la expresión de PPARG y corre reguladores como de una enzima que sintetiza ligando endógenos para PPARG en un ambiente androgénico es un enfoque novedoso, y además muestra que existe una asociación entre el exceso de andrógenos y una regulación negativa del sistema PPARG en ovario, y de ese modo se apoya la hipótesis que postula a PPARG como posible mediador de la función ovárica cuya disrupción disminuye la fertilidad (Cui, Miyoshi y col. 2002), tal como ocurre en desordenes androgénicos como el SOP (Wood, Dumesic y col. 2007, Yildiz, Azziz y col. 2010). Debemos mencionar que la evidencia actual es en gran parte a favor de una asociación entre el exceso de andrógenos y PPARG, aunque algunos autores lo descartan. Por un lado algunos autores asocian el polimorfismo Pro12Ala en el gen de PPARG (sustitución nucleotídica que reemplaza en la proteína al aminoácido alanina por prolina) con la predisposición genética a padecer el SOP, siendo la variante Ala de PPARG protectora para el desarrollo del SOP (Korhonen, Heinonen y col. 2003, Gu y Baek 2009). Además, Qu y col. mostraron en mujeres que el hiperandrogenismo induce alteraciones epigenéticas en PPARG y NcOR de GCs del ovario, disminuyendo la expresión de PPARG y aumentando la de NcOR, y reduciendo así la actividad transcripcional de PPARG con un impacto negativo en la función ovárica en mujeres hiperandrogénicas (Qu, Wang y col. 2012). Por otro lado, Xita y col. concluyen por un estudio en mujeres hiperandrogénicas que el polimorfismo Pro12Ala de PPARG no está asociado al SOP (Xita, Lazaros y col. 2009). Finalmente, un análisis reciente y exhaustivo de la bibliografía existente concluyó que existe una asociación entre PPARG y el SOP (San-Millan y Escobar-Morreale 2010). Para concluir la evidencia a favor de la asociación entre PPARG y desordenes hiperandrogénicos, está demostrado que la administración de ligandos

de PPARG disminuye los niveles de andrógenos y mejora parámetros reproductivos en pacientes con SOP (Tuorno y Nestler 1999, Seli y Duleba 2004, Fattah, Al Mohammady y col. 2014). Previamente mencionamos que en nuestro modelo de inducción ovárica temprana el exceso de andrógenos alteró los porcentajes de folículos primordiales y primarios, coincidiendo con otros autores en otorgar un importante rol a los andrógenos sobre las primeras etapas del desarrollo folicular (Vendola, Zhou y col. 1998, Webber, Stubbs y col. 2003, Yang, Zhang y col. 2010). Además, Yoon y col. mostraron recientemente (Yoon, Eum y col. 2015) que PPARG estaría involucrado ya en la activación de folículos primordiales y su desarrollo posterior, por lo que en nuestro trabajo la alteración en el desarrollo folicular temprano producto del exceso de andrógenos podría estar mediado, al menos en parte, por la desregulación del sistema PPARG (Qu, Wang y col. 2012). De existir esta mediación, el mecanismo molecular subyacente que vincula el exceso de andrógenos y la desregulación del sistema PPARG en ovario queda pendiente de resolución, aunque se cree que el receptor de andrógenos (*androgen receptor*, AR) y la hormona FSH cumplirían un rol importante (Gleicher, Weghofer y col. 2011), al igual que el factor de diferenciación del crecimiento 9 (*growth differentiation factor 9*, GDF-9) (Chang y Cook-Andersen 2013).

Finalmente, una de las claves de nuestro trabajo fue la posibilidad de activar la expresión de PPARG y de sus correguladores en nuestro modelo de inducción de la función ovárica temprana en un ambiente con exceso de andrógenos. En nuestro trabajo de tesis encontramos que la administración de PGZ previno la regulación negativa observada con el exceso de andrógenos sobre el sistema PPARG en ovario, ya que aumentó tanto la expresión génica y proteica de PPARG, como la expresión génica del coactivador PGC1A, a la vez disminuyó la del correpressor NcOR. Aunque la activación de PPARG por PGZ es un resultado esperable (Sakamoto, Kimura y col. 2000, Zhao, Patzer y col. 2006, Wang, Li y col. 2014), nuestro trabajo es el primero que analiza no solo la activación de PPARG por PGZ en ovario y en un ambiente hiperandrogénico, sino también la expresión de correguladores de PPARG, como PGC1A y NcOR. Encontramos interesante que el efecto de PGZ sobre el sistema PPARG se observó en el tratamiento con exceso de andrógenos (eCG+HA+PGZ), pero no encontramos un efecto de PGZ *per se* sobre el sistema PPARG en ausencia de exceso de andrógenos (tratamiento eCG+PGZ). Creemos que en nuestro modelo ya con el tratamiento con gonadotrofinas (grupo eCG) hallamos una regulación positiva en la expresión de PPARG y PGC1A y negativa en la de NcOR, y que las dosis utilizadas del ligando de PPARG pioglitazona (eCG+PGZ) no alcanzaron para lograr una activación

mayor del sistema PPARG. La comprobación de esta hipótesis requerirá a futuro evaluar diferentes dosis de ligandos PGZ y su efecto en la activación del sistema PPARG.

6.3. Esteroidogénesis folicular, exceso de andrógenos y activación del sistema PPARG

Uno de los factores clave del desarrollo folicular es lo que comprende a la síntesis de hormonas esteroideas, o más conocida como la esteroidogénesis folicular. Y entre las enzimas esteroidogénicas, un paso clave en la vía lo realiza la proteína STAR, la cual permite la movilización del colesterol hacia la membrana interna de las mitocondrias para su posterior conversión en pregnenolona (Clark, Wells y col. 1994). Por eso primero analizamos la localización de StAR en el tejido ovárico. En animales control encontramos a StAR localizado en pocos folículos, con la interesante observación que la localización se observó generalmente sobre las células de la teca. Este resultado es similar a lo hallado por otros autores, en ratas prepúberes no inducidas con eCG (Ronen-Fuhrmann, Timberg y col. 1998). También se observó, en animales control, señal positiva en células intersticiales del estroma indicando la expresión de StAR. Se ha demostrado que estas células pueden producir hormonas esteroideas (Smyth, Miro y col. 1993). Estos resultados en animales control dan la idea de que en animales en edad prepuberal la esteroidogénesis es limitada, ya que esta comienza a establecerse con la aparición del eje HHG. A continuación encontramos que la administración de la gonadotrofina eCG aumentó la señal de inmunolocalización de StAR en ovario, conservándose lo observado en animales control de que la mayor localización de StAR se dio en las células de la teca de los folículos antrales. También se observó tinción en los folículos preantrales y células intersticiales. Es interesante remarcar que nuestro modelo de inducción ovárica es temprano, ya que analizamos a las 8 hs post inducción. Por lo tanto el aumento en la inmunolocalización de StAR sugiere una rápida activación de la esteroidogénesis. Esto está de acuerdo con Ronen-Fuhrmann y col., que utilizan un modelo similar (Ronen-Fuhrmann, Timberg y col. 1998). Además, se pone en evidencia la regulación espacio-temporal de la esteroidogénesis folicular y la expresión de StAR, tal como describen otros autores (Ronen-Fuhrmann, Timberg y col. 1998, Thompson, Powell y col. 1999), y provee información acerca de la interacción existente entre las diferentes poblaciones foliculares y cómo esta interacción puede dirigir la síntesis de hormonas esteroideas, ya que los andrógenos que se producen en la teca sirven de precursores para la formación de estrógenos en la granulosa (teoría de las “Dos células, dos gonadotrofinas”) (Liu y Hsueh

1986, Liu, Qiao y col. 2015). Finalmente, encontramos que ni el exceso de andrógenos ni la activación de PPAR γ modificó el patrón e intensidad de la inmunolocalización de StAR en el ovario, como tampoco lo hicieron ambos tratamientos juntos (grupo eCG+HA+PGZ).

Ya que con la inmunolocalización de StAR nos enfocamos en analizarla cualitativamente, a continuación cuantificamos la expresión de StAR y el resto de las enzimas esteroideas, y además evaluamos los niveles séricos de las hormonas esteroideas testosterona y estradiol. Encontramos que la inducción con gonadotrofinas aumentó la expresión de StAR en el ovario, pero sin modificar la expresión de las enzimas esteroidogénicas CYP17A, 3 β HSD y 17 β HSD. Esto concuerda con la idea de que la regulación de StAR es central y limitante para la esteroidogénesis, y aquí nosotros mostramos que las gonadotrofinas pueden activar la esteroidogénesis en una etapa temprana (Wood y Strauss 2002, Stocco, Wang y col. 2005). Un análisis aparte merece la expresión de la enzima aromatasa, y los niveles séricos de estradiol y testosterona. La aromatasa es la enzima responsable en convertir andrógenos en estrógenos (Stocco 2008) y la aromatasa presente en el ovario es la principal fuente de estrógenos séricos (Simpson 2003) y está regulada principalmente por FSH (Steinkampf, Mendelson y col. 1987, Simpson 2003), relacionándose directamente con la necesidad de controlar los niveles de estrógenos y andrógenos en la fase folicular del ovario (Dewailly, Robin y col. 2016). A su vez, el estradiol actúa por un mecanismo de retroalimentación (dependiendo del momento del ciclo, puede ser tanto positiva como negativa) modulando la liberación de gonadotrofinas desde la hipófisis (Messinis 2006). Todo este complejo mecanismo de control de las hormonas esteroideas y gonadotrofinas debe asegurar la ciclicidad en la función ovárica (Dewailly, Robin y col. 2016), y tal como mencionamos previamente, niveles fisiológicos de andrógenos cumplen un rol importante en el desarrollo folicular a la vez que alteraciones patológicas en el balance de andrógenos y estrógenos se asocian fuertemente con disrupciones en la función ovárica (Amato, Verghi y col. 2011, Prizant, Gleicher y col. 2014). En este trabajo de tesis encontramos que la inducción con gonadotrofinas aumentó la expresión en ovario de la aromatasa- resultado según lo esperado-, a la vez que también aumentaron los niveles séricos de estradiol y testosterona. Además, la relación estradiol/testosterona se incrementó, indicando una actividad de la aromatasa aumentada. El aumento en estradiol y testosterona con la inducción ovárica demuestra que, tal como mencionamos, ambas hormonas cumplen un rol fisiológico en el desarrollo folicular inducido por gonadotrofinas, y además está de acuerdo con el aumento encontrado aquí en la expresión de StAR, y más generalmente, un aumento en la esteroidogénesis folicular.

Seguidamente evaluamos el efecto del exceso de andrógenos sobre la esteroidogénesis folicular observada con la inducción ovárica. La evidencia previa indica que una exposición prenatal al exceso de andrógenos altera la esteroidogénesis folicular en ratas adultas derivando en hiperandrogenismo (Eisner, Barnett y col. 2002, Amalfi, Velez y col. 2012), pero en nuestro trabajo de tesis nos enfocamos en estudiar el efecto temprano y postnatal del exceso de andrógenos sobre animales en los que inducimos la función ovárica. Encontramos que el exceso de andrógenos incrementó la expresión génica de la enzima StAR, así como también las enzimas CYP17A, 3BHSD y 17BHSD. Estos resultados indican un aumento en la vía esteroidogénica producto del exceso de andrógenos. Esto podría explicarse por que, como ya lo mencionamos, los andrógenos pueden sensibilizar la acción de FSH aumentando sus receptores en ovario (Nielsen, Rasmussen y col. 2011, Dewailly, Robin y col. 2016), así amplificando su efecto incrementando la expresión de las enzimas esteroidogénicas, tanto de StAR como del resto de las enzimas de la vía, indicando un aumento generalizado de la vía esteroidogénica (Garverick, Baxter y col. 2002). Entonces el efecto del exceso de andrógenos podría ser el de sensibilizar FSH y amplificar su acción esteroidogénica (o en nuestro modelo el análogo eCG) con la consecuente sobreexpresión de las enzimas esteroidogénicas (Eimerl y Orly 2002, Irusta, Parborell y col. 2003). En cuanto a los niveles séricos de estradiol y testosterona y la expresión de la aromatasa, diversos estudios mostraron que el hiperandrogenismo ejerce una regulación negativa sobre la aromatasa (Erickson, Hsueh y col. 1979, Jakimiuk, Weitsman y col. 1998, Yang, Ruan y col. 2015). Nosotros encontramos aquí que el exceso de andrógenos junto a la inducción de la función ovárica produjo un aumento en los niveles séricos de estradiol y testosterona, y además una disminución en la relación estradiol/testosterona, indicando un hiperandrogenismo sérico. Además, el exceso de andrógenos efectivamente reguló negativamente la expresión de la aromatasa, coincidiendo con la baja en la relación estradiol/testosterona. Esto concuerda con trabajos muy recientes que demuestran que la expresión y actividad de la aromatasa está disminuida en mujeres hiperandrogénicas (Xita, Lazaros y col. 2010, Yang, Ruan y col. 2015).

Finalmente evaluamos el efecto de la activación de PPARG sobre las alteraciones en la esteroidogénesis producto del hiperandrogenismo encontradas en este trabajo. En las últimas décadas se pudo conocer que los efectos de la insulina sobre los órganos target clásicos (como tejido adiposo y musculo) pueden ser modulados por ligandos de PPARG como las glitazonas, las cuales mejoran la sensibilidad a la insulina en esos órganos (Cho, Lee y col. 2008, Minge, Robker y col. 2008). Esa mejora en la sensibilidad por activación de PPARG se traduce en una reducción de la hiperinsulinemia sistémica, y además en mujeres con SOP se

demonstró una reducción del hiperandrogenismo (Brettenthaler, De Geyter y col. 2004, Tang, Lord y col. 2012). Pero recientemente diversos trabajos en roedores y humanos reportan que la activación de PPAR γ directamente inhibe o incrementa la actividad de las enzimas esteroidogénicas (Gasic, Bodenbun y col. 1998, Gasic, Nagamani y col. 2001, Veldhuis, Zhang y col. 2002, Coffler, Patel y col. 2003, Seto-Young, Avtanski y col. 2007) y por ende alteran los niveles de hormonas sexuales. Además, se postula que la regulación de la esteroidogénesis ovárica por acción directa de PPAR γ podría estar mediada en el ovario tanto por vías alternativas de señalización independientes de la insulina (Arlt, Auchus y col. 2001, Seto-Young, Paliou y col. 2005) como por interacción directa de PPAR γ con las enzimas esteroidogénicas (Gasic, Nagamani y col. 2001, Veldhuis, Zhang y col. 2002). Por ejemplo, en cultivos *in vitro* de GCs, Gasic y col. mostraron que la activación de PPAR γ inhibió la actividad de la 3 β HSD y la liberación de P4 (Gasic, Bodenbun y col. 1998, Gasic, Nagamani y col. 2001), mientras que en cultivos *in vitro* de TCs, Veldhuis y col. mostraron que la activación de PPAR γ con ligandos sintéticos y naturales directamente revirtió el aumento en ovario de los niveles de andrógenos y la enzima CYP17A (Veldhuis, Zhang y col. 2002). Por el contrario, en cultivos *in vitro* de una mezcla de GCs y TCs, Seto-Young y col. mostraron que la activación de PPAR γ aumentó la expresión de la enzima StAR (Seto-Young, Avtanski y col. 2007). Estas diferencias entre los trabajos mencionados puede resultar tanto del uso de diferentes tipos celulares *in vitro*, del estadio de diferenciación celular estudiada y tiempo de exposición de los tratamientos. Aún así el efecto directo de la activación de PPAR γ en un modelo *in vivo* sobre la esteroidogénesis temprana alterada producto del exceso de andrógenos no había sido estudiado. Nosotros en este trabajo encontramos que la activación de PPAR γ evitó la regulación positiva del hiperandrogenismo sobre las enzimas esteroidogénicas StAR, CYP17A, 3 β HSD y 17 β HSD. Nuestros resultados entonces muestran los efectos directos y tempranos de la activación de PPAR γ en la esteroidogénesis ovárica alterada por el hiperandrogenismo, efectos que participarían en modelos de hiperandrogenismo (o en pacientes con SOP) a largo plazo junto a los efectos de PPAR γ como sensibilizante de la insulina sistémica, en el restablecimiento de la función ovárica (Seto-Young, Paliou y col. 2005). Para finalizar el análisis de la esteroidogénesis, en este trabajo de tesis encontramos que la activación de PPAR γ no solo redujo la expresión de las enzimas esteroidogénicas sino que también redujo los niveles de los andrógenos sistémicos junto a un aumento en los niveles de estradiol, evitando las alteraciones hormonales hiperandrogénicas. Además, la activación de PPAR γ aumentó la expresión de la aromatasas, así como también la relación estradiol/testosterona, indicando una actividad

aromatasa a favor del estradiol y restableciendo el balance entre estas dos hormonas claves. Con respecto a esto debemos mencionar algunos estudios con resultados contrarios respecto a la acción de PPARG sobre la aromatasa, ya que Komar y col. mostraron en cultivos *in vitro* de GCs que la activación de PPARG tanto por ligandos naturales como sintéticos aumentó la síntesis de estradiol, sugiriendo un aumento de la aromatasa (Komar, Braissant y col. 2001), mientras que Mu y col. mostraron también en cultivos *in vitro* de GCs que la activación de PPARG directamente inhibió la actividad de la aromatasa (Mu, Yanase y col. 2000). Nuestros resultados avalan la hipótesis de Komar y col. (Komar, Braissant y col. 2001). Acá debemos mencionar que nuestro modelo de estudio resulta novedoso, ya que utilizamos un modelo *in vivo* y evaluamos el rol de la activación de PPARG sobre la expresión de las enzimas esteroideas, incluyendo a la aromatasa, en condiciones hiperandrogénicas y en un modelo temprano de función ovárica.

Por último, el hecho que la activación del sistema PPARG solo modificó la expresión de las enzimas esteroideas y las hormonas testosterona y estradiol en un contexto hiperandrogénico (el grupo eCG+HA+PGZ) sugiere que el sistema PPARG podría actuar como un regulador transcripcional, restableciendo diversos parámetros cuando son alterados por el hiperandrogenismo.

6.4. Marcadores inflamatorios y de la apoptosis en ovario, exceso de andrógenos y activación del sistema PPARG

La inflamación es un proceso biológico que media en los tejidos diversos efectos como la vasodilatación, hiperemia, edema, colagenólisis y proliferación celular a través de vías inmunológicas complejas. Con respecto al rol de la inflamación en el ovario, esta cumple roles fisiológicos esenciales y bien documentados durante la foliculogénesis y la ovulación (Armstrong y Grinwich 1972, Espey 1980, Armstrong 1981, Duffy y Stouffer 2001, Clancy, Baerwald y col. 2013, Boots y Jungheim 2015), es más, el proceso de ovulación es considerado una reacción inflamatoria (Espey 1980, Espey 1994, Boots y Jungheim 2015). Por otro lado, los procesos inflamatorios también están involucrados en numerosas patologías, y condiciones pro inflamatorias pueden impactar negativamente en la dinámica folicular del ovario (Kulbe, Thompson y col. 2007, Gonzalez, Rote y col. 2009, Repaci, Gambineri y col. 2011, Xiong, Liang y col. 2011, Gonzalez 2012, Gonzalez, Nair y col. 2012, Nteeba, Ganesan y col. 2014). Más específicamente, una expresión temprana de marcadores

inflamatorios en el ovario puede inducir un flujo prematuro de leucocitos que resulta en alteraciones en la maduración folicular y por consiguiente en la ovulación, como ocurre en desordenes androgénicos como el SOP (Schmidt, Weijdegard y col. 2014, Boots y Jungheim 2015). Entre los marcadores inflamatorios más importantes del ovario se encuentran el factor TNFA y la enzima COX2, así como los productos de la función enzimática de COX2, las prostaglandinas (Behrman 1979, Kaipia, Chun y col. 1996, Murdoch, Colgin y col. 1997, Terranova 1997, Morrison y Marcinkiewicz 2002, Sirois, Sayasith y col. 2004). TNFA ejerce un rol regulador de la apoptosis ovárica y atresia folicular (Kaipia, Chun y col. 1996, Morrison y Marcinkiewicz 2002), y durante la ovulación cumpliría un rol clave en facilitar la ruptura de la pared ovárica (Murdoch, Colgin y col. 1997, Terranova 1997). A su vez, la expresión de COX2 en el ovario y la síntesis de prostaglandinas ocurre tardíamente durante la foliculogénesis, y su expresión está regulada por gonadotrofinas (Duffy y Stouffer 2001, Sirois, Sayasith y col. 2004), aunque en condiciones normales COX2 está controlado principalmente por el pico de la gonadotrofina LH, y su rol clave en la ovulación es evidente según se desprende de estudios realizados desde la década de 1970 hasta la actualidad (Armstrong y Grinwich 1972, Behrman 1979, Armstrong 1981, Duffy y Stouffer 2001, Sirois, Sayasith y col. 2004). Además, consideramos también la expresión de la enzima 12-LOX, la cual cataliza la síntesis del ácido 12-hidroxicicosatetraenoico (12-HETE), un conocido ligando endógeno de PPARG (Limor, Sharon y col. 2008), y que se considera que antagoniza la respuesta inflamatoria y contrarresta el efecto pro inflamatorio (Conrad 1999). En este trabajo de tesis encontramos que la inducción con la gonadotrofina eCG produjo una reducción en la expresión de TNFA en el ovario, concordando con la disminución en la atresia folicular encontrada y ya descrita anteriormente. Esto sugiere que la reducción en la atresia folicular producto de la inducción con gonadotrofinas podría ocurrir al menos en parte por la regulación negativa que ejerce FSH sobre TNFA. Diversos trabajos sostienen que la FSH antagoniza la función de TNFA, y viceversa (Emoto y Baird 1988, Darbon, Oury y col. 1989, Montgomery Rice, Limback y col. 1999, Glistler, Hatzirodos y col. 2014). Con respecto a COX2 y la prostaglandina PGE2, encontramos que la inducción con gonadotrofinas aumentó la expresión ambas en el ovario. Dado que la eCG utilizada tiene cierta analogía y funcionalidad con LH (Combarous, Guillou y col. 1984, Practice Committee of American Society for Reproductive Medicine 2008) es esperable que el aumento en COX2 (y consecuentemente PGE2) pueda explicarse por la acción de esta gonadotrofina mediada por la vía de LH, ya que el control de la expresión de COX2 recae en gran parte en LH (Duffy y Stouffer 2001, Sirois, Sayasith y col. 2004). Este aumento no sería

suficiente para impactar negativamente en la funcionalidad ovárica temprana (Racowsky 1991). Por último, no encontramos diferencia en la expresión de la enzima 12-LOX, lo que sugiere que la inducción con gonadotrofinas no regula la expresión de la 12-LOX, o al menos no lo hace a tiempos tan tempranos como el de nuestro modelo. Además, esto podría indicar que la concentración de los ligandos endógenos 12- y 15-LOX no se vio modificada por la administración de gonadotrofinas. A continuación, y debido al vínculo que existe entre marcadores inflamatorios y la apoptosis folicular (Haanen y Vermees 1995, Kaipia, Chun y col. 1996, Murdoch, Colgin y col. 1997, Morrison y Marcinkiewicz 2002, Rock y Kono 2008), analizamos la expresión en el ovario de la enzima anti apoptótica BCL2 y la pro apoptótica BAX, y evaluamos el balance existente entre ellas. En condiciones fisiológicas de un organismo adulto en edad reproductiva, y a pesar de que en el tejido ovárico constitutivamente ocurre muerte celular, el balance es a favor de la expresión de la anti apoptótica BCL2 (Marone, Scambia y col. 1998). Nosotros encontramos en este trabajo que la inducción con gonadotrofinas reguló negativamente la expresión de BAX y de forma positiva la de BCL2, y consecuentemente el balance BAX/BCL2 disminuyó respecto al control, indicando una disminución en la apoptosis folicular. Esta reducción en la apoptosis correlaciona con la disminución en la atresia folicular luego de la inducción con gonadotrofinas, y además está de acuerdo con evidencia previa que muestra que la inducción ovárica con gonadotrofinas disminuye tanto la apoptosis y la atresia folicular (Braw y Tsafiriri 1980, Tilly, Tilly y col. 1995). Es importante remarcar que la apoptosis folicular es el mecanismo subyacente detrás de la atresia folicular (Hughes y Gorospe 1991, Manabe, Goto y col. 2004). Para finalizar el análisis del efecto de la inducción ovárica sobre los marcadores inflamatorios y apoptosis en el ovario, proponemos que la inducción con gonadotrofinas disminuyó la apoptosis/atresia folicular de forma indirecta a través de una regulación negativa en la expresión de TNFA (Kaipia, Chun y col. 1996, Morrison y Marcinkiewicz 2002). En nuestro modelo de inducción temprana de la función ovárica, bajos niveles de marcadores pro inflamatorios y de la apoptosis son esperables e indicadores de una buena funcionalidad ovárica (Braw y Tsafiriri 1980, Boots y Jungheim 2015).

Los desórdenes androgénicos como el SOP están fuertemente asociados con un estado de inflamación crónica (Gonzalez, Rote y col. 2009, Repaci, Gambineri y col. 2011, Xiong, Liang y col. 2011, Gonzalez 2012, Gonzalez, Nair y col. 2012) y con una desregulación del mecanismo de apoptosis folicular, que impactan negativamente en la foliculogénesis (Anderson y Lee 1997, Zhang, Zhu y col. 2007, Bas, Abramovich y col. 2011, Ding, Gao y col. 2016). Además ya mencionamos que la inflamación y la apoptosis son dos mecanismos

fisiológicos que ocurren en la foliculogénesis normal (Hsueh, Billig y col. 1994, Boots y Jungheim 2015), y ambos mecanismos están vinculados entre sí (Haanen y Vermes 1995, Rock y Kono 2008). Encontramos en este trabajo que el exceso de andrógenos aumentó tanto los niveles de TNFA como de COX2 y la PGE2, indicando el establecimiento de un ambiente pro-inflamatorio en el ovario, al igual que ocurre en desórdenes androgénicos como el SOP y modelos animales de exceso de andrógenos (Escobar-Morreale, Calvo y col. 2001, Peral, San Millan y col. 2002, Karimzadeh, Nabiuni y col. 2013, Shahnazi, Zaree y col. 2015). Además, los niveles de expresión de la 12-LOX también fueron menores, y ya mencionamos que los productos de esta enzima tendrían un efecto anti inflamatorio, por lo que este resultado reafirma el establecimiento de un estado pro inflamatorio en el ovario de animales hiperandrogenizados. También la baja expresión de la 12-LOX coincide con la desregulación del sistema PPARG y con bajos niveles de ligandos endógenos. Aunque el mecanismo molecular subyacente entre el hiperandrogenismo y el aumento de marcadores inflamatorios no está dilucidado, una posibilidad es que el exceso de andrógenos produzca una sensibilización de las células inmunes del ovario que desemboca en una mayor liberación de TNFA en el tejido ovárico, con el consiguiente aumento de la inflamación (Araya, Aguirre y col. 2002, Gonzalez, Nair y col. 2012). Además, nuestros resultados apoyan la hipótesis de que es necesario una baja respuesta inflamatoria (excepto en el período que comprende al proceso de ovulación) para una buena funcionalidad ovárica, y teniendo en cuenta las alteraciones encontradas en la histología folicular sugerimos que la desregulación en la inflamación debido al exceso de andrógenos participaría de las alteraciones foliculares encontradas en este trabajo. Más aún, la desregulación del sistema PPARG producto del hiperandrogenismo también impactaría negativamente en la funcionalidad ovárica. Con respecto a la apoptosis ovárica, encontramos que el exceso de andrógenos aumentó la relación en la expresión génica de BAX/BCL2, indicando una apoptosis ovárica aumentada, aunque sin modificar significativamente los niveles proteicos de BAX y BCL2. Este resultado concuerda con el aumento encontrado en TNFA descrito más arriba, ya que se ha mostrado que TNFA aumenta la apoptosis folicular mediada por BAX (Kaipia, Chun y col. 1996, Morrison y Marcinkiewicz 2002). Colectivamente, proponemos que el exceso de andrógenos impactó negativamente en el ovario estableciendo un estado pro-inflamatorio, el cual a su vez produjo una desregulación en la apoptosis del ovario. Todas esas alteraciones impactan negativamente y participan de las alteraciones observadas en la histología folicular.

Con respecto al rol de la activación del sistema PPARG y su efecto sobre la inflamación, recordamos que existe una correlación negativa entre PPARG y marcadores

inflamatorios, que se hace evidente durante el proceso de la ovulación, en el cual hay un aumento de los marcadores inflamatorios y una disminución del sistema PPARG (Terranova 1997, Komar 2005). Ya que PPARG puede regular directamente la expresión génica de COX2 (Meade, McIntyre y col. 1999) y de TNFA en el ovario (Chen, Sun y col. 2009, Rezvanfar, Ahmadi y col. 2012), entonces decidimos analizar si en nuestro modelo de foliculogénesis y exceso de andrógenos la activación del sistema PPARG previene las alteraciones en el estatus inflamatorio del ovario. En este trabajo encontramos que la activación del sistema PPARG previno tanto las alteraciones en TNFA, COX2 y la PGE2 observada en condiciones hiperandrogénicas, revirtiendo el estado pro-inflamatorio ovárico establecido por el exceso de andrógenos. Por otro lado, la activación del sistema PPARG no modificó los bajos niveles de expresión de la enzima 12-LOX observada en condiciones hiperandrogénicas, por lo que la participación de la 12-LOX en ovario no sería relevante durante la activación de PPARG en nuestro modelo. De esa forma nuestros resultados fortalecen la hipótesis de que el sistema PPARG cumple un rol importante en la regulación de la funcionalidad ovárica a través de la inhibición de marcadores pro-inflamatorios. Acerca de la vinculación entre PPARG y el mecanismo de apoptosis, diversos trabajos muestran que el sistema PPARG puede inhibir o aumentar la apoptosis en diferentes órganos y condiciones (Harris y Phipps 2001, Yang y Frucht 2001, Butts, Tran y col. 2004, Ren, Sun y col. 2009), pero hasta ahora no se había evaluado la activación del sistema PPARG y su efecto sobre la apoptosis alterada por el exceso de andrógenos. Nosotros encontramos en este trabajo que la activación del sistema PPARG revirtió la alteración en el balance BAX/BCL2 obtenida con el exceso de andrógenos, de esa forma evitando el aumento en la apoptosis producto del hiperandrogenismo. Cabe agregar que un trabajo relativamente reciente demostró que PPARG puede actuar directamente a nivel del promotor de BCL2 aumentando sus niveles y reduciendo la apoptosis (Butts, Tran y col. 2004).

6.5. Estrés oxidativo sistémico, exceso de andrógenos y activación del sistema PPARG

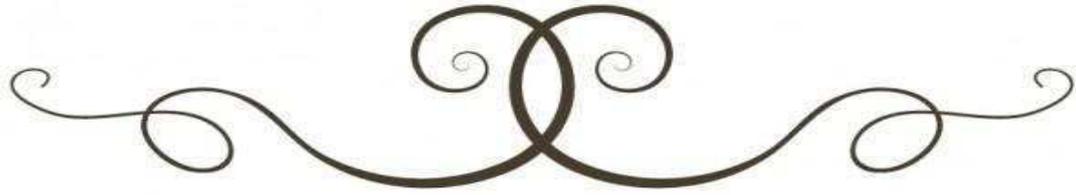
Hasta ahora nos enfocamos en estudiar y analizar la dinámica folicular y diversos parámetros de la funcionalidad ovárica, el efecto del exceso de los andrógenos sobre esa funcionalidad, y por último evaluamos el rol de la activación de PPARG en ovario. Ahora, en esta última parte nos abocamos a estudiar cómo afecta el exceso de andrógenos y la activación de PPARG a un parámetro sistémico como lo es el estrés oxidativo (EO), debido

a la vinculación que existe entre el EO y eventos reproductivos adversos (Ruder, Hartman y col. 2009, Al-Gubory, Fowler y col. 2010, Chattopadhyay, Ganesh y col. 2010, Curti, Jacob y col. 2011, Blair, Kyaw-Tun y col. 2013, Murri, Luque-Ramirez y col. 2013, Paine, Ruder y col. 2013, Harley, Gupta y col. 2015, Papalou, Victor y col. 2016). Particularmente, existen hipótesis que postulan que el EO circulante podría estar involucrado en la etiología de los desórdenes androgénicos como el SOP (Murri, Luque-Ramirez y col. 2013, Papalou, Victor y col. 2016). Es por eso que evaluamos el EO por medio de un indicador de la peroxidación lipídica como son los niveles circulantes de MDA (Draper y Hadley 1990, Janero 1990), y como respuesta celular antioxidante los niveles circulantes de GSH (Tietze 1969, Mari, Morales y col. 2009). Nosotros encontramos en primer lugar que la inducción de la función ovárica con gonadotrofinas no alteró los niveles tanto de MDA como de GSH, con lo que la inducción ovárica temprana no alteró el balance oxidativo. Ya que mencionamos que un EO sistémico tendría efectos adversos en la función reproductiva, esperamos que un estimulador de la función ovárica como la eCG no altere el balance entre oxidantes/antioxidantes, aunque hay que mencionar que niveles fisiológicos tanto de oxidantes como de antioxidantes cumplen un rol importante en la función reproductiva normal (Agarwal, Gupta y col. 2005).

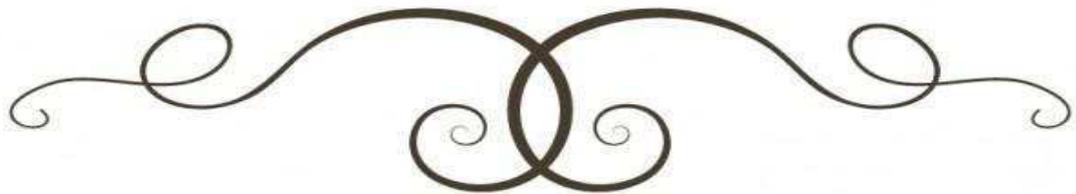
A continuación encontramos que el exceso de andrógenos estableció un estado de EO sistémico, ya que los niveles de MDA aumentaron en tanto los de GSH disminuyeron. Entonces a partir de este resultado nos surge la pregunta: ¿De dónde proviene el EO sistémico producto del exceso de andrógenos? Esa respuesta parecería estar en la inducción por parte del hiperandrogenismo de la producción de especies reactivas del oxígeno en las células mono nucleares de la sangre (Gonzalez, Rote y col. 2006) y leucocitos (Victor, Rocha y col. 2011, Victor, Rocha y col. 2014). Además, en mujeres con SOP la adiposidad abdominal cumpliría un rol importante en la generación del EO sistémico (Furukawa, Fujita y col. 2004), y no se puede descartar el aporte al EO sistémico por parte de otros tejidos claves como el muscular (Pansarasa, D'Antona y col. 2002). En cualquier caso, la cuestión del origen del EO sistémico en nuestro modelo trasciende este trabajo, pero es importante remarcar en nuestro estudio el efecto temprano en la generación del ambiente EO por parte del exceso de andrógenos. Además, el exceso de andrógenos y el EO sistémico están asociados al establecimiento de un estado pro-inflamatorio general (Morgan y Liu 2011, Duleba y Dokras 2012), los cuales impactan negativamente sobre el balance metabólico y particularmente sobre las funciones reproductivas (Repaci, Gambineri y col. 2011, Xiong, Liang y col. 2011, Rezvanfar, Ahmadi y col. 2012, Blair, Kyaw-Tun y col. 2013, Clancy, Baerwald y col. 2013, Nteeba, Ganesan y col. 2014, Zuo, Zhu y col. 2016). Por último,

nuestros resultados sobre el EO sistémico evidenciado por MDA y GSH concuerda con lo esperado, ya que según un estudio retrospectivo reciente, alteraciones en los niveles tanto de MDA como de GSH ocurre frecuentemente en mujeres hiperandrogénicas (Murri, Luque-Ramirez y col. 2013), provocado en gran parte por una producción excesiva de radicales libres pro oxidantes que desemboca en un EO sistémico (Papalou, Victor y col. 2016). Creemos que el establecimiento de este estado de EO producto del exceso de andrógenos podría contribuir a una disminución general de la función reproductiva en nuestro modelo de estudio.

Por último evaluamos el efecto de la activación de PPARG sobre el EO sistémico generado por el exceso de andrógenos. La evidencia previa indica que la activación de PPARG atenúa el EO en diferentes modelos (Ren, Sun y col. 2009, Rezvanfar, Ahmadi y col. 2012, Taguchi, Okada y col. 2012, Wang, Li y col. 2014). Es más, se indica que PPARG ejerce un rol anti oxidante y anti inflamatorio sistémico (Polvani, Tarocchi y col. 2012). Nosotros encontramos en este trabajo que la activación de PPARG revirtió los niveles de MDA y GSH observado con el exceso de andrógenos, restableciendo el balance de oxidantes/antioxidantes. Una posibilidad para explicar este resultado es que la activación de PPARG puede revertir el EO sistémico producto de una desregulación en las células del sistema inmune, ya que por ejemplo bajos niveles de PPARG en células mono nucleares se vincula a una desregulación en la generación de especies reactivas (Macias-Gonzalez, Cardona y col. 2008), y la activación de PPARG tendría efectos beneficiosos sistémicos no solo por su acción en el sistema inmune sino también en diferentes tejidos claves como el adiposo, el muscular y el páncreas (Ahmadian, Suh y col. 2013). A su vez, no podemos dejar de mencionar que en el complejo mecanismo de la regulación entre oxidantes y antioxidantes participan muchos otros factores además de MDA y GSH (Betteridge 2000), cuya evaluación trasciende este trabajo. Aun así, nuestros resultados evidencian como la activación de PPARG puede normalizar parámetros sistémicos como el EO evaluado por MDA y GSH, y de esa forma impactar no solo en la función ovárica sino en una mejora en general de la función reproductiva.



Conclusiones



7. Conclusiones

- En nuestro modelo de estudio encontramos que la exposición muy temprana a un exceso de andrógenos (8 hs) afectó tanto la calidad de los folículos como la composición de los tipos foliculares. Cuando administramos el exceso de andrógenos conjuntamente con el ligando de PPAR γ , Pioglitazona, se evitó parcialmente tanto las alteraciones en la calidad como en la composición folicular.

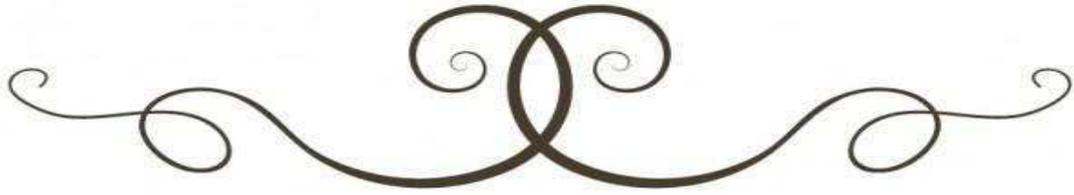
- La exposición temprana al exceso de andrógenos reguló negativamente al sistema PPAR γ (niveles de PPAR γ , su coactivador PGC1A, el correpresor NcoR). La administración del ligando Pioglitazona bloqueó esa regulación negativa sobre el sistema PPAR γ , activándolo.

- La exposición temprana al exceso de andrógenos sobreexpresó a las enzimas de la vía esteroidogénica. La activación del sistema PPAR γ evitó este efecto. Más aún, el exceso de andrógenos disminuyó la relación estradiol/testosterona, remarcando el establecimiento de un estado hiperandrogénico. Este aumento se dio junto a una disminución de la enzima aromatasas ovárica, con lo cual además se refuerza la idea de un hiperandrogenismo intra-ovárico. La activación del sistema PPAR γ no solo evitó el establecimiento del estado hiperandrogénico sistémico sino que además restituyó los niveles de la aromatasas ovárica, sugiriendo una reversión del estado hiperandrogénico intra-ovárico.

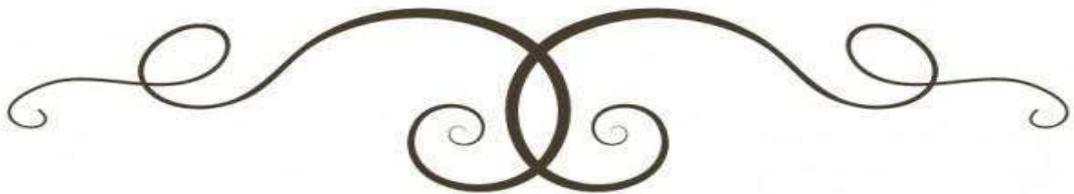
- El establecimiento de un estado hiperandrogénico llevó a un estado pro-inflamatorio en el ovario, y a una desregulación en el mecanismo de la apoptosis ovárica. Ambas alteraciones, tanto la inflamación como la apoptosis, podrían estar vinculadas a través del factor de necrosis tumoral TNF α , el cual se encontró aumentado en condiciones hiperandrogénicas. La activación del sistema PPAR γ revirtió el estado pro-inflamatorio ovárico y parcialmente las alteraciones en el mecanismo de la apoptosis, y más aún, revirtió el efecto sobre TNF α .

- A nivel sistémico, el hiperandrogenismo indujo estado de EO. La activación del sistema PPAR γ evitó el desbalance oxidativo producto del hiperandrogenismo.

En conclusión, nuestros resultados evidencian la presencia de un mecanismo complejo de interacción entre el sistema PPAR γ y los principales reguladores de la función ovárica durante la foliculogénesis temprana. A su vez que muestran como el hiperandrogenismo produce alteraciones en esa interacción y como la activación del sistema PPAR γ puede revertir esas alteraciones.



Referencias



8. Referencias

- Adashi, E. Y., C. E. Resnick, C. S. Croft y D. W. Payne (1989). "Tumor necrosis factor alpha inhibits gonadotropin hormonal action in nontransformed ovarian granulosa cells. A modulatory noncytotoxic property." J Biol Chem **264**(20): 11591-11597.
- Agarwal, A., S. Gupta y R. K. Sharma (2005). "Role of oxidative stress in female reproduction." Reprod Biol Endocrinol **3**: 28.
- Aggarwal, B. B., S. C. Gupta y J. H. Kim (2012). "Historical perspectives on tumor necrosis factor and its superfamily: 25 years later, a golden journey." Blood **119**(3): 651-665.
- Ahmadian, M., J. M. Suh, N. Hah, C. Liddle, A. R. Atkins, M. Downes y R. M. Evans (2013). "PPARgamma signaling and metabolism: the good, the bad and the future." Nat Med **19**(5): 557-566.
- Al-Gubory, K. H., P. A. Fowler y C. Garrel (2010). "The roles of cellular reactive oxygen species, oxidative stress and antioxidants in pregnancy outcomes." Int J Biochem Cell Biol **42**(10): 1634-1650.
- Allan, C. M., Y. Wang, M. Jimenez, B. Marshan, J. Spaliviero, P. Illingworth y D. J. Handelsman (2006). "Follicle-stimulating hormone increases primordial follicle reserve in mature female hypogonadal mice." J Endocrinol **188**(3): 549-557.
- Amalfi, S., L. M. Velez, M. F. Heber, S. Vighi, S. R. Ferreira, A. V. Orozco, O. Pignataro y A. B. Motta (2012). "Prenatal hyperandrogenization induces metabolic and endocrine alterations which depend on the levels of testosterone exposure." PLoS One **7**(5): e37658.
- Amato, M. C., M. Verghi, M. Nucera, A. Galluzzo y C. Giordano (2011). "Low estradiol-to-testosterone ratio is associated with oligo-anovulatory cycles and atherogenic lipidic pattern in women with polycystic ovary syndrome." Gynecol Endocrinol **27**(8): 579-586.
- Andersen, C. Y. y D. Ezcurra (2014). "Human steroidogenesis: implications for controlled ovarian stimulation with exogenous gonadotropins." Reproductive Biology and Endocrinology **12**(1): 128.
- Anderson, E. y G. Y. Lee (1997). "The polycystic ovarian (PCO) condition: apoptosis and epithelialization of the ovarian antral follicles are aspects of cystogenesis in the dehydroepiandrosterone (DHEA)-treated rat model." Tissue Cell **29**(2): 171-189.
- Anderson, R., T. K. Copeland, H. Scholer, J. Heasman y C. Wylie (2000). "The onset of germ cell migration in the mouse embryo." Mech Dev **91**(1-2): 61-68.
- Apter, D., T. Butzow, G. A. Laughlin y S. S. Yen (1994). "Accelerated 24-hour luteinizing hormone pulsatile activity in adolescent girls with ovarian hyperandrogenism: relevance to the developmental phase of polycystic ovarian syndrome." J Clin Endocrinol Metab **79**(1): 119-125.
- Araya, A. V., A. Aguirre, C. Romero, C. Miranda, M. C. Molina y A. Ferreira (2002). "Evaluation of tumor necrosis factor alpha production in ex vivo short term cultured whole blood from women with polycystic ovary syndrome." Eur Cytokine Netw **13**(4): 419-424.

Arendsen de Wolff-Exalto, E. (1982). "Influence of gonadotrophins on early follicle cell development and early oocyte growth in the immature rat." J Reprod Fertil **66**(2): 537-542.

Arlt, W., R. J. Auchus y W. L. Miller (2001). "Thiazolidinediones but not metformin directly inhibit the steroidogenic enzymes P450c17 and 3beta -hydroxysteroid dehydrogenase." J Biol Chem **276**(20): 16767-16771.

Armstrong, D. T. (1981). "Prostaglandins and follicular functions." J Reprod Fertil **62**(1): 283-291.

Armstrong, D. T. y D. L. Grinwich (1972). "Blockade of spontaneous and LH-induced ovulation in rats by indomethacin, an inhibitor of prostaglandin biosynthesis. I." Prostaglandins **1**(1): 21-28.

Azziz, R., E. Carmina, D. Dewailly, E. Diamanti-Kandarakis, H. F. Escobar-Morreale, W. Futterweit, O. E. Janssen, R. S. Legro, R. J. Norman, A. E. Taylor, S. F. Witchel, E. Task Force on the Phenotype of the Polycystic Ovary Syndrome of The Androgen y P. Society (2009). "The Androgen Excess and PCOS Society criteria for the polycystic ovary syndrome: the complete task force report." Fertil Steril **91**(2): 456-488.

Azziz, R., D. Ehrmann, R. S. Legro, R. W. Whitcomb, R. Hanley, A. G. Fereshetian, M. O'Keefe, M. N. Ghazzi y P. C. T. S. Group (2001). "Troglitazone improves ovulation and hirsutism in the polycystic ovary syndrome: a multicenter, double blind, placebo-controlled trial." J Clin Endocrinol Metab **86**(4): 1626-1632.

Barak, Y., M. C. Nelson, E. S. Ong, Y. Z. Jones, P. Ruiz-Lozano, K. R. Chien, A. Koder y R. M. Evans (1999). "PPAR gamma is required for placental, cardiac, and adipose tissue development." Mol Cell **4**(4): 585-595.

Bas, D., D. Abramovich, F. Hernandez y M. Tesone (2011). "Altered expression of Bcl-2 and Bax in follicles within dehydroepiandrosterone-induced polycystic ovaries in rats." Cell Biol Int **35**(5): 423-429.

Bauminger, A. y H. R. Lindner (1975). "Perioovulatory changes in ovarian prostaglandin formation and their hormonal control in the rat." Prostaglandins **9**(5): 737-751.

Behrman, H. R. (1979). "Prostaglandins in hypothalamo-pituitary and ovarian function." Annu Rev Physiol **41**: 685-700.

Behrman, H. R., P. H. Kodaman, S. L. Preston y S. Gao (2001). "Oxidative stress and the ovary." J Soc Gynecol Investig **8**(1 Suppl Proceedings): S40-42.

Betteridge, D. J. (2000). "What is oxidative stress?" Metabolism **49**(2 Suppl 1): 3-8.

Billig, H., I. Furuta y A. J. Hsueh (1993). "Estrogens inhibit and androgens enhance ovarian granulosa cell apoptosis." Endocrinology **133**(5): 2204-2212.

Blair, S. A., T. Kyaw-Tun, I. S. Young, N. A. Phelan, J. Gibney y J. McEneny (2013). "Oxidative stress and inflammation in lean and obese subjects with polycystic ovary syndrome." J Reprod Med **58**(3-4): 107-114.

Boots, C. E. y E. S. Jungheim (2015). "Inflammation and Human Ovarian Follicular Dynamics." Semin Reprod Med **33**(4): 270-275.

Bozdog, G., S. Mumusoglu, D. Zengin, E. Karabulut y B. O. Yildiz (2016). "The prevalence and phenotypic features of polycystic ovary syndrome: a systematic review and meta-analysis." Hum Reprod.

Bradford, M. M. (1976). "A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding." Anal Biochem **72**: 248-254.

Brannstrom, M., N. Bonello, L. J. Wang y R. J. Norman (1995). "Effects of tumour necrosis factor alpha (TNF alpha) on ovulation in the rat ovary." Reprod Fertil Dev **7**(1): 67-73.

Brannstrom, M., L. Wang y R. J. Norman (1993). "Effects of cytokines on prostaglandin production and steroidogenesis of incubated preovulatory follicles of the rat." Biol Reprod **48**(1): 165-171.

Brash, A. R. (1999). "Lipoxygenases: occurrence, functions, catalysis, and acquisition of substrate." J Biol Chem **274**(34): 23679-23682.

Braw, R. H. y A. Tsafiri (1980). "Effect of PMSG on follicular atresia in the immature rat ovary." J Reprod Fertil **59**(2): 267-272.

Brettenthaler, N., C. De Geyter, P. R. Huber y U. Keller (2004). "Effect of the insulin sensitizer pioglitazone on insulin resistance, hyperandrogenism, and ovulatory dysfunction in women with polycystic ovary syndrome." J Clin Endocrinol Metab **89**(8): 3835-3840.

Broughton, K. S., D. C. Rule, Y. Ye, X. Zhang, M. Driscoll y B. Culver (2009). "Dietary omega-3 fatty acids differentially influence ova release and ovarian cyclooxygenase-1 and cyclooxygenase-2 expression in rats." Nutr Res **29**(3): 197-205.

Buege, J. A. y S. D. Aust (1978). "Microsomal lipid peroxidation." Methods Enzymol **52**: 302-310.

Burton, G. J. y E. Jauniaux (2011). "Oxidative stress." Best Pract Res Clin Obstet Gynaecol **25**(3): 287-299.

Butler, W. R. (1998). "Review: effect of protein nutrition on ovarian and uterine physiology in dairy cattle." J Dairy Sci **81**(9): 2533-2539.

Butts, B. D., N. L. Tran y M. M. Briehl (2004). "Identification of a functional peroxisome proliferator activated receptor response element in the 3' untranslated region of the human bcl-2 gene." Int J Oncol **24**(5): 1305-1310.

Carmina, E. (2006). "Ovarian and adrenal hyperandrogenism." Ann N Y Acad Sci **1092**: 130-137.

Catteau-Jonard, S. y D. Dewailly (2013). "Pathophysiology of polycystic ovary syndrome: the role of hyperandrogenism." Front Horm Res **40**: 22-27.

Celinski, K., T. Dworzanski, R. Fornal, A. Korolczuk, A. Madro y M. Slomka (2012). "Comparison of the anti-inflammatory and therapeutic actions of PPAR-gamma agonists rosiglitazone and troglitazone in experimental colitis." J Physiol Pharmacol **63**(6): 631-640.

Cindrova-Davies, T., H. W. Yung, J. Johns, O. Spasic-Boskovic, S. Korolchuk, E. Jauniaux, G. J. Burton y D. S. Charnock-Jones (2007). "Oxidative stress, gene expression, and protein changes induced in the human placenta during labor." Am J Pathol **171**(4): 1168-1179.

Clancy, K. B., A. R. Baerwald y R. A. Pierson (2013). "Systemic inflammation is associated with ovarian follicular dynamics during the human menstrual cycle." PLoS One **8**(5): e64807.

Clark, B. J., J. Wells, S. R. King y D. M. Stocco (1994). "The purification, cloning, and expression of a novel luteinizing hormone-induced mitochondrial protein in MA-10 mouse Leydig tumor cells. Characterization of the steroidogenic acute regulatory protein (StAR)." J Biol Chem **269**(45): 28314-28322.

Coffler, M. S., K. Patel, M. H. Dahan, R. Y. Yoo, P. J. Malcom y R. J. Chang (2003). "Enhanced granulosa cell responsiveness to follicle-stimulating hormone during insulin infusion in women with polycystic ovary syndrome treated with pioglitazone." J Clin Endocrinol Metab **88**(12): 5624-5631.

Combarrous, Y., F. Guillou, N. Martinat y C. Cahoreau (1984). "[Origin of the FSH + LH double activity of equine chorionic gonadotropin (eCG/PMSG)]." Ann Endocrinol (Paris) **45**(4-5): 261-268.

Conneely, O. M., B. Mulac-Jericevic, F. DeMayo, J. P. Lydon y B. W. O'Malley (2002). "Reproductive functions of progesterone receptors." Recent Prog Horm Res **57**: 339-355.

Conrad, D. J. (1999). "The arachidonate 12/15 lipoxygenases. A review of tissue expression and biologic function." Clin Rev Allergy Immunol **17**(1-2): 71-89.

Corbett, J. V. y V. Akin (1994). "Prostaglandins: a variety of uses for clinical practice." MCN Am J Matern Child Nurs **19**(2): 128.

Couzinet, B., N. Le Strat, A. Ulmann, E. E. Baulieu y G. Schaison (1986). "Termination of early pregnancy by the progesterone antagonist RU 486 (Mifepristone)." N Engl J Med **315**(25): 1565-1570.

Cui, Y., K. Miyoshi, E. Claudio, U. K. Siebenlist, F. J. Gonzalez, J. Flaws, K. U. Wagner y L. Hennighausen (2002). "Loss of the peroxisome proliferation-activated receptor gamma (PPARgamma) does not affect mammary development and propensity for tumor formation but leads to reduced fertility." J Biol Chem **277**(20): 17830-17835.

Curti, M. L., P. Jacob, M. C. Borges, M. M. Rogero y S. R. Ferreira (2011). "Studies of gene variants related to inflammation, oxidative stress, dyslipidemia, and obesity: implications for a nutrigenetic approach." J Obes **2011**: 497401.

Chan, K. A., M. W. Tsoulis y D. M. Sloboda (2015). "Early-life nutritional effects on the female reproductive system." J Endocrinol **224**(2): R45-62.

Chandrasekharan, N. V., H. Dai, K. L. Roos, N. K. Evanson, J. Tomsik, T. S. Elton y D. L. Simmons (2002). "COX-3, a cyclooxygenase-1 variant inhibited by acetaminophen and other analgesic/antipyretic drugs: cloning, structure, and expression." Proc Natl Acad Sci U S A **99**(21): 13926-13931.

- Chang, H. M., C. Klausen y P. C. Leung (2013). "Antimullerian hormone inhibits follicle-stimulating hormone-induced adenylyl cyclase activation, aromatase expression, and estradiol production in human granulosa-lutein cells." Fertil Steril **100**(2): 585-592 e581.
- Chang, R. J. y H. Cook-Andersen (2013). "Disordered follicle development." Mol Cell Endocrinol **373**(1-2): 51-60.
- Chang, R. J., L. R. Laufer, D. R. Meldrum, J. DeFazio, J. K. Lu, W. W. Vale, J. E. Rivier y H. L. Judd (1983). "Steroid secretion in polycystic ovarian disease after ovarian suppression by a long-acting gonadotropin-releasing hormone agonist." J Clin Endocrinol Metab **56**(5): 897-903.
- Chattopadhyay, R., A. Ganesh, J. Samanta, S. K. Jana, B. N. Chakravarty y K. Chaudhury (2010). "Effect of follicular fluid oxidative stress on meiotic spindle formation in infertile women with polycystic ovarian syndrome." Gynecol Obstet Invest **69**(3): 197-202.
- Chen, G. y D. V. Goeddel (2002). "TNF-R1 signaling: a beautiful pathway." Science **296**(5573): 1634-1635.
- Chen, Q., X. Sun, J. Chen, L. Cheng, J. Wang, Y. Wang y Z. Sun (2009). "Direct rosiglitazone action on steroidogenesis and proinflammatory factor production in human granulosa-lutein cells." Reprod Biol Endocrinol **7**: 147.
- Cho, M. C., K. Lee, S. G. Paik y D. Y. Yoon (2008). "Peroxisome Proliferators-Activated Receptor (PPAR) Modulators and Metabolic Disorders." PPAR Res **2008**: 679137.
- Choi, J. H., A. S. Banks, J. L. Estall, S. Kajimura, P. Bostrom, D. Laznik, J. L. Ruas, M. J. Chalmers, T. M. Kamenecka, M. Bluher, P. R. Griffin y B. M. Spiegelman (2010). "Anti-diabetic drugs inhibit obesity-linked phosphorylation of PPARgamma by Cdk5." Nature **466**(7305): 451-456.
- Chu, W. M. (2013). "Tumor necrosis factor." Cancer Lett **328**(2): 222-225.
- Dagna, L., A. Corti, S. Langheim, B. Guglielmi, F. D. Cobelli, C. Doglioni, G. Fragasso, M. G. Sabbadini y M. Ferrarini (2012). "Tumor Necrosis Factor α As a Master Regulator of Inflammation in Erdheim-Chester Disease: Rationale for the Treatment of Patients With Infliximab." Journal of Clinical Oncology **30**(28): e286-e290.
- Dailey, L. A. y P. Imming (1999). "12-Lipoxygenase: classification, possible therapeutic benefits from inhibition, and inhibitors." Curr Med Chem **6**(5): 389-398.
- Darbon, J. M., F. Oury, J. Laredo y F. Bayard (1989). "Tumor necrosis factor-alpha inhibits follicle-stimulating hormone-induced differentiation in cultured rat granulosa cells." Biochem Biophys Res Commun **163**(2): 1038-1046.
- Davis, B. J., D. E. Lennard, C. A. Lee, H. F. Tian, S. G. Morham, W. C. Wetsel y R. Langenbach (1999). "Anovulation in cyclooxygenase-2-deficient mice is restored by prostaglandin E2 and interleukin-1beta." Endocrinology **140**(6): 2685-2695.
- Dewailly, D., S. Catteau-Jonard, A. C. Reyss, C. Maunoury-Lefebvre, E. Poncelet y P. Pigny (2007). "The excess in 2-5 mm follicles seen at ovarian ultrasonography is tightly associated to the follicular arrest of the polycystic ovary syndrome." Hum Reprod **22**(6): 1562-1566.

- Dewailly, D., G. Robin, M. Peigne, C. Decanter, P. Pigny y S. Catteau-Jonard (2016). "Interactions between androgens, FSH, anti-Mullerian hormone and estradiol during folliculogenesis in the human normal and polycystic ovary." Hum Reprod Update **22**(6): 709-724.
- Diamanti-Kandarakis, E. y F. Economou (2006). "Stress in women: metabolic syndrome and polycystic ovary syndrome." Ann N Y Acad Sci **1083**: 54-62.
- Ding, L., F. Gao, M. Zhang, W. Yan, R. Tang, C. Zhang y Z. J. Chen (2016). "Higher PDCD4 expression is associated with obesity, insulin resistance, lipid metabolism disorders, and granulosa cell apoptosis in polycystic ovary syndrome." Fertil Steril **105**(5): 1330-1337 e1333.
- Dinger, Y., T. Akcay, T. Erdem, E. Ilker Saygili y S. Gundogdu (2005). "DNA damage, DNA susceptibility to oxidation and glutathione level in women with polycystic ovary syndrome." Scand J Clin Lab Invest **65**(8): 721-728.
- Downey, B. R., J. E. Mootoo y S. E. Doyle (1998). "A role for lipoxygenase metabolites of arachidonic acid in porcine ovulation." Anim Reprod Sci **49**(4): 269-279.
- Downs, S. M. y F. J. Longo (1983). "Prostaglandins and preovulatory follicular maturation in mice." J Exp Zool **228**(1): 99-108.
- Draper, H. H. y M. Hadley (1990). "Malondialdehyde determination as index of lipid peroxidation." Methods Enzymol **186**: 421-431.
- Duffy, D. M. y R. L. Stouffer (2001). "The ovulatory gonadotrophin surge stimulates cyclooxygenase expression and prostaglandin production by the monkey follicle." Mol Hum Reprod **7**(8): 731-739.
- Duleba, A. J. y A. Dokras (2012). "Is PCOS an inflammatory process?" Fertil Steril **97**(1): 7-12.
- Dunaif, A., D. Scott, D. Finegood, B. Quintana y R. Whitcomb (1996). "The insulin-sensitizing agent troglitazone improves metabolic and reproductive abnormalities in the polycystic ovary syndrome." J Clin Endocrinol Metab **81**(9): 3299-3306.
- Dupont, J., M. Reverchon, L. Cloix, P. Froment y C. Rame (2012). "Involvement of adipokines, AMPK, PI3K and the PPAR signaling pathways in ovarian follicle development and cancer." Int J Dev Biol **56**(10-12): 959-967.
- Edson, M. A., A. K. Nagaraja y M. M. Matzuk (2009). "The mammalian ovary from genesis to revelation." Endocr Rev **30**(6): 624-712.
- Ehrmann, D. A. (2005). "Polycystic Ovary Syndrome." New England Journal of Medicine **352**(12): 1223-1236.
- Ehrmann, D. A., D. J. Schneider, B. E. Sobel, M. K. Cavaghan, J. Imperial, R. L. Rosenfield y K. S. Polonsky (1997). "Troglitazone improves defects in insulin action, insulin secretion, ovarian steroidogenesis, and fibrinolysis in women with polycystic ovary syndrome." J Clin Endocrinol Metab **82**(7): 2108-2116.

Eimerl, S. y J. Orly (2002). "Regulation of steroidogenic genes by insulin-like growth factor-1 and follicle-stimulating hormone: differential responses of cytochrome P450 side-chain cleavage, steroidogenic acute regulatory protein, and 3beta-hydroxysteroid dehydrogenase/isomerase in rat granulosa cells." Biol Reprod **67**.

Eisner, J. R., M. A. Barnett, D. A. Dumesic y D. H. Abbott (2002). "Ovarian hyperandrogenism in adult female rhesus monkeys exposed to prenatal androgen excess." Fertil Steril **77**(1): 167-172.

Elia, E., V. Sander, C. G. Luchetti, M. E. Solano, G. Di Girolamo, C. Gonzalez y A. B. Motta (2006). "The mechanisms involved in the action of metformin in regulating ovarian function in hyperandrogenized mice." Mol Hum Reprod **12**(8): 475-481.

Emoto, N. y A. Baird (1988). "The effect of tumor necrosis factor/cachectin on follicle-stimulating hormone-induced aromatase activity in cultured rat granulosa cells." Biochem Biophys Res Commun **153**(2): 792-798.

Eppig, J. J. (2001). "Oocyte control of ovarian follicular development and function in mammals." Reproduction **122**(6): 829-838.

Erickson, G. F., A. J. Hsueh, M. E. Quigley, R. W. Rebar y S. S. Yen (1979). "Functional studies of aromatase activity in human granulosa cells from normal and polycystic ovaries." J Clin Endocrinol Metab **49**(4): 514-519.

Escobar-Morreale, H. F., R. M. Calvo, J. Sancho y J. L. San Millan (2001). "TNF-alpha and hyperandrogenism: a clinical, biochemical, and molecular genetic study." J Clin Endocrinol Metab **86**(8): 3761-3767.

Espey, L. L. (1980). "Ovulation as an inflammatory reaction--a hypothesis." Biol Reprod **22**(1): 73-106.

Espey, L. L. (1994). "Current status of the hypothesis that mammalian ovulation is comparable to an inflammatory reaction." Biol Reprod **50**(2): 233-238.

Evans, R. M., G. D. Barish y Y. X. Wang (2004). "PPARs and the complex journey to obesity." Nat Med **10**(4): 355-361.

Fattah, G. A., M. Al Mohammady y D. A. Hamed (2014). "Combined pioglitazone-metformin and clomiphene citrate versus metformin and clomiphene citrate in induction of ovulation in women with clomiphene citrate-resistant polycystic ovary syndrome." Middle East Fertility Society Journal **19**(1): 27-33.

Faut, M., E. M. Elia, F. Parborell, N. M. Cugnata, M. Tesone y A. B. Motta (2011). "Peroxisome proliferator-activated receptor gamma and early folliculogenesis during an acute hyperandrogenism condition." Fertil Steril **95**(1): 333-337.

Fedorcsak, P., M. Raki y R. Storeng (2007). "Characterization and depletion of leukocytes from cells isolated from the pre-ovulatory ovarian follicle." Hum Reprod **22**(4): 989-994.

Fenkci, V., S. Fenkci, M. Yilmazer y M. Serteser (2003). "Decreased total antioxidant status and increased oxidative stress in women with polycystic ovary syndrome may contribute to the risk of cardiovascular disease." Fertil Steril **80**(1): 123-127.

- Findlay, J. K. (1993). "An update on the roles of inhibin, activin, and follistatin as local regulators of folliculogenesis." Biol Reprod **48**(1): 15-23.
- Fowler, R. E. y R. G. Edwards (1957). "Induction of superovulation and pregnancy in mature mice by gonadotrophins." J Endocrinol **15**(4): 374-384.
- Froment, P., S. Fabre, J. Dupont, C. Pisselet, D. Chesneau, B. Staels y P. Monget (2003). "Expression and functional role of peroxisome proliferator-activated receptor-gamma in ovarian folliculogenesis in the sheep." Biol Reprod **69**(5): 1665-1674.
- Froment, P., F. Gizard, D. Defever, B. Staels, J. Dupont y P. Monget (2006). "Peroxisome proliferator-activated receptors in reproductive tissues: from gametogenesis to parturition." J Endocrinol **189**(2): 199-209.
- Funk, C. D. (2001). "Prostaglandins and leukotrienes: advances in eicosanoid biology." Science **294**(5548): 1871-1875.
- Furukawa, S., T. Fujita, M. Shimabukuro, M. Iwaki, Y. Yamada, Y. Nakajima, O. Nakayama, M. Makishima, M. Matsuda y I. Shimomura (2004). "Increased oxidative stress in obesity and its impact on metabolic syndrome." J Clin Invest **114**(12): 1752-1761.
- Garverick, H. A., G. Baxter, J. Gong, D. G. Armstrong, B. K. Campbell, C. G. Gutierrez y R. Webb (2002). "Regulation of expression of ovarian mRNA encoding steroidogenic enzymes and gonadotrophin receptors by FSH and GH in hypogonadotrophic cattle." Reproduction **123**(5): 651-661.
- Gasic, S., Y. Bodenburg, M. Nagamani, A. Green y R. J. Urban (1998). "Troglitazone inhibits progesterone production in porcine granulosa cells." Endocrinology **139**(12): 4962-4966.
- Gasic, S., M. Nagamani, A. Green y R. J. Urban (2001). "Troglitazone is a competitive inhibitor of 3beta-hydroxysteroid dehydrogenase enzyme in the ovary." Am J Obstet Gynecol **184**(4): 575-579.
- Gervasio, C. G., M. P. Bernuci, M. F. Silva-de-Sa y E. S. A. C. Rosa (2014). "The role of androgen hormones in early follicular development." ISRN Obstet Gynecol **2014**: 818010.
- Ginsburg, M., M. H. Snow y A. McLaren (1990). "Primordial germ cells in the mouse embryo during gastrulation." Development **110**(2): 521-528.
- Gleicher, N., A. Weghofer y D. H. Barad (2011). "The role of androgens in follicle maturation and ovulation induction: friend or foe of infertility treatment?" Reprod Biol Endocrinol **9**: 116.
- Glister, C., N. Hatzirodos, K. Hummitzsch, P. G. Knight y R. J. Rodgers (2014). "The global effect of follicle-stimulating hormone and tumour necrosis factor alpha on gene expression in cultured bovine ovarian granulosa cells." BMC Genomics **15**: 72.
- Gonzalez, F. (2012). "Inflammation in Polycystic Ovary Syndrome: underpinning of insulin resistance and ovarian dysfunction." Steroids **77**(4): 300-305.
- Gonzalez, F., K. S. Nair, J. K. Daniels, E. Basal y J. M. Schimke (2012). "Hyperandrogenism sensitizes mononuclear cells to promote glucose-induced

inflammation in lean reproductive-age women." Am J Physiol Endocrinol Metab **302**(3): E297-306.

Gonzalez, F., N. S. Rote, J. Minium y J. P. Kirwan (2006). "Reactive oxygen species-induced oxidative stress in the development of insulin resistance and hyperandrogenism in polycystic ovary syndrome." J Clin Endocrinol Metab **91**(1): 336-340.

Gonzalez, F., N. S. Rote, J. Minium y J. P. Kirwan (2009). "Evidence of proatherogenic inflammation in polycystic ovary syndrome." Metabolism **58**(7): 954-962.

Gu, B. H. y K. H. Baek (2009). "Pro12Ala and His447His polymorphisms of PPAR-gamma are associated with polycystic ovary syndrome." Reprod Biomed Online **18**(5): 644-650.

Guo, A. M., X. Liu, Z. Al-Wahab, K. R. Maddipati, R. Ali-Fehmi, A. G. Scicli y A. R. Munkarah (2011). "Role of 12-lipoxygenase in regulation of ovarian cancer cell proliferation and survival." Cancer Chemother Pharmacol **68**(5): 1273-1283.

Gupta, S., A. Agarwal, N. Krajcir y J. G. Alvarez (2006). "Role of oxidative stress in endometriosis." Reprod Biomed Online **13**(1): 126-134.

Haanen, C. y I. Vermes (1995). "Apoptosis and inflammation." Mediators Inflamm **4**(1): 5-15.

Hage, A. J., A. C. Groen-Klevant y R. Welschen (1978). "Follicle growth in the immature rat ovary." Acta Endocrinol (Copenh) **88**(2): 375-382.

Hampton, J. H., M. Manikkam, D. B. Lubahn, M. F. Smith y H. A. Garverick (2004). "Androgen receptor mRNA expression in the bovine ovary." Domest Anim Endocrinol **27**(1): 81-88.

Haning, R. V., Jr., J. J. Hua, R. J. Hackett, C. A. Wheeler, G. N. Frishman, D. B. Seifer, C. A. Dahl y H. G. Burger (1994). "Dehydroepiandrosterone sulfate and anovulation increase serum inhibin and affect follicular function during administration of gonadotropins." J Clin Endocrinol Metab **78**(1): 145-149.

Harley, A., S. Gupta y A. Agarwal (2015). "Targeting oxidative stress to treat endometriosis." Expert Opin Ther Targets **19**(11): 1447-1464.

Harris, S. G. y R. P. Phipps (2001). "The nuclear receptor PPAR gamma is expressed by mouse T lymphocytes and PPAR gamma agonists induce apoptosis." Eur J Immunol **31**(4): 1098-1105.

Hasegawa, I., H. Murakawa, M. Suzuki, Y. Yamamoto, T. Kurabayashi y K. Tanaka (1999). "Effect of troglitazone on endocrine and ovulatory performance in women with insulin resistance-related polycystic ovary syndrome." Fertil Steril **71**(2): 323-327.

Henmi, H., T. Endo, K. Nagasawa, T. Hayashi, M. Chida, N. Akutagawa, M. Iwasaki, Y. Kitajima, T. Kiya, A. Nishikawa, K. Manase y R. Kudo (2001). "Lysyl oxidase and MMP-2 expression in dehydroepiandrosterone-induced polycystic ovary in rats." Biol Reprod **64**(1): 157-162.

- Hill, J. W., J. K. Elmquist y C. F. Elias (2008). "Hypothalamic pathways linking energy balance and reproduction." Am J Physiol Endocrinol Metab **294**(5): E827-832.
- Hillier, S. G., P. F. Whitelaw y C. D. Smyth (1994). "Follicular oestrogen synthesis: the 'two-cell, two-gonadotrophin' model revisited." Mol Cell Endocrinol **100**(1-2): 51-54.
- Hirshfield, A. N. (1989). "Granulosa cell proliferation in very small follicles of cycling rats studied by long-term continuous tritiated-thymidine infusion." Biol Reprod **41**(2): 309-316.
- Hoang, Y. D., B. N. Nakamura y U. Luderer (2009). "Follicle-stimulating hormone and estradiol interact to stimulate glutathione synthesis in rat ovarian follicles and granulosa cells." Biol Reprod **81**(4): 636-646.
- Hsu, S. Y., R. J. Lai, M. Finegold y A. J. Hsueh (1996). "Targeted overexpression of Bcl-2 in ovaries of transgenic mice leads to decreased follicle apoptosis, enhanced folliculogenesis, and increased germ cell tumorigenesis." Endocrinology **137**(11): 4837-4843.
- Hsueh, A. J., H. Billig y A. Tsafiriri (1994). "Ovarian follicle atresia: a hormonally controlled apoptotic process." Endocr Rev **15**(6): 707-724.
- Hsueh, A. J., K. Kawamura, Y. Cheng y B. C. Fauser (2015). "Intraovarian control of early folliculogenesis." Endocr Rev **36**(1): 1-24.
- Huang, J. C. (2008). "The role of peroxisome proliferator-activated receptors in the development and physiology of gametes and preimplantation embryos." PPAR Res **2008**: 732303.
- Hudson, P., M. John, R. Crawford, J. Haralambidis, D. Scanlon, J. Gorman, G. Tregear, J. Shine y H. Niall (1984). "Relaxin gene expression in human ovaries and the predicted structure of a human preprorelaxin by analysis of cDNA clones." EMBO J **3**(10): 2333-2339.
- Hughes, F. M., Jr. y W. C. Gorospe (1991). "Biochemical identification of apoptosis (programmed cell death) in granulosa cells: evidence for a potential mechanism underlying follicular atresia." Endocrinology **129**(5): 2415-2422.
- Hussein, M. R. (2005). "Apoptosis in the ovary: molecular mechanisms." Hum Reprod Update **11**(2): 162-177.
- Inhorn, M. C. y P. Patrizio (2015). "Infertility around the globe: new thinking on gender, reproductive technologies and global movements in the 21st century." Hum Reprod Update **21**(4): 411-426.
- Irusta, G., F. Parborell, M. Peluffo, P. R. Manna, S. I. Gonzalez-Calvar, R. Calandra, D. M. Stocco y M. Tesone (2003). "Steroidogenic acute regulatory protein in ovarian follicles of gonadotropin-stimulated rats is regulated by a gonadotropin-releasing hormone agonist." Biol Reprod **68**(5): 1577-1583.
- Issemann, I. y S. Green (1990). "Activation of a member of the steroid hormone receptor superfamily by peroxisome proliferators." Nature **347**(6294): 645-650.

Iuorno, M. J. y J. E. Nestler (1999). "The polycystic ovary syndrome: treatment with insulin sensitizing agents." Diabetes Obes Metab **1**(3): 127-136.

Jabbour, H. N. y K. J. Sales (2004). "Prostaglandin receptor signalling and function in human endometrial pathology." Trends Endocrinol Metab **15**(8): 398-404.

Jagarlamudi, K. y A. Rajkovic (2012). "Oogenesis: transcriptional regulators and mouse models." Mol Cell Endocrinol **356**(1-2): 31-39.

Jakimiuk, A. J., S. R. Weitsman, P. R. Brzechffa y D. A. Magoffin (1998). "Aromatase mRNA expression in individual follicles from polycystic ovaries." Mol Hum Reprod **4**(1): 1-8.

Jakimiuk, A. J., S. R. Weitsman, A. Navab y D. A. Magoffin (2001). "Luteinizing hormone receptor, steroidogenesis acute regulatory protein, and steroidogenic enzyme messenger ribonucleic acids are overexpressed in thecal and granulosa cells from polycystic ovaries." J Clin Endocrinol Metab **86**(3): 1318-1323.

Jamnongjit, M. y S. R. Hammes (2006). "Ovarian steroids: the good, the bad, and the signals that raise them." Cell Cycle **5**(11): 1178-1183.

Janero, D. R. (1990). "Malondialdehyde and thiobarbituric acid-reactivity as diagnostic indices of lipid peroxidation and peroxidative tissue injury." Free Radic Biol Med **9**(6): 515-540.

Johnson, J., J. Canning, T. Kaneko, J. K. Pru y J. L. Tilly (2004). "Germline stem cells and follicular renewal in the postnatal mammalian ovary." Nature **428**(6979): 145-150.

Jonard, S. y D. Dewailly (2004). "The follicular excess in polycystic ovaries, due to intra-ovarian hyperandrogenism, may be the main culprit for the follicular arrest." Hum Reprod Update **10**(2): 107-117.

Kaipia, A., S. Y. Chun, K. Eisenhauer y A. J. Hsueh (1996). "Tumor necrosis factor-alpha and its second messenger, ceramide, stimulate apoptosis in cultured ovarian follicles." Endocrinology **137**(11): 4864-4870.

Kaipia, A. y A. J. Hsueh (1997). "Regulation of ovarian follicle atresia." Annu Rev Physiol **59**: 349-363.

Karimzadeh, L., M. Nabiuni, H. M. Kouchesfehiani, H. Adham, A. Bagheri y A. Sheikholeslami (2013). "Effect of bee venom on IL-6, COX-2 and VEGF levels in polycystic ovarian syndrome induced in Wistar rats by estradiol valerate." J Venom Anim Toxins Incl Trop Dis **19**(1): 32.

Kennedy, T. G., C. Gillio-Meina y S. H. Phang (2007). "Prostaglandins and the initiation of blastocyst implantation and decidualization." Reproduction **134**(5): 635-643.

Knudsen, J. F., A. Costoff y V. B. Mahesh (1975). "Dehydroepiandrosterone-induced polycystic ovaries and acyclicity in the rat." Fertil Steril **26**(8): 807-817.

Komar, C. M. (2005). "Peroxisome proliferator-activated receptors (PPARs) and ovarian function--implications for regulating steroidogenesis, differentiation, and tissue remodeling." Reprod Biol Endocrinol **3**: 41.

Komar, C. M., O. Braissant, W. Wahli y T. E. Curry, Jr. (2001). "Expression and localization of PPARs in the rat ovary during follicular development and the periovulatory period." Endocrinology **142**(11): 4831-4838.

Komar, C. M. y T. E. Curry, Jr. (2002). "Localization and expression of messenger RNAs for the peroxisome proliferator-activated receptors in ovarian tissue from naturally cycling and pseudopregnant rats." Biol Reprod **66**(5): 1531-1539.

Kono, T., G. Ahn, D. R. Moss, L. Gann, A. Zarain-Herzberg, Y. Nishiki, P. T. Fueger, T. Ogihara y C. Evans-Molina (2012). "PPAR-gamma activation restores pancreatic islet SERCA2 levels and prevents beta-cell dysfunction under conditions of hyperglycemic and cytokine stress." Mol Endocrinol **26**(2): 257-271.

Koo, Y. A., S. Y. Shin, B. K. Yoon y D. Choi (2007). "Pioglitazone for treating polycystic ovary syndrome in non-obese women of reproductive age with different clinical presentations." Gynecol Endocrinol **23**(8): 461-467.

Korhonen, S., S. Heinonen, M. Hiltunen, S. Helisalmi, M. Hippelainen, R. Koivunen, J. S. Tapanainen y M. Laakso (2003). "Polymorphism in the peroxisome proliferator-activated receptor-gamma gene in women with polycystic ovary syndrome." Hum Reprod **18**(3): 540-543.

Kronenberg, H. M. (2009). Williams : tratado de endocrinología, Elsevier Science Health Science Division.

Kugu, K., V. S. Ratts, G. N. Piquette, K. I. Tilly, X. J. Tao, S. Martimbeau, G. W. Aberdeen, S. Krajewski, J. C. Reed, G. J. Pepe, E. D. Albrecht y J. L. Tilly (1998). "Analysis of apoptosis and expression of bcl-2 gene family members in the human and baboon ovary." Cell Death Differ **5**(1): 67-76.

Kulbe, H., R. Thompson, J. L. Wilson, S. Robinson, T. Hagemann, R. Fatah, D. Gould, A. Ayhan y F. Balkwill (2007). "The inflammatory cytokine tumor necrosis factor-alpha generates an autocrine tumor-promoting network in epithelial ovarian cancer cells." Cancer Res **67**(2): 585-592.

Kurusu, S., M. Jinno, H. Ehara, T. Yonezawa y M. Kawaminami (2009). "Inhibition of ovulation by a lipoxygenase inhibitor involves reduced cyclooxygenase-2 expression and prostaglandin E2 production in gonadotropin-primed immature rats." Reproduction **137**(1): 59-66.

KuşÇU, N. K. y A. Var (2009). "Oxidative stress but not endothelial dysfunction exists in non-obese, young group of patients with polycystic ovary syndrome." Acta Obstetrica et Gynecologica Scandinavica **88**(5): 612-617.

Laloraya, M., K. G. Pradeep y M. M. Laloraya (1988). "Changes in the levels of superoxide anion radical and superoxide dismutase during the estrous cycle of *Rattus norvegicus* and induction of superoxide dismutase in rat ovary by lutropin." Biochem Biophys Res Commun **157**(1): 146-153.

Lebbe, M. y T. K. Woodruff (2013). "Involvement of androgens in ovarian health and disease." Mol Hum Reprod **19**(12): 828-837.

- Lee, D. C., R. Romero, J. S. Kim, W. Yoo, J. Lee, P. Mittal, J. P. Kusanovic, S. S. Hassan, B. H. Yoon y C. J. Kim (2010). "Evidence for a spatial and temporal regulation of prostaglandin-endoperoxide synthase 2 expression in human amnion in term and preterm parturition." J Clin Endocrinol Metab **95**(9): E86-91.
- Lee, M. T., E. Anderson y G. Y. Lee (1991). "Changes in ovarian morphology and serum hormones in the rat after treatment with dehydroepiandrosterone." Anat Rec **231**(2): 185-192.
- Li, Q., Y. P. Cheon, A. Kannan, S. Shanker, I. C. Bagchi y M. K. Bagchi (2004). "A novel pathway involving progesterone receptor, 12/15-lipoxygenase-derived eicosanoids, and peroxisome proliferator-activated receptor gamma regulates implantation in mice." J Biol Chem **279**(12): 11570-11581.
- Lim, H., R. A. Gupta, W. G. Ma, B. C. Paria, D. E. Moller, J. D. Morrow, R. N. DuBois, J. M. Trzaskos y S. K. Dey (1999). "Cyclo-oxygenase-2-derived prostacyclin mediates embryo implantation in the mouse via PPARdelta." Genes Dev **13**(12): 1561-1574.
- Limor, R., O. Sharon, E. Knoll, A. Many, G. Weisinger y N. Stern (2008). "Lipoxygenase-derived metabolites are regulators of peroxisome proliferator-activated receptor gamma-2 expression in human vascular smooth muscle cells." Am J Hypertens **21**(2): 219-223.
- Lin, D., T. Sugawara, J. F. Strauss, 3rd, B. J. Clark, D. M. Stocco, P. Saenger, A. Rogol y W. L. Miller (1995). "Role of steroidogenic acute regulatory protein in adrenal and gonadal steroidogenesis." Science **267**(5205): 1828-1831.
- Lin, J., C. Handschin y B. M. Spiegelman (2005). "Metabolic control through the PGC-1 family of transcription coactivators." Cell Metab **1**(6): 361-370.
- Liu, X., P. Qiao, A. Jiang, J. Jiang, H. Han, L. Wang y C. Ren (2015). "Paracrine Regulation of Steroidogenesis in Theca Cells by Granulosa Cells Derived from Mouse Preantral Follicles." Biomed Res Int **2015**: 925691.
- Liu, Y. X. y A. J. Hsueh (1986). "Synergism between granulosa and theca-interstitial cells in estrogen biosynthesis by gonadotropin-treated rat ovaries: studies on the two-cell, two-gonadotropin hypothesis using steroid antisera." Biol Reprod **35**(1): 27-36.
- Long, M. J., M. R. Sairam y C. M. Komar (2009). "Initiation of the expression of peroxisome proliferator-activated receptor gamma (PPAR gamma) in the rat ovary and the role of FSH." Reprod Biol Endocrinol **7**: 145.
- Loucks, A. B. (2003). "Energy availability, not body fatness, regulates reproductive function in women." Exerc Sport Sci Rev **31**(3): 144-148.
- Luchetti, C. G., M. E. Solano, V. Sander, M. L. Arcos, C. Gonzalez, G. Di Girolamo, S. Chiochio, G. Cremaschi y A. B. Motta (2004). "Effects of dehydroepiandrosterone on ovarian cystogenesis and immune function." J Reprod Immunol **64**(1-2): 59-74.
- Luzzo, K. M., Q. Wang, S. H. Purcell, M. Chi, P. T. Jimenez, N. Grindler, T. Schedl y K. H. Moley (2012). "High fat diet induced developmental defects in the mouse: oocyte meiotic aneuploidy and fetal growth retardation/brain defects." PLoS One **7**(11): e49217.

- Macias-Gonzalez, M., F. Cardona, M. Queipo-Ortuno, R. Bernal, M. Martin y F. J. Tinahones (2008). "PPAR γ mRNA expression is reduced in peripheral blood mononuclear cells after fat overload in patients with metabolic syndrome." J Nutr **138**(5): 903-907.
- Maciel, G. A., E. C. Baracat, J. A. Benda, S. M. Markham, K. Hensinger, R. J. Chang y G. F. Erickson (2004). "Stockpiling of transitional and classic primary follicles in ovaries of women with polycystic ovary syndrome." J Clin Endocrinol Metab **89**(11): 5321-5327.
- Magoffin, D. A. (2007). Ovarian Steroidogenic Abnormalities in the Polycystic Ovary Syndrome. Androgen Excess Disorders in Women: Polycystic Ovary Syndrome and Other Disorders. R. Azziz, J. E. Nestler y D. Dewailly. Totowa, NJ, Humana Press: 203-211.
- Manabe, N., Y. Goto, F. Matsuda-Minehata, N. Inoue, A. Maeda, K. Sakamaki y T. Miyano (2004). "Regulation mechanism of selective atresia in porcine follicles: regulation of granulosa cell apoptosis during atresia." J Reprod Dev **50**(5): 493-514.
- Marcinkiewicz, J. L., A. Krishna, C. M. Cheung y P. F. Terranova (1994). "Oocytic tumor necrosis factor alpha: localization in the neonatal ovary and throughout follicular development in the adult rat." Biol Reprod **50**(6): 1251-1260.
- Mari, M., A. Morales, A. Colell, C. Garcia-Ruiz y J. C. Fernandez-Checa (2009). "Mitochondrial glutathione, a key survival antioxidant." Antioxid Redox Signal **11**(11): 2685-2700.
- Marone, M., G. Scambia, S. Mozzetti, G. Ferrandina, S. Iacovella, A. De Pasqua, P. Benedetti-Panici y S. Mancuso (1998). "bcl-2, bax, bcl-XL, and bcl-XS expression in normal and neoplastic ovarian tissues." Clin Cancer Res **4**(2): 517-524.
- Mason, A. J., H. D. Niall y P. H. Seeburg (1986). "Structure of two human ovarian inhibins." Biochem Biophys Res Commun **135**(3): 957-964.
- McGee, E. A. y A. J. Hsueh (2000). "Initial and cyclic recruitment of ovarian follicles." Endocr Rev **21**(2): 200-214.
- McGee, E. A., E. Perlas, P. S. LaPolt, A. Tsafri y A. J. Hsueh (1997). "Follicle-stimulating hormone enhances the development of preantral follicles in juvenile rats." Biol Reprod **57**(5): 990-998.
- McLaren, A. (2003). "Primordial germ cells in the mouse." Dev Biol **262**(1): 1-15.
- Meade, E. A., T. M. McIntyre, G. A. Zimmerman y S. M. Prescott (1999). "Peroxisome proliferators enhance cyclooxygenase-2 expression in epithelial cells." J Biol Chem **274**(12): 8328-8334.
- Medan, M. S., G. Watanabe, K. Sasaki, Y. Nagura, H. Sakaime, M. Fujita, S. Sharawy y K. Taya (2003). "Effects of passive immunization of goats against inhibin on follicular development, hormone profile and ovulation rate." Reproduction **125**(5): 751-757.
- Meijs-Roelofs, H. M. A., J. T. J. Uilenbroek, F. H. D. Jong y R. Welschen (1973). "PLASMA OESTRADIOL-17 β AND ITS RELATIONSHIP TO SERUM FOLLICLE-STIMULATING HORMONE IN IMMATURE FEMALE RATS." Journal of Endocrinology **59**(2): 295-304.

Menke, D. B., J. Koubova y D. C. Page (2003). "Sexual differentiation of germ cells in XX mouse gonads occurs in an anterior-to-posterior wave." Dev Biol **262**(2): 303-312.

Messinis, I. E. (2006). "Ovarian feedback, mechanism of action and possible clinical implications." Hum Reprod Update **12**(5): 557-571.

Miller, W. L. y H. S. Bose (2011). "Early steps in steroidogenesis: intracellular cholesterol trafficking." J Lipid Res **52**(12): 2111-2135.

Minge, C. E., R. L. Robker y R. J. Norman (2008). "PPAR Gamma: Coordinating Metabolic and Immune Contributions to Female Fertility." PPAR Res **2008**: 243791.

Mitwally, M. F. M., N. K. Kuscu y T. M. Yalcinkaya (1999). "High ovulatory rates with use of troglitazone in clomiphene-resistant women with polycystic ovary syndrome." Human Reproduction **14**(11): 2700-2703.

Mohan, M., J. R. Malayer, R. D. Geisert y G. L. Morgan (2002). "Expression patterns of retinoid X receptors, retinaldehyde dehydrogenase, and peroxisome proliferator activated receptor gamma in bovine preattachment embryos." Biol Reprod **66**(3): 692-700.

Molyneaux, K. A., J. Stallock, K. Schaible y C. Wylie (2001). "Time-lapse analysis of living mouse germ cell migration." Dev Biol **240**(2): 488-498.

Montgomery Rice, V., S. D. Limback, K. F. Roby y P. F. Terranova (1999). "Tumor necrosis factor alpha inhibition of follicle-stimulating hormone-induced granulosa cell estradiol secretion in the human does not involve reduction of cAMP secretion but inhibition at post-cAMP site(s)." Endocrine **10**(1): 19-23.

Morgan, M. J. y Z. G. Liu (2011). "Crosstalk of reactive oxygen species and NF-kappaB signaling." Cell Res **21**(1): 103-115.

Morita, Y. y J. L. Tilly (1999). "Oocyte apoptosis: like sand through an hourglass." Dev Biol **213**(1): 1-17.

Morrison, L. J. y J. L. Marcinkiewicz (2002). "Tumor necrosis factor alpha enhances oocyte/follicle apoptosis in the neonatal rat ovary." Biol Reprod **66**(2): 450-457.

Motta, A. B., A. Estevez y M. F. de Gimeno (1999). "The involvement of nitric oxide in corpus luteum regression in the rat: feedback mechanism between prostaglandin F(2alpha) and nitric oxide." Mol Hum Reprod **5**(11): 1011-1016.

Motta, A. B., A. Estevez, A. Franchi, S. Perez-Martinez, M. Farina, M. L. Ribeiro, A. Lasserre y M. F. Gimeno (2001). "Regulation of lipid peroxidation by nitric oxide and PGF2alpha during luteal regression in rats." Reproduction **121**(4): 631-637.

Mu, Y. M., T. Yanase, Y. Nishi, N. Waseda, T. Oda, A. Tanaka, R. Takayanagi y H. Nawata (2000). "Insulin sensitizer, troglitazone, directly inhibits aromatase activity in human ovarian granulosa cells." Biochem Biophys Res Commun **271**(3): 710-713.

Murdoch, W. J., D. C. Colgin y J. A. Ellis (1997). "Role of tumor necrosis factor-alpha in the ovulatory mechanism of ewes." J Anim Sci **75**(6): 1601-1605.

- Murri, M., M. Luque-Ramirez, M. Insenser, M. Ojeda-Ojeda y H. F. Escobar-Morreale (2013). "Circulating markers of oxidative stress and polycystic ovary syndrome (PCOS): a systematic review and meta-analysis." Hum Reprod Update **19**(3): 268-288.
- Nakao, S., Y. Ogtata, E. Shimizu, M. Yamazaki, S. Furuyama y H. Sugiya (2002). "Tumor necrosis factor alpha (TNF-alpha)-induced prostaglandin E2 release is mediated by the activation of cyclooxygenase-2 (COX-2) transcription via NFkappaB in human gingival fibroblasts." Mol Cell Biochem **238**(1-2): 11-18.
- Navarra, P., C. L. Andreani, N. Lazzarin, E. Pierro, A. Mirtella, A. Lanzone y S. Mancuso (1996). "Increased production and release of prostaglandin-E2 by human granulosa cells from polycystic ovaries." Prostaglandins **52**(3): 187-197.
- Nelson, V. L., R. S. Legro, I. Jerome F. Strauss y J. M. McAllister (1999). "Augmented Androgen Production Is a Stable Steroidogenic Phenotype of Propagated Theca Cells from Polycystic Ovaries." Molecular Endocrinology **13**(6): 946-957.
- Nielsen, M. E., I. A. Rasmussen, S. G. Kristensen, S. T. Christensen, K. Mollgard, E. Wreford Andersen, A. G. Byskov y C. Yding Andersen (2011). "In human granulosa cells from small antral follicles, androgen receptor mRNA and androgen levels in follicular fluid correlate with FSH receptor mRNA." Mol Hum Reprod **17**(1): 63-70.
- Nteeba, J., S. Ganesan y A. F. Keating (2014). "Progressive obesity alters ovarian folliculogenesis with impacts on pro-inflammatory and steroidogenic signaling in female mice." Biol Reprod **91**(4): 86.
- Oltvai, Z. N., C. L. Milliman y S. J. Korsmeyer (1993). "Bcl-2 heterodimerizes in vivo with a conserved homolog, Bax, that accelerates programmed cell death." Cell **74**(4): 609-619.
- Orczyk, G. P. y H. R. Behrman (1972). "Ovulation blockade by aspirin or indomethacin--in vivo evidence for a role of prostaglandin in gonadotrophin secretion." Prostaglandins **1**(1): 3-20.
- Orvieto, R., N. Fisch, V. Yulzari-Roll y A. La Marca (2005). "Ovarian androgens but not estrogens correlate with the degree of systemic inflammation observed during controlled ovarian hyperstimulation." Gynecol Endocrinol **21**(3): 170-173.
- Paine, M. A., E. H. Ruder, T. J. Hartman, J. Blumberg y M. B. Goldman (2013). Oxidative Stress, Oogenesis and Folliculogenesis. Studies on Women's Health. A. Agarwal, N. Aziz y B. Rizk. Totowa, NJ, Humana Press: 75-94.
- Palacio, J. R., A. Iborra, Z. Ulcova-Gallova, R. Badia y P. Martinez (2006). "The presence of antibodies to oxidative modified proteins in serum from polycystic ovary syndrome patients." Clin Exp Immunol **144**(2): 217-222.
- Pansarasa, O., G. D'Antona, M. R. Gualea, B. Marzani, M. A. Pellegrino y F. Marzatico (2002). ""Oxidative stress": effects of mild endurance training and testosterone treatment on rat gastrocnemius muscle." Eur J Appl Physiol **87**(6): 550-555.
- Papalou, O., V. M. Victor y E. Diamanti-Kandarakis (2016). "Oxidative Stress in Polycystic Ovary Syndrome." Curr Pharm Des **22**(18): 2709-2722.

- Parker, C. R., Jr. y V. B. Mahesh (1976). "Hormonal events surrounding the natural onset of puberty in female rats." Biol Reprod **14**(3): 347-353.
- Payne, A. H. y D. B. Hales (2004). "Overview of steroidogenic enzymes in the pathway from cholesterol to active steroid hormones." Endocr Rev **25**(6): 947-970.
- Pepling, M. E. y A. C. Spradling (2001). "Mouse ovarian germ cell cysts undergo programmed breakdown to form primordial follicles." Dev Biol **234**(2): 339-351.
- Peral, B., J. L. San Millan, R. Castello, P. Moghetti y H. F. Escobar-Morreale (2002). "Comment: the methionine 196 arginine polymorphism in exon 6 of the TNF receptor 2 gene (TNFRSF1B) is associated with the polycystic ovary syndrome and hyperandrogenism." J Clin Endocrinol Metab **87**(8): 3977-3983.
- Perez, G. I., R. Robles, C. M. Knudson, J. A. Flaws, S. J. Korsmeyer y J. L. Tilly (1999). "Prolongation of ovarian lifespan into advanced chronological age by Bax-deficiency." Nat Genet **21**(2): 200-203.
- Peters, H. (1969). "The development of the mouse ovary from birth to maturity." Acta Endocrinol (Copenh) **62**(1): 98-116.
- Peters, H., A. G. Byskov y J. Grinsted (1978). "Follicular growth in fetal and prepubertal ovaries of humans and other primates." Clin Endocrinol Metab **7**(3): 469-485.
- Piquette, G. N., P. S. LaPolt, M. Oikawa y A. J. Hsueh (1991). "Regulation of luteinizing hormone receptor messenger ribonucleic acid levels by gonadotropins, growth factors, and gonadotropin-releasing hormone in cultured rat granulosa cells." Endocrinology **128**(5): 2449-2456.
- Polvani, S., M. Tarocchi y A. Galli (2012). "PPARgamma and Oxidative Stress: Con(beta) Catenating NRF2 and FOXO." PPAR Res **2012**: 641087.
- Practice Committee of American Society for Reproductive Medicine, B. A. (2008). "Gonadotropin preparations: past, present, and future perspectives." Fertil Steril **90**(5 Suppl): S13-20.
- Prizant, H., N. Gleicher y A. Sen (2014). "Androgen actions in the ovary: balance is key." J Endocrinol **222**(3): R141-151.
- Puigserver, P., Z. Wu, C. W. Park, R. Graves, M. Wright y B. M. Spiegelman (1998). "A cold-inducible coactivator of nuclear receptors linked to adaptive thermogenesis." Cell **92**(6): 829-839.
- Qiu, M., F. Quan, C. Han, B. Wu, J. Liu, Z. Yang, F. Su y Y. Zhang (2013). "Effects of granulosa cells on steroidogenesis, proliferation and apoptosis of stromal cells and theca cells derived from the goat ovary." J Steroid Biochem Mol Biol **138**: 325-333.
- Qu, F., F. F. Wang, R. Yin, G. L. Ding, M. El-Prince, Q. Gao, B. W. Shi, H. H. Pan, Y. T. Huang, M. Jin, P. C. Leung, J. Z. Sheng y H. F. Huang (2012). "A molecular mechanism underlying ovarian dysfunction of polycystic ovary syndrome: hyperandrogenism induces epigenetic alterations in the granulosa cells." J Mol Med (Berl) **90**(8): 911-923.

- Racowsky, C. (1991). "Gamete resources: origin and production of oocytes." Animal applications of research in mammalian development: 23-82.
- Ratts, V. S., J. A. Flaws, R. Kolp, C. M. Sorenson y J. L. Tilly (1995). "Ablation of bcl-2 gene expression decreases the numbers of oocytes and primordial follicles established in the post-natal female mouse gonad." Endocrinology **136**(8): 3665-3668.
- Reich, R., F. Kohen, Z. Naor y A. Tsafri (1983). "Possible involvement of lipoxygenase products of arachidonic acid pathway in ovulation." Prostaglandins **26**(6): 1011-1020.
- Ren, Y., C. Sun, Y. Sun, H. Tan, Y. Wu, B. Cui y Z. Wu (2009). "PPAR gamma protects cardiomyocytes against oxidative stress and apoptosis via Bcl-2 upregulation." Vascul Pharmacol **51**(2-3): 169-174.
- Repaci, A., A. Gambineri y R. Pasquali (2011). "The role of low-grade inflammation in the polycystic ovary syndrome." Mol Cell Endocrinol **335**(1): 30-41.
- Rezvanfar, M. A., A. Ahmadi, H. A. Saadi, M. Baeri y M. Abdollahi (2012). "Mechanistic links between oxidative/nitrosative stress and tumor necrosis factor alpha in letrozole-induced murine polycystic ovary: biochemical and pathological evidences for beneficial effect of pioglitazone." Hum Exp Toxicol **31**(9): 887-897.
- Ricote, M. y C. K. Glass (2007). "PPARs and molecular mechanisms of transrepression." Biochim Biophys Acta **1771**(8): 926-935.
- Rivera-Woll, L. M., M. Papalia, S. R. Davis y H. G. Burger (2004). "Androgen insufficiency in women: diagnostic and therapeutic implications." Hum Reprod Update **10**(5): 421-432.
- Robinson, R. S., A. J. Hammond, D. C. Wathes, M. G. Hunter y G. E. Mann (2008). "Corpus luteum-endometrium-embryo interactions in the dairy cow: underlying mechanisms and clinical relevance." Reprod Domest Anim **43 Suppl 2**: 104-112.
- Roby, K. F. y P. F. Terranova (1989). Localization of Tumor Necrosis Factor (TNF) in the Rat and Bovine Ovary Using Immunocytochemistry and Cell Blot: Evidence for Granulosa Production. Growth Factors and the Ovary. A. N. Hirshfield. Boston, MA, Springer US: 273-278.
- Rock, K. L. y H. Kono (2008). "The inflammatory response to cell death." Annu Rev Pathol **3**: 99-126.
- Ronen-Fuhrmann, T., R. Timberg, S. R. King, K. H. Hales, D. B. Hales, D. M. Stocco y J. Orly (1998). "Spatio-temporal expression patterns of steroidogenic acute regulatory protein (StAR) during follicular development in the rat ovary." Endocrinology **139**(1): 303-315.
- Rotterdam, E. A.-S. P. c. w. g. (2004). "Revised 2003 consensus on diagnostic criteria and long-term health risks related to polycystic ovary syndrome (PCOS)." Hum Reprod **19**(1): 41-47.
- Roy, S., V. B. Mahesh y R. B. Greenblatt (1962). "Effect of dehydroepiandrosterone and delta4-androstenedione on the reproductive organs of female rats: production of cystic changes in the ovary." Nature **196**: 42-43.

Ruder, E. H., T. J. Hartman y M. B. Goldman (2009). "Impact of oxidative stress on female fertility." Curr Opin Obstet Gynecol **21**(3): 219-222.

Runner, M. N. (1947). "Development of mouse eggs in the anterior chamber of the eye." Anat Rec **98**(1): 1-17.

Sabuncu, T., H. Vural, M. Harma y M. Harma (2001). "Oxidative stress in polycystic ovary syndrome and its contribution to the risk of cardiovascular disease." Clin Biochem **34**(5): 407-413.

Sakamoto, J., H. Kimura, S. Moriyama, H. Odaka, Y. Momose, Y. Sugiyama y H. Sawada (2000). "Activation of human peroxisome proliferator-activated receptor (PPAR) subtypes by pioglitazone." Biochem Biophys Res Commun **278**(3): 704-711.

San-Millan, J. L. y H. F. Escobar-Morreale (2010). "The role of genetic variation in peroxisome proliferator-activated receptors in the polycystic ovary syndrome (PCOS): an original case-control study followed by systematic review and meta-analysis of existing evidence." Clin Endocrinol (Oxf) **72**(3): 383-392.

Scaramuzzi, R. J., H. M. Brown y J. Dupont (2010). "Nutritional and metabolic mechanisms in the ovary and their role in mediating the effects of diet on folliculogenesis: a perspective." Reprod Domest Anim **45** Suppl 3: 32-41.

Schmidt, J., B. Weijdegard, A. L. Mikkelsen, S. Lindenberg, L. Nilsson y M. Brannstrom (2014). "Differential expression of inflammation-related genes in the ovarian stroma and granulosa cells of PCOS women." Mol Hum Reprod **20**(1): 49-58.

Schneider, C. A., W. S. Rasband y K. W. Eliceiri (2012). "NIH Image to ImageJ: 25 years of image analysis." Nat Methods **9**(7): 671-675.

Schoppee, P. D., J. C. Garmey y J. D. Veldhuis (2002). "Putative activation of the peroxisome proliferator-activated receptor gamma impairs androgen and enhances progesterone biosynthesis in primary cultures of porcine theca cells." Biol Reprod **66**(1): 190-198.

Schumacher, H. R. y J. R. Kos (1982). "Deficiency of platelet lipoxygenase activity in myeloproliferative disorders." N Engl J Med **307**(6): 378-379.

Sedgwick, J. D., D. S. Riminton, J. G. Cyster y H. Korner (2000). "Tumor necrosis factor: a master-regulator of leukocyte movement." Immunol Today **21**(3): 110-113.

Seli, E. y A. J. Duleba (2004). "Treatment of PCOS with metformin and other insulin-sensitizing agents." Curr Diab Rep **4**(1): 69-75.

Sen, A., H. Prizant, A. Light, A. Biswas, E. Hayes, H. J. Lee, D. Barad, N. Gleicher y S. R. Hammes (2014). "Androgens regulate ovarian follicular development by increasing follicle stimulating hormone receptor and microRNA-125b expression." Proc Natl Acad Sci U S A **111**(8): 3008-3013.

Seto-Young, D., D. Avtanski, M. Strizhevsky, G. Parikh, P. Patel, J. Kaplun, K. Holcomb, Z. Rosenwaks y L. Poretsky (2007). "Interactions among peroxisome proliferator activated receptor-gamma, insulin signaling pathways, and steroidogenic acute regulatory protein in human ovarian cells." J Clin Endocrinol Metab **92**(6): 2232-2239.

- Seto-Young, D., M. Paliou, J. Schlosser, D. Avtanski, A. Park, P. Patel, K. Holcomb, P. Chang y L. Poretsky (2005). "Direct thiazolidinedione action in the human ovary: insulin-independent and insulin-sensitizing effects on steroidogenesis and insulin-like growth factor binding protein-1 production." J Clin Endocrinol Metab **90**(11): 6099-6105.
- Shahnazi, V., M. Zaree, M. Nouri, M. Mehrzad-Sadaghiani, S. Fayezi, M. Darabi, S. Khani y M. Darabi (2015). "Influence of omega-3 fatty acid eicosapentaenoic acid on IGF-1 and COX-2 gene expression in granulosa cells of PCOS women." Iran J Reprod Med **13**(2): 71-78.
- Shi, D. y D. F. Vine (2012). "Animal models of polycystic ovary syndrome: a focused review of rodent models in relationship to clinical phenotypes and cardiometabolic risk." Fertil Steril **98**(1): 185-193.
- Simpson, E. R. (2003). "Sources of estrogen and their importance." J Steroid Biochem Mol Biol **86**(3-5): 225-230.
- Sirois, J., K. Sayasith, K. A. Brown, A. E. Stock, N. Bouchard y M. Dore (2004). "Cyclooxygenase-2 and its role in ovulation: a 2004 account." Hum Reprod Update **10**(5): 373-385.
- Smith, U. (2001). "Pioglitazone: mechanism of action." International journal of clinical practice. Supplement(121): 13-18.
- Smith, W. L. y D. L. Dewitt (1996). "Prostaglandin endoperoxide H synthases-1 and -2." Adv Immunol **62**: 167-215.
- Smith, W. L., D. L. DeWitt y R. M. Garavito (2000). "Cyclooxygenases: structural, cellular, and molecular biology." Annu Rev Biochem **69**: 145-182.
- Smyth, C. D., F. Miro, P. F. Whitelaw, C. M. Howles y S. G. Hillier (1993). "Ovarian thecal/interstitial androgen synthesis is enhanced by a follicle-stimulating hormone-stimulated paracrine mechanism." Endocrinology **133**(4): 1532-1538.
- Srinivasan, K., P. S. Patole, C. L. Kaul y P. Ramarao (2004). "Reversal of glucose intolerance by pioglitazone in high fat diet-fed rats." Methods Find Exp Clin Pharmacol **26**(5): 327-333.
- Steel, D. M. y A. S. Whitehead (1994). "The major acute phase reactants: C-reactive protein, serum amyloid P component and serum amyloid A protein." Immunol Today **15**(2): 81-88.
- Steinkampf, M. P., C. R. Mendelson y E. R. Simpson (1987). "Regulation by follicle-stimulating hormone of the synthesis of aromatase cytochrome P-450 in human granulosa cells." Mol Endocrinol **1**(7): 465-471.
- Stocco, C. (2008). "Aromatase expression in the ovary: hormonal and molecular regulation." Steroids **73**(5): 473-487.
- Stocco, C., C. Telleria y G. Gibori (2007). "The molecular control of corpus luteum formation, function, and regression." Endocr Rev **28**(1): 117-149.

- Stocco, D. M., X. Wang, Y. Jo y P. R. Manna (2005). "Multiple signaling pathways regulating steroidogenesis and steroidogenic acute regulatory protein expression: more complicated than we thought." Mol Endocrinol **19**(11): 2647-2659.
- Subbaramaiah, K., D. T. Lin, J. C. Hart y A. J. Dannenberg (2001). "Peroxisome proliferator-activated receptor gamma ligands suppress the transcriptional activation of cyclooxygenase-2. Evidence for involvement of activator protein-1 and CREB-binding protein/p300." J Biol Chem **276**(15): 12440-12448.
- Sugino, N., T. Suzuki, S. Kashida, A. Karube, S. Takiguchi y H. Kato (2000). "Expression of Bcl-2 and Bax in the human corpus luteum during the menstrual cycle and in early pregnancy: regulation by human chorionic gonadotropin." J Clin Endocrinol Metab **85**(11): 4379-4386.
- Taguchi, K., A. Okada, T. Yasui, T. Kobayashi, R. Ando, K. Tozawa y K. Kohri (2012). "Pioglitazone, a peroxisome proliferator activated receptor gamma agonist, decreases renal crystal deposition, oxidative stress and inflammation in hyperoxaluric rats." J Urol **188**(3): 1002-1011.
- Tang, T., J. M. Lord, R. J. Norman, E. Yasmin y A. H. Balen (2012). "Insulin-sensitising drugs (metformin, rosiglitazone, pioglitazone, D-chiro-inositol) for women with polycystic ovary syndrome, oligo amenorrhoea and subfertility." Cochrane Database Syst Rev **5**: CD003053.
- Terranova, P. F. (1997). "Potential roles of tumor necrosis factor-alpha in follicular development, ovulation, and the life span of the corpus luteum." Domest Anim Endocrinol **14**(1): 1-15.
- Thathapudi, S., V. Kodati, J. Erukkambattu, A. Katragadda, U. Addepally y Q. Hasan (2014). "Tumor Necrosis Factor-Alpha and Polycystic Ovarian Syndrome: A Clinical, Biochemical, and Molecular Genetic Study." Genetic Testing and Molecular Biomarkers **18**(9): 605-609.
- Thompson, W. E., J. Powell, K. H. Thomas y J. A. Whittaker (1999). "Immunolocalization and expression of the steroidogenic acute regulatory protein during the transitional stages of rat follicular differentiation." J Histochem Cytochem **47**(6): 769-776.
- Tietze, F. (1969). "Enzymic method for quantitative determination of nanogram amounts of total and oxidized glutathione: applications to mammalian blood and other tissues." Anal Biochem **27**(3): 502-522.
- Tilly, J. L. y K. I. Tilly (1995). "Inhibitors of oxidative stress mimic the ability of follicle-stimulating hormone to suppress apoptosis in cultured rat ovarian follicles." Endocrinology **136**(1): 242-252.
- Tilly, J. L., K. I. Tilly, M. L. Kenton y A. L. Johnson (1995). "Expression of members of the bcl-2 gene family in the immature rat ovary: equine chorionic gonadotropin-mediated inhibition of granulosa cell apoptosis is associated with decreased bax and constitutive bcl-2 and bcl-xlong messenger ribonucleic acid levels." Endocrinology **136**(1): 232-241.
- Toblli, J. E., M. G. Ferrini, G. Cao, D. Vernet, M. Angerosa y N. F. Gonzalez-Cadavid (2009). "Antifibrotic effects of pioglitazone on the kidney in a rat model of type 2 diabetes mellitus." Nephrol Dial Transplant **24**(8): 2384-2391.

- Tsai-Turton, M. y U. Luderer (2006). "Opposing effects of glutathione depletion and follicle-stimulating hormone on reactive oxygen species and apoptosis in cultured preovulatory rat follicles." Endocrinology **147**(3): 1224-1236.
- Uilenbroek, J. T. y J. S. Richards (1979). "Ovarian follicular development during the rat estrous cycle: gonadotropin receptors and follicular responsiveness." Biol Reprod **20**(5): 1159-1165.
- Van Nassauw, L., L. Tao y F. Harrison (1999). "Distribution of apoptosis-related proteins in the quail ovary during folliculogenesis: BCL-2, BAX and CPP32." Acta Histochem **101**(1): 103-112.
- Vane, J. R., Y. S. Bakhle y R. M. Botting (1998). "Cyclooxygenases 1 and 2." Annu Rev Pharmacol Toxicol **38**: 97-120.
- Veldhuis, J. D., G. Zhang y J. C. Garmey (2002). "Troglitazone, an insulin-sensitizing thiazolidinedione, represses combined stimulation by LH and insulin of de novo androgen biosynthesis by thecal cells in vitro." J Clin Endocrinol Metab **87**(3): 1129-1133.
- Vendola, K. A., J. Zhou, O. O. Adesanya, S. J. Weil y C. A. Bondy (1998). "Androgens stimulate early stages of follicular growth in the primate ovary." J Clin Invest **101**(12): 2622-2629.
- Victor, V. M., M. Rocha, C. Banuls, A. Alvarez, C. de Pablo, M. Sanchez-Serrano, M. Gomez y A. Hernandez-Mijares (2011). "Induction of oxidative stress and human leukocyte/endothelial cell interactions in polycystic ovary syndrome patients with insulin resistance." J Clin Endocrinol Metab **96**(10): 3115-3122.
- Victor, V. M., M. Rocha, C. Banuls, S. Rovira-Llopis, M. Gomez y A. Hernandez-Mijares (2014). "Mitochondrial impairment and oxidative stress in leukocytes after testosterone administration to female-to-male transsexuals." J Sex Med **11**(2): 454-461.
- Waclawik, A. (2011). "Novel insights into the mechanisms of pregnancy establishment: regulation of prostaglandin synthesis and signaling in the pig." Reproduction **142**(3): 389-399.
- Wang, H., K. Andoh, H. Hagiwara, L. Xiaowei, N. Kikuchi, Y. Abe, K. Yamada, R. Fatima y H. Mizunuma (2001). "Effect of adrenal and ovarian androgens on type 4 follicles unresponsive to FSH in immature mice." Endocrinology **142**(11): 4930-4936.
- Wang, H., L. Sun, L. Su, J. Rizo, L. Liu, L. F. Wang, F. S. Wang y X. Wang (2014). "Mixed lineage kinase domain-like protein MLKL causes necrotic membrane disruption upon phosphorylation by RIP3." Mol Cell **54**(1): 133-146.
- Wang, P., B. Li, G. Cai, M. Huang, L. Jiang, J. Pu, L. Li, Q. Wu, L. Zuo, Q. Wang y P. Zhou (2014). "Activation of PPAR-gamma by pioglitazone attenuates oxidative stress in aging rat cerebral arteries through upregulating UCP2." J Cardiovasc Pharmacol **64**(6): 497-506.
- Webber, L. J., S. Stubbs, J. Stark, G. H. Trew, R. Margara, K. Hardy y S. Franks (2003). "Formation and early development of follicles in the polycystic ovary." Lancet **362**(9389): 1017-1021.

Willis, D., J. White, S. Brosens y S. Franks (1999). "Effect of 15-deoxy-delta (12, 14)-prostaglandin J2 (PGJ2) a peroxisome proliferator activating receptor γ (PPAR γ) ligand on human ovarian steroidogenesis." Endocrinology **140**(suppl 1): 491.

Wood, J. R., D. A. Dumesic, D. H. Abbott y J. F. Strauss, 3rd (2007). "Molecular abnormalities in oocytes from women with polycystic ovary syndrome revealed by microarray analysis." J Clin Endocrinol Metab **92**(2): 705-713.

Wood, J. R. y J. F. Strauss, 3rd (2002). "Multiple signal transduction pathways regulate ovarian steroidogenesis." Rev Endocr Metab Disord **3**(1): 33-46.

Wu, M. Y. y H. N. Ho (2003). "The role of cytokines in endometriosis." Am J Reprod Immunol **49**(5): 285-296.

Wu, X., L. Chen, C. A. Brown, C. Yan y M. M. Matzuk (2004). "Interrelationship of growth differentiation factor 9 and inhibin in early folliculogenesis and ovarian tumorigenesis in mice." Mol Endocrinol **18**(6): 1509-1519.

Xiong, Y. L., X. Y. Liang, X. Yang, Y. Li y L. N. Wei (2011). "Low-grade chronic inflammation in the peripheral blood and ovaries of women with polycystic ovarian syndrome." Eur J Obstet Gynecol Reprod Biol **159**(1): 148-150.

Xita, N., L. Lazaros, I. Georgiou y A. Tsatsoulis (2009). "The Pro12Ala polymorphism of the PPAR-gamma gene is not associated with the polycystic ovary syndrome." Hormones (Athens) **8**(4): 267-272.

Xita, N., L. Lazaros, I. Georgiou y A. Tsatsoulis (2010). "CYP19 gene: a genetic modifier of polycystic ovary syndrome phenotype." Fertil Steril **94**(1): 250-254.

Xu, H. E., M. H. Lambert, V. G. Montana, K. D. Plunket, L. B. Moore, J. L. Collins, J. A. Oplinger, S. A. Klierer, R. T. Gampe, Jr., D. D. McKee, J. T. Moore y T. M. Willson (2001). "Structural determinants of ligand binding selectivity between the peroxisome proliferator-activated receptors." Proc Natl Acad Sci U S A **98**(24): 13919-13924.

Yang, F., Y. C. Ruan, Y. J. Yang, K. Wang, S. S. Liang, Y. B. Han, X. M. Teng y J. Z. Yang (2015). "Follicular hyperandrogenism downregulates aromatase in luteinized granulosa cells in polycystic ovary syndrome women." Reproduction **150**(4): 289-296.

Yang, J. L., C. P. Zhang, L. Li, L. Huang, S. Y. Ji, C. L. Lu, C. H. Fan, H. Cai, Y. Ren, Z. Y. Hu, F. Gao y Y. X. Liu (2010). "Testosterone induces redistribution of forkhead box-3a and down-regulation of growth and differentiation factor 9 messenger ribonucleic acid expression at early stage of mouse folliculogenesis." Endocrinology **151**(2): 774-782.

Yang, M. Y. y J. E. Fortune (2006). "Testosterone stimulates the primary to secondary follicle transition in bovine follicles in vitro." Biol Reprod **75**(6): 924-932.

Yang, W. L. y H. Frucht (2001). "Activation of the PPAR pathway induces apoptosis and COX-2 inhibition in HT-29 human colon cancer cells." Carcinogenesis **22**(9): 1379-1383.

Yildiz, B. O., R. Azziz, E. Androgen y P. Society (2010). "Ovarian and adipose tissue dysfunction in polycystic ovary syndrome: report of the 4th special scientific meeting of the Androgen Excess and PCOS Society." Fertil Steril **94**(2): 690-693.

- Yoon, S., J. Eum, H. Jang, N. Yang, J. Lee, D. Shin, E. Chang, Y. Choi, T. Yoon, D. Lee y W. Lee (2015). "Artificial primordial follicles activation by peroxisome proliferator-activated receptor gamma modulator on neonatal mouse ovary in vitro." Fertility and Sterility **104**(3): e253-e254.
- Yoshimoto, T. y Y. Takahashi (2002). "Arachidonate 12-lipoxygenases." Prostaglandins Other Lipid Mediat **68-69**: 245-262.
- Yu, C., K. Markan, K. A. Temple, D. Deplewski, M. J. Brady y R. N. Cohen (2005). "The nuclear receptor corepressors NCoR and SMRT decrease peroxisome proliferator-activated receptor gamma transcriptional activity and repress 3T3-L1 adipogenesis." J Biol Chem **280**(14): 13600-13605.
- Zhang, J., G. Zhu, X. Wang, B. Xu y L. Hu (2007). "Apoptosis and expression of protein TRAIL in granulosa cells of rats with polycystic ovarian syndrome." J Huazhong Univ Sci Technolog Med Sci **27**(3): 311-314.
- Zhao, Y., A. Patzer, T. Herdegen, P. Gohlke y J. Culman (2006). "Activation of cerebral peroxisome proliferator-activated receptors gamma promotes neuroprotection by attenuation of neuronal cyclooxygenase-2 overexpression after focal cerebral ischemia in rats." FASEB J **20**(8): 1162-1175.
- Zuo, T., M. Zhu y W. Xu (2016). "Roles of Oxidative Stress in Polycystic Ovary Syndrome and Cancers." Oxid Med Cell Longev **2016**: 8589318.