

Tesis de Licenciatura en Ciencias Básicas, orientación Biología



Efecto del neuroesteroide Allopregnanolona sobre la morfo- fisiología, apoptosis y angiogénesis ovárica de la rata en ciclo.

Tesista: Joana Antonela Asensio

Directora: Dra. Myriam Laconi

Instituto de Investigaciones biomédicas (INBIOMED) - IMBECU - CONICET

Marzo 2013 - Diciembre 2014



Tabla de contenido

I. DEDICATORIA	3
II. AGRADECIMIENTOS	4
III. ABREVIATURAS	5
IV. RESUMEN	6
1. INTRODUCCIÓN	7
1.1 ESTRÉS EN LA REPRODUCCIÓN.....	7
1.1.1 Consideraciones generales.....	7
1.1.2 Sistema GABAérgico	7
1.1.3 Neuroesteroides.....	8
1.1.4 Allopregnanolona	9
1.2 OVARIO	10
1.2.1 Morfología.....	10
1.2.2 Angiogénesis ovárica.....	11
1.3 DESARROLLO FOLICULAR	12
1.3.1 Folículo primordial.....	12
1.3.2 Folículo primario	13
1.3.3 Folículo secundario.....	14
1.3.4 Folículo terciario o antral.....	14
1.3.5 Selección del folículo dominante.....	15
1.3.6 Folículo de Graaf o preovulatorio	16
1.3.7 Ovulación.....	16
1.3.8 Formación cuerpo lúteo y proceso de luteólisis.....	17
1.3.9 Atresia folicular	18
1.4 MUERTE CELULAR.....	20
1.4.1 Apoptosis.....	20
1.4.2 Apoptosis como mecanismo de atresia folicular.....	20
1.5 CICLO OVÁRICO EN LA RATA	22
1.6 REGULACIÓN NEUROENDOCRINA.....	24
1.6.1 Sistema neuroendocrino	24
1.6.2 Conexiones anatómicas del eje hipotálamo-hipófisis	25
2. HIPÓTESIS.....	28
3. OBJETIVOS.....	28

4. MATERIALES Y MÉTODOS.....	29
4.1 REACTIVOS	29
4.2 ANIMALES DE EXPERIMENTACIÓN	29
4.3 PROTOCOLO DE CIRUGÍA ESTEREOTÁXICA EN VLD	29
4.4 DISEÑO EXPERIMENTAL	30
4.5 FOLÍCULOS OVÁRICOS	31
4.5.1 Recuento	31
4.5.2 Morfología.....	32
4.5.3 Apoptosis.....	32
4.5.4 Proliferación celular	33
4.5.5 Concentración sérica de estradiol	34
4.6 CUERPOS LÚTEOS	34
4.6.1 Recuento	34
4.6.2 Diámetro	34
4.6.3 Apoptosis.....	35
4.6.4 Concentración sérica de progesterona.....	36
4.7 ANÁLISIS ESTADÍSTICO	36
5. RESULTADOS	37
5.1 FOLÍCULOS OVÁRICOS	37
5.1.1 Clasificación y recuento	37
5.1.2 Morfología.....	39
5.1.3 Apoptosis.....	39
5.1.4 Proliferación celular	41
5.1.5 Concentración sérica de estradiol	42
5. 2 CUERPOS LÚTEOS	43
5.2.1 Recuento	43
5.2.2 Diámetro	44
5.2.3 Apoptosis.....	44
5.2.4 Formación de vasos sanguíneos nuevos (angiogénesis).....	45
5.2.5 Concentración sérica de progesterona.....	47
6. CONCLUSIONES Y DISCUSIÓN	48
7. BIBLIOGRAFÍA.....	54

I. DEDICATORIA

Dedico el tiempo, el esfuerzo y las energías invertidas en mi carrera universitaria a los dos fueguitos que me acompañan desde el cielo, mis abuelos Chicha e Hilario.

“Abuelo, ¿por qué el cielo es azul?

Porque para hacerte feliz, mi niño, me tragué todas las nubes negras.”

II. AGRADECIMIENTOS

A la Dra. Myriam Laconi, por hacerme formar parte de su equipo de investigación, por la confianza e independencia brindadas para realizar este trabajo de tesis.

Al INBIOMED - UM - IMBECU - CONICET y a sus autoridades correspondientes, Dr. Ricardo Cabrera, Dra. Graciela Jahn y personal a cargo, por facilitarme el acceso a las instalaciones de los laboratorios, materiales y equipos, por brindarme el espacio y la seguridad necesarios para llevar a cabo el presente proyecto de investigación.

Al equipo del Dr. Alfredo Castro Vázquez del IHEM - CONICET por permitirme el acceso a las instalaciones para procesamiento de muestras histológicas. Al Lic. Cristian Rodríguez y Dr. Sergio Carminatti por su asistencia en el aprendizaje de las técnicas histológicas, y al Dr. Israel Vega por la instrucción que me brindó en fundamentos estadísticos.

Al equipo de la Dra. Fernanda Parborell del IBYME - CONICET, Buenos Aires. Gracias por su generosidad, por integrarme a su equipo tan amablemente y por hacerme sentir tan cómoda.

A Nicolás, Juan Manuel, Alicia y Mariel por el mantenimiento del orden y limpieza en nuestro laboratorio.

Quiero agradecer especialmente a mis compañeros de laboratorio: Fernando Giuliani, Carla Escudero, Vanesa Bazzocchini, Sebastián García, Belén Mulle y Macarena Herrera. Gracias por hacer mis días más llevaderos, por hacerme reír tanto, por tolerar mis quejas, por sus consejos, por su generosidad en el conocimiento, por su cariño infinito y mucho más. El ánimo con que afronté este proyecto no hubiera sido el mismo sin ustedes.

Gracias a los profesores que hicieron de mi carrera universitaria una experiencia maravillosa y sumamente enriquecedora: Cecilia Fernández, Néstor Ciocco, Carina Gonzales, Eduardo Koch, Susana Valdez, Walter Berón, Mercedes Larriqueta, Rubén Santos, Miriam Pirani y muchos más. Gracias por enseñarme a pensar.

A mi familia, mi sustento: Rosa, Érica, Juan Carlos, Emanuel, Evelyn y Adriana.

A Juan Pablo, el gran amor de mi vida, y a quien hasta hace poco latía conmigo dentro mío, León.

A mis amigas de la vida: Maritta Cortes, Florencia Álvarez, Marité, Evangelina, Florencia Pérez. Gracias por estar, por la incondicionalidad y por tanta felicidad compartida.

A mi patria, por verme crecer y darme las herramientas para ser quien soy.

A mí misma, por ser tan resiliente y perseverante.

Gracias a la vida que me ha dado tanto.

III. ABREVIATURAS

ALLO: allopregnanolona

ANOVA 2: análisis de varianza de doble vía

CL(s): cuerpo(s) lúteo(s)

DDPM: desorden disfórico pre menstrual

EGF: factor de crecimiento epidermal

ES: estradiol

GABA: *gamma amino butiric acid* (ácido gamma-amino butírico)

hCG: gonadotropina coriónica humana

ICV: intra-cerebro-ventricular

IHQ: inmunohistoquímica

i.p.: intraperitoneal

FSH: hormona folículo estimulante

GnRH: hormona liberadora de gonadotrofinas

KRBG: *Krebs Ringer Bicarbonate Buffer containing Glucose* (Solución amortiguadora Krebs Ringer Bicarbonato-Glucosa)

LH: hormona luteinizante

NMDA: receptor N-metil-D-aspártico

PMSG: gonadotrofina de suero de yegua preñada

PREG: pregnenolona

PRL: prolactina

PROG: progesterona

SNC: sistema nervioso central

SNP: sistema nervioso periférico

VLD: ventrículo lateral derecho

IV. RESUMEN

El estrés es parte de la vida de cualquier animal vertebrado y un factor de riesgo para la reproducción. Los esteroides sintetizados y metabolizados en el sistema nervioso central (SNC) se denominan neuroesteroides y juegan un rol central en la relación entre el estrés y la biología reproductiva. Allopregnanolona (ALLO) es un metabolito activo derivado de la progesterona (PROG) que interviene en numerosos parámetros fisiológicos y reproductivos de la rata hembra. En estudios previos, se encontró que ALLO inhibió la secreción de hormona luteinizante (LH), como así también el proceso de ovulación y la receptividad sexual. Además, ALLO aumentó los niveles de las hormonas PROG y prolactina (PRL). Todos estos antecedentes nos condujeron a hipotetizar que el efecto de ALLO podría extenderse hacia la morfo-fisiología ovárica. Nuestro objetivo consiste en determinar si una inyección intra-cerebro-ventricular (icv) de ALLO interviene en el proceso de regresión lútea, la concentración de PROG, el proceso de apoptosis en folículos y la morfometría de las distintas estructuras ováricas. Se inyectó ALLO icv en la mañana del proestro y los animales se sacrificaron 24 y 96hs posteriores a la administración. Se evaluaron los niveles séricos de las hormonas PROG y estradiol (ES), el proceso de apoptosis y proliferación celular en folículos ováricos, y el proceso de angiogénesis en cuerpos lúteos (CLs). Se halló que ALLO estimuló la apoptosis en los folículos ováricos, generó un aumento en el número de folículos atrésicos y una disminución en los niveles de ES. Además, ALLO indujo una disminución de la expresión del antígeno nuclear de proliferación celular (PCNA) en las células de los folículos ováricos, acompañado por una disminución en el número de folículos en estadios preovulatorios. A partir de los resultados hallados, se puede concluir que ALLO ejerce un efecto pro-apoptótico sobre los folículos ováricos en desarrollo y estimula la atresia folicular, con el consecuente descenso en la producción de ES. Por otro lado, el número de CLs se redujo y aumentó la apoptosis en animales bajo tratamiento con ALLO, y los niveles de PROG sérica aumentaron. Estos resultados sugieren que ALLO prolonga la supervivencia de los CLs, manteniéndolos funcionales por más tiempo y así generando un aumento en la PROG. Finalmente ALLO retrasaría el proceso natural de luteólisis, es decir, ejerce un efecto anti-apoptótico sobre la población de CLs. En un contexto ecológico, los hallazgos encontrados pueden interpretarse como un retraso de la reproducción ante situaciones de estrés, tales como la falta de recursos alimentarios, ausencia de machos o inclemencias climáticas.

1. INTRODUCCIÓN

1.1 ESTRÉS EN LA REPRODUCCIÓN

1.1.1 Consideraciones generales

La reproducción, la transmisión de genes de generación en generación, es la actividad más importante de cualquier organismo. Sin embargo, cuando las condiciones no son óptimas resulta prudente suspenderla hasta que el ambiente sea propicio. El estrés es una respuesta biológica que generan todos los organismos frente a las demandas y presiones del medio ambiente (Selye, 1936). El estrés está orientado a reestablecer la homeostasis o equilibrio interno y adaptarse a los cambios ambientales o estresores (Aboitiz y Dagnino-Subiabre, 2007). Normalmente un factor de estrés activa el eje hipotálamo-hipófisis-adrenal e induce la secreción de glucocorticoides como el cortisol que intervienen en la respuesta a situaciones de estrés. Existen diversos sistemas de neurotransmisión y núcleos en el hipotálamo que regulan la relación entre el estrés y la reproducción. En general, la estimulación de las glándulas adrenales por el estrés retrasa o incluso inhibe el pico preovulatorio de GnRH (Hormona liberadora de gonadotrofinas) y LH (hormona luteinizante), ocasionando así el retraso o inhibición de la ovulación (Dobson y col., 2003). La relación que existe entre la reproducción y el estrés involucra diversos sistemas de neurotransmisores, tales como GABA, NMDA, entre otros. Estos compuestos son cruciales para la correcta secreción hipotalámica de GnRH en distintas fases del ciclo reproductivo. La secreción de GnRH, y el consecuente pico de LH, está regulada por un fino balance entre estimulación e inhibición. Las influencias inhibitorias las ejerce el sistema GABA (Giuliani y col., 2013).

1.1.2 Sistema GABAérgico

GABA es el principal neurotransmisor inhibitor del SNC. Las neuronas GABAérgicas se encuentran distribuidas en el área preóptica medial (APOM) del hipotálamo. Dicha zona del cerebro está implicada en la regulación de la liberación de hormonas hipofisarias. De esta forma, pueden modular la actividad de otras neuronas, ya sean excitadoras o inhibitoras, y además controlan la secreción de hormonas, tales como GnRH y LH.

Existen tres tipos de receptores en el sistema GABAérgico: uno ionotrópico, el GABA_A, y dos metabotrópicos, GABA_B y GABA_C. Los receptores GABA_A forman un canal permeable al cloruro (Cl⁻) y al bicarbonato (HCO₃⁻). Algunos neuroesteroides, y en particular allopregnanolona (ALLO), potencian la conductancia de Cl⁻ vía receptor GABA_A a nivel pre y postsináptico (Lambert y col., 2003) (Figura 1). El mecanismo a través del cual ALLO interacciona con el receptor GABA_A continúa siendo investigado. Como se mencionó anteriormente, esta molécula es un modulador alostérico que, a concentraciones en el rango nM (nanomolares), potencia el efecto de GABA sobre los receptores GABA_A, mientras que concentraciones más altas (µM, micromolares) puede directamente abrir el canal de cloruro del receptor (Belelli & Lambert, 2005).

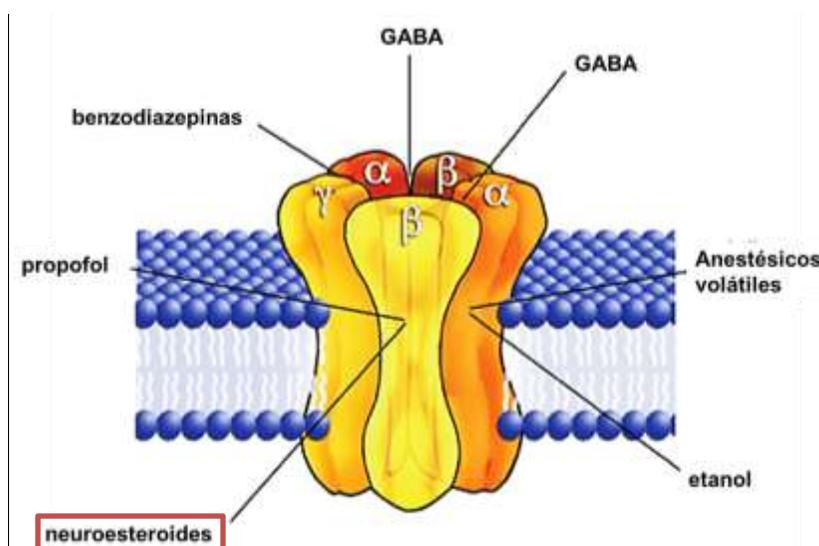


Figura 1. Representación esquemática del receptor GABA_A.

1.1.3 Neuroesteroides

Los neuroesteroides se definen como esteroides sintetizados *de novo* en el cerebro. Anteriormente se creía que los esteroides que actuaban modulando funciones cerebrales provenían únicamente de las glándulas esteroidogénicas clásicas (gónadas, adrenales y la placenta). En la década de los 80', se puso en evidencia que el cerebro era capaz de sintetizar esteroides a partir de colesterol de manera independiente de fuentes periféricas (Baulieu, 1981). Se propuso así el término "neuroesteroides" para designar a aquellos esteroides que se sintetizan en el cerebro, ya sea *de novo* o por un metabolismo *in situ* de precursores hormonales periféricos. La síntesis, acumulación y liberación de dichos compuestos en el sistema nervioso central (SNC) y sistema nervioso periférico (SNP) ocurren de manera independiente a las de los esteroides secretados por las glándulas esteroidogénicas clásicas (Robel & Baulieu, 1985; Baulieu, 1997; Melcangi & Panzica, 2006). Tanto los neuroesteroides como aquellos sintetizados por tejidos esteroidogénicos clásicos están involucrados en la regulación de numerosos procesos del SNC y SNP, modifican la excitabilidad neuronal mediante su unión a receptores de membrana de la misma forma a la que lo hacen los neurotransmisores excitatorios e inhibitorios (Paul & Purdy, 1992; Casas y col., 2011). Los niveles de neuroesteroides varían durante diferentes procesos fisiológicos (por ej. ciclo estral y menopausia), actuando en regiones cerebrales que regulan la actividad neuroendocrina y comportamental. Estas sustancias también actúan en procesos patológicos como enfermedades neurodegenerativas tales como el Mal de Parkinson, Alzheimer, esclerosis múltiple y desórdenes mentales como la esquizofrenia (Melcangi y col., 2011; Casas y col., 2013). Numerosas investigaciones se están llevando a cabo para esclarecer las funciones fisiológicas y mecanismos de acción farmacológicos de esta nueva clase de moléculas regulatorias centrales (Baulieu, 1997; Belelli & Lambert, 2005).

1.1.4 Allopregnanolona

Uno de los neuroesteroides más abundantes en el SNC es ALLO (3 α -hydroxi-5 α -pregnan-20-ona) (Majewska y col., 1986) (Figura 2). Se trata de un metabolito activo derivado de PROG que se sintetiza por células de la glía (astrocitos y oligodendrocitos) y por algunas neuronas en el SNC (Mensah-Nyagan y col., 1999). También ha sido demostrada la producción de este neuroesteroide en ovario y glándulas adrenales (Corpéchet y col., 1993). ALLO actúa como un potente modulador positivo del receptor GABA_A y posee propiedades hipnóticos-sedativas y anticonvulsivantes (Belelli y col., 1989). El efecto ansiolítico de dicho esteroide también se ha visto asociado al estado hormonal de ratas hembra (Laconi y col., 2001; Laconi & Cabrera, 2002; Laconi y col., 2007).

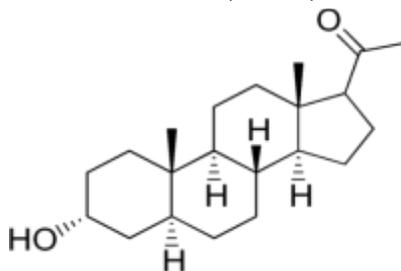


Figura 2: Representación de la molécula de ALLO.

Los neuroesteroides, principalmente ALLO, están involucrados en las respuestas al estrés y ansiedad (Laconi y col., 2001), en las modificaciones cíclicas del estado de ánimo y en la conducta sexual de la rata hembra (Laconi y col., 2002 y 2007). De hecho, se conoce que su concentración varía durante el ciclo estral, la preñez o bien durante situaciones de estrés.

En trabajos previos de nuestro laboratorio (Laconi y col., 2012), se encontró que ALLO administrada intra-cerebro-ventricular (icv) (30 minutos y 24hs pos administración) inhibió el proceso ovulatorio y la regresión lútea, así como también disminuyó el número de ovocitos en proestro. Además, ALLO inyectada de modo icv generó cambios significativos en el sistema dopaminérgico-hipotalámico, interactuando a nivel de diferentes sistemas de neurotransmisión que involucran receptores de membrana (por ej. dopamina, GABA y NMDA), y en forma genómico-dependiente, determinada por la activación de receptores intracelulares a esteroides ováricos. Este fenómeno es de relevancia en la regulación del eje hipotálamo-hipofiso-gonadal que regula la función reproductiva, entre otras (Cabrera y col., 2002; Laconi & Cabrera 2002; Laconi y col., 2007; Laconi y col., 2001 y 2012).

Los niveles hormonales séricos de progesterona (PROG) y estrógenos (ES) varían durante el ciclo estral y la preñez, así como también se modifican las concentraciones de ALLO en el SNC. Backström y col., demostraron que las variaciones en las concentraciones de los neuroesteroides, principalmente de aquellos actuantes sobre el receptor GABA_A, inducen cambios en los estados de ánimo en las mujeres. Estas alteraciones se tornan más evidentes durante la fase pre menstrual (Desorden Disfórico Pre Menstrual, DDPM), donde los niveles de PROG y, por consiguiente, los de ALLO, se encuentran en su punto máximo. El DDPM comprende alteraciones del humor

relacionadas con el ciclo menstrual, cuyos síntomas se encuentran en relación con los niveles hormonales circulantes post ovulación, coincidentes con la fase lútea. Diversos estudios han demostrado que la sensibilidad de los receptores GABA_A a los neuroesteroides como a otros moduladores alostéricos positivos disminuye durante etapa post ovulatoria (Guille y col., 2008). El tratamiento con antidepresivos, en especial con SSRI (Inhibidores de la Recaptación de Serotonina), aumenta la síntesis de ALLO en diferentes regiones del cerebro, atenuando así los síntomas característicos del DDPM (Sundström & Backström, 1998). Este neuroesteroide también parece ser el responsable de las propiedades anticonvulsivantes de PROG cuyos niveles están reducidos en pacientes con epilepsia. La administración de ALLO en varios modelos de epilepsia reduce la frecuencia de los episodios de ataques, lo que refuerza la idea de que podría ser un efecto mediado por el derivado 5 α -hidroxilado de la PROG (Frye, 1995).

Además, es bien conocido que el estrés induce aumentos en los neuroesteroides en el cerebro que tiene como consecuencias alteraciones en ciertos patrones de la reproducción como la receptividad sexual de la hembra, la ovulación y los patrones de secreción de hormonas sexuales femeninas. ALLO es uno de los neuroesteroides más sensibles a las alteraciones ambientales o endógenas compatibles con el estrés (Barbaccia y col., 1996).

1.2 OVARIO

1.2.1 Morfología

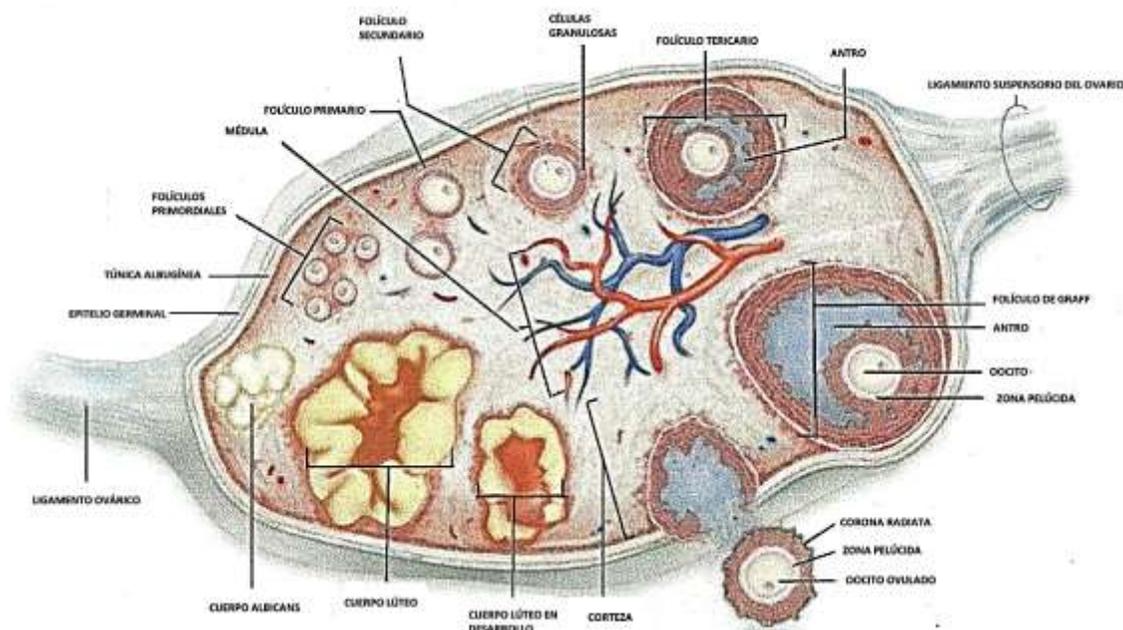


Figura 3: Estructura del ovario. Modificado de Human Anatomy, McKinley y O'Loughlin, McGraw-Hill Companies, Inc 2006.

Los ovarios de mamíferos son órganos con forma ovoide, de estructura compacta y están localizados en la zona abdominal (Figura 3). El ovario adulto se encuentra rodeado por un

epitelio cúbico simple (epitelio celómico) y puede ser subdividido morfológicamente en tres regiones: corteza, médula e hilio (Harrison & Weir, 1977). La corteza representa la mayor masa; comprende el estroma ovárico, formado por tejido conectivo laxo, fibroblastos y precursores de células tecales y folículos en distintos estadios de maduración, folículos atrésicos y CLs. Los ovocitos se encuentran dispuestos en una compleja estructura celular denominada folículo ovárico, unidad funcional del ovario adulto. La médula corresponde a la porción interna del ovario y está compuesta principalmente por tejido conectivo laxo y fibras musculares lisas (Byskov & Hoyer, 1988). Se encuentran abundantes vasos sanguíneos de calibre importante cuya trayectoria tortuosa alcanza la región cortical, como también vasos linfáticos y nervios. El hilio constituye el sitio de arribo y salida de vasos sanguíneos, linfáticos y nervios; está compuesto por tejido conectivo donde se encuentran células intersticiales hiliares. Al alcanzar la edad reproductiva el órgano comienza a engrosarse debido al crecimiento de los folículos y aparecen protrusiones sobre su superficie a medida que los mismos maduran. En animales con ovulación múltiple, como la rata, con varios folículos desarrollándose simultáneamente, la apariencia del ovario es semejante a un racimo de uvas.

El ovario es uno de los componentes del sistema hipotálamo-hipófisis-gónadas, responsable de regular las funciones reproductivas en hembras y machos. La tarea principal del ovario consiste liberar periódicamente ovocitos y sintetizar las hormonas esteroidales sexuales, manifestada fundamentalmente en respuesta a la secreción cíclica de gonadotrofinas hipofisarias LH y FSH (hormona folículo estimulante). La liberación cíclica de estos factores es controlada por la liberación pulsátil de sustancias neurosecretoras específicas, tales como la GnRH, que se originan en el hipotálamo, así como también por las influencias modificadoras procedentes de otros puntos del SNC y la innervación periférica (Greenwald & Terranova, 1988).

En el ovario adulto, las gametas son liberadas en forma recurrente a intervalos de tiempo que son especie-específicos; por ejemplo, 4-5 días en la rata y 28 días en la mujer. En general, se observan tantos folículos como ovocitos y se encuentran simultáneamente en un amplio rango de tamaños y estadios de desarrollo.

1.2.2 Angiogénesis ovárica

La angiogénesis es el proceso mediante el cual se forman nuevos vasos sanguíneos (neovascularización) y es esencial para el desarrollo y crecimiento tisular normal. Está regulado por factores pro y anti angiogénicos; comienza con la proliferación de capilares y culmina con la formación de una nueva red microcirculatoria compuesta por arteriolas, capilares y vénulas (Folkman & Klagsbrun, 1987). La neovascularización se completa mediante la formación del lumen capilar y la diferenciación de los capilares recién formados en arteriolas y vénulas. La angiogénesis ocurre en adultos durante procesos de crecimiento y reparación tisular como cicatrización de heridas y fracturas (Klagsbrun & D'Amore, 1991). El crecimiento capilar sostenido se asocia con condiciones patológicas diversas, como el crecimiento de tumores, retinopatías y hemangiomas.

Los órganos reproductivos femeninos (ovario, útero y placenta) crecen y se retraen periódica, rápida y dinámicamente (Reynolds y col., 1992), acompañados de cambios en la tasa de flujo sanguíneo y modificaciones en la arquitectura de la red vascular (Andersen, 1926; Bassett, 1943). Se ha demostrado que los folículos ováricos y cuerpos lúteos (CLs) contienen y producen factores angiogénicos. La tasa de proliferación en CLs, útero y placenta es comparable o mayor que la de tumores que crecen rápido o tejidos regenerando (Reynolds y col., 1994; Zheng y col., 1994; Christenson & Stouffer, 1995). El cuerpo lúteo (CL) en particular, además de exhibir un rápido crecimiento, regresa durante un corto período de tiempo en ciclo estral; estos eventos están acompañados por un rápido crecimiento y regresión de la vasculatura. Al mismo tiempo, el desarrollo vascular luteal se refleja en cambios dramáticos en las tasas de flujo sanguíneo y producción hormonal. Es por ello que en el presente trabajo resultan de particular interés los CLs como estructura modelo para estudiar el efecto de ALLO sobre el proceso angiogénico en ovario.

1.3 DESARROLLO FOLICULAR

El folículo ovárico consiste en una célula germinal femenina, el ovocito, rodeada por células de la granulosa y, eventualmente, células de la teca. La función del folículo ovárico es la de proveer el sistema de soporte necesario para que el ovocito adquiera la capacidad para unirse a una célula germinal masculina, el espermatozoide, y así generar un embrión capaz de desarrollarse hasta llegar al nacimiento. Las células del folículo sintetizan las hormonas sexuales femeninas (PROG y ES) que regulan la función reproductiva. Inicialmente, proveen los requerimientos nutritivos del ovocito; luego, controlan la maduración nuclear y citoplasmática de los ovocitos en folículos seleccionados para la ovulación y contribuyen a la atresia de los folículos no seleccionados. Estos efectos de las células foliculares sobre el desarrollo y destino de los ovocitos son mediados por cambios en el microambiente del folículo, principalmente a través de hormonas y factores de crecimiento que secretan al fluido folicular. Además, células foliculares especializadas (células del cúmulus) que forman la capa más interna que rodea al ovocito, están metabólicamente acopladas a él a través de uniones estrechas (*gap junctions*), que permiten la entrada de nutrientes y moléculas regulatorias al ooplasma.

El desarrollo de los folículos comienza con la formación de los folículos primordiales en la etapa prenatal; tras el nacimiento, el proceso se interrumpe, y continúa en un período que transcurre desde la pubertad a la menopausia. La clasificación de los folículos varía según los autores, en el presente trabajo se siguió la de Williams, 2008.

1.3.1 Folículo primordial

Histológicamente, un folículo primordial consiste en un ovocito arrestado en la fase diplotene de la profase meiótica, una capa de células de la granulosa aplanadas en estrecho contacto con el ovocito y una lámina basal. Mediante de ésta última estructura, las células de la granulosa y el ovocito se encuentran en un microambiente en el que no

ocurre contacto directo con otras células (Irving-Rodgers, 2000). Por ello, estos folículos tienen acceso limitado al sistema endócrino. Dichos folículos se encuentran en la periferia de la corteza, inmediatamente por debajo de la túnica albugínea, y **constituyen un reservorio de folículos en estado de reposo que disminuyen a lo largo de la vida reproductiva.**

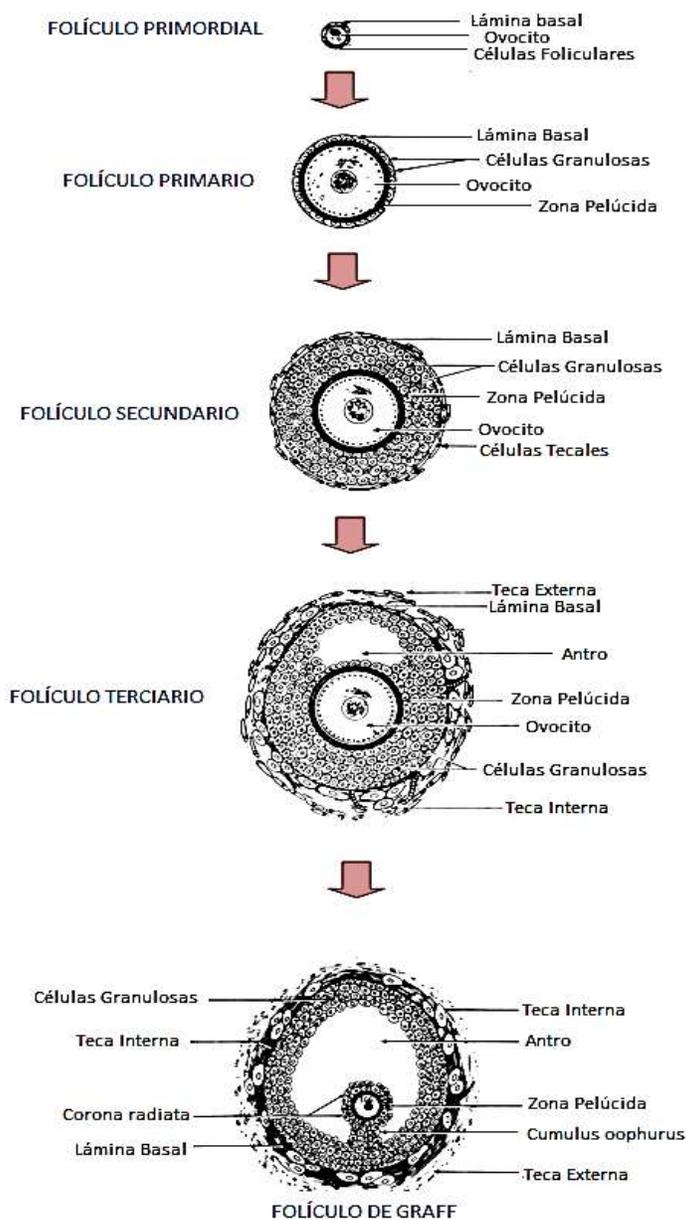


Figura 4: Estadios del desarrollo folicular. Modificado de Erickson y col, 1985.

1.3.2 Folículo primario

La transición a folículo primario implica ciertas modificaciones citológicas en todo el folículo. A medida que el ovocito aumenta de tamaño, la capa de células de la granulosa

aplanadas se convierte en una capa de células cúbicas y mediante mitosis origina las células granulosas que formarán posteriormente un epitelio estratificado. Entre el ovocito y las células granulosas se originan espacios donde se depositan mucopolisacáridos secretados por las células de la granulosa, lo que representa el inicio de la zona pelúcida. La capa de células granulosas carece de vasos durante todo el desarrollo. Los eventos principales de desarrollo en esta etapa son la expresión de receptores para FSH y el crecimiento y diferenciación del ovocito. A pesar de que las fases iniciales del crecimiento folicular son independientes de gonadotropinas, la hormona FSH es necesaria para el pasaje de folículo primario a terciario o preantral.

1.3.3 Folículo secundario

Los cambios principales de los folículos secundarios incluyen la formación de un epitelio estratificado de células de la granulosa alrededor del ovocito, la maduración de la zona pelúcida (Balinsky, 1984; Bloom y col., 1986) y la aparición de una teca incipiente por fuera de la lámina basal. Las células de la granulosa poseen uniones estrechas que permiten el acople metabólico del epitelio, asegurando la nutrición de las capas más internas. Las células de granulosa tienen la capacidad de sintetizar los tres tipos de esteroides ováricos (progestágenos, andrógenos y estrógenos) en cantidades limitadas. Sin embargo, se produce más ES que andrógenos o progestágenos (Hillier y col., 1977). La enzima aromatasa cataliza la conversión de andrógenos a ES (aromatización) y es el factor limitante de la producción ovárica de ES. La enzima es inducida por la FSH (Moon y col., 1978), de modo que la producción de ES está limitada, en parte, por el número de receptores para esta hormona. La FSH se combina con los ES para ejercer un efecto mitogénico sobre las células de granulosa (Goldenberg y col, 1972). El destino del folículo secundario depende del balance de esteroides: en concentraciones bajas, los andrógenos aumentan su propia aromatización y contribuyen a la producción de ES; en concentraciones altas, la capacidad limitada de aromatización es sobrepasada y el folículo deviene androgénico y se transforma en atrésico.

1.3.4 Folículo terciario o antral

En este tipo de folículo se pueden distinguir dos capas de células de la teca: una interna, glandular y vascularizada, con células epiteliales cuyo citoplasma está lleno de gotas lipídicas, retículo endoplásmico liso y mitocondrias; y otra externa, que consiste en células musculares lisas y tejido conectivo. La teca interna posee receptores para LH e insulina; las células de la teca externa no tienen actividad esteroideogénica. En respuesta a dichas hormonas, se producen altos niveles de andrógenos. Por otro lado, existen capilares en la teca interna y externa pero están ausentes en células de la granulosa porque la lámina basal actúa como una barrera a la vascularización. Luego de la ovulación, las células de la teca interna y sus capilares asociados cruzan la lámina basal e invaden la capa de granulosa en tanto el tejido se transforma en CL. Bajo la influencia de los ES y la FSH, se produce un aumento de la producción de fluido folicular, que empieza acumularse en los espacios intercelulares de las células de granulosa hasta que se forma una cavidad llamada antro. El fluido folicular provee un ambiente endócrino para cada folículo,

permitiendo el acceso de las hormonas FSH y LH hasta sus receptores celulares. La presencia de ES y FSH en el fluido antral es esencial para la proliferación de las células de granulosa y para el crecimiento folicular continuo (McNatty y col., 1979). Las proteínas plasmáticas, las gonadotropinas y la prolactina (PRL) alcanzan el líquido antral por difusión desde los espacios vasculares externos a la lámina basal. Los folículos antrales que tienen mayor proliferación celular poseen altas concentraciones de ES y menor relación andrógenos/estrógenos, permitiendo una mayor probabilidad de mantener un ovocito viable. En caso contrario, si existe un ambiente androgénico, promueve la degeneración del ovocito.

La síntesis de hormonas esteroideas parece estar compartimentalizada dentro del folículo: las células de granulosa producen principalmente ES, mientras que la síntesis de andrógenos predomina en células tecales (McNatty y col., 1979). La biosíntesis de ES dada por ambos tipos de células dio origen a la hipótesis “dos células, dos gonadotropinas” (Fortune & Armstrong, 1977) (Figura 5). LH estimula la síntesis de andrógenos a partir del colesterol en las células tecales. Los andrógenos difunden a través de la lámina basal por medio de una red de capilares y se convierten en ES por medio de la enzima aromatasa inducida por FSH en las células de granulosa (Moon y col., 1978). Además, la PROG liberada por las células de granulosa en respuesta a gonadotropinas puede difundir hacia las células tecales convirtiéndose en sustrato para la síntesis de andrógenos. Aunque la actividad de la aromatasa es principalmente estimulada por FSH, estudios in vitro en células de granulosa provenientes de ratas inyectadas con FSH mostraron que LH también estimula directamente la producción de ES.

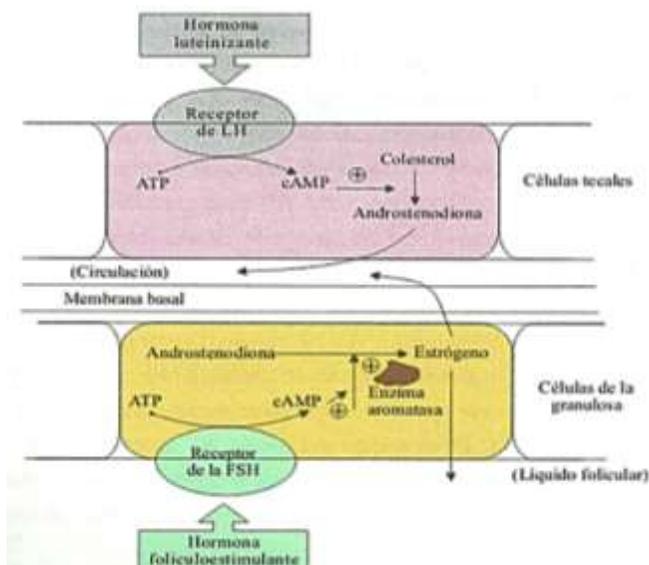


Figura 5: Esquema de la teoría dos células-dos gonadotropinas. Modificado de Yen & Jaffe, 2002, Editorial Panamericana.

1.3.5 Selección del folículo dominante

El proceso de desarrollo de los folículos puede dividirse en dos etapas: etapa preantral y etapa antral. La etapa preantral está dividida en tres fases: folículos primordiales, primarios y secundarios. La etapa antral se encuentra dividida en cuatro fases, según el

tamaño de los folículos: pequeños, medios, grandes y preovulatorios o de Graaf (Williams & Erickson, 2003). La etapa preantral corresponde al crecimiento de folículos primordiales hasta el estadio antral temprano o folículos secundarios (Hsueh y col., 2000). Se caracteriza por un aumento en la proliferación de células de granulosa y por un crecimiento del antro. Esta fase es independiente de las gonadotropinas y se caracteriza por el crecimiento y diferenciación del ovocito. **La segunda etapa, la etapa antral, comienza con el inicio de la pubertad y es el resultado del aumento de FSH** (Hsueh y col., 2000), por lo que **depende de gonadotropinas**. Se caracteriza por un aumento importante en el tamaño del folículo mismo. En la fase folicular temprana, la FSH estimula la actividad de la aromatasa de las células de la granulosa, lo que produce altas concentraciones de ES. Esto aumenta la sensibilidad del folículo a la acción de la FSH. Hacia la mitad del ciclo, un folículo habrá producido más cantidad de ES que el resto de los folículos de la cohorte. El aumento de los ES e inhibina en el folículo dominante está acompañado por la disminución de los niveles circundantes de FSH. Por lo tanto, el resto de los folículos no alcanzan a desarrollarse. Estos folículos poseen alta cantidad de andrógenos y baja sensibilidad a FSH. Las gonadotropinas y los ES cumplen una función determinante en la selección folicular. También, las células de la teca del folículo dominante tienen más receptores para LH y mayor vascularización respecto de los folículos no seleccionados. El aumento de la irrigación conduce a una mayor entrega de FSH a las células de la granulosa. Por lo tanto, el folículo dominante adopta un rol activo para asegurarse un medio propicio. FSH es el factor más potente para rescatar a los folículos antrales tempranos de la apoptosis durante el reclutamiento cíclico y les permite establecer dominancia sobre el resto de los folículos (Greenwald & Sieger, 1982). Para el caso de especies de ovulación múltiple se seleccionan varios folículos al mismo tiempo para ovular.

1.3.6 Fólculo de Graaf o preovulatorio

Son aquellos que han alcanzado los estadios finales de crecimiento y maduración del folículo y han adquirido la habilidad para ovular ante los adecuados niveles de LH. La cavidad antral se encuentra completamente formada y las células de la granulosa aumentan de volumen. Las células de la granulosa se agrandan y adquieren inclusiones lipídicas, mientras que las células de la teca adquieren vacuolas y capilares. El ovocito reasume la meiosis y el folículo aumenta de tamaño ante la acumulación de fluido folicular entre las células de la granulosa. **Los niveles de ES se elevan y estimulan el pico de gonadotropinas**. LH promueve la luteinización de las células de la granulosa y tecales. El incremento de ES inhibe la síntesis de andrógenos por las células de la teca, favoreciendo la producción de PROG.

1.3.7 Ovulación

La ovulación consiste en un aumento del tamaño folicular seguido de la protrusión de los folículos desde la corteza ovárica debido a un ascenso de ES, seguido de un pico de LH y FSH. Luego del pico de LH, la concentración de PROG en el folículo preovulatorio continúa aumentando, hasta la ovulación. Este esteroide, mediante un mecanismo de

retroalimentación negativa, sería el responsable de la finalización del pico de LH (Caron y col., 1975). Otra importante función de la PROG es la de aumentar la dilatabilidad de la pared del folículo (Peters & McNatty, 1980).

1.3.8 Formación cuerpo lúteo y proceso de luteólisis

El CL es una glándula endócrina transitoria formada por células esteroidogénicas (luteales), fibroblastos, células endoteliales, inmunes y pericitos; produce PROG por estímulo de hormonas tróficas hipofisarias. Lo componen dos tipos de células: luteales grandes de forma poliédrica, con citoplasma claro en el cual se encuentran gránulos de secreción que contienen PROG, además de otras hormonas como relaxina y oxitocina; y células luteales pequeñas de forma ahusada, con un citoplasma oscuro que contiene gotas de contenido lipídico (Wathes y col., 1983).

Luego de la ovulación, el folículo dominante atraviesa un proceso de remodelado tisular para convertirse en un CL (luteinización). Involucra cambios estructurales y genómicos, desaparecen proteínas claves y comienza la síntesis de otras. Esto determina una alteración en la respuesta celular a señales externas, por ejemplo el receptor de FSH se vuelve indetectable en los CLs. Los capilares y los fibroblastos del estroma circundante proliferan y penetran la lámina basal. Las células de granulosa se hipertrofian por el aumento de organelas intracelulares, tales como mitocondrias, retículo endoplásmico liso y vacuolas lipídicas. La transformación celular también involucra cambios en la expresión de proteínas claves, lo que desencadena una alteración en la respuesta celular a señales externas. Por otro lado, las profundas alteraciones tisulares están acompañadas por cambios en la matriz extracelular que permiten la migración celular y la neovascularización del nuevo CL.

El regulador clave de la esteroidogénesis es la LH, hormona esencial para la estimulación y mantenimiento de la producción luteal de PROG. Actúa a través del receptor de LH localizado en el CL; al activarlo aumentan los niveles de AMPc, se activa la proteína quinasa A, que estimula la incorporación y el transporte de colesterol a la mitocondria, su conversión en PREG y PROG. Además, PROG es capaz de actuar localmente para sostener la función luteal (Rothchild, 1981). Este esteroide puede estimular su propia secreción y proteger al CL de la muerte celular.

El proceso de apoptosis de CLs viejos es esencial para mantener la ciclicidad y la liberación de PROG durante el ciclo estral (Amsterdam & Selvaraj, 1997). La regresión del CL ocurre en dos fases: regresión funcional y estructural. La primera se asocia con una marcada disminución en la producción de PROG; la segunda se produce tras el descenso inicial en la producción de PROG, donde las células luteales mueren por apoptosis. El proceso culmina con la formación de una estructura conocida como cuerpo *albicans*, producto del remodelado tisular que finalmente se transformará en una cicatriz en el tejido del estroma ovárico.

1.3.9 Atresia folicular

La muerte celular es un evento crucial para el mantenimiento de la homeostasis ovárica; asegura que solo un ovocito o varios por ciclo alcanzarán el estado de Graaf y ovularán. El ovario humano contiene 2 millones de ovocitos al nacer y alrededor de 400.000 folículos al inicio de la pubertad (Figura 6). Sin embargo, se ovulan solamente 400 folículos durante la vida fértil de la mujer. Por lo tanto, más del 99,9 % de los folículos degeneran antes de llegar a la ovulación mediante un proceso conocido como atresia. Todos los estadios del desarrollo folicular son susceptibles de atravesar dicho proceso y resultan en estructuras conocidas como folículos atrésicos. El mecanismo de selección folicular más importante es la exposición de los folículos a FSH durante un estadio crítico del desarrollo. Aquellos folículos que reciben insuficiente cantidad de FSH están condenados a la degeneración por atresia. Se hipotetiza que la exposición a FSH durante la penúltima etapa del desarrollo folicular es un requisito para escapar a la atresia y alcanzar la etapa ovulatoria (Baird, 1983).

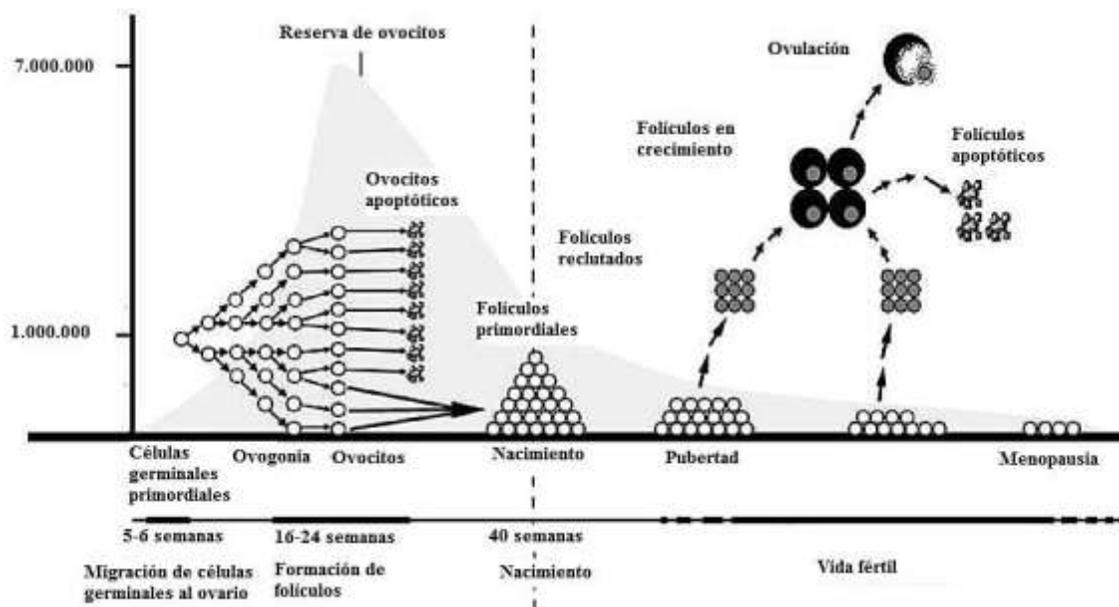


Figura 6. Ilustración que muestra las etapas de desarrollo y la disminución en la reserva folicular lo largo de la vida de la hembra.

Desde el punto de vista morfológico, los folículos atrésicos pueden dividirse en varios estadios (Figura 7) (Tsafriri & Adashi, 1994):

Estadio I: se caracteriza por un bajo número de células de granulosa (<10%) con núcleo picnótico cerca del antro folicular mientras otras células se encuentran en mitosis.

Estadio II: presenta de varias células de granulosa picnóticas (10- 30%), pocas células en mitosis y restos celulares en el antro. La lámina basal pierde la integridad y existe infiltración de leucocitos en la capas de células de granulosa.

Estadio III: presenta escasas células de granulosa, ausencia de células en mitosis y un colapso del folículo. Las células de la teca se hipertrofian y contienen gotas de lípidos. Estas células forman parte ahora de las células intersticiales del estroma y se cree que son activas a nivel esteroidogénico.

Cambios histológicos en las células de la granulosa en estados avanzados de atresia incluyen separación de la lámina basal y presencia de cuerpos apoptóticos. Además, el ovocito condensa su citoplasma y adquiere límites irregulares.

Por otro lado, se han identificado varios marcadores bioquímicos como la síntesis reducida de DNA en células de granulosa (Greenwald, 1989), expresión disminuida del antígeno de proliferación celular (PCNA) y de los receptores para aromatasa y gonadotrofinas (Uilenbroek y col., 1980).

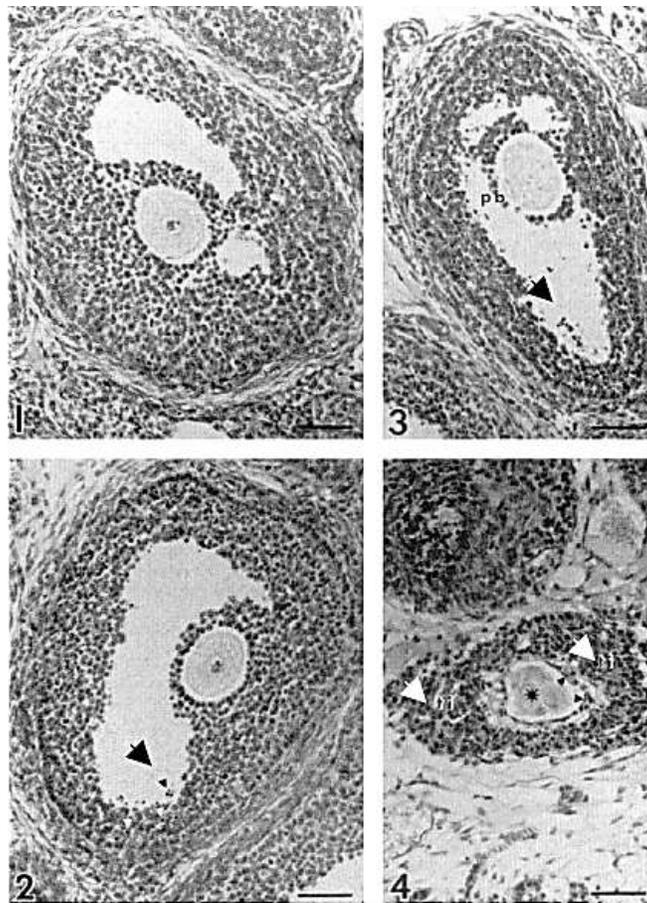


Figura 7: Histología de los estadios de atresia en el ovario de la rata. 1: Folículo sano; 2: Estadio 1 de atresia, la flecha indica núcleos de células de granulosa picnóticos; 3: Estadio 2 de atresia, el fluido folicular contiene restos celulares (flechas). 4: Estadio 3 de atresia: * indica ovocito fragmentado. Las células de la teca interna están hipertrofiadas (flechas). El folículo se encuentra colapsado. Barra 50mm. (Braw & Tsafiri, 1980).

1.4 MUERTE CELULAR

1.4.1 Apoptosis

La apoptosis es un evento activo (utiliza energía química) que ocurre en tejidos en crecimiento o en respuesta a estímulos fisiológicos. Este suicidio se caracteriza por pérdida de volumen celular (condensación citoplasmática) acompañada por picnosis nuclear que resulta de la marginación de la cromatina y su redistribución a lo largo de la membrana nuclear. Además, muchas organelas se mantienen intactas antes del estadio final de la muerte celular, que es observado en la formación y liberación de vesículas rodeadas por membrana plasmática (cuerpos apoptóticos). Estas vesículas contienen componentes celulares que luego son fagocitados por células vecinas (Hsueh y col., 1994).

1.4.2 Apoptosis como mecanismo de atresia folicular

Durante el desarrollo del ovario ocurren tres procesos relacionados con la apoptosis: degeneración de la ovogonia y del ovocito, luteólisis y atresia folicular. En el presente trabajo nos focalizaremos en la atresia folicular.

Estudios in vivo demuestran que la degeneración de la ovogonia y de ovocitos fetales de ratón está dada por apoptosis (Coucouvani y col., 1993). En la mayoría de los mamíferos, los folículos ováricos degeneran por atresia y se ha observado por análisis inmunohistoquímico que la marca apoptótica está confinada a las células de granulosa (Tilly, 1993). La fragmentación del DNA se encontró en folículos atrésicos y no en los saludables, demostrando el rol de la apoptosis en la atresia folicular (Tilly y col., 1991). Similares estudios mostraron la presencia de actividad de endonucleasa en ovarios de ratas tratadas con PMSG (que posee actividad de FSH) y hCG (gonadotropina coriónica humana); indicando que la atresia dada por apoptosis involucra la activación de endonucleasa (Zelevnik y col., 1989).

En modelos in vitro como in vivo, se ha demostrado en el ovario la presencia de varios factores atretogénicos (pro-apoptóticos): GnRH, IL-6, andrógenos, TNF- α , Ligando Fas, entre otros. El péptido GnRH y sus agonistas tienen efectos inhibitorios en la diferenciación folicular a través de sus receptores en células de granulosa y tecaes. Además, GnRH aumenta los niveles de Ca²⁺ y de fosfatidil inositol en células de granulosa de rata (Wang y col., 1992). Los andrógenos estimulan la apoptosis en ovario (Tapanainen y col., 1993), aumentando así el número de células de granulosa picnóticas (Azzolin & Saiduddin, 1983). Además, la tasa de andrógenos/estrógenos es alta en el fluido folicular de folículos atrésicos (Carson y col., 1981).

En cambio, entre los factores de supervivencia folicular (antiapoptóticos), se encuentran el Factor de Crecimiento Epidermal (EGF), Factor de Crecimiento similar a Insulina tipo I (IGF-I), Factor de Crecimiento Transformante (TGF), hormonas FSH, LH o hCG. Los ES inhiben la apoptosis en ovario (Billig y col., 1993), aumentan el crecimiento folicular y el índice mitótico de las células de granulosa. El tratamiento con FSH en ratas hipofisectomizadas disminuyó la apoptosis folicular de células de granulosa (Billig y col.,

1994). Además, se observó que el tratamiento in vitro con FSH o hCG/LH previene la fragmentación de DNA apoptótico en cultivos de folículos preovulatorios (Chun y col., 1994).

Los receptores de FSH están presentes exclusivamente en células de granulosa y cumplen un importante rol en las células vecinas, las células tecales. FSH o LH pueden actuar en las células de granulosa, produciendo un factor estimulador que aumenta la secreción de EGF por células tecales. Luego, estos factores de crecimiento podrían difundir hacia las células de granulosa e inhibir la apoptosis. También, el FGFb es producido por células de granulosa (Neufeld y col., 1987) y el TGF es producido por células de la teca y de granulosa, indicando que estos factores cumplirían un rol autócrino en la regulación de la apoptosis.

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

Caspasas

Estas proteínas pertenecen a una familia de proteasas ricas en cisteína que clivan a otras proteínas en residuos aspartato (*Cysteinyl aspartate-specific proteases*), y son responsables de la mayoría de los clivajes proteolíticos que ocurren durante la apoptosis. Las caspasas son traducidas como zimógenos inactivos que deben ser activadas mediante su clivaje. El mecanismo mediante el cual las caspasas son activadas las divide en dos categorías diferentes. El primer grupo incluye las denominadas "Caspasas iniciadoras" (caspasa 2, 8, 9 y 10) que inician la cascada y poseen un dominio que facilita su autocatálisis mediante el ensamblaje de complejos multiproteicos. Una vez procesadas las caspasas iniciadoras, activan a la segunda categoría de caspasas, "Caspasas efectoras" (caspasa 3, 6, 7) que degradan proteínas estructurales (como las del citoesqueleto) y homeostáticas como la polimerasa ADP-ribosa (enzima que repara ADN), ribonucleoproteínas nucleares (factores responsables del ensamblaje del spliceosoma y procesamiento del ARN) y proteínas estructurales responsables del plegamiento nuclear (Martin & Grenn, 1995). La expresión y activación de caspasa-3 clivada induce la apoptosis en distintos tipos celulares y su expresión se ha encontrado en ovario de rata (Boone & Tsang, 1998). El resultado de la activación de estas proteínas no solo es la pérdida de la homeostasis celular, sino también la ruptura y empaquetamiento de las células en cuerpos apoptóticos eliminados por fagocitosis. De esta última etapa se encargan los macrófagos o células circundantes que normalmente no intervienen en el proceso apoptótico. Cualquier célula con núcleo posiblemente tenga capacidad fagocítica y digiera células muertas por apoptosis, por ejemplo las células epiteliales (Cohen, 1993). Otros autores sostienen que los cuerpos apoptóticos son fagocitados por las células vecinas como fibroblastos o células epiteliales (y no necesariamente por macrófagos profesionales) (Majno & Joris, 1995).

1.5 CICLO OVÁRICO EN LA RATA

Se denomina ciclo estral a la modificación periódica del útero y de la vagina desencadenada por secreciones hipofisarias y ováricas, que preparan a la rata para la fecundación y la gestación. Este período tiene una duración de 4 a 5 días y está comprendido por 4 estadios: estro, diestro 1, diestro 2 y proestro. Los distintos estadios del ciclo estral pueden ser reconocidos mediante observación al microscopio óptico de frotis vaginal según los tipos celulares presentes en el extendido.

Estro: período durante el cual la hembra está dispuesta a recibir al macho en coito fecundante. Se produce la **ruptura del folículo ovárico y la subsecuente ovulación**. Hay **bajos niveles séricos de ES durante este estadio**. A nivel histológico, hay predominio de células cornificadas (escamas) y muy pocas células epiteliales.

Diestro I: se caracteriza por la **formación de CLs, los cuales comienzan a sintetizar PROG**, observándose el primer pico hacia la tarde de este estadio. Hay alteración de la pared vaginal y uterina. Tardíamente los niveles de **ES comienzan a aumentar**. En el frotis vaginal se observa predominio de leucocitos.

Diestro II: tiempo durante el cual **la secreción ovárica prepara los tejidos reproductivos para la recepción del óvulo fertilizado luego del coito en estro**. En su etapa temprana los niveles de **ES siguen en aumento y la PROG empieza a declinar permitiendo un subsecuente período de ovulación**. En el frotis vaginal se observan proporciones similares de células epiteliales y leucocitos. En la rata dura normalmente uno o dos días, determinando que el ciclo estral tenga una duración de 4 o 5 días. Si la fertilización no ocurre, el animal vuelve al período de proestro y un nuevo ciclo se inicia.

Proestro: es el momento en la que la hembra manifiesta máxima receptividad sexual. Es la fase en la que el folículo comienza a aumentar de tamaño, el CL regresiona por completo, las paredes vaginales se engrosan y el útero está más irrigado. **En el proestro temprano los niveles de ES son máximos y se mantienen elevados hacia la mitad del estadio**. Cuando comienza el período de oscuridad los niveles séricos de esta hormona decaen abruptamente. A su vez, hay un segundo pico de PROG. Durante esta etapa del ciclo estral, a nivel citológico predominan células epiteliales nucleadas, redondas y algunas veces escamosas.

La rata de laboratorio es un mamífero no estacional, de ovulación espontánea y poliéstrica. Es decir, el ciclo ovárico ocurre durante todo el año, la ovulación no depende del estímulo de la cópula y presenta múltiples períodos de receptividad sexual. Estas características, su fácil reproducción y mantenimiento en bioterio hacen de la rata de laboratorio un buen modelo para el estudio de la fisiología ovárica gonadal.

Los patrones de liberación hormonal son muy complejos e históricamente se ha tratado de desentrañar cuáles son los factores que los regulan. Se sabe que los perfiles de liberación de hormonas gonadales se correlacionan con los patrones de liberación de hormonas

hipofisarias y éstos a su vez, con los factores liberadores hipotalámicos. Lo anterior ha llevado a establecer que el sistema neuroendocrino mediante el eje hipotálamo-hipófiso-gonadal gobierna todas estas acciones, en perfecta sincronía con los sistemas regulatorios de retroalimentación y los ritmos circadianos (Figura 8).

Los ovarios no sólo son la fuente de ovocitos, sino también de hormonas esteroideas cuya regulación está dada por hormonas hipofisarias. Las hormonas esteroideas pueden clasificarse, en base a su función biológica y estructura química, en tres clases: progestágenos, andrógenos y estrógenos. Son sintetizados a partir del colesterol derivado de una de estas tres fuentes: a) incorporado de la circulación sanguínea, unido a lipoproteínas; b) almacenado dentro de la célula, como colesterol libre en las membranas celulares, o como ésteres de colesterol en gotas lipídicas citoplasmáticas; c) sintetizado *de novo* en la célula.

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

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

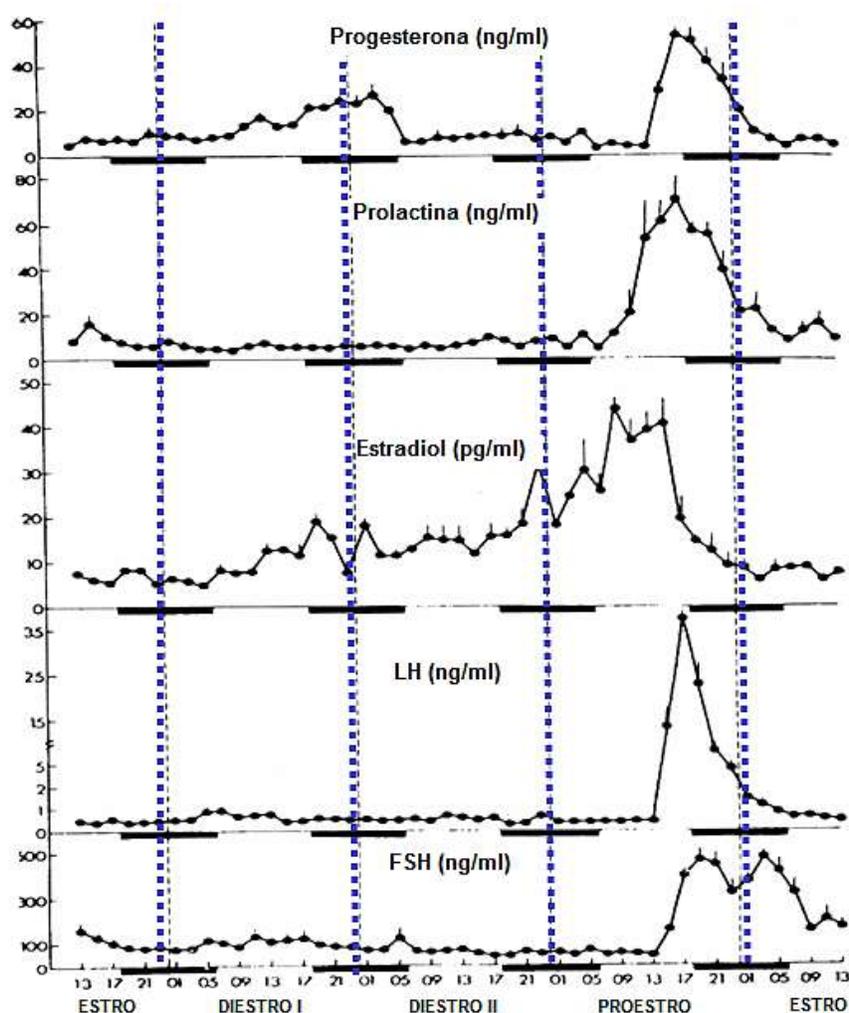


Figura 8: Niveles séricos de PROG, PRL, ES, LH y FSH, a lo largo de los cuatro días del ciclo estral en la rata. Las barras negras representan el período de oscuridad de (18 a 06hs), los números en la abscisa indican la hora del día. (De Smith y col., 1975).

1.6 REGULACIÓN NEUROENDOCRINA

1.6.1 Sistema neuroendocrino

El sistema neuroendocrino ha evolucionado para registrar, transducir e integrar de manera efectiva la información neural y humoral, y llevar a cabo acciones fisiológicas apropiadas basadas en la interpretación de las señales fisiológicas que llegan desde la periferia. En casi todo el sistema endócrino, predominan señales de retroalimentación negativa para el mantenimiento de la homeostasis. En el eje hipotálamo-hipófiso-gonadal los esteroides gonadales controlan la liberación de gonadotrofinas hipofisarias y factores liberadores hipotalámicos a través de retroalimentación negativa y positiva (Figura 9). La acción de retroalimentación positiva de los ES es la responsable de la producción de un robusto pico de secreción de gonadotrofinas que induce la ovulación. Las señales neuroendocrinas claves para la estimulación de los picos de gonadotrofinas se conocen desde hace décadas pero los mecanismos celulares que integran estas señales todavía no son muy

bien entendidos. Es claro que las secreciones preovulatorias de ES son necesarias para la ovulación. En ratas y en otras especies, se requieren además, señales neurales y gliales desconocidas aún para iniciar este proceso en un momento específico y bajo las condiciones fisiológicas apropiadas (Levine, 1997).

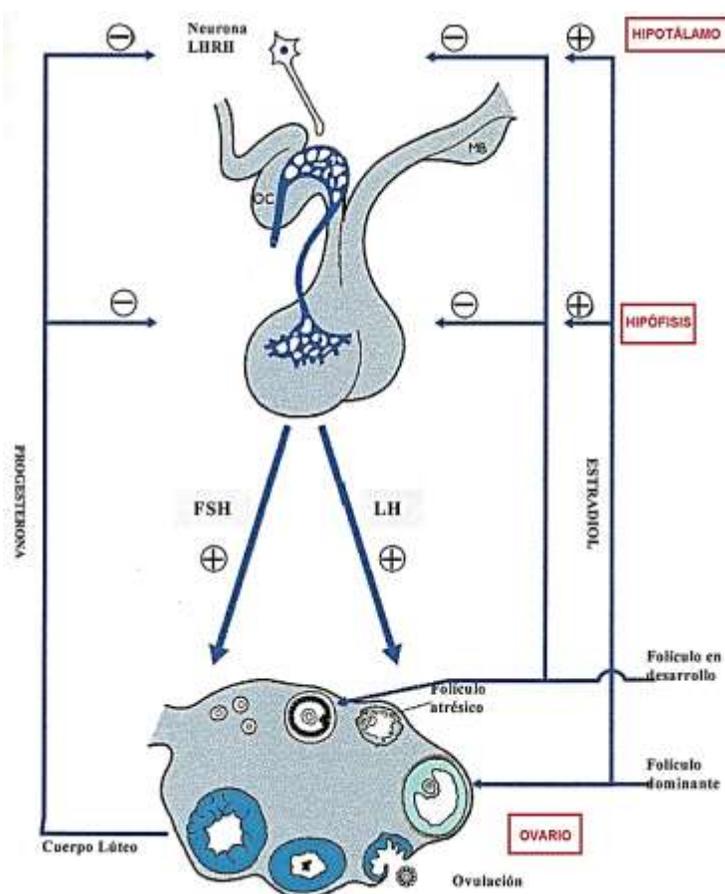


Figura 9: Efecto de retroalimentación de las distintas hormonas sobre el eje hipotálamo-hipófiso-gonadal. Modificado de Nussey y Whitehead, 2001.

1.6.2 Conexiones anatómicas del eje hipotálamo-hipófisis

El hipotálamo es un órgano neuroendocrino que forma parte del encéfalo y es fuente de varias neurohormonas que interactúan con la hipófisis. La hipófisis o glándula pituitaria es una glándula pequeña situada en la base del cráneo (silla turca). Consta de dos partes estructural y fisiológicamente distintas: adenohipófisis, que comprende lóbulos anterior e intermedio, y la neurohipófisis, que comprende el lóbulo posterior. La neurohipófisis recibe terminales axónicas del hipotálamo mediante los que se transportan y almacenan neurohormonas hipotalámicas (Figura 10). La mayoría de las neurohormonas secretadas por el hipotálamo viaja mediante un delicado sistema de vasos (sistema porta hipotálamo-hipofisario) hacia la adenohipófisis, en donde estimulan o inhiben secreciones hormonales como LH y FSH. Los principales determinantes de los picos primarios de LH y FSH son las acciones de retroalimentación positiva del ES, junto con los ritmos circadianos.

El hipotálamo sintetiza GnRH mediante sus axones que terminan en los capilares porta-hipofisarios, a través de los cuales GnRH llega a las células gonadotróficas de la adenohipófisis. En adultos GnRH es secretada de manera pulsátil cada hora y en rata aproximadamente cada media hora. Diferentes patrones de secreción son observados dependiendo de la etapa de desarrollo del individuo. GnRH estimula la síntesis y liberación de LH y FSH y es el patrón (amplitud y frecuencia) de pulsos secretorios lo que regula estas funciones. Las respuestas de LH y FSH a un pulso de GnRH son mediadas por dos factores más: retroalimentación de los esteroides gonadales sobre las células gonadotróficas de la hipófisis y la regulación sobre los receptores de GnRH presentes en estas células. Ante la ausencia de pulsos regulares de GnRH, los gonadotrofos de la hipófisis internalizan los receptores de GnRH y se hacen gradualmente menos sensibles (Levine, 1997).

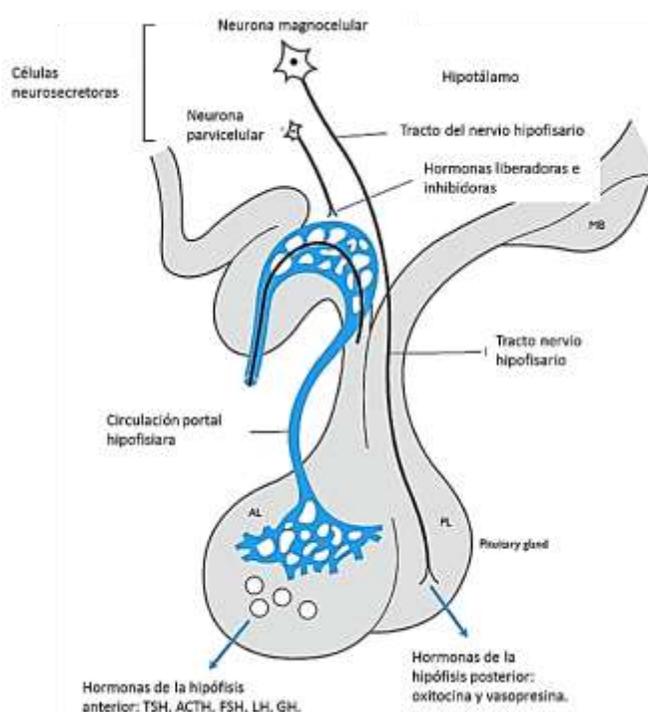


Figura 10: Hipófisis y sus relaciones anatómicas con el hipotálamo. Abreviaciones: AL, lóbulo anterior; PL, lóbulo posterior; OC, quiasma óptico; MB, cuerpo mamilar. Modificado de Nussey SS and Whitehead SA, 2001.

Los antecedentes inmediatos de este trabajo (Laconi y col., 2001; Laconi y col., 2012) proponen a ALLO como un modulador de la regulación de la fisiología reproductiva de la hembra en situaciones de estrés. Dichos estudios, demuestran que ALLO alteró la conducta sexual de la rata hembra (inhibe la receptividad) e inhibió la ovulación. Por este motivo, se desarrollaron en los últimos años líneas de investigación sobre el rol de este neuroesteroide en la fisiología ovárica de rata. Además, teniendo en cuenta su acción moduladora sobre los receptores GABA_A, es que se abre un panorama promisorio en la investigación del rol de ALLO y su relación con los componentes involucrados en el

control neural de la función reproductiva en la hembra y su potencial rol farmacológico en patologías asociadas.

Hasta ahora se conocen, como hemos citado, efectos de ALLO sobre la conducta sexual y la neuromodulación. Sin embargo, no existen evidencias hasta el presente de la acción del neuroesteroide sobre la morfo-fisiología ovárica, incluyendo patrones de liberación hormonal y desarrollo folicular.

En este trabajo, nos enfocamos a estudiar los efectos de allopregnanolona, sobre diversos parámetros de la morfo-fisiología ovárica de la rata hembra: niveles de las hormonas ES y PROG, crecimiento y desarrollo folicular, procesos de apoptosis y angiogénesis. Finalmente se integra su función con el resto del eje hipotálamo-hipófisis-gónadas desde el punto de vista endocrino.

2. HIPÓTESIS

El neuroesteroide allopregnanolona administrado intra-cerebro-ventricular en una dosis equivalente a la concentración producida por estrés altera la morfo-fisiología del ovario de la rata interviniendo en el proceso de atresia folicular, apoptosis, angiogénesis y patrones de liberación de hormonas esteroidales.

3. OBJETIVOS

3.1 OBJETIVO GENERAL

Evaluar el efecto de la administración de una única dosis de ALLO, equivalente a la concentración producida por el estrés, en el ventrículo lateral derecho a las 24 y 96hs pos administración sobre los procesos de muerte celular programada, formación de nuevos vasos sanguíneos y sobre la morfo-fisiología ovárica de la rata adulta en ciclo.

3.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS

Determinar el efecto *in vivo* de una única dosis de ALLO 24 y 96hs pos administración en ratas vírgenes de 60 días de edad sobre los siguientes parámetros:

1. Morfometría y morfología ovárica y desarrollo folicular
2. El proceso de apoptosis de folículos ováricos
3. Proliferación celular en folículos ováricos
4. La formación de vasos sanguíneos nuevos en cuerpos lúteos (angiogénesis)
5. Concentración de las hormonas séricas progesterona y estradiol

4. MATERIALES Y MÉTODOS

4.1 REACTIVOS

Allopregnanolona (Sigma Chemical Co., St. Louis, MO, USA). ALLO fue inicialmente diluida en propilenglicol a una concentración de 600 μM . La dosis de ALLO utilizada en los experimentos (6 μM) se obtuvo por dilución en buffer Krebs-Ringer bicarbonato-glucosa (KRBG) a pH 7.4 (Laconi y col., 2012). La dosis de ALLO utilizada equivale a los niveles máximos circulantes durante situaciones de estrés (Laconi y col., 2012).

4.2 ANIMALES DE EXPERIMENTACIÓN

Se usaron ratas hembras vírgenes de la cepa Sprague Dawley (*Rattus norvegicus*) de 60-75 días de edad, con un peso de 250 – 300g, nacidas y criadas en nuestro bioterio. Se alojaron de a 4 animales por caja. Fueron mantenidas en condiciones óptimas de temperatura ($21\pm 2^\circ\text{C}$) y con un fotoperiodo de 12 horas luz/12 horas oscuridad, con libre acceso a alimento (alimento balanceado Cargill, Córdoba, Argentina) y agua. En todos los experimentos realizados en este trabajo se siguieron las pautas para cuidado y uso de animales de laboratorio provistas por el CICUAL (entidad que aprobó previamente nuestro protocolo experimental), número de protocolo 141021, Universidad Nacional de Cuyo, Mendoza, Argentina.

4.3 PROTOCOLO DE CIRUGÍA ESTEREOTÁXICA EN VLD

Se anestesió las ratas con hidrato de cloral al 8% (0.5 ml/100g i.p.) (Anedra, Argentina) y se colocaron firmemente en equipo estereotáxico (David Kopf, EE.UU). Se les implantó una cánula de manera unilateral en ventrículo lateral derecho (VLD), de acuerdo con las coordenadas del atlas de Paxinos y Watson (2008): antero-posterior +0.4, lateral -1.5 y profundidad -4 (Figura 11). Se usaron cánulas guía de acero inoxidable de 0.8mm de diámetro x 1.4mm de largo que se fijaron al cráneo con cemento dental y un tornillo óptico de acero inoxidable. Adicionalmente, se utilizó cloruro de benzalconio al 10% p/v y solución de Iodopovidona al 10% p/v para la limpieza y desinfección de las heridas. Al finalizar la cirugía, las cánulas fueron ocluidas con un mandril de acero inoxidable para protegerlas de la obstrucción. Los animales recibieron una inyección intramuscular de 0.2ml de 1.200.000UI (1UI = 0.6 μg) Penicilina G Benzatínica (Laboratorios Richet, Argentina) para prevenir infecciones. Los animales reposaron en sus cajas durante un período de recuperación de entre 5-7 días para luego ser usados en los experimentos.

Solamente fueron canuladas aquellas ratas que seguían un patrón regular en su ciclo estral. Al finalizar los experimentos se confirmó la posición de la cánula en el VLD y solo se utilizaron los datos obtenidos a partir de animales canulados en el sitio correcto.

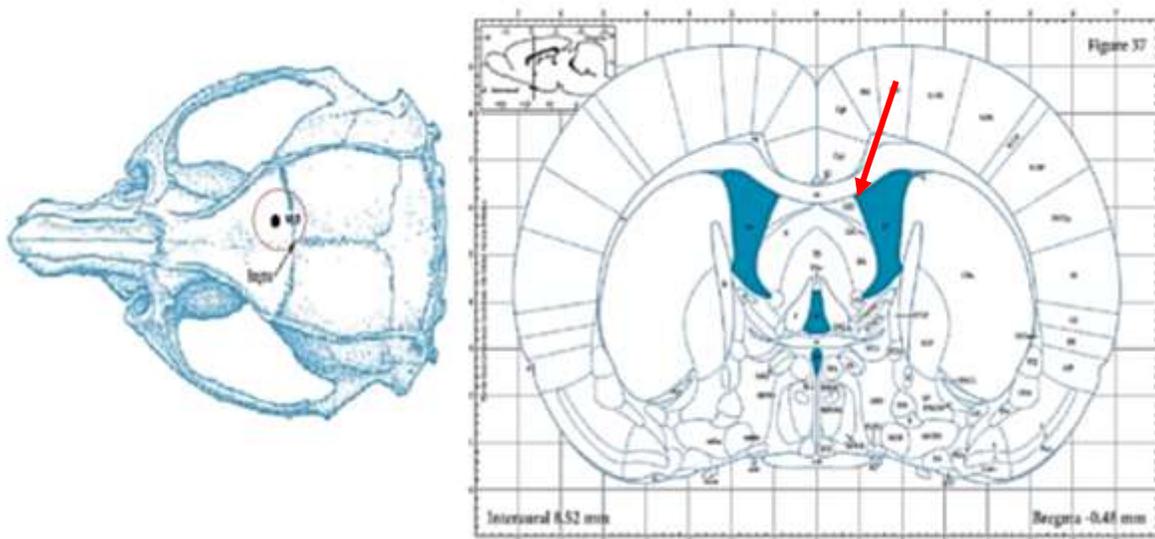


Figura 11. Representación esquemática de una sección de cerebro. El punto bregma constituye la intersección de las suturas sagitales y coronales del cráneo. Se muestra con flecha roja la vía de acceso al VLD. Modificado de Paxinos y Watson, 2010.

4.4 DISEÑO EXPERIMENTAL

Luego del periodo de recuperación pos-quirúrgico, se evaluó el ciclo estral de los animales diariamente entre las 8:00 y 10:00 am mediante el análisis del patrón citológico del frotis vaginal. Dicho procedimiento se realizó con la inserción de una pipeta Pasteur con solución salina en la vagina de cada rata. En el presente trabajo sólo fueron utilizados aquellos animales que presentaron 2 ciclos estrales regulares y consecutivos.

Por otro lado, se evaluó el patrón citológico vaginal mediante frotis luego de la inyección de ALLO en animales del grupo 24 y 96hs hasta el momento del sacrificio. El objetivo consiste en conocer el impacto de ALLO sobre la ciclicidad de las ratas.

En el día del proestro se inyectaron las ratas de manera icv con 0.6 μ l de ALLO (6 μ M) o KRBG, según grupo el experimental. Se introdujo una aguja de acero inoxidable en la cánula guía (cánula de inyección); la aguja estaba conectada por un catéter de silicona a una jeringa de 10 μ l Hamilton. La jeringa se mantuvo durante 10s posteriores a la inyección en la cánula para evitar reflujo del líquido. Durante dicho procedimiento se manipuló cuidadosamente a los animales para evitar posible influencia del estrés en los resultados. Los animales fueron sacrificados 24 o 96hs más tarde según el grupo experimental (controles y tratados) al que pertenecieran mediante decapitación con guillotina. Se recolectó la sangre troncal y se extirparon ambos ovarios. Se separó el suero de la sangre troncal en baño termostático seguido de centrifugación y se mantuvo a -20°C hasta su posterior análisis por RIA para determinación hormonal. Una vez extraídos y libres de grasa, se procesaron los ovarios de acuerdo a los requerimientos técnicos particulares. Para inmunohistoquímica o lectinhistoquímica se los sumergió en el fijador formalina al 4%; para el análisis histo-morfométrico se realizó la tinción con hematoxilina/eosina para lo que se los sumergió en el fijador Bouin débil (ver detalle más adelante) (Figura 12). Para las técnicas histológicas, se utilizaron un total de 7 animales

por grupo experimental (control y tratado) a partir de los cuales se obtuvo 1 ovario por animal. Se obtuvo de cada ovario un total de 12 cortes de 5µm cada uno separados por 50µm entre sí. A cada corte se le aplicó la técnica que correspondiera.

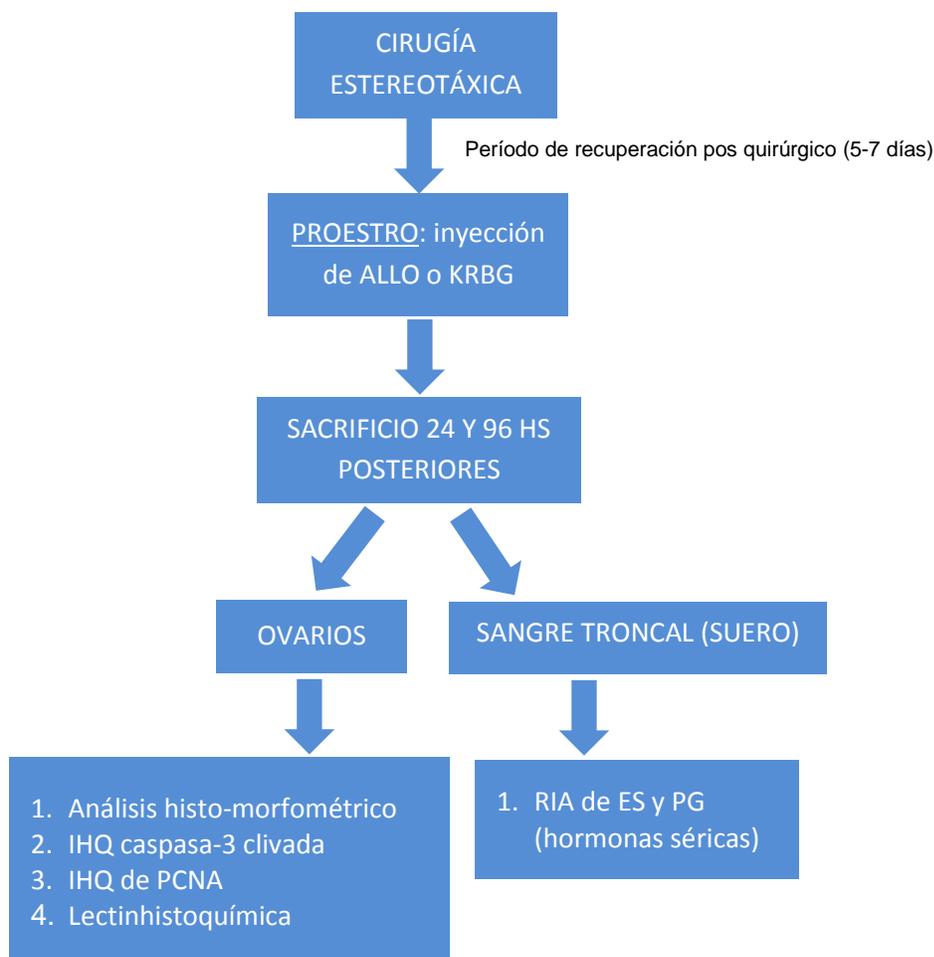


Figura 12. Representación esquemática del procedimiento experimental. IHQ: inmunohistoquímica, RIA: radioinmunoensayo.

A continuación, se procederá a describir la metodología experimental para los objetivos propuestos en dos grandes bloques con el fin de guiar la interpretación y elaboración de conclusiones. En primer lugar, se presentan aquellos resultados asociados a folículos ováricos y, en segundo lugar, aquellos relacionados con los cuerpos lúteos.

4.5 FOLÍCULOS OVÁRICOS

4.5.1 Recuento

Para estudiar la variación en el número de estructuras ováricas luego de la administración de ALLO se realizó un recuento de las mismas en cortes histológicos provenientes de cada grupo experimental. Los ovarios obtenidos se fijaron en una solución de Bouin débil, luego se deshidrataron en una serie de alcoholes etílicos de concentración ascendente,

se aclararon en xilol (Merk, Alemania) y, finalmente, se incluyeron en parafina líquida en estufa a 60°C. Se cortaron secciones seriadas de 5µm en micrótomos de deslizamiento (Microm HM 325), se llevaron a baño termostático (Vicking modelo Masson) para resolver pliegues y se las montó en portaobjetos para ser procesadas según los estudios que correspondieran. Posteriormente, se colorearon los cortes con la tinción hematoxilina-eosina (Merk, Alemania); para lo cual fueron inicialmente desparafinados con xileno, rehidratados en una serie de alcoholes de concentración decreciente, hidratados en agua corriente y sumergidos en un couplin con hematoxilina de Mayer (laboratorios Biopur, Rosario, Argentina) durante 10min. Se efectuó el viraje de color en agua común durante 2 a 5min hasta que se observó color violeta. Se colocó el corte en un couplin con eosina alcohólica durante 2min, se lavó los restos del colorante en agua corriente, se deshidrató los tejidos en una serie de alcoholes de concentración creciente y finalmente se los montó con líquido de montaje adecuado y cubre objetos.

En las secciones histológicas teñidas con hematoxilina-eosina se procedió a registrar el número de folículos en distintas etapas de desarrollo por ovario bajo microscopio óptico (Zeiss, Alemania). Se tuvieron en cuenta cortes histológicos separados por 50µm entre sí para evitar contar dos veces la misma estructura. Las estructuras ováricas se clasificaron como se indicó anteriormente en la introducción. Dos clases de folículos se basaron en la clasificación de Williams & Erickson, 2008: (a) folículos terciarios contienen múltiples capas de células de la granulosa con algún antro central y (b) folículos de Graaf donde la cavidad antral ocupa la mayor parte del volumen folicular total. El número de folículos primarios, secundarios, terciarios o antrales, de Graaf y atrésicos se contó en secciones ováricas de todos los grupos experimentales.

4.5.2 Morfología

Se evaluó la presencia de signos de atresia folicular en cortes histológicos de ovarios teñidos con hematoxilina eosina como se detalla en el inciso anterior. Los folículos atrésicos se definieron mediante la presencia de más de 10 células picnóticas de granulosa (Parborell, 2002). En folículos primarios y secundarios, el criterio para la atresia fue un ovocito degenerado con citoplasma condensado y retraído, y/o la formación de un antro precoz.

4.5.3 Apoptosis

La localización de la forma activa de la caspasa-3 no sólo permite identificar células apoptóticas sino también sirve como un marcador útil del proceso de atresia folicular. Muchos estudios revelan que la atresia folicular ocurre en todos los estadios del desarrollo, incluyendo folículos primordiales (Baker, 1963); es por ello que en el presente trabajo se tuvieron en cuenta todos los folículos que presentaron signos de atresia, incluso en estadios iniciales del desarrollo (primarios).

Los ovarios correspondientes a los distintos tratamientos se fijaron en formalina 4% durante 12hs, se deshidrataron en una serie de alcoholes de concentración creciente, se aclararon en xileno y se incluyeron en parafina. Se realizaron cortes de los tacos de

parafina cada 50µm con un grosor de 5µm cada una y se montaron en portaobjetos con líquido de montaje adecuado y portaobjetos. De esta forma, se evitó contar al mismo folículo dos veces acorde a lo descrito por Woodruff y col. (1990). Las secciones de tejido se desparafinaron en xileno y se rehidrataron realizando lavados con alcoholes con graduación decreciente. La actividad de la enzima peroxidasa endógena se bloqueó con peróxido de hidrógeno al 3% en buffer PBS y la unión no específica a otros epítopes se bloqueó incubando las secciones con BSA 2% (albúmina sérica bovina) durante 20min. Se realizó el desenmascaramiento antigénico en buffer citrato 0.01M a pH 6 durante 10min en microondas. Luego las secciones histológicas se incubaron con 20µl por corte del anticuerpo anti caspasa-3 clivada (dilución 1:100) durante toda la noche a 4°C en cámara húmeda. El control negativo de la técnica consistió en omitir la incubación de los cortes con el primer anticuerpo recién mencionado. El día siguiente, luego de lavados sucesivos con PBS, se incubó las secciones con el anticuerpo secundario IgG anti-conejo biotinilado (dilución 1/400) durante 1h y luego durante 30min con el complejo ABC: avidina-peroxidasa biotinilada (Vectastain ABC system, Vector Laboratories, Burlingame, CA). La marca positiva fue visualizada con el sustrato de la enzima peroxidasa, diaminobencidina (DAB) en buffer de revelado (Roche, Diagnostics, Alemania). La reacción se detuvo con agua destilada una vez obtenido un color marrón, las secciones se tiñeron con hematoxilina durante 1min y se procedió a la deshidratar antes de realizar el montaje con el medio apropiado (PMYR, Buenos Aires, Argentina).

Una vez finalizado el proceso de inmunomarcaje de caspasa-3 clivada, se tomaron imágenes con microscopio adosado a cámara digital (Zeiss, Alemania) para su posterior procesamiento. Mediante el uso del programa informático Image J, se contaron las células marcadas positivamente y células totales por folículo, incluyendo las células de la granulosa y de la teca de cada uno. Para facilitar los cálculos y la interpretación de los resultados, se decidió incluir a los folículos primarios, secundarios, terciarios y de Graaf dentro del grupo "folículos en desarrollo". En cada folículo se contaron tanto células de la granulosa como células de la teca. Luego se calculó el índice de células inmunomarcadas para cada folículo usando la fórmula: células teñidas positivamente/número total de células del folículo. Para cada ovario, se obtuvo la media del índice de células inmunomarcadas positivamente para caspasa-3 clivada para los folículos en desarrollo. El índice de células inmunomarcadas se calculó usando la fórmula: células teñidas positivamente/número total de células del folículo.

4.5.4 Proliferación celular

El antígeno nuclear de proliferación celular (PCNA – *Proliferating Cell Nuclear Antigen*) es un marcador de replicación del DNA detectable en células de la granulosa y de la teca de folículos en distintas etapas de desarrollo (Lundy y col., 1999). Para evaluar si ALLO alteró la capacidad proliferativa, y así el desarrollo subsecuente de folículos en crecimiento, se evaluó la presencia de PCNA mediante la técnica de inmunohistoquímica. El procedimiento fue semejante al de caspasa-3 clivada mencionado más arriba. En este caso, se incubaron los cortes de ovario con 20µl por corte del anticuerpo anti-PCNA (1:100) durante toda la noche a 4°C en cámara húmeda (primer anticuerpo). Se realizó un

control negativo de la técnica omitiendo la incubación con el primer anticuerpo recién mencionado. Para facilitar la distinción de estructuras celulares (como el núcleo), las secciones se tiñeron con hematoxilina durante 1min y se procedió a la deshidratarlas previo a realizar el montaje con el medio apropiado (PMYR, Buenos Aires, Argentina).

El paso siguiente consistió en obtener imágenes de los cortes procesados, lo que se realizó con microscopio óptico y cámara digital (Zeiss, Alemania). Se utilizó el programa Image J para contabilizar el número de células marcadas positivamente para PCNA. Se registró el número de células teñidas y el número total de células de cada folículo ovárico, teniendo en cuenta células de la teca y de la granulosa. El conteo de células se realizó en los folículos correspondientes a todos los estadios de desarrollo. Para facilitar los cálculos y la interpretación de los resultados, se decidió incluir a los folículos primarios, secundarios, terciarios y de Graaf dentro de la categoría “folículos en desarrollo”, pues son los que presentan células de la granulosa con una alta tasa mitótica (Reynolds & Redmer, 1995) y los de interés para el presente objetivo. Para cada ovario, se obtuvo la media del índice de células inmunomarcadas positivamente para PCNA para los folículos en desarrollo. El índice de células inmunomarcadas se calculó usando la fórmula: células teñidas positivamente/número total de células del folículo.

4.5.5 Concentración sérica de estradiol

Se midió la concentración sérica de la hormona estradiol. La sangre troncal extraída se llevó a baño termostático a 20°C durante 10min para favorecer la formación de coágulos, y así eliminar eficazmente la proteína fibrinógeno del suero. Luego se centrifugó 15 minutos a 1500 rpm y se extrajo el suero. La concentración sérica de ES se midió por radioinmunoensayo (RIA) de doble anticuerpo utilizando kits comerciales para hormonas totales (PITKPG1, Siemens Healthcare Diagnostic, Los Angeles, CA, USA).

4.6 CUERPOS LÚTEOS

4.6.1 Recuento

Para la obtención de cortes histológicos teñidos con hematoxilina eosina que permitieran el recuento de CLs, se siguió el mismo procedimiento histológico que para el recuento de folículos descrito anteriormente. Una vez obtenidos los cortes montados en portaobjetos, se procedió a contar el número de CLs por ovario bajo microscopio óptico (Zeiss, Alemania). Se tuvieron en cuenta cortes histológicos separados por 50µm entre sí para evitar contar dos veces la misma estructura. El número de CLs se contó en secciones ováricas (n=7) de todos los grupos experimentales.

4.6.2 Diámetro

En secciones histológicas de ovario teñidas con hematoxilina eosina, se determinó el diámetro promedio de todos CLs por cada ovario control y tratado con ALLO a las 24 y 96hs (n=7). Para ello se utilizó el programa Image J (Procesamiento y análisis de imágenes de <http://rsb.info.nih.gov/ij>). Luego se obtuvo la media del diámetro de los CL

encontrados por ovario, por lo que se contaba con 7 medias de diámetro de CL por grupo experimental. Se obtuvo la media y el error estándar de los promedios recién descritos para cada grupo experimental; luego se realizó análisis de ANOVA de doble vía (ver sección 4.7 “análisis estadístico”).

4.6.3 Apoptosis

Una vez finalizado el proceso histológico de inmunomarcaje de caspasa-3 clivada, se tomaron imágenes con microscopio adosado a cámara digital (Zeiss, Alemania) para su posterior procesamiento. Mediante el uso del programa informático Image J, se contaron las células marcadas positivamente y células totales por CL, incluyendo las células de forma poliédrica y ahusada. Luego se calculó el índice de células inmunomarcadas para cada CL usando la fórmula: células teñidas positivamente/número total de células del CL. Para cada ovario de rata obtenido (n=7), se obtuvo la media del índice de células inmunomarcadas incluyendo todas las generaciones de cuerpos lúteos.

4.6.4 Formación de vasos sanguíneos nuevos (angiogénesis)

Con el fin de evidenciar las células endoteliales de los vasos sanguíneos de los CLs, se procedió a realizar la técnica histológica de marcaje con lectina o lectinhistoquímica. Las lectinas son una familia de proteínas con dominios capaces de reconocer y unirse a glúcidos terminales que forman oligosacáridos de la superficie de células del endotelio vascular. En este caso, se utilizó una lectina proveniente de la especie vegetal *Bandeiraea simplicifolia* BS-1, capaz de reconocer a los glúcidos de membrana α -N-acetilgalactosamina y α -galactosa. Se trata de un marcador constitutivo de células endoteliales que tiñe células en distintos estadios de desarrollo del CL, así como también células endoteliales en vasos de distinto calibre (Augustin y col., 1995). Para observar el sitio de unión específico de la lectina con el glúcido, se une la lectina a un marcador que produzca señal visible al microscopio óptico, en este caso el marcador utilizado fue DAB.

El protocolo del primer día es idéntico al seguido para inmunohistoquímica de caspasa-3 clivada. Se hizo uso de la lectina mencionada anteriormente (Sigma Aldrich) en una dilución de 1:100. El segundo día se realizaron tres lavados de 5min cada uno en buffer PBS, se incubaron los cortes histológicos con el complejo ABC: avidina-peroxidasa biotinilada (Vectastain ABC system, Vector Laboratories, Burlingame, CA) durante 30min a temperatura ambiente y luego se repitieron 3 lavados de 5min en buffer PBS. La marca positiva fue visualizada con el sustrato de la enzima peroxidasa, diaminobencidina (DAB), en buffer de revelado (Roche, Diagnostics, Germany). La reacción se detuvo con agua destilada una vez obtenido un color marrón, las secciones se tiñeron con hematoxilina durante 1min y se procedió a la deshidratación previo a realizar el montaje con el medio apropiado (PMYR, Buenos Aires, Argentina).

Subsiguientemente se tomaron imágenes con microscopio adosado a cámara digital para su posterior procesamiento. Mediante el uso del programa informático Image J se midió el área vascular marcada por lectina y el área total de cada CL. Se obtuvo el área vascular relativa de cada CL mediante la fórmula: área marcada positivamente/área total del CL.

Para cada corte histológico de ovario, se obtuvo el promedio de las áreas vasculares relativas de todos los CLs encontrados.

4.6.5 Concentración sérica de progesterona

La sangre extraída se llevó a baño termostático a 20°C durante 10min para favorecer la formación de coágulos, y así eliminar eficazmente la proteína fibrinógeno del suero. Luego se centrifugó 15 minutos a 1500 rpm y se extrajo el suero. La concentración sérica de PROG se midió por radioinmunoensayo (RIA) de doble anticuerpo utilizando kits comerciales para hormonas totales (PIKE2D1, Siemens Healthcare Diagnostic, Los Angeles, CA, USA).

4.7 ANÁLISIS ESTADÍSTICO

Para todos los objetivos de este trabajo, se hicieron comparaciones estadísticas entre todos los grupos utilizando Análisis de Varianza de doble vía (two-way ANOVA) en un diseño factorial 4x2, seguidos por el test de Bonferroni. Se seleccionó dicho análisis dado que se cuenta con dos variables: tiempo (24 y 96hs) y tratamiento (controles y tratados con ALLO). Previo a realizar ANOVA de doble vía, se realizó el test de normalidad de Shapiro-Wilks con el fin de determinar si las muestras provenían de poblaciones con distribución gaussiana.

Para el caso de la medición de PROG sérica, la población de datos correspondiente a la muestra obtenida no se ajustaba a una distribución normal; por lo que se procedió a transformar los datos mediante la aplicación de una función matemática a cada uno de ellos (Log(y)). Esto fue seguido por el test ANOVA de doble vía.

Los resultados fueron expresados como la media \pm S.E.M. Valores de $p < 0.05$ fueron considerados estadísticamente significativos para todas las pruebas estadísticas.

NOTA: Los protocolos correspondientes a las técnicas de histoquímica para caspasa-3 clivada, lectina y PCNA fueron llevados a cabo en el Instituto de Biología y Medicina Experimental (IByME-CONICET), Buenos Aires, Argentina. Los reactivos y equipos utilizados fueron gentilmente provistos por el equipo de la Dra. Fernanda Parborell.

5. RESULTADOS

En primer lugar se presentan los resultados obtenidos a partir de la evaluación del ciclo estral de las ratas. Se encontró que la administración central de ALLO no alteró la regularidad del ciclo estral de las ratas.

A continuación, se presentan los resultados obtenidos en dos grandes bloques para guiar la interpretación y elaboración de conclusiones. En primer lugar, se presentan aquellos resultados asociados a folículos ováricos y, en segundo lugar, aquellos relacionados con los cuerpos lúteos.

5.1 FOLÍCULOS OVÁRICOS

5.1.1 Clasificación y recuento

Con el objetivo de evaluar el efecto de ALLO sobre el número de estructuras ováricas, se contaron los folículos en distintos estadios de maduración y folículos atrésicos en cortes de ovario teñidos con hematoxilina eosina. El número promedio de dichas estructuras \pm SEM por grupo experimental se presenta en la Tabla 1. El análisis histológico revela que, por un lado, ALLO provocó una disminución en el número de folículos primarios 24hs pos administración y, por otro lado, disminuyeron los folículos secundarios, terciarios y de Graaf 96hs pos administración respecto a grupos controles. No se observó diferencia significativa en los grupos 24 y 96hs de folículos primarios.

El número de folículos atrésicos resultó ser significativamente mayor en cortes de ovarios 96hs posteriores a la administración de ALLO (Figura 15). En base a estos resultados se podría sugerir que ALLO interfiere en el proceso de reclutamiento folicular al disminuir del número de folículos sanos, o bien llevando a la atresia a un mayor número de los mismos.

Tabla 1. Media \pm SEM del número de folículos primarios, secundarios, terciarios, de Graaf y atrésicos por ovario en distintos tiempos de experimentos (24 y 96hs). Las diferencias significativas respecto al grupo control se indican como * $p < 0.05$. ** $p < 0.05$ ó *** $p < 0.001$. F: folículo.

	24hs		96hs	
	control	ALLO	control	ALLO
F. primarios	1.7 \pm 0.5	1.9 \pm 0.6	1.3 \pm 0.5	0.9 \pm 0.3
F. secundarios	7.6 \pm 1.4	2.6 \pm 0.5***	4.3 \pm 0.6	1.4 \pm 0.5*
F. terciarios	2.7 \pm 0.4	2.9 \pm 0.9	9.3 \pm 0.4	5.6 \pm 0.4***
F. de Graaf	1.9 \pm 0.6	1.3 \pm 0.5	0.9 \pm 0.3	0.3 \pm 0.2*
F. atrésicos	0.9 \pm 0.5	2.7 \pm 0.9	6.3 \pm 0.4	12.4 \pm 1.7***

Folículos ováricos

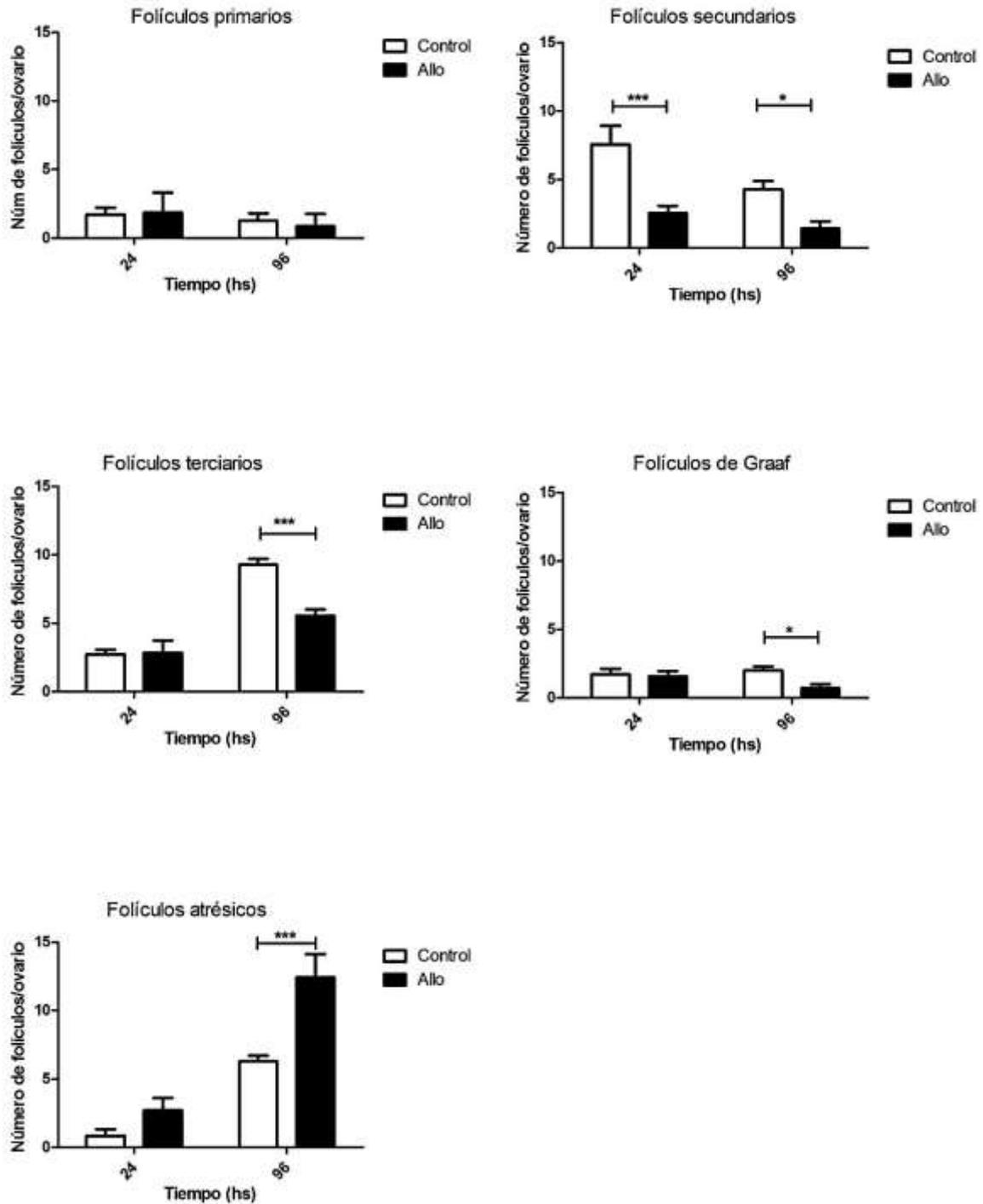


Figura 13. Media \pm SEM del número de folículos primarios, secundarios, terciarios, de Graaf y atrésicos por ovario en distintos grupos experimentales (24 y 96hs). Las diferencias significativas respecto al grupo control se indican como * $p < 0.05$, ** $p < 0.01$ ó *** $p < 0.001$.

5.1.2 Morfología

Se estudió en detalle la morfología de los folículos ováricos, haciendo énfasis en signos de atresia folicular tales como los mencionados anteriormente. El análisis morfológico revela la presencia de cuerpos apoptóticos y células de la granulosa con núcleos picnóticos invadiendo el antro folicular, desprendimiento de la lámina basal y fragmentación del ovocito en folículos atrésicos del grupo ALLO de 24 y 96hs (Figura 14). Estos resultados sugieren que ALLO estaría interfiriendo en el proceso de atresia folicular y así conduciendo menos folículos a la ovulación. En la Figura 14C se puede observar la fragmentación del ovocito y la marginación de la cromatina, que son rasgos característicos de las células apoptóticas.

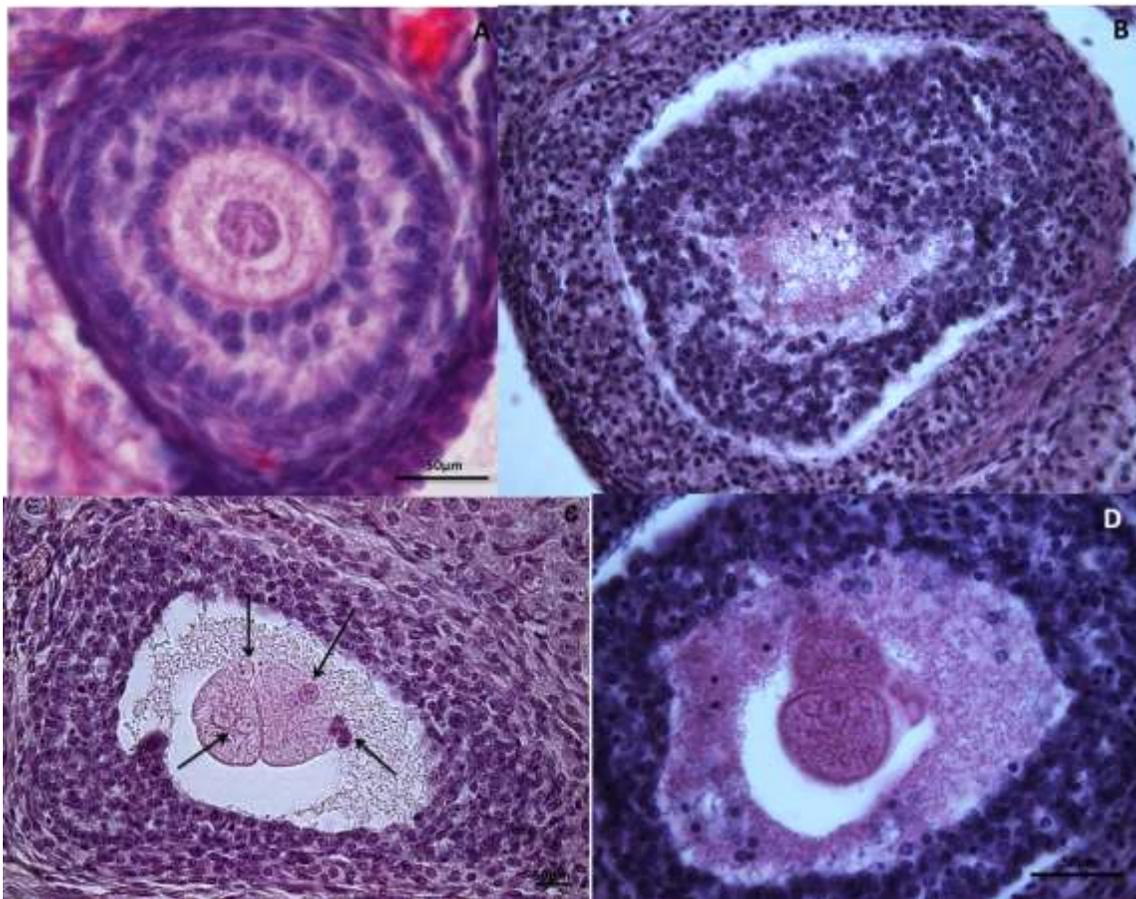


Figura 14. H&E Microscopía óptica. A) Folículo terciario sano grupo control 24hs B) Folículo terciario atrésico del grupo ALLO 24hs. Nótese los cuerpos apoptóticos invadiendo en antro folicular, la desorganización de las células de la granulosa y la separación de la lámina basal respecto de las células de la granulosa. C) Folículo terciario en estado de atresia avanzada con el ovocito fragmentado. Se advierten los cuerpos apoptóticos encerrados por membrana (flechas). D) Folículo terciario atrésico que presenta ovocito dividido, cuerpos apoptóticos en el líquido antral y desprendimiento de la lámina basal.

5.1.3 Apoptosis

Con el fin de evaluar si el aumento en la atresia folicular es mediado por un aumento en la muerte celular programada en células foliculares inducido por ALLO, se determinó el

grado de apoptosis en folículos. Para ello se procesaron secciones ováricas fijadas en formalina para la localización inmunohistoquímica de caspasa-3 clivada en folículos ováricos (Figuras 15 y 16), y se calculó el índice de células marcadas positivamente para caspasa-3 clivada. El tratamiento con ALLO causó un aumento en el índice de células apoptóticas en células de la granulosa de folículos ováricos, tanto a las 24 como a las 96hs. A continuación se muestra la media \pm SEM hallados por grupo experimental: Control 24hs: 0.12 ± 0.01 vs ALLO 24hs: 0.32 ± 0.02 , $p < 0.01$; Control 96hs: 0.08 ± 0.01 vs. ALLO 96hs: 0.34 ± 0.04 , $p < 0.001$. Estos resultados sugieren que el aumento de folículos atrésicos estaría mediado por el proceso de apoptosis. Los folículos ováricos provenientes de ratas tratadas con ALLO, tanto a las 24 como a las 96hs, mostraron mayor cantidad de células atravesando por el proceso de apoptosis (Figuras 15 y 16). Estos resultados sugerirían que el efecto de LA en el reclutamiento o atresia folicular estaría mediado por la apoptosis.

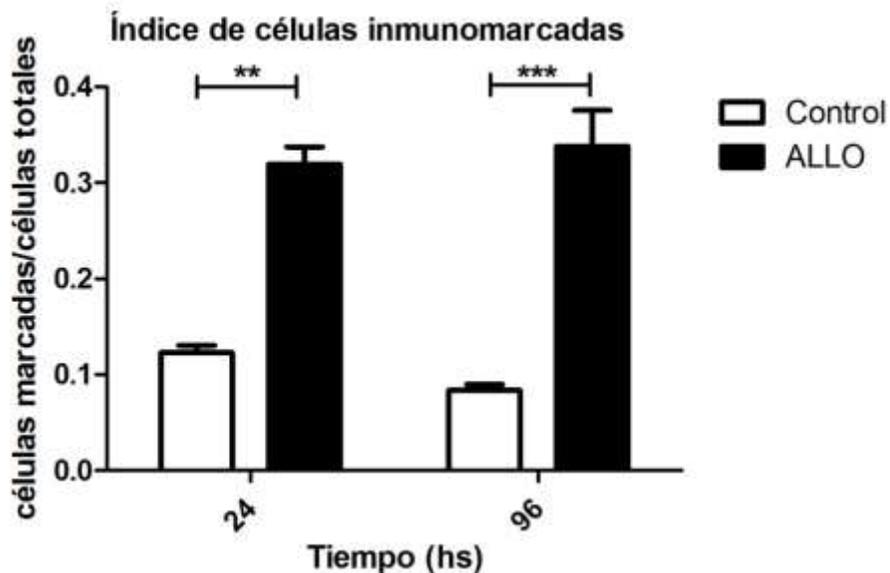


Figura 15. Media \pm SEM del índice de células marcadas para caspasa-3 clivada en folículos en crecimiento de grupos controles y tratados a las 24 y 96hs. Las diferencias significativas respecto al grupo control se indican como * $p < 0.05$, ** $p < 0.05$ ó *** $p < 0.001$.

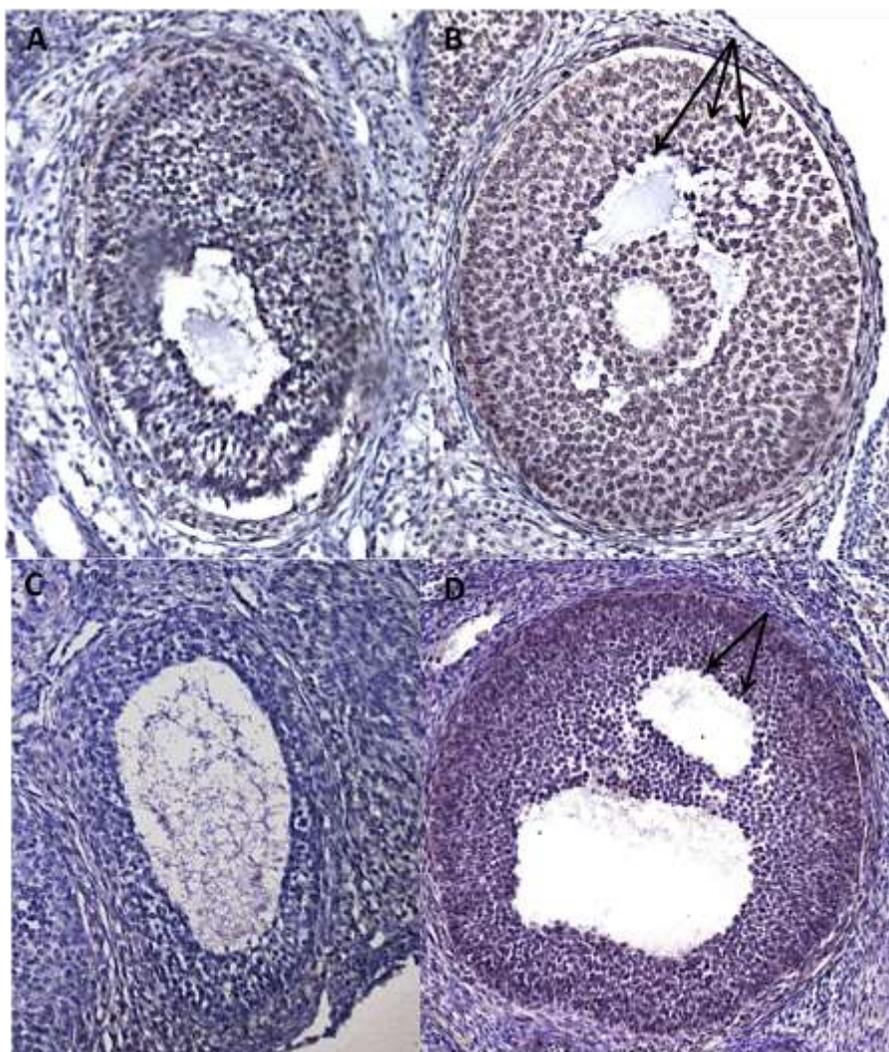


Figura 16. Microscopía óptica, magnificación 100. Se estudió la localización inmunohistoquímica de caspasa 3 clivada en folículos ováricos 24 y 96hs pos administración de ALLO. Expresión de Caspasa-3 clivada en ovarios A) control 24hs, B) ALLO 24, C) control 96hs. D) ALLO 96hs. Las flechas señalan células marcadas positivamente para caspasa 3 clivada.

5.1.4 Proliferación celular

A los efectos de evaluar el efecto del neuroesteroide en estudio sobre el crecimiento de las células foliculares, se analizó la localización por inmunohistoquímica de PCNA en folículos ováricos de los grupos controles y tratados, 24 y 96hs pos administración de ALLO. En los ovarios controles de 96hs la mayor parte de las células de la granulosa de folículos en crecimiento (89%) resultaron positivas para PCNA, como era de esperarse debido a la alta tasa de división celular que las caracteriza (Figuras 17 y 18). Por otro lado, ALLO indujo una notable disminución en la cantidad de células en división, tanto a las 24 como a las 96hs. A continuación se presenta la media \pm SEM por grupo experimental: Control 24hs: 0.89 ± 0.03 vs. ALLO 24hs: 0.8 ± 0.06 , $p < 0.001$; Control 96hs: 0.4 ± 0.08 vs. ALLO 96hs: 0.4 ± 0.07 , $p < 0.01$. Estos hallazgos sugieren que ALLO estaría interviniendo negativamente en el proceso de proliferación celular de las células foliculares, tanto a las 24 como a las 96hs. Al interpretar estos resultados junto con lo

encontrado para el proceso de apoptosis, se puede sugerir que ALLO favorece el proceso de apoptosis y dificulta la división celular de células que forman los folículos ováricos.

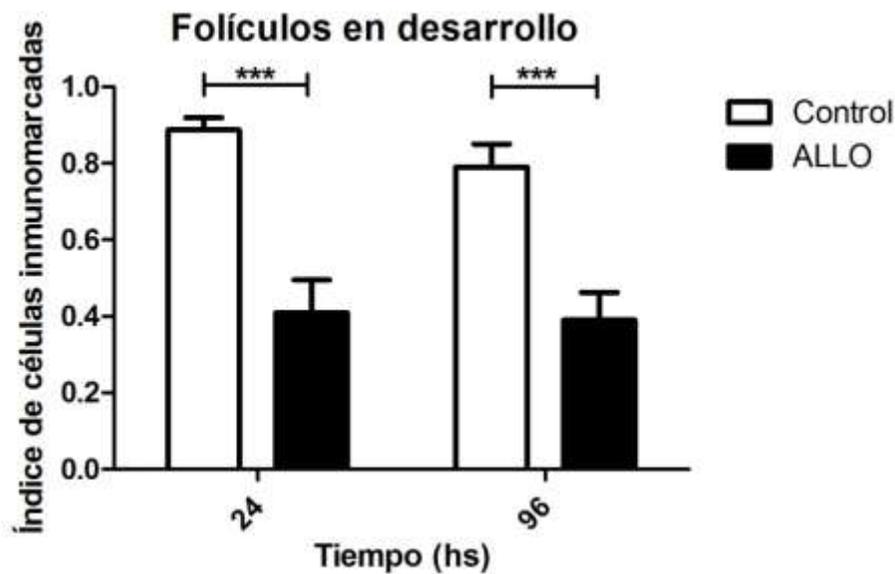


Figura 17. Media \pm SEM del índice de células marcadas para PCNA de grupos controles y tratados a las 24 y 96hs. Las diferencias significativas respecto al grupo control se indican como * $p < 0.05$, ** $p < 0.05$ ó

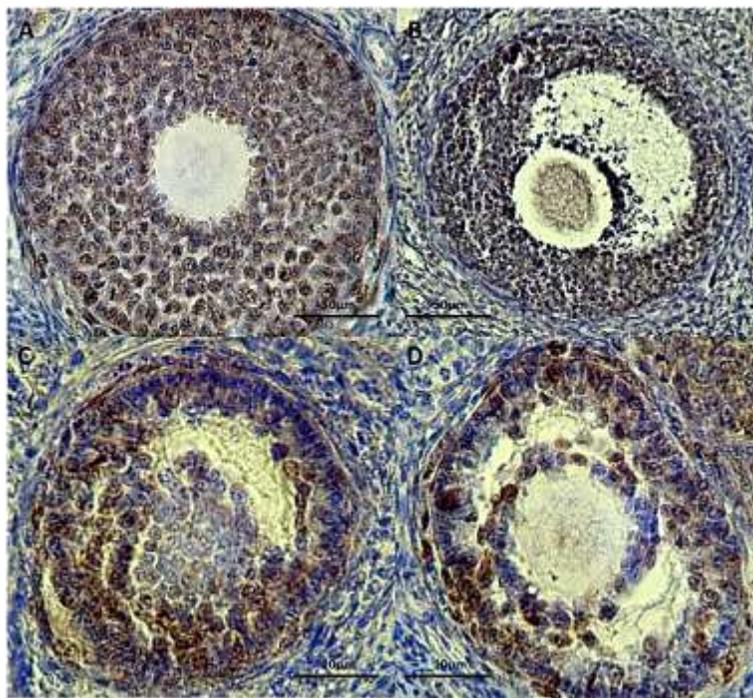


Figura 18. Microscopía óptica. Se estudió la localización inmunohistoquímica de PCNA en folículos ováricos 24 y 96hs pos administración de ALLO. Expresión de PCNA en ovarios A) controles 24hs, B) ALLO 24, C) controles 96hs. D) ALLO 96hs.

5.1.5 Concentración sérica de estradiol

Se determinaron los niveles séricos de la hormona ES 24 y 96hs pos administración de KRBP ó ALLO. La evaluación de los niveles séricos de ES revela que el grupo de 24hs no presenta diferencia significativa entre controles y tratados con ALLO (Figura 19). Por otro lado, el grupo ALLO 96hs mostró una disminución estadísticamente significativa respecto al grupo control de 96hs (control: 57 ± 17.9 ; ALLO: 10.3 ± 3.6 , $p < 0.01$). Este resultado se correlaciona con el aumento en la atresia folicular, aumento de la apoptosis y disminución de la proliferación celular encontrados en los grupos tratados con ALLO. Es decir, una disminución en los niveles séricos de ES podrían atribuirse a una menor cantidad de células de la granulosa funcionalmente activas.

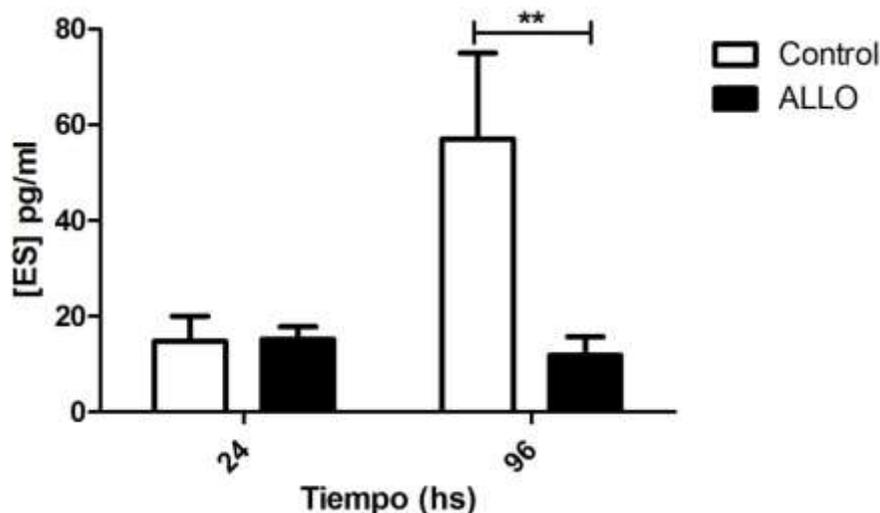


Figura 19. Niveles séricos de ES expresados como pg/ml. Media \pm SEM. Las diferencias significativas respecto al grupo control se indican como * $p < 0.05$, ** $p < 0.05$ ó *** $p < 0.001$.

5. 2 CUERPOS LÚTEOS

5.2.1 Recuento

El recuento de estructuras ováricas revela que a las 24hs no existe diferencia de importancia estadística en el número promedio de CLs, mientras que el número de CLs se vio disminuido en el grupo ALLO 96hs respecto al grupo control (Tabla 2).

Tabla 2. Recuento de CLs en grupos tratados con ALLO y controles 24 y 96hs. Se presenta media \pm SEM del número CLs por grupo experimental. Las diferencias significativas respecto al grupo control se indican como * $p < 0.05$, ** $p < 0.05$ ó *** $p < 0.001$.

	24hs		96hs	
CLs	control	ALLO	control	ALLO
	6.9 ± 0.7	7 ± 0.7	7.6 ± 0.7	$6.7 \pm 0.6^{**}$

5.2.2 Diámetro

La media \pm SEM de los diámetros de los CLs para los grupos controles y tratados con ALLO a las 24 y 96hs se presenta en la tabla 3. Las mediciones de los diámetros resultaron ser mayores en los grupos tratados con ALLO (24 y 96hs). Sin embargo, la diferencia en el diámetro fue significativamente mayor en el grupo de ALLO 96hs respecto al control 96hs ($p < 0.001$). (Tabla 3, Figura 20).

Tabla 3. Diámetro promedio de CLs \pm SEM en ovarios controles y tratados 24 y 96hs pos administración de ALLO. Las diferencias significativas respecto al grupo control se indican como * $p < 0.05$, ** $p < 0.05$ ó *** $p < 0.001$.

	24hs		96hs	
CL	Control	ALLO	Control	ALLO
	0.87 \pm 0.04	1.1 \pm 0.09*	0.82 \pm 0.05	1.4 \pm 0.07***

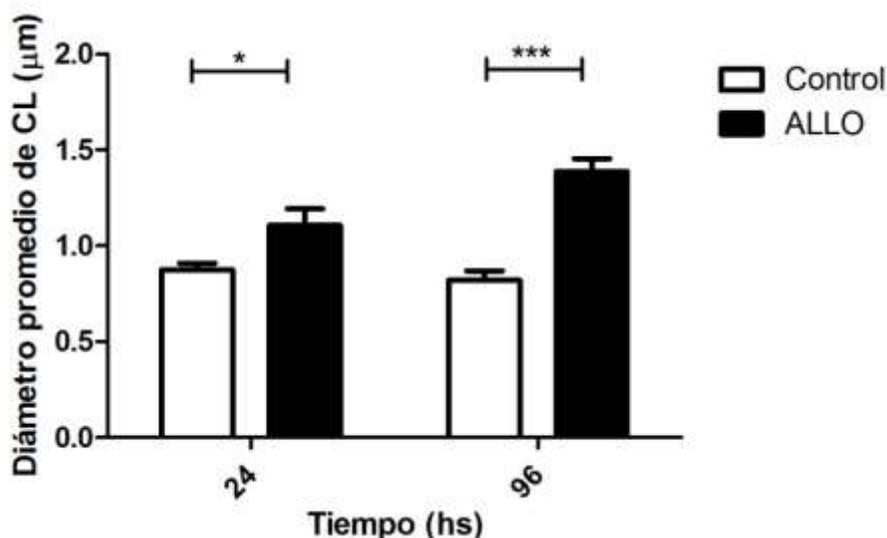


Figura 20. Media \pm SEM del diámetro de CLs por ovario de grupos controles y tratados a las 24 y 96hs. Las diferencias significativas respecto al grupo control se indican como * $p < 0.05$, ** $p < 0.05$ ó *** $p < 0.001$.

5.2.3 Apoptosis

Mediante análisis inmunohistoquímico, se determinó el índice de células marcadas positivamente para caspasa-3 clivada en CLs (Figura 21). Se encontró una disminución en dicho índice en los grupos ALLO de 24 y 96hs respecto al grupo control (Control24: 0.36 \pm 0.03 vs ALLO24: 0.19 \pm 0.03, $p < 0.01$; Control96: 0.48 \pm 0.04 vs. ALLO96: 0.25 \pm 0.02, $p < 0.001$). Aquellos CLs de ovarios tratados con ALLO presentaron una menor cantidad de células atravesando por el proceso de apoptosis, es decir, menos células desapareciendo por muerte celular programada que los grupos controles. Probablemente, los CL de grupos tratados con ALLO sobrevivan por más tiempo que los CLs controles.

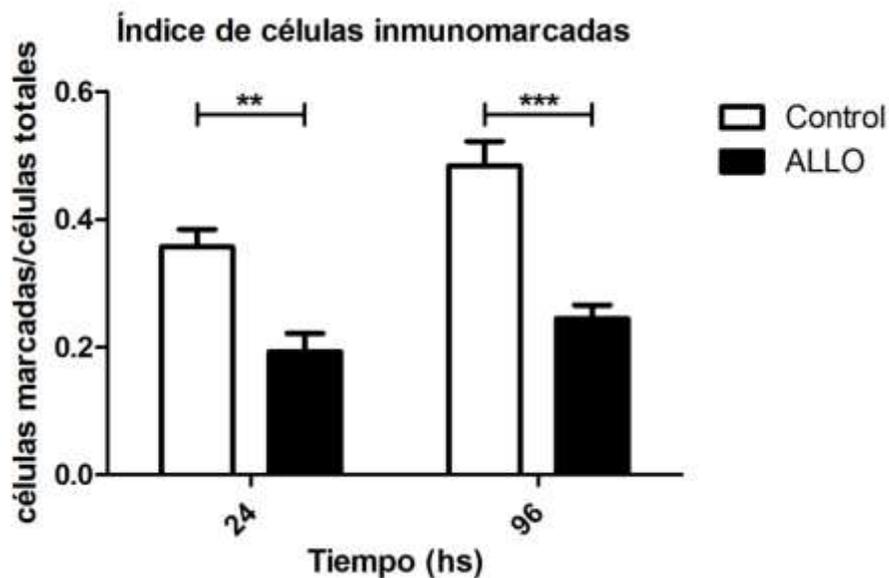


Figura 21 Media \pm SEM del índice de células marcadas en CLs para caspasa-3 clivada de grupos controles y tratados a las 24 y 96hs. Las diferencias significativas respecto al grupo control se indican como * $p < 0.05$, ** $p < 0.05$ ó *** $p < 0.001$.

5.2.4 Formación de vasos sanguíneos nuevos (angiogénesis)

Se evaluó el efecto de ALLO sobre la formación de nuevos vasos sanguíneos en CLs. Mediante lectinhistoquímica se midió el área vascular relativa de los CLs de ovarios controles y tratados 24 y 96hs pos administración de ALLO. Se observó un aumento de vasos sanguíneos en CLs provenientes de ovarios tratados con ALLO 96hs pos tratamiento (Figuras 22 y 23). Control 24: 0.27 ± 0.03 vs. ALLO 24: 0.28 ± 0.06 , no hay diferencia significativa; Control 96: 0.21 ± 0.04 vs. ALLO 96: 0.56 ± 0.07 , $p < 0.001$. En base a estos resultados se podría afirmar que ALLO favorece la vascularización del CL 96hs posteriores de tratamiento, mientras que a las 24hs no tiene un efecto importante.

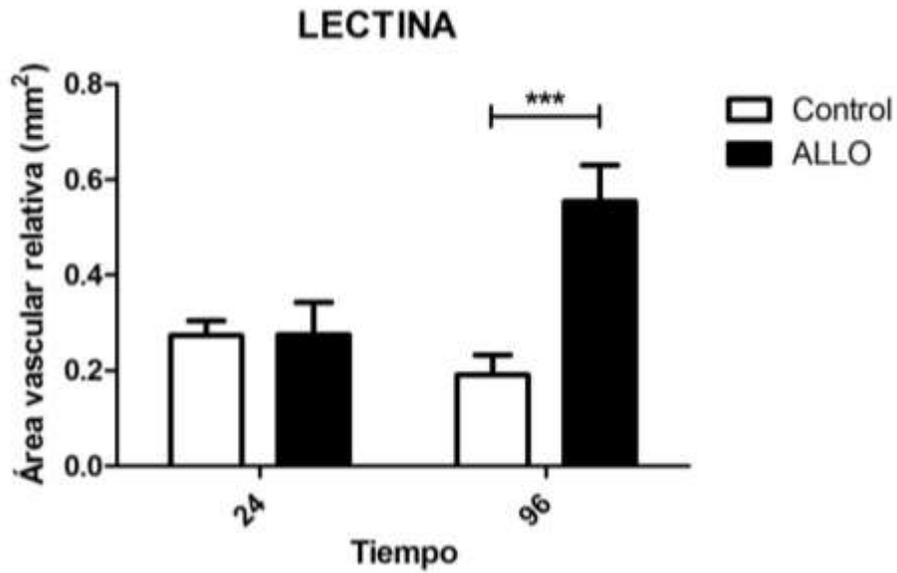


Figura 22. Media \pm SEM del área vascular relativa de CLs por ovario de grupos controles y tratados a las 24 y 96hs. Las diferencias significativas respecto al grupo control se indican como * $p < 0.05$, ** $p < 0.05$ ó *** $p < 0.001$.

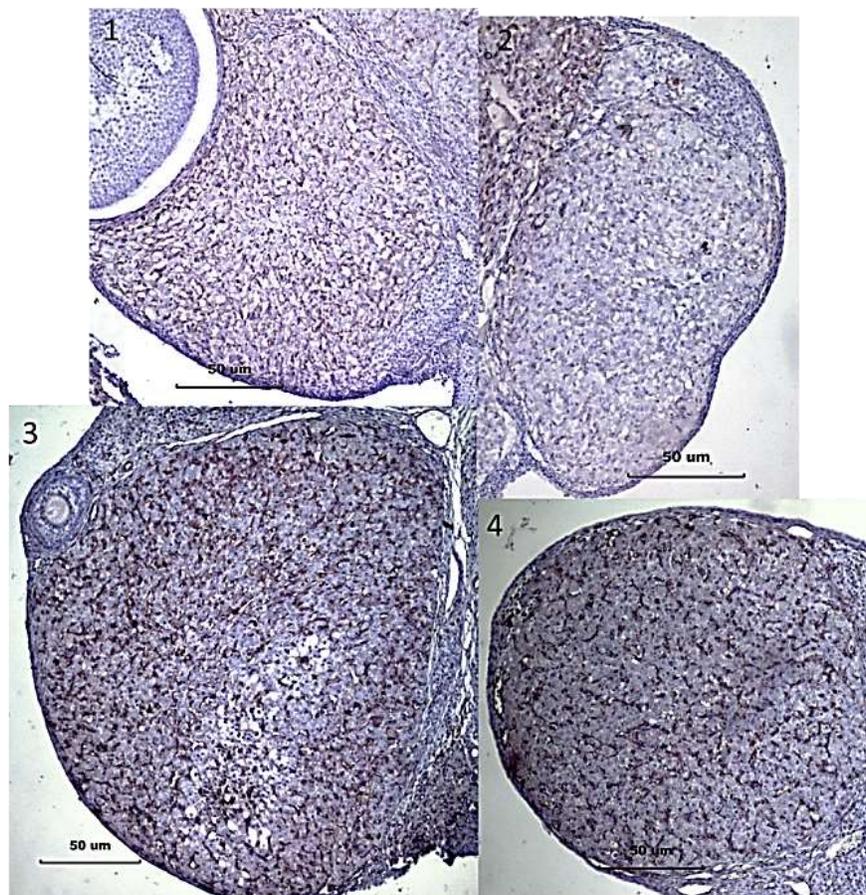


Figura 23. Imágenes de CLs en cortes histológicos teñidos para la identificación de vasos sanguíneos. 1: grupo control 24hs; 2: grupo control 96hs; 3: grupo ALLO 24hs; 4: grupo ALLO 96hs.

5.2.5 Concentración sérica de progesterona

Mediante la técnica de detección de hormonas RIA se midió la concentración sérica de la hormona PROG. El tratamiento con ALLO durante 96hs indujo un aumento en la concentración de PROG sérica respecto al grupo control, mientras que a las 24hs no se encontró diferencia de relevancia estadística entre grupo control y tratado (Figura 24). Control 24: 12.8 ± 4.8 ; ALLO 24: 14.03 ± 2.6 ; control 96: 57 ± 17.9 ; ALLO 96: 10.03 ± 3.6 , $p < 0.01$). Interpretando los resultados de apoptosis, angiogénesis y niveles de PROG sérica, podría sugerirse que ALLO favorece la supervivencia del CL al disminuir la apoptosis y mantener elevada la producción de PROG.

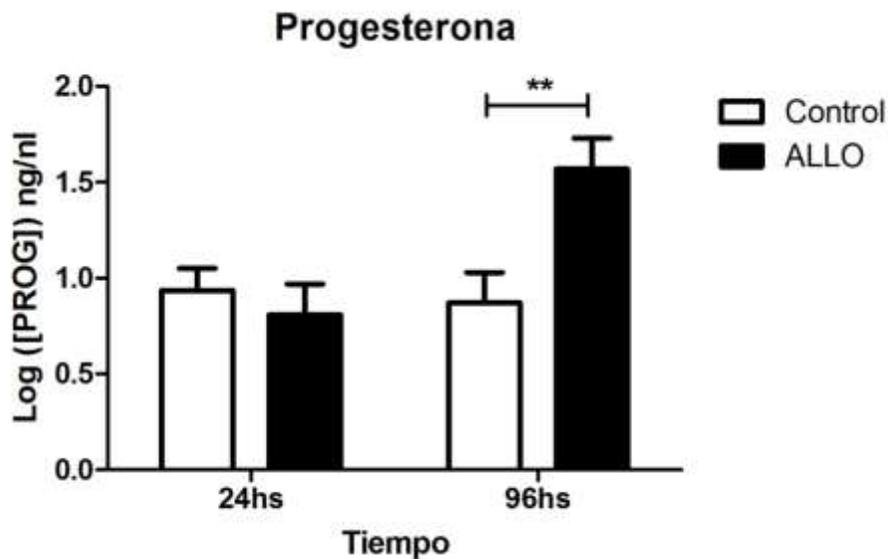


Figura 24. Niveles séricos de PROG expresados como Log ([PROG])pg/ml. Media \pm SEM. Las diferencias significativas respecto al grupo control se indican como * $p < 0.05$, ** $p < 0.05$ ó *** $p < 0.001$.

6. CONCLUSIONES Y DISCUSIÓN

En términos generales, mediante el presente trabajo de investigación se ha demostrado que la administración de ALLO, en una dosis equivalente a la concentración producida por el estrés, altera diversos procesos de la morfo-fisiología ovárica de la rata hembra, tales como la regresión luteal, angiogénesis y la atresia folicular. Lo antes mencionado fue demostrado por los hallazgos 24 y 96hs posteriores a la administración de una única dosis del neuroesteroide bajo estudio en el VLD de la rata en ciclo.

La inyección de ALLO activa el eje hipotálamo-hipófisis-ovario, como se demuestra por el aumento en la concentración sérica de PROG y la disminución de ES. Dicho eje se encuentra bajo el control de múltiples sistemas de neurotransmisores (Giuliani y col., 2013).

Se encontró que 24 y 96hs posteriores a la administración de ALLO, aumentó el índice de células foliculares marcadas positivamente para caspasa-3 clivada. Es decir, ALLO indujo un aumento en el proceso de apoptosis en células de folículos en crecimiento, conduciendo así a un mayor número de folículos a la degeneración por atresia. Esto implicaría un menor número de ovocitos disponibles para ovular y, a su vez, implica la formación de un menor número de CLs. Esto se correlaciona con nuestros resultados pues encontramos un menor número de CLs 96hs pos inyección de ALLO.

El proceso de apoptosis se asocia con cambios morfológicos específicos tales como condensación de la cromatina, membrana plasmática irregular, retracción citoplasmática, núcleos picnóticos y formación de fragmentos celulares encerrados por membrana (cuerpos apoptóticos) (Tilly, 1993). Muchas de estas características fueron observadas en los cortes histológicos de ovarios tratados con ALLO, tanto en el grupo 24 como 96hs; lo que indica que ocurrieron cambios morfológicos degenerativos asociados a la apoptosis en ovarios tratados con ALLO. Este hallazgo, en conjunto con el aumento de la marcación de caspasa-3 clivada, fortalece la idea de que efectivamente la atresia es el mecanismo por el cual los folículos ováricos degeneraron ante la acción de ALLO.

Por otro lado, el análisis de proliferación celular mediante inmunohistoquímica de PCNA revela que los grupos de ovarios de 24 y 96hs tratados con ALLO exhibieron un porcentaje mayor de células en división (Figuras 17 y 18). Por lo que podemos concluir que ALLO genera un efecto inhibitorio sobre el desarrollo folicular al reducir el número de células foliculares dividiéndose activamente.

Nuestros resultados sugieren que ALLO promueve el proceso de apoptosis en células de folículos ováricos. Estos resultados armonizan con el aumento en el número de folículos atrésicos encontrados en ovarios tratados con ALLO. Por lo tanto, ALLO juega un rol importante en el desarrollo folicular y en la atresia folicular mediada por apoptosis. Estos hallazgos, analizados en conjunto con la caída en los niveles séricos de ES, sugieren que ALLO induce una disminución en la capacidad funcional de los folículos ováricos.

Por otro lado, el crecimiento y desarrollo tisular depende del desarrollo de nuevos vasos sanguíneos (angiogénesis). El sistema vascular adulto es quiescente: una vez establecido sufre pocas alteraciones, excepto el sistema reproductor femenino. Los órganos reproductores femeninos, tales como útero, ovarios y placenta, exhiben un crecimiento y retracción cíclica acompañados por cambios importantes en la arquitectura vascular y flujo sanguíneo. En particular, el CL es una glándula endocrina transitoria que crece e involuciona rápida y cíclicamente; estos eventos están acompañados por un crecimiento y regresión de la vasculatura luteal. Al mismo tiempo que cambia la vasculatura luteal, se produce también un marcado cambio en las tasas de flujo sanguíneo y producción de hormonas. De hecho, el CL maduro recibe el mayor aporte sanguíneo por gramo de tejido que cualquier otro órgano (Reynolds & Redmer, 1995).

La regresión luteal ocurre en dos fases: regresión funcional, asociada a una marcada disminución en la secreción de PROG, y regresión estructural, en la que mueren las células luteales y vasculares por muerte celular programada e implica la reducción del peso y tamaño del CL. Existen diversos factores, incluyendo prostaglandina $F2\alpha$ ($PGF2\alpha$) y LH, implicados en el cese de la producción luteal de PROG. $PGF2\alpha$ es esencial para la inhibición de la síntesis de PROG en el CL. Por otro lado, se han identificado diversas señales, tales como PRL, $PGF2\alpha$, TNF y Fas ligando (FasL), involucradas en la inducción de apoptosis que conducen a la regresión estructural del CL (Stocco y col, 2007; Tellería 2006).

Uno de los objetivos de este trabajo fue evaluar el desarrollo vascular en CLs 24 y 96hs posteriores a la administración de ALLO mediante la medición del área vascular relativa marcada por lectinas. Se halló que los grupos tratados con ALLO mostraron un aumento en el área vascular de CLs respecto a grupo control. Por otro lado, se detectó un aumento considerable en la concentración de PROG sérica 96hs posteriores a la administración de ALLO. Lo anterior sugiere que ALLO interfiere en el proceso natural de luteólisis al inhibir la apoptosis y favorecer la angiogénesis, aumentando así la producción de PROG. Es decir, ALLO inhibe la regresión funcional y estructural de los CLs sin alterar el patrón citológico vaginal, es decir, no se alteró la ciclicidad regular de los animales tratados. Además, en el presente trabajo se encontró que ALLO disminuyó el número de CLs en el grupo de 96hs. Como se mencionó anteriormente, ALLO aumentó el número de folículos atrésicos, lo que implica que hay menos ovocitos disponibles para ovular y, a su vez, se forma un menor número de CLs. Estos resultados indicarían que, como consecuencia del tratamiento con ALLO, existiría un menor número de folículos rescatados debido a un aumento en la atresia folicular, y, por consiguiente, disminuye el número de cuerpos lúteos presentes en el ovario.

En estudios previos de nuestro laboratorio, se encontró que la misma dosis de ALLO administrada icv inhibió la ovulación, los niveles séricos de LH y a su vez generó un aumento en los niveles séricos de PROG y PRL (Laconi y col., 2012). En base a estos resultados previos y a los presentados en el presente trabajo, se propone que ALLO ejerce su efecto a nivel SNC y así altera la función reproductiva de la hembra. El efecto de

ALLO se origina en la inhibición del pico preovulatorio de LH, que luego se extiende al ovario generando un retraso de la regresión lútea y manteniendo la producción de PROG.

De modo que, en base a nuestros resultados, ALLO inhibe la apoptosis y así obstaculiza el proceso de regresión luteal, lo que se manifiesta mediante un aumento en la liberación de PROG. A su vez, la PROG podría también estar actuando como protector frente al proceso de luteólisis, como han mencionado otros autores (Stocco y Telleria, 2006 y 2007). ALLO administrada icv protege al CL de la regresión tanto funcional como estructural. El significado fisiológico de estos hallazgos consiste en que ALLO promueve y sostiene la supervivencia del CL actuando simultáneamente sobre hormonas como la LH (Laconi y col., 2001), sobre la PROG (este trabajo) y aumentando la liberación de PRL (Laconi, y col 2001), modulando redes neuronales hipotálamicas e hipofisarias. Podemos concluir que ALLO ejerce un efecto anti-apoptótico sobre los CLs y pro-apoptótico sobre folículos en crecimiento.

Existen otras condiciones fisiológicas que se caracterizan por el sostenimiento de la función luteal luego de la ovulación. Nuestros hallazgos podrían interpretarse desde la perspectiva de una falsa preñez. La pseudopreñez consiste en la prolongación de la fase lútea que resulta de la estimulación sensorial que la hembra recibe durante el coito (Long & Evans, 1922). Además, la prolongación de la fase lútea de la pseudopreñez depende de la secreción hipofisaria de PRL que es provocada por la estimulación cervicovaginal (Rotchild, 1981). En este contexto, se podría hipotetizar que tras la administración de ALLO ocurre un retraso en el proceso natural de la luteólisis semejante al que acontece durante la pseudopreñez. Sin embargo, nuestros resultados no concuerdan con dicha suposición debido a que las ratas tratadas con ALLO mantuvieron la regularidad en su ciclo estral, no recibieron la estimulación cérvico-vaginal de la cópula y la ovulación está inhibida.

El significado biológico de la pseudopreñez se atribuye a la prolongación de la actividad luteal como consecuencia de la estimulación cérvico-vaginal (Castro-Vazquez, 1993). En esta tesina, los resultados apuntan a un mecanismo de protección de la maquinaria reproductiva de la hembra frente a un estresógeno, que podría responder a un agente externo como la ausencia de macho, la falta de disponibilidad de recursos alimentarios o cambios climáticos extremos.

Mecanismo de acción propuesto a nivel SNC

El mecanismo a través del cual ALLO extiende su efecto al ovario comienza en el SNC, mediante la disminución en el índice de recambio ácido dihidroxifenilacético (DOPAC)/dopamina (DA) (Laconi y col., 2001). La DA es una neurohormona producida en el hipotálamo y es el principal regulador de la liberación de la hormona PRL por el lóbulo anterior de la hipófisis (adenohipófisis). Por otro lado, ALLO potencia el efecto inhibitorio de GABA, GABA inhibe la secreción de GnRH y así se suprime el pico preovulatorio de LH. También se ha observado que ALLO suprime la liberación de FSH en cultivo de células de la hipófisis (Wiebe y col., 1994), lo que implica una disminución en el estímulo para la síntesis de ES por las células de la granulosa. En estudios previos, se encontró que ALLO

inyectado icv inhibió la conducta sexual y ocasionó un descenso en los niveles de LH séricos; ambos efectos podrían ser mediados por el receptor GABA_A puesto que se revirtieron mediante inyección de bicuculina, antagonista de los receptores GABA_A (Laconi y col., 2002). Finalmente, la disminución de LH altera el desarrollo folicular y la producción de hormonas ováricas, como se demostró en el presente trabajo.

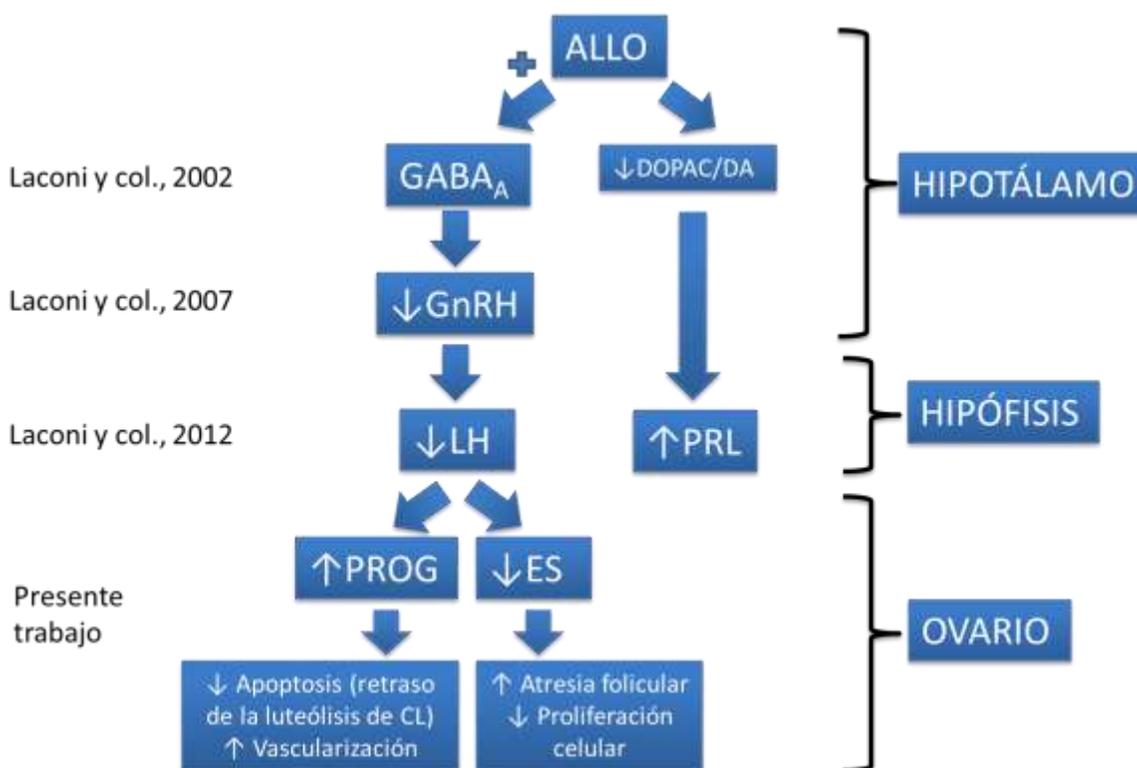


Figura 28. Representación esquemática del mecanismo de acción a nivel ovárico propuesto a partir de los resultados hallados en la presente tesina.

Mecanismo de acción propuesto a nivel ovárico

Se pretende proponer un mecanismo de acción que explique los niveles disminuidos de ES encontrados en el presente trabajo. No contamos con evidencia suficiente como para sugerir una vía metabólica que concluya lo encontrado para el caso de los niveles séricos de la hormona PROG. El mecanismo propuesto para interpretar la disminución de ES se sustenta en la teoría “dos células – dos gonadotropinas” (Figura 29). Se sabe que la LH estimula la síntesis de andrógenos a partir de colesterol en las células tecaes de los folículos ováricos. Los andrógenos difunden hacia las células de la granulosa y allí se convierten en ES mediante la acción de la enzima aromatasa, proceso inducido por FSH (Moon y col., 1978). Al estar inhibido el pico preovulatorio de LH, disminuye el estímulo para la conversión de colesterol a PROG ovárica, por lo que sería de esperar que la PROG ovárica esté disminuida. En resultados previos de nuestro laboratorio, usando el mismo modelo experimental, se encontró que ALLO ocasionó una disminución en la concentración de PROG ovárica. Sería de esperar que también disminuyan los niveles ováricos de andrógenos. Ante una disminución en la concentración de andrógenos en las

células de la granulosa, habría menos sustrato para la síntesis de ES, y con ello disminuiría la conversión de andrógenos a ES. Además, la hormona PRL inhibe la actividad de la enzima aromatasa y, en estudios previos, observamos que PRL aumenta utilizando el mismo modelo experimental. Por lo que los bajos niveles de ES podrían atribuirse también a la inhibición de la actividad de la enzima aromatasa por la hormona PRL. Sin embargo, para confirmar esta vía metabólica sería necesario medir los niveles séricos de FSH, andrógenos ováricos y la actividad de la enzima aromatasa. Nuestros resultados sintonizan con investigaciones previas que sugieren que la disminución en la producción de ES se debe a la incapacidad de los folículos no ovulados de convertir PROG en androstenediona o testosterona, sustratos para la síntesis de ES (Braw & Tsafirri, 1980). Uilenbroek y col., 1985 encontraron que la adición de LH al medio de cultivo de folículos en proestro aumenta la producción de ES y PROG.

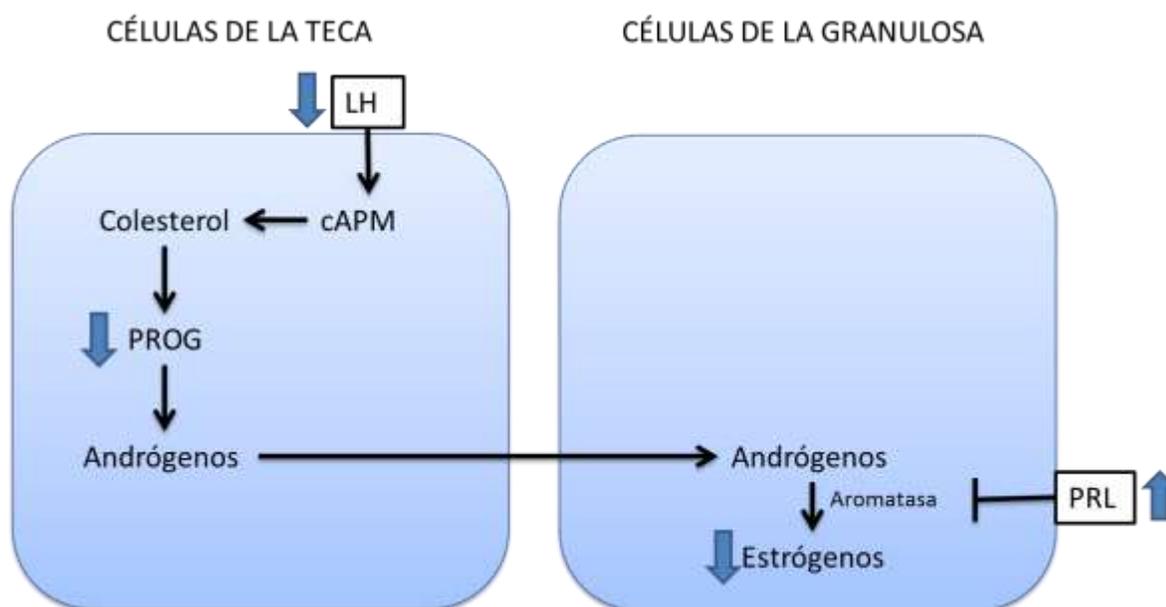


Figura 29. Representación esquemática del mecanismo de acción a nivel ovárico propuesto para los resultados respecto a los niveles de ES. Las células de la teca y de la granulosa son parte de los folículos.

Se concluye que el estrés es un factor preponderante en la función reproductiva de las hembras, pues interviene en la receptividad sexual y en el desarrollo normal de folículos sanos. En el presente trabajo, se encontró que una dosis farmacológica de ALLO, equivalente a los niveles circulantes durante situaciones de estrés, disminuye el número de folículos sanos o disponibles para ovular, como así también retrasa el proceso natural de luteólisis. En un contexto ecológico, el razonamiento previo podría interpretarse como una respuesta natural a las condiciones adversas que presenta el ambiente. Es decir, ante un ambiente desfavorable para la reproducción (baja disponibilidad de alimento, clima hostil, pocos sitios de nidificación, entre otros), resulta conveniente retrasar temporalmente dicho proceso hasta que las condiciones sean las adecuadas. En otras especies animales ocurre un proceso conocido como “anestro estacional o período anovulatorio” y es un estado en el que la producción de crías se retrasa ante un ambiente desfavorable hasta que las condiciones sean adecuadas para generar descendencia. La

respuesta final resulta del balance entre la energía invertida en la supervivencia propia y la generación de crías (Figura 30).

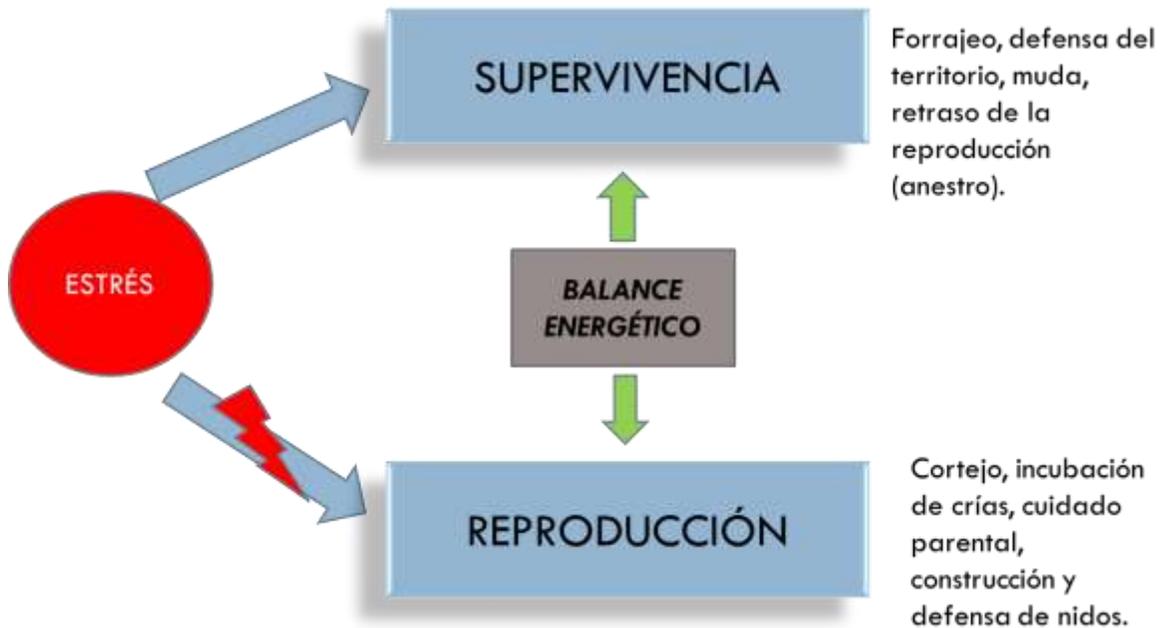


Figura 30. Representación esquemática del balance energético que se establece entre dos procesos vitales para un organismo: la reproducción y la supervivencia.

Proyecciones futuras

El efecto dual de ALLO sobre el mecanismo de apoptosis encontrado en este trabajo, por un lado anti-apoptótico sobre los CLs y pro-apoptótico sobre los folículos, coloca a este neuroesteroide en el foco de futuras investigaciones. Una desregulación en la síntesis de ALLO podría conducir a enfermedades patológicas causadas por las alteraciones en la muerte celular programada, tales como el cáncer. En este último caso, los compuestos como ALLO podrían participar en el desarrollo de nuevas estrategias terapéuticas.

De ahora en adelante en nuestro laboratorio se comenzará a realizar cultivo primario de ovario y cultivo de líneas cancerígenas ováricas para analizar proliferación celular, viabilidad y factores angiogénicos y apoptóticos en respuesta a ALLO.

7. BIBLIOGRAFÍA

Aboitiz F & Dagnino-Subiabre A. (2007). *The Neurobiology of Stress: An Evolutionary Approach*. Research Signpost. Trivandrum-695 023, Kerala, India.

Amsterdam A & Selvaraj N. (1997) Control of differentiation, transformation, and apoptosis in granulosa cells by oncogenes, oncoviruses, and tumor suppressor genes. *Endocrine Reviews*, 18: 435–61.

Augustin H, Braun K, Telemenakis I, Modlich U, Kuhn W. (1995). Ovarian Angiogenesis. Phenotypic Characterization of Endothelial Cells in a Physiological Model of Blood Vessel Growth and Regression, *American Journal of Pathology*, 147(2): 339-351.

Azzolin GC & Saiduddin S. (1983). Effect of androgens on the ovarian morphology of the hypophysectomized rat. *Proceedings of the Society for Experimental Biology and Medicine*, 172: 70-73.

Backström T, Haage D, Löfgren M, Johansson IM, Strömberg J, Nyberg S, Andréen L, Ossewaarde L, van Wingenb GA, Turkmen S, Bengtsson SK. (2011). Paradoxical effects of GABA_A modulators may explain sex steroid induced negative mood symptoms in some persons. *Neuroscience*, 191: 46-54.

Baker TG. A quantitative and cytological study of germ cells in human ovaries. (1963). *Proceedings of the Royal Society B*, 158: 417–433.

Bali N, Arimoto JW, Iwata N, Lin SW, Zhao L, Brinton RD, Morgan TE, Finch CE. (2012). Differential responses of progesterone receptor membrane component-1 (Pgrmc1) and the classical progesterone receptor to 17 β -estradiol and progesterone in hippocampal subregions that support synaptic remodeling and neurogenesis. *Endocrinology*, 153: 759-69.

Baird DT. (1983). Factors regulating the growth of the preovulatory follicle in the sheep and human. *Journal of Reproduction and Fertility*, 69: 343-352.

Baulieu EE. (1981). *Steroid hormones in the brain: several mechanisms?* En: Steroid hormone regulation of the brain. Fuxe K, Gustafsson JA, Weterberg L. Pergamon Press, Oxford.

Baulieu EE. (1997). Neurosteroids: of the nervous system, by the nervous system, for the nervous system. *Recent Progress in Hormone Research*, 52: 1-32.

Barbaccia ML, Roscetti G, Bolacchi F, Concas A, Mostallino MC, Purdy RH, Biggio G. (1996). *Pharmacology, biochemistry and behavior*, 54: 205–210.

Bassett DL. (1943). The changes in the vascular pattern of the ovary of the albino rat during the estrous cycle. *American Journal of Anatomy*, 73: 251–291.

Belelli D, Bolger MB, Kelvin WG. (1989). Anticonvulsant profile of the progesterone metabolite 5 α -pregnan-3 α -ol-20-one. *European Journal of Pharmacology*, 166: 325-329.

Belelli D & Lambert JJ. (2005). Neurosteroids: endogenous regulators of the GABA_A receptor. *Natural Review of Neuroscience*, 6(7): 565-75.

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

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

Bloom W & Fawcett DW. (1986). *Tratado de Histología*. Editorial Interamericana Mc Graw-Hill, Madrid.

Boone DL & Tsang BK. (1998). Caspase-3 in the rat ovary: localization and possible role in follicular atresia and luteal regression. *Biology of Reproduction*, 58: 1533-1539.

Braw RH, Tsafirri A. (1980). Effect of PMSG on follicular atresia in the rat ovary. *Journal of Reproduction and Fertility*, 59: 267-272.

Byskov AG & Hoyer PE. (1988). *Embryology of mammalian gonads and ducts*. En: The physiology of Reproduction. Knobil E & Neill J. Raven Press, New York.

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

Carson RS, Findlay JK, Clarke IJ, Burger HG. (1981). Estradiol, testosterone and androstenedione in ovine follicular fluid during growth and atresia of ovarian follicles. *Biology of Reproduction*, 24: 105-113.

Casas S, García S, Cabrera R, Nanfaro F, Escudero C, Yunes R. (2011). Progesterone prevents depression-like behavior in a model of Parkinson's disease induced by 6-hydroxydopamine in male rats. *Pharmacology, biochemistry and behavior*, 99: 614-618.

Casas S, Giuliani F, Cremaschi F, Yunes R, Cabrera R. (2013). Neuromodulatory effect of progesterone on the dopaminergic, glutamatergic, and GABAergic activities in a male rat model of Parkinson's disease. *Neurological Research*, 35: 719-25.

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

Castro Vázquez A. (1993). La percepción de estímulos claves en el desencadenamiento de reacciones neuroendócrinas y de comportamiento. LARLAC-CONICET.

Cohen JJ. (1993). Apoptosis: the physiologic pathway of cell death. *Hospital Practice (Office Edition)*, 28(12): 35-43.

Compagnone NA & Mellon SH. (2000). Neurosteroids: biosynthesis and function of these novel neuromodulators. *Frontiers in Neuroendocrinology*, 21: 1-56.

Corpéchet C, Young J, Calvel M, Wehrey C, Veltz JN, Touyer G, Mouren M, Prasad VV, Banner C, Sjövall J. (1993). Neurosteroids: 3 alpha-hydroxy-5-alpha-pregnan-20-one and its precursors in the brain, plasma, and steroidogenic glands of male and female rats. *Endocrinology*, 133: 1003-1009.

Do Rego JL, Tremblay Y, Luu-The V, Repetto E, Castel H, Vallarino M. (2007). Immunohistochemical localization and biological activity of the steroidogenic enzyme cytochrome P450 17alpha-hydroxylase/C17, 20-lyase (P450C17) in the frog brain and pituitary. *Journal of Neurochemistry*, 100: 251-268.

Do Rego JL, Seong JY, Burel D, Leprince J, Luu-The V, Tsutsui K, Tonon MC, Pelletier G, Vaudry H. (2009). Neurosteroid biosynthesis: enzymatic pathways and neuroendocrine regulation by neurotransmitters and neuropeptides. *Frontiers in Neuroendocrinology*, 30: 259-301.

Dobson H, Ghuman S, Prabhakar S, Smith R. (2003). A conceptual model of the influence of stress on female reproduction. *Reproduction*, 125: 151-163.

Enders AC. (1973). Cytology of the corpus luteum. *Biology of Reproduction*. 8(2): 158-82.

Erickson GF, Magoffin DA, Dyer CA, Hofeditz C. (1985). The ovarian androgen producing cells: a review of structure/function relationship. *Endocrine reviews*, 6: 371-399.

Folkman J & Klagsbrun M. (1987). Angiogenic factors. *Science*, 235: 442-447.

Frye CA. (1995). The neurosteroid 3- α , 5- α -THP has antiseizure and possible neuroprotective effects in an animal model of epilepsy. *Brain Research*, 696: 113-120.

Greenwald GS. (1989). Temporal and topographic changes in DNA synthesis after induced follicular atresia. *Biology of Reproduction*, 41:175-181.

Greenwald GS & Sieger HI. (1982). Is the first or the second preovulatory surge of FSH responsible for follicle recruitment in the hamster? *Proceedings of the Society for Experimental Biology and Medicine*, 170: 225-230.

Greenwald GS & Terranova PF. (1988). *Follicular selection and its control*. En E. Knobil and J. Neill. *The Physiology of Reproduction*, Raven Press, New York.

Guille C, Spencer S, Cavus I, Epperson CN. (2008). The rol of sex steroids in catamenial epilepsy and premenstrual dysphoric disorder: implications for diagnosis and treatment. *Epilepsy Behavior*, 13: 12-24.

Harrison RJ & Weir BJ. *Structure of the mammalian ovary*. En: Zuckerman L & Weirs BJ. *The Ovary*. Academic Press, New York.

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

Hsueh AJ, Billing H, Tsafriri A. (1994). Ovarian follicle atresia: A hormonally controlled apoptotic process. *Endocrine reviews*, 15: 707-724.

Hsueh AJ, McGee EA, Hayashi M, Hsu SY. (2000). Hormonal regulation of early follicle development in the rat ovary. *Molecular and Cellular Endocrinology*, 163: 95-100.

Irving-Rodgers HF & Rodgers RJ. (2000). Ultrastructure of the basal lamina of bovine ovarian follicles and its relationship to the membrane granulosa. *Journal of Reproduction and Fertility*, 118: 221-228.

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

Klagsbrun MA & D'Amore PA. (1991). Regulators of angiogenesis. *Annual Review of Physiology*, 53: 217–239.

Laconi MR, Casteller G, Gargiulo PA, Bregonzio C, Cabrera RJ. (2001). The anxiolytic effect of Allopregnanolone is associated with gonadal hormonal status in female rats. *European Journal of Pharmacology*, 417: 111-116.

Laconi MR & Cabrera RJ. (2002). Effect of centrally injected allopregnanolone on sexual receptivity, luteinizing hormone release, hypothalamic dopamine turnover, and release in female rats. *Endocrine*, 17: 77-83.

Laconi MR, Reggiani PC, Penissi A, Yunes R, Cabrera RJ. (2007). Allopregnanolone modulates striatal dopaminergic activity of rats under different gonadal hormones conditions. *Neurological Research*, 29: 622-627.

Laconi MR, Chavez C, Cavicchia JC, Fóscolo M, Sosa Z, Yunes RF, Cabrera RJ. (2012). Allopregnanolone alters the luteinizing hormone, prolactin and progesterone serum levels interfering with the regression and apoptosis in rat corpus luteum. *Hormone and Metabolic Research*, 44: 1–7.

Lambert JJ, Belelli D, Peden DR, Vardy AW, Peters JA. (2003). Neurosteroid modulation of GABA_A receptors. *Progress in Neurobiology*, 71: 67-80.

Levine JE. (1997). New concepts of the neuroendocrine regulation of gonadotropin surges in rats. *Biology of Reproduction*, 56: 293-302.

Long JA & Evans HM. (1922). The oestrous cycle of the rat and its associated phenomena. *Mem Univ Calif*, 6:1-148.

Lundy T, Smith P, O'Connell A, Hudson NL, McNatty KP. (1999). Populations of granulosa cells in small follicles of the sheep ovary. *Journal of Reproduction and Fertility*, 115: 251–262.

Majewska MD, Harrison NL, Schwartz RD, Barker JL, Paul SM. (1986). Steroid hormone metabolites are barbiturate-like modulators of the GABA receptor. *Science*, 232: 1004-1007.

Majno G & Joris I. (1995). Apoptosis, Oncosis, and Necrosis. An Overview of Cell Death. *American Journal of Pathology*, 146: 3-16.

Marcál JM, Chew NJ, Salomon DS, Sherman MI. (1975). Delta5, 3beta-hydroxysteroid dehydrogenase activities in rat trophoblast and ovary during pregnancy. *Endocrinology*, 96: 1270-9.

McNatty KP, Makris A, DeGrazia C, Osathanondh R, Ryan KJ. (1979). The production of progesterone, androgens, and estrogens by granulosa cells, thecal tissue and stromal tissue from human ovaries in vitro. *The Journal of Clinical Endocrinology and Metabolism*, 49: 687-699.

McKinley M & O'Loughlin V. (2006). *Human Anatomy*. McGraw-Hill Companies, New York.

Melcangi RC, Panzica G, García-Segura LM. (2011). Neuroactive steroids: focus on human brain. *Neuroscience*, 191: 1-5.

Mensah-Nyagan AG, Do Rego JL, Beaujean D, Luu-The V, Pelletier G, Vaudry H. (1999). Neurosteroids: expression of steroidogenic enzymes and regulation of steroid biosynthesis in the central nervous system. *Pharmacological reviews*, 51: 63-81.

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

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

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

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

Nussey SS & Whitehead SA. (2001). *Endocrinology: an integrated approach*. BIOS Scientific Publishers, Oxford, UK.

- Parborell F. (2002). Tesis doctoral: *Efecto de análogos de GnRH sobre la dinámica folicular en el ovario de rata*. Universidad de Buenos Aires, Argentina.
- Paul SM & Purdy RH. (1992). Neuroactive steroids. *FASEB Journal*, 6: 2311-2322.
- Paxinos G y Watson C. (2010). *The rat brain in stereotaxic coordinates*. Academic Press, Paris.
- Pelletier G. (2010). Steroidogenic enzymes in the brain: morphological aspects. *Progress in Brain Research*, 181: 193-207.
- Penning TM, Jin Y, Heredia VV, Lewis M. (2003). Structure-function relationships in 3-alpha-hydroxysteroid dehydrogenases: a comparison of the rat and human isoforms. *The Journal of Steroid Biochemistry and Molecular Biology*, 85: 247-255.
- Peters H & McNatty KP. (1980). *Ovulation. The ovary*. In: Peters H, McNatty KP. (eds.). Granada Publishing, London.
- Redmer DA, Dai Y, Li J, Charnock-Jones DS, Smith SK, Reynolds LP, Moor RM. (1996). Characterization and expression of vascular endothelial growth factor (VEGF) in the ovine corpus luteum. *Journal of Reproduction and Fertility*, 108(1): 157-65.
- Revelli A, Pacchioni D, Cassoni P, Bussolati G, Massobrio M. (1996). In situ hybridization study of messenger RNA for estrogen receptor and immunohistochemical detection of estrogen and progesterone receptors in the human ovary. *Gynecology and Endocrinology*. 10(3): 177-86.
- Reynolds LP and Redmer DA. (1995). Utero-placental vascular development and placental function. *Journal of Animal Science*, 73: 1839-1851.
- Robel P & Baulieu EE. (1985). Neuro-steroids-3-beta-hydroxy-delta-5-derivatives in the rodent brain. *Neurochemistry International*, 7: 953-958.
- Robel P, Schumacher M, Baulieu EE. (1999). *Neurosteroids: From Definition and Biochemistry to Physiopathologic function*. En: Baulieu EE, Robel P, Schumacher M. Neurosteroids: a new regulatory function in the nervous system. Humana Press, Totowa, New Jersey.
- Rivier C & Rivest S. (1991). Effect of stress on the activity of the hypothalamic-pituitary-gonadal axis: peripheral and central mechanisms. *Biology of Reproduction*, 45: 523-532.
- Rothchild I, Pepe GJ, Morishige WK. (1974). Factors affecting the dependency of LH in the regulation of corpus luteum progesterone secretion in the rat. *Endocrinology*, 95(1): 280-8.
- Rothchild I. (1981). The regulation of the mammalian corpus luteum. *Recent Progress in Hormone Research*, 37: 183-298.
- Rupprecht R & Holsboer F. (1999). Neuroactive steroids: mechanisms of action and neuro-psycho-pharmacological perspectives. *Trends in Neuroscience*, 9: 410-416.

- Selye, H. (1936). A Syndrome produced by Diverse Nocuous Agents. *Nature*, 138, 32-32.
- Smith MS, Freeman ME, Neill JD. (1975). The control of progesterone secretion during the estrous cycle and early pseudo-pregnancy in the rat: prolactin, gonadotropin and steroid levels associated with rescue of the corpus luteum of pseudo-pregnancy. *Endocrinology*, 96: 219-26.
- Sundström I & Bäckström T. (1998). Citalopram increases pregnanolone sensitivity in patients with premenstrual syndrome: An open trial. *Psychoneuroendocrinology*, 23: 73-88.
- Tapanainen JS, Tilly JL, Vihko KK, Hsueh AJ. (1993). Hormonal control of apoptotic cell death in the testis: gonadotropins and androgens as testicular cell survival factors. *Molecular Endocrinology*, 7:643-650.
- Tilly JL. Ovarian follicular atresia: a model to study the mechanisms of physiological cell death. (1993). *Endocrine Journal*, 1:67-72.
- Tilly JL, Kowalski KI, Johnson AL, Hsueh AJ. (1991). Involvement of apoptosis in ovarian follicular atresia and postovulatory regression. *Endocrinology*, 129: 2799-2801.
- Tsafiri A & Adashi EY. (1994). *Local nonsteroidal regulators of ovarian function*. En: The Physiology of Reproduction. Knovil E & Neill J. Raven Press, New York.
- Uilenbroek J, Woutersen P, van der Schoot P. (1980). Atresia of preovulatory follicles: gonadotropin binding and steroidogenic activity. *Biology of Reproduction*, 23: 219-229.
- Uilenbroek J. (1985). Effect of LH on progesterone and oestradiol production *in vivo* and *in vitro* by preovulatory follicles. *Journal of Reproduction and Fertility*, 74: 303-310.
- Wang J, Steele GL, Baimbridge KG, Rodway MR, Leung PC. (1992). Intracellular calcium and the signaling mechanism of luteinizing hormone-releasing hormone in rat granulosa cells. *American Journal of Obstetrics & Gynecology*, 167: 541-447.
- Wathes DC, Swann RW, Birkett SD, Porter DG, Pickering BT. (1983). Characterization of oxytocin, vasopressin, and neurophysin from the bovine corpus luteum. *Endocrinology*, 113(2): 693-8.
- Williams CJ & Erickson GF. (2003). *Morphology and physiology of the ovary*. Endotext.org
- Williams CJ, Erickson GF. (2012). Morphology and physiology of the ovary. In: Rebar RW, editor. (ed.), *Female Reproductive Endocrinology*. Endotext.com.
- Woodruff TK, Lyon RJ, Hansen SE, Rice GC, Mather JP. (1990). Inhibin and activin locally regulate rat ovarian folliculogenesis. *Endocrinology*, 127: 3196-3205.
- Yen S, Jaffe R, Barbieri R. (2001). *Endocrinología de la reproducción*. Editorial Panamericana, Buenos Aires, Bogotá, Caracas, Ciudad de México, São Paulo.

Zeleznik AJ, Ihrig LL, Bassett SG. (1989). Developmental expression of $\text{Ca}^{+2}/\text{Mg}^{+2}$ -dependent endonuclease activity in rat granulosa and luteal cells. *Endocrinology*, 125: 2218–2220.

Zwain IH & Yen SS. (1999). Neurosteroidogenesis in astrocytes, oligodendrocytes, and neurons of cerebral cortex of rat brain. *Endocrinology*, 140: 3843-52.