



UNIVERSIDAD DE BELGRANO

Las tesis de Belgrano

**Facultad de Ciencias Exactas y Naturales
Licenciatura en Ciencias Biológicas**

**Efectos de gonadotrofinas y un análogo de la
hormona liberadora**

Nº 60

Marina Peluffo

Tutora: Marta Tesone

Departamento de Investigación
Agosto 2002

Agradecimientos

A la Dra. Marta Tesone, por confiar en mí y darme la oportunidad de trabajar y aprender en su laboratorio. Por su buena predisposición, alentarme y apoyarme en el campo de la investigación.

A Ale, por dedicar mucho de su tiempo en enseñarme las prácticas del laboratorio y en el desarrollo de mi tesina. Por guiarme y apoyarme en el comienzo de mi vida profesional.

A Fer, por proporcionarme material bibliográfico y estar dispuesta a responder mis inquietudes. Por preocuparse siempre por nosotras.

A Lili, por su tiempo y asesoramiento, sobre todo en el área de la biología molecular.

A Gri, por compartir muchos momentos en el laboratorio y ayudarme siempre que lo necesité, como por ejemplo cuando comencé a escribir la tesina.

A Dalhia, por estar siempre dispuesta a ayudar.

A Pato, por responder a mis infinitas preguntas.

A todo el primer piso del IBYME, por su buena predisposición.

Al IBYME, por darme la posibilidad de realizar mi tesina.

A todos los del Laboratorio Beta, por facilitarme material de laboratorio.

A la UB, en especial al Dr. Vernengo, a Cecilia, a Vanina, a María Inés y a Gabriela por tratar de facilitarnos las cosas.

A Silvia, por transmitirnos su vocación por la ciencia y estar dispuesta a escucharnos y ayudarnos.

A mi mamá, por darme la vida 2 veces y brindarme siempre su amor incondicional. Por ser una mujer y madre ejemplar.

A mi papá, por estar orgulloso de mí y apoyarme siempre en todo. Por ser un ejemplo de fortaleza y perseverancia.

A mis 6 hermanos, por estar siempre a mi lado: a Lionel, por su disciplina y responsabilidad; a Alexia, por darme una visión distinta de la realidad; a Ixriel, por su honestidad y nunca olvidarse de llevar a cabo mi cábala los días de exámenes; a Eliana, por soportar todos mis rayes sin quejarse y ser mi compinche; a Nahuel, por ser mi debilidad a pesar de nuestras diferencias, a Florencia, por su dulzura y vitalidad.

A mis cuñados: Ramiro y Carolina, por aceptarme como soy y estar dispuestos a apoyarme cuando lo requiera. A Hernán y Gabriel, por estar ahí.

A mis sobrinos, por ser la alegría de mi familia y saludarme en vísperas de exámenes.

A Mari, por ser una especie de abuela postiza y acompañarme siempre.

A mis primos, tíos, padrinos y ahijado por acompañarme en los distintos momentos de mi vida.

A María Inés, por nunca olvidarse de encenderme una vela los días de exámenes y de esa manera brindarme tranquilidad.

A Juan Carlos Campanera, por ayudarme cuando más lo necesité y seguir haciéndolo sin tener obligación de hacerlo.

A Magui, por ayudarme con el inglés y poder contar siempre con ella; y a toda su familia en especial a Beatriz, por alentarme a seguir adelante.

A Naty, por ayudarme en el diseño de este trabajo y por sus buenos consejos.

A Clau y Ariel, por poder seguir contando con ellos a pesar del tiempo.

A Eri, por ser la persona que me acompañó durante toda la carrera con su gran personalidad. Por estar juntas en los momentos difíciles de la facultad como ser los parciales y finales, y hacerla de esa forma más fácil.

A las Caros, por su alegría y poder compartir muchos momentos de nuestras carreras.

A Vero, Vir y Lilu, porque a pesar de no terminar juntas la carrera seguir ahí.

A Juan y Gaspar, por estar siempre dispuestos a escuchar y proporcionarme ayuda sobre todo cuando desespero frente a la computadora.

A Marina, Nuria, Carolina, Valeria, Mariana, Agustín, José, David y Claudio, por acompañarme en mis locuras.

Indice

INTRODUCCION	7
EL OVARIO	7
FOLICULOGÉNESIS	7
Desarrollo folicular	7
Ovulación	10
Luteinización	10
Atresia folicular	11
FACTORES INVOLUCRADOS EN LA FOLÍCULOGENESIS	12
Reclutamiento inicial	12
Reclutamiento cíclico	13
NECROSIS VS APOPTOSIS	13
MECANISMOS MOLECULARES DE LA ATRESIA	15
Miembros de la familia de Bcl-2	15
Caspasas como ejecutoras de la apoptosis	18
Sistema Fas/Fas ligando y proteína p53	20
GnRH COMO REGULADOR DE LA SÍNTESIS Y LIBERACIÓN DE GONADOTROFINAS	20
Gonadotropinas	21
GnRH Y RECEPTORES DE GnRH	21
PEPTIDOS SIMILARES A GnRH PRODUCIDOS EN EL OVARIO	22
ANALOGOS DE GnRH	22
HIPOTESIS Y OBJETIVOS	23
HIPÓTESIS	23
OBJETIVOS:	23
MATERIALES Y METODOS	23
ANIMALES	23
TRATAMIENTOS	23
Obtención de ratas superovuladas	23
Administración del análogo de GnRH	23
AISLAMIENTO DEI ARN	23
TRATAMIENTO CON ADNasa	24
RT-PCR PARA b-ACTINA	24
RT-PCR MULTIPLE (RT-MPCR)	24
GEL DE AGAROSA 1%	24
GEL DE POLIACRILAMIDA 8%	24
TINCIÓN CON PLATA	24
ANÁLISIS DE LOS DATOS	24
RESULTADOS Y DISCUSION	25
PUESTA A PUNTO DE LA TECNICA DE RT-PCR	25
RT-PCR DE b-ACTINA	26
ENSAYOS PRELIMINARES	27
RT-PCR MULTIPLE DE LAS MUESTRAS C Y LA	29
Expresión de bax y bcl2. Análisis de la relación entre ambos genes	31
Expresión de bcl-xL	32
Expresión de la caspasa-3	33
CONCLUSION	34
BIBLIOGRAFIA	34

Introducción

El ovario

En los mamíferos, el ovario es el sitio de almacenamiento y desarrollo de los oocitos formados durante la vida embrionaria/fetal ó alrededor del momento del nacimiento. La principal función de la gónada femenina es la maduración del oocito para la fertilización y exitosa propagación de la especie (McGee and Hsueh, 2000). Para esto genera un ambiente propicio para la instalación del cigoto, ligado a cambios inducidos por la transformación del folículo ovulatorio en el cuerpo lúteo (Thibault et al., 1993). Además, el ovario constituye el principal portador de las células secretoras de hormonas femeninas que desarrollan y mantienen los caracteres sexuales secundarios de la hembra, así como también las características adecuadas durante la preñez.

En la rata los ovarios están situados cerca de los riñones a lo largo del borde del músculo lateral psoas y se encuentran rodeados de grasa. Durante la adultez la superficie del ovario es nodular y se encuentra cubierta por una capa monoestratificada de células cúbicas ó poliédricas, llamada epitelio germinal (Mae-kawa, 1990). Esta cubierta epitelial está frecuentemente invaginada hacia el tejido conectivo subyacente, llamado túnica albugínea, formando pequeños pliegues, hoyos ó criptas. Por debajo se encuentran dos zonas: la llamada zona cortical y la zona medular, y el límite entre ambas no se encuentra bien definido. La primera comprende al estroma ovárico (formado por tejido conectivo laxo, fibroblastos y precursores de células tecales), y folículos en distintos estadios de maduración, atrésicos y cuerpos lúteos. La zona medular que se encuentra muy vascularizada e inervada, contiene células de tipo muscular y tejido conectivo laxo (Bloom W. and Fawcett W.D., 1975).

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

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

Foliculogénesis

El proceso de **foliculogenesis** (Fig. 1) comprende el crecimiento del folículo y su pasaje a través de los distintos estadios de desarrollo, desde el momento en que emerge del pool de folículos formado durante la oogénesis, hasta el momento en el cual es ovulado o entra en atresia. Este proceso es llevado a cabo en la corteza del ovario.

Desarrollo folicular

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

Debido al continuo crecimiento y a la regresión de los folículos, la relación volumen/contenido del ovario, se encuentra en constante cambio (Thibault et al., 1993). El número total de folículos ováricos es determinado en forma temprana en la vida del individuo, y la depleción de este pool, lleva a la senescencia de la vida reproductiva (McGee and Hsueh, 2000). Para cada especie se encuentran diferencias en el número de

folículos que contienen como reservorios formados durante la oogénesis. Al nacimiento, el ovario contiene 20.000, 160.000, y 1.000.000 folículos en ratas, ovejas y humanos respectivamente. Estas diferencias también se encuentran dentro de la misma especie (Thibault et al., 1993).

El desarrollo de los folículos comienza con la formación de los folículos primordiales en la etapa prenatal; tras el nacimiento, el proceso se interrumpe, y continúa en un período que transcurre desde la pubertad a la menopausia. La clasificación de los folículos puede estar basada en los cambios morfológicos observados durante su desarrollo o en el tamaño o diámetro folicular, o en el número de capas de células de la granulosa, y varía según los autores. Algunos los clasifican como folículos primordiales, primarios, secundarios y de De Graaf (Bloom W. and Fawcett W.D., 1975), otros como folículos primordiales, primarios, secundarios, y terciarios tempranos y tardíos (Banka and Erickson, 1985).

Folículos primordiales: En la mayoría de los mamíferos antes o luego del nacimiento, la oogonia es transformada en *oocitos primarios* caracterizados por una profase meiótica prolongada y rodeados por una capa única de células foliculares aplanadas, llamadas de la pregranulosa. En esta fase, las superficie del oocito y de las células foliculares envoltantes son lisas y están en estrecho contacto.

El **folículo primordial** está compuesto por un ovocito, arrestado en el estadio de diplotene de la profase meiótica, rodeado por una capa de células planas epiteliales llamadas células de la granulosa. Carece de células de la teca y tejido conectivo. Los **folículos primordiales** constituyen la reserva de folículos en reposo, los cuales serán progresivamente eliminados durante la vida reproductiva, y se encuentran principalmente en la periferia de la corteza, inmediatamente por debajo de la túnica albugínea.

Folículos primarios: Los folículos primordiales continuamente abandonan el reservorio para convertirse en **folículos primarios**. Esta transición implica ciertas modificaciones citológicas en el oocito, las células foliculares y el tejido conjuntivo adyacente. A medida que el oocito aumenta de tamaño, la capa única de células aplanadas se convierte inicialmente en una capa de células cúbicas y cilíndricas, y luego mediante mitosis, da origen a las *células granulosa* que forman un epitelio estratificado. Entre el oocito y las células granulosa circundantes, se originan espacios donde se deposita una sustancia que representa el inicio de la *zona pelúcida*, mucopolisacáridos secretados por la células de la granulosa, que más tarde originarán un halo translúcido que rodea al ovocito. La adquisición de la zona pelúcida es una característica del folículo preantral primario. A medida que los folículos aumentan de tamaño, van desplazándose gradualmente hacia el interior de la corteza. Los folículos primarios representan un reservorio de gametas durante el período fértil de la hembra. Poseen un diámetro $> 60 \mu\text{m}$.

Folículo secundario: La transformación del folículo primario a **secundario**, implica la transformación de células foliculares que forman un epitelio estratificado alrededor del ovocito, llamándose células de granulosa (Bloom W. and Fawcett W.D., 1975). Estas células poseen uniones estrechas ("gap junction") que permiten el acople metabólico con el epitelio, asegurando la nutrición de las capas más internas. Por fuera de la lámina basal que separa las células de la granulosa del estroma, se diferencia una teca incipiente. Además, en esta etapa se completa la maduración de la zona pelúcida (Bloom W. and Fawcett W.D., 1975). La zona pelúcida madura posee glicoproteínas, las cuales poseen propiedades funcionales durante la fecundación, mucopolisacáridos, ácido siálico y ácido hialurónico. Las células de granulosa del folículo secundario tiene la capacidad de sintetizar los tres tipos de esteroides ováricos (progestágenos, andrógenos y estrógenos) en cantidades limitadas. Sin embargo, se produce más estrógenos que andrógenos o progestágenos (Hillier et al., 1977). La enzima aromatasa cataliza la conversión de andrógenos a estrógenos (aromatización) y es el factor limitante de la producción ovárica de estrógenos. La enzima es inducida por la FSH (Moon et al., 1975), de modo que la producción de estrógenos está limitada por el número de receptores para la hormona.

En este estadio, las células de la granulosa conforman una población homogénea y adquieren receptores de alta afinidad para la hormona folículo estimulante (FSH) y hormonas esteroideas (Adashi et al., 1993). La FSH se combina con los estrógenos para ejercer un efecto mitogénico sobre las células de granulosa (Goldenberg et al., 1972). El destino del folículo secundario (preantral) depende de un delicado balance de esteroides. Es decir, en bajas concentraciones, los andrógenos aumentan su propia aromatización y contribuyen a la producción de estrógenos. En concentraciones más altas, la capacidad limitada de aromatización es sobrepasada y el folículo deviene androgénico y se transforma en atrésico. La atresia, al igual que el comienzo del crecimiento folicular, es un proceso continuo. Es posible que los folículos progresen en su desarrollo sólo si emergen cuando la FSH está elevada y la LH (Hormona Luteinizante) baja.

Al final de esta fase denominada **preantral**, el oocito detiene su crecimiento y se vuelve competente para reasumir la meiosis. Cuando el folículo alcanza un diámetro aproximado de 0.2 mm y posee de seis a doce capas de células (en humanos), aparecen unos espacios irregulares, llenos de un líquido claro entre las

células de la granulosa. Este líquido aumenta en cantidad a medida que crece el folículo y los espacios irregulares que se forman entre las células de la granulosa confluyen para constituir una sola cavidad, denominada *antro*. Poseen un diámetro $\approx 120 \mu\text{m}$.

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

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

Folículos preovulatorios: Son aquellos que han alcanzado los estadios finales de crecimiento y maduración y han adquirido la habilidad para ovular ante los adecuados niveles de gonadotropina LH ó la administración de hCG.

En los **folículos preovulatorios o folículos de De Graaf**, las células de granulosa se agrandan y adquieren inclusiones lipídicas, mientras que en las células de la teca aparecen vacuolas y aumenta la vascularización. Estos folículos se caracterizan por una baja tasa mitótica de las células foliculares y una alta relación estrógenos/andrógenos y estrógenos/progesterona en el fluido folicular (contrario a lo que se observa en los folículos atrésicos asociado a pérdida de capacidad de aromatización por parte de las células de la granulosa). Además presentan receptores de LH en células de la granulosa (ausentes ó no funcionales en los folículos atrésicos), alta producción de inhibina y alto flujo sanguíneo comparado a los atrésicos (Thibault et al., 1993).

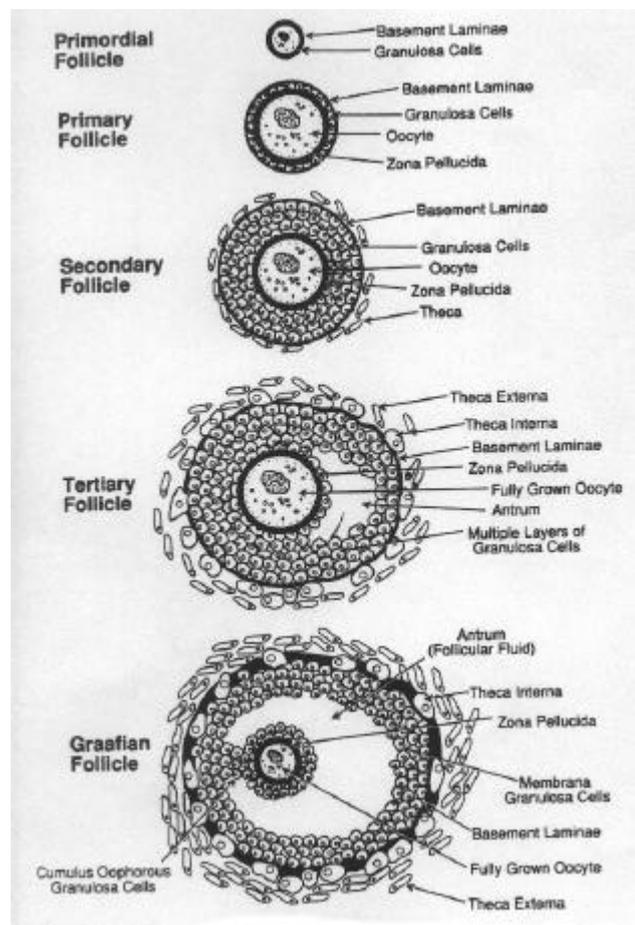


Figura 1. Estructura y Clasificación del folículo ovárico durante su desarrollo y crecimiento (Williams, 1998)

Ovulación

La ovulación consiste en un aumento del tamaño folicular seguido de la protrusión del folículo desde la corteza ovárica debido a un ascenso de estrógenos, seguido de un pico de LH y FSH. Luego del pico de LH, la concentración de progesterona en el folículo preovulatorio continúa aumentando, hasta la ovulación (Fig. 2).

Luego del pico preovulatorio se observa un incremento en el flujo sanguíneo y por otro lado, las células de la granulosa cercanas a la lámina basal, comienzan a soltarse debido a la desaparición de las uniones estrechas que las mantenían unidas. El único sitio donde estas uniones no se ven alteradas es en aquellas células que están formando parte de la corona radiata. Otro evento que ocurre en la ruptura folicular es la digestión proteolítica de la pared folicular, por ejemplo las colagenasas disuelven la membrana basal y el estroma folicular durante la ovulación.

Luteinización

Luego de la ovulación, el folículo dominante se reorganiza para convertirse en un cuerpo lúteo. Los capilares y los fibroblastos del estroma circundante proliferan y penetran la membrana basal. El cuerpo lúteo es un órgano endócrino transiente formado por las células foliculares remanentes del folículo que ha sido ovulado. Su principal función es la de secretar progesterona, la cual tiene numerosas funciones, entre ellas, el acondicionamiento del útero para el período de preñez y la regulación de las contracciones del oviducto para el transporte del óvulo al útero.

La formación del cuerpo lúteo se inicia mediante numerosos cambios bioquímicos y morfológicos que sufren las células de la teca interna y las células de la granulosa de los folículos preovulatorios. Estos cambios que determinan el proceso de *luteinización*, se producen como consecuencia del incremento en los niveles séricos de LH asociado al pico preovulatorio de esta hormona.

No todas las células se diferencian sincrónicamente luego de la ovulación. Adicionalmente, las células del cuerpo lúteo derivan de los dos tipos de células foliculares secretoras de esteroides, de la granulosa y tecales. Por lo tanto esta glándula consiste en, al menos, dos tipos celulares de *células luteales*; *las células luteales grandes* y *las células pequeñas*. Las primeras derivan de la granulosa y contienen todos los elementos de las células secretoras de esteroides como numerosas mitocondrias y abundante retículo endoplasmático liso. Por el contrario las células pequeñas provienen de la teca y tiene moderada cantidad de mitocondrias pero abundante retículo endoplasmático liso (Knobil and Neill, 1994). Ambos tipos celulares constituyen el 50 % del cuerpo lúteo, que también contiene tejido conectivo y fibroblastos.

En la rata, la diferencia entre células luteales grandes y pequeñas podría residir, no sólo en un origen celular diferente, sino también en la capacidad de responder diferencialmente a determinados estímulos del ambiente folicular, como los factores de crecimiento (O'Hara A et al., 1987; Parmer TG et al., 1991)

La producción de progesterona en la fase lútea se caracteriza por una primera etapa ascendente, un plateau y una etapa descendente (Fig 2). Esta síntesis de progesterona es una medida de la capacidad funcional del cuerpo lúteo y depende de varios factores. La acumulación de receptores de LH y la adecuada producción de esteroides y otros factores durante la fase folicular, predetermina el grado de luteinización y la capacidad funcional del cuerpo lúteo.

El control de la secreción de progesterona en la rata es llevada a cabo por las hormonas LH y prolactina (ambas luteotróficas) y la sustancia luteolítica, prostaglandina F2a (PGF 2a).

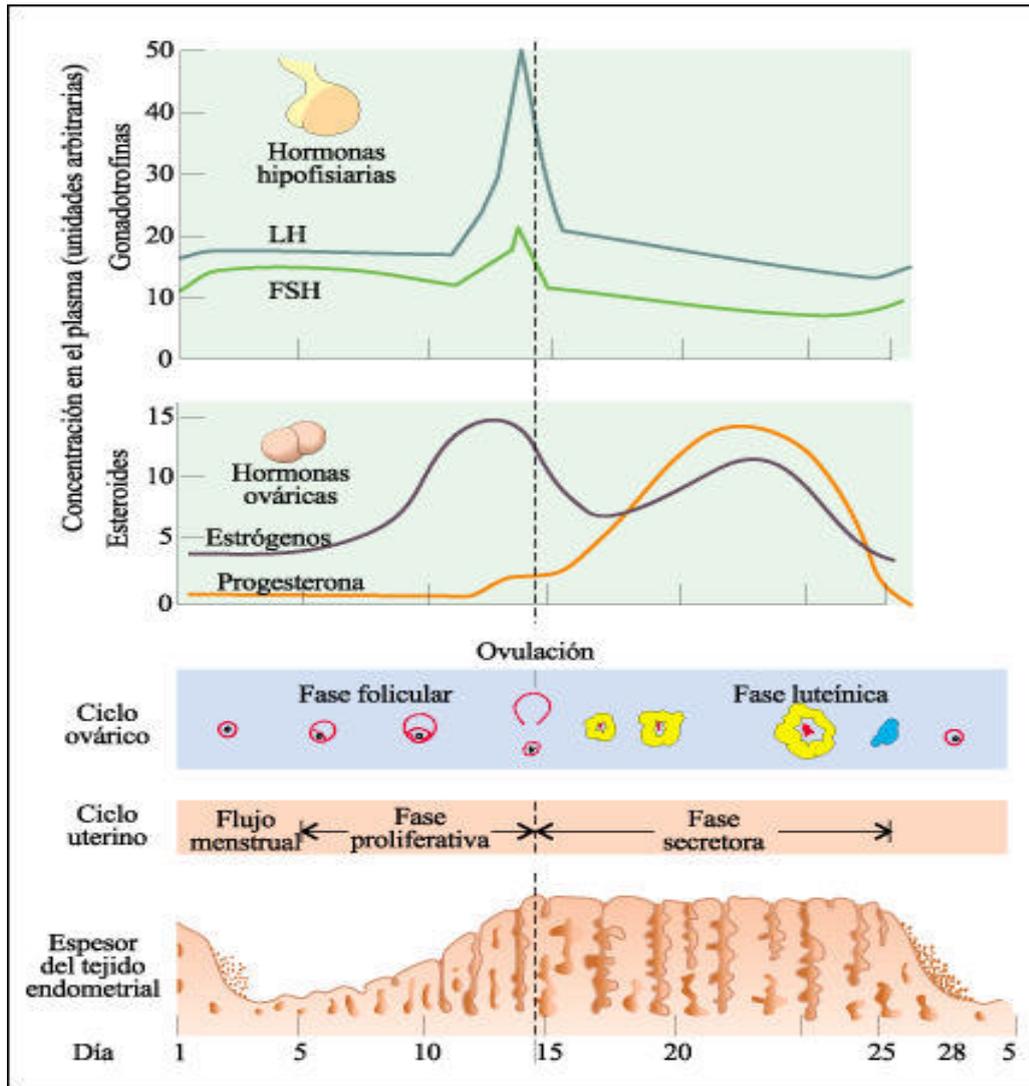


Figura 2: Esquema de todos los acontecimientos que se producen en un ciclo menstrual, que implica cambios de concentración hormonal y anatómicos en el ovario en el endometrio (Curtis H. and Barnes N.S., 2000).

Atresia folicular

En el ovario humano, 2 millones de ovocitos se encuentran al nacer y alrededor de 400.000 folículos están presentes en la pubertad. Sin embargo, solamente 400 folículos serán ovulados durante la vida fértil de la mujer. Por lo tanto, el 99,9 % de los folículos sufren cambios degenerativos y este proceso corresponde a un normal funcionamiento del ovario. Y esto podría resultar una ventaja evolutiva seleccionando aquellos folículos que contengan oocitos saludables para finalmente ser ovulados (Hsueh et al., 1994). En otras especies de mamíferos, la gran mayoría de los folículos (entre el 70-99%) también es eliminada antes de alcanzar la ovulación. El proceso degenerativo por el cual los folículos son eliminados antes de llegar a la ovulación se denomina atresia.

La palabra atresia deriva del idioma griego (a: no; tresia: perforado). Basándose en la definición estricta, la atresia se refiere a los folículos antrales que sufren cambios degenerativos antes de llegar a la ruptura folicular durante la ovulación.

Desde el punto de vista morfológico, los folículos antrales pueden dividirse en varios estadios (Fig 3) (Hsueh et al., 1994):

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

- **Estadio II:** se caracteriza por la presencia de varias células de granulosa picnóticas (10-30%), pocas células en mitosis y restos celulares en el antro. La membrana celular pierde la integridad y existe infiltración de leucocitos en la capas de células de granulosa. En un estadio avanzado de atresia, los folículos de rata no pueden ser rescatados por tratamiento con PMSG y degeneran (Hirshfield, 1988).
- **Estadio III:** se caracteriza por un reducción en el número de células de granulosa, ausencia de células en mitosis y un colapso del folículo. Las células de la teca se hiperatrofian y contienen gotas de lípidos. Estas células forman parte ahora de las células intersticiales del estroma y se cree que son activas a nivel esteroidogénico. También, ocurren cambios histológicos como separación de la membrana basal y presencia de cuerpos apoptóticos. Con respecto al ovocito, sufre ruptura de la vesícula germinal como resultado probablemente, de los cambios ocurridos en células de granulosa.

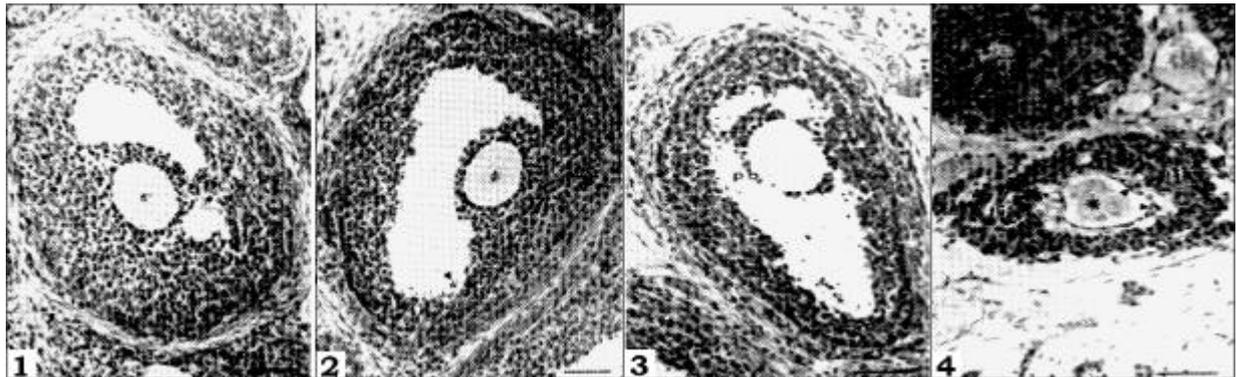


Figura 3: Histología de los folículos a los diferentes estadios de la atresia en el ovario de rata. 1- Folículos antrales no atrésicos normales. 2- Estadio I. 3- Estadio II. 4- Estadio III. (Hsueh et al., 1994).

El destino de la capa de células de la teca durante la atresia varía entre las diferentes especies. Mientras que en humanos, ratas y conejos, las células de la teca son sometidas a una extensa hipertrofia durante la atresia, en las células de la teca de folículos de hamster no se observan cambios morfológicos marcados a pesar de una pronunciada reducción de la vascularidad folicular y un colapso total de la capa de células de granulosa. En los ovinos, las células de la teca derivadas de folículos atrésicos son sometidas a una condensación nuclear y degeneración similar a lo observado en células de granulosa, aunque este proceso parece estar restringido al estadio más avanzado de la atresia. En el caso donde se observa hipertrofia de las células de la teca, se cree que estas células de la teca pueden formar células intersticiales secundarias, esteroidogénicamente activas en el estroma (Hsueh et al., 1994).

El degeneramiento que sufren las células de granulosa a medida que avanza la atresia posee todas las características de la muerte celular programada o apoptosis.

Factores involucrados en la foliculogénesis

Uno de los puntos más difíciles de dilucidar en la fisiología del ovario, son los factores que determinan que los folículos permanezcan senescentes, que entren en desarrollo y en proceso de atresia (muerte folicular), mientras un tercer grupo madura y es ovulado.

Existen dos eventos importantes durante la foliculogénesis, **reclutamiento inicial** y **reclutamiento cíclico** (Fig 4).

Reclutamiento inicial

Se da de una forma continua y empieza en el preciso momento en que se han formado los folículos, mucho antes de la pubertad y es el responsable de que los folículos primordiales salgan de su estado de reposo y comiencen una etapa de crecimiento. Durante el **reclutamiento inicial**, factores intraováricos u otros factores desconocidos, estimulan a un grupo de folículos primordiales a iniciar el crecimiento, mientras el resto permanece senescente durante meses o años. Este proceso podría deberse a la liberación de estímulos inhibitorios que hasta ese momento mantenían a los folículos en reposo (McGee and Hsueh, 2000).

Reclutamiento cíclico

Comienza después de la llegada a la pubertad como resultado de un aumento en los niveles de FSH circulante durante los ciclos reproductivos. Esto permite que una cohorte de folículos en fase antral, sea rescatada del proceso de atresia. En este momento, los folículos han completado su crecimiento, adquirido la zona pelúcida y se encuentran competentes para reasumir la meiosis. De este modo, sólo un número de folículos sobrevivirá, mientras que el resto entrará en atresia.

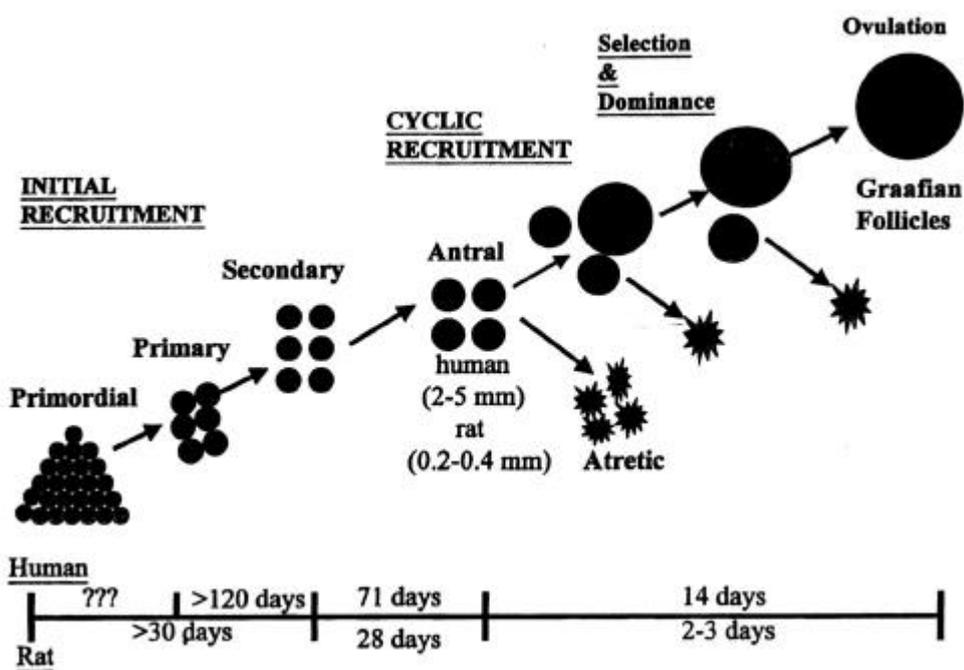


Figura 4: Esquema representativo de los procesos que sufren los folículos ováricos a lo largo de la vida reproductiva (McGee and Hsueh, 2000).

Necrosis vs. apoptosis

En base a diferencias morfológicas y bioquímicas, existen dos vías por las cuales las células mueren: *necrosis* y *apoptosis*. Ambos procesos difieren en sus mecanismos de inducción: la necrosis es inducida por compuestos químicos letales, eventos biológicos y físicos. Mientras que, la apoptosis requiere procesos biológicos que necesitan energía y que están dirigidos genéticamente. La muerte celular por apoptosis ocurre cuando una célula activa un programa interno de suicidio como resultado de la acción de señales intrínsecas o extrínsecas.

En 1972, el australiano John Kerr y sus colaboradores escoceses Andrew Wyllie y Alastair Currie descubrieron los diferentes aspectos de las células en la muerte programada y en la patológica. Para distinguirlas, llamaron *apoptosis* a la primera, en oposición a la *necrosis*. En griego antiguo, la palabra *apoptosis* significa el "acto de caer", como caen los pétalos de las flores y las hojas de los árboles en otoño, y fue elegido porque sugiere pérdidas benéficas – la muerte celular, en este caso-, necesarias para el buen funcionamiento y la supervivencia del organismo (M de Fátima Horta et al., 1999).

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

Además de estos cambios morfológicos a nivel celular, ocurren cambios bioquímicos a nivel nuclear. La característica principal es la fragmentación que sufre el ADN como consecuencia de la activación de señales intracelulares que concluyen en la activación de una endonucleasa CA^{2+}/Mg^{2+} dependiente produciendo

clivajes en el ADN de forma regular entre las unidades nucleosomales. Como resultado de la activación de esta enzima se generan fragmentos de múltiplos de 200 pares de bases, que se visualiza como un patrón característico de bandas en geles de agarosa (Hsueh et al., 1994).

La apoptosis es un proceso altamente regulado que puede ser inducido, estimulado e inhibido en diferentes etapas.

La cascada de apoptosis puede ser dividida en tres etapas secuenciales: iniciación, ejecución y muerte apoptótica.

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

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

- La etapa de ejecución comienza con la activación de las caspasas ejecutoras. Su activación es llamada «punto de no retorno», ya que una vez activadas estas proteasas ejecutoras degradan una variedad de proteínas que ocasionan daños irreversibles en la célula.
- La etapa de la muerte apoptótica, es el resultado de una cascada de eventos muy compleja que finalmente lleva al colapso del núcleo celular y de la célula misma. Aún en la etapa final, la célula no libera componentes intracelulares, evitando de esta manera la reacción inflamatoria.

La apoptosis puede ser inducida por:

- Unión de ligandos con sus respectivos receptores. Este proceso ocurre con la familia de los factores de necrosis tumoral (TNF).
- Compuestos citolíticos secretados por linfocitos citotóxicos.
- Disminución o ausencia de factores de crecimiento específicos.
- Aumento o disminución de hormonas específicas (ej. Hormonas esteroideas).
- Estímulos no fisiológicos, como la ausencia de nutrientes, irradiación, quimioterápicos o calor.

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

[Vía que involucra la señalización inducida por la activación de receptores de superficie, llamados receptores de muerte.

[Vía iniciada por daño del DNA. Esta vía es regulada por la proteína p53 y también por las proteínas de la familia de Bcl-2.

[Vía iniciada por la caída de los factores de crecimientos, que es regulada por la familia de proteínas Bcl-2.

[La cuarta vía es la iniciada por compuestos citosólicos secretados por linfocitos citotóxicos. Estas células liberan granzima B y perforina.

Este conjunto de múltiples señales apoptóticas convergen en la activación de las caspasas, llevando finalmente a los cambios morfológicos que caracterizan a la apoptosis (Fig. 5)

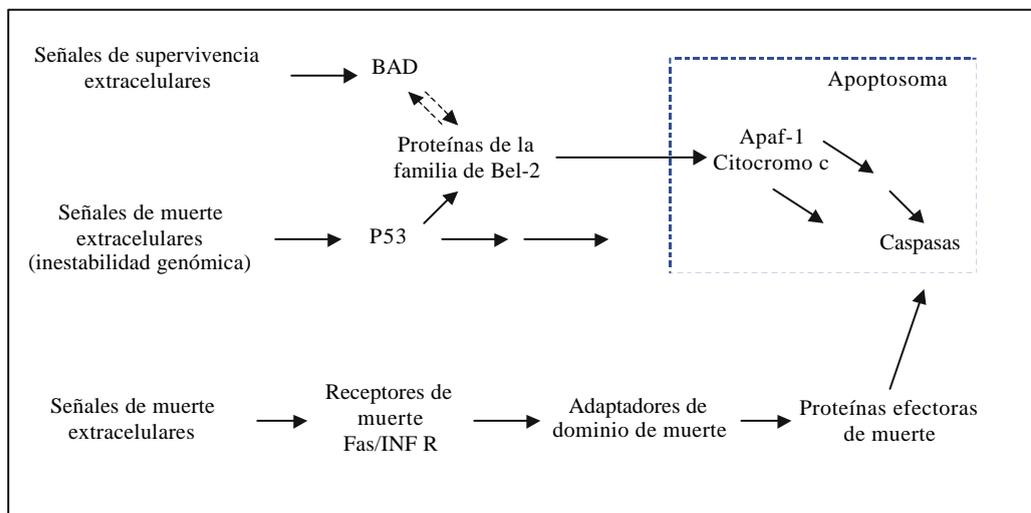


Figura 5: Vías convergentes en la apoptosis (Hsu and Hsueh, 2000)

Mecanismos moleculares de la atresia

Miembros de la familia de Bcl-2

Una de las vías clásicas de señalización de la apoptosis más importante en el ovario es la vía que involucra la activación de miembros de la familia de Bcl-2. Bcl-2 es el acrónimo de B-cell leukemia/lymphoma 2 y se aisló por primera vez como un protooncogen cuya translocación cromosomal se asociaba al linfoma de células B (Tsujiyama et al., 1985). Esta traslocación conduce a la sobreexpresión de Bcl-2 en células linfocíticas ya que queda bajo el control del promotor de la cadena pesada de inmunoglobulina, ocasionando tumorigenesis.

Vaux y colaboradores (1988) fueron los primeros en reportar que Bcl-2 puede prolongar la supervivencia celular. También se vio que reducciones en la expresión de *bcl-2* mediada por "antisense" aceleran el grado de muerte celular en ausencia de factores de crecimiento (Reed et al., 1990a; Reed et al., 1990b) confirmando de esta forma, la importancia de Bcl-2 en la regulación de la supervivencia celular. Por otro lado, se observó que la sobreexpresión de la proteína Bcl-2 suprime la apoptosis inducida por distintos agentes, tanto *in vitro* como *in vivo* (McDonnell et al., 1990; Nunez et al., 1991; Baffy et al., 1993). Sin embargo, su acción supresora de la apoptosis no es universal y esta proteína no puede evitar la apoptosis en muchas ocasiones (Cuende et al., 1993; Vanhaesebroeck et al., 1993), como por ejemplo en el caso de la apoptosis inducida por la ausencia de factores tróficos como la IL-2, IL-6 o el factor neurotrófico ciliar de células dependientes. De esta manera, la supresión de la apoptosis por Bcl-2 está restringida a estímulos apoptóticos determinados en determinados tejidos.

La proteína Bcl-2 es homóloga a la proteína Ced-9 de *Caenorhabditis elegans* y se localiza en la mitocondria, en la membrana perinuclear y en el retículo endoplásmico liso.

Los miembros de esta familia poseen los siguientes dominios (Fig. 6): BH1, BH2, BH3, BH4 y TM.

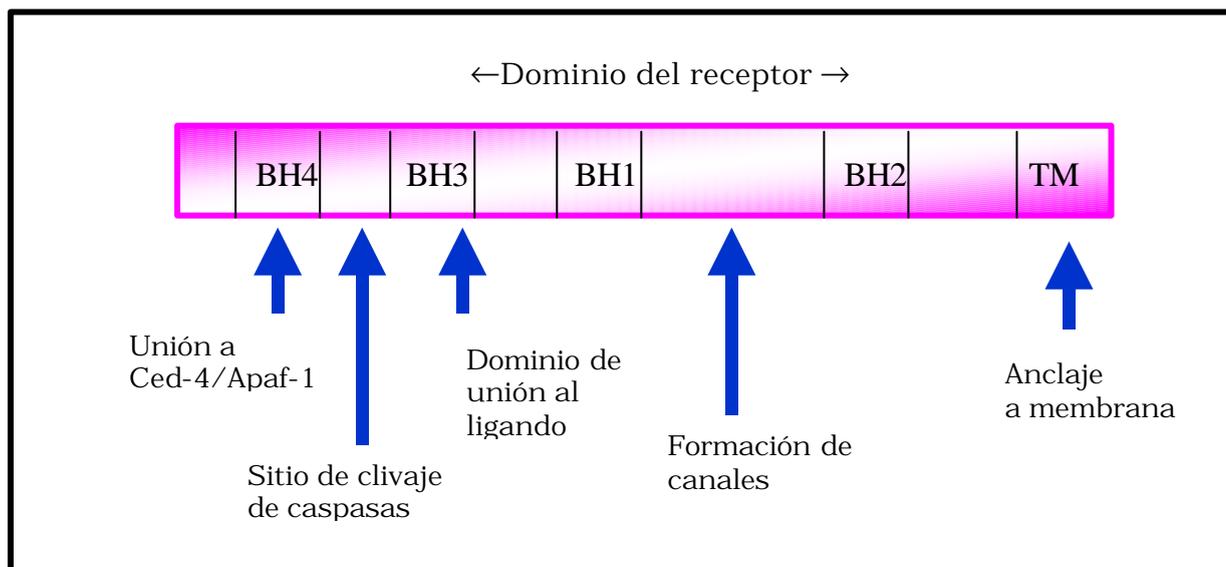


Figura 6: Dominios funcionales diferentes de las proteínas de Bcl-2 (Hsu and Hsueh, 2000).

Algunos miembros de la familia de Bcl-2:

- **Bax** (Bcl-2 Associated X Protein) de 21 kD fue originalmente identificada por su capacidad para unirse no covalentemente con Bcl-2 (Oltvai et al., 1993). Sin embargo, Bax probablemente actúa en forma independiente para inducir la apoptosis por un mecanismo desconocido aún.
- **Bcl-x** es otro miembro de la familia de Bcl-2 y sufre splicing alternativo, dando una isoforma corta, Bcl-x-S (proapoptótica), y una isoforma larga, Bcl-x-L (antiapoptótica).
- **Bok** (Bcl-2 Related Ovarian Killer) conserva los dominios BH1, 2, 3 y una región transmembrana presente en otras proteínas de la familia de Bcl-2 pero carece del dominio BH4. Bok sólo heterodimeriza con proteínas antiapoptóticas selectivas como Mcl-1, BHRF-1 y Bfl-1.
- **Bad** (Bcl-2 Associated Death Promoter) interactúa con Bcl-2 a través de ambos dominios de Bcl-2, el BH4 y el BH2 (Kaipia et al., 1997). El grado de fosforilación de BAD juega un rol importante en su actividad proapoptótica y se sugiere que es un mecanismo por el cual las gonadotrofinas y otros factores

de supervivencia que se encuentran “upstream” suprimen la apoptosis aumentando la fosforilación de BAD. De esta manera, permiten su unión a las proteínas 14-3-3. Estas proteínas son proteínas señal que se encuentran “upstream” y que se unen a BAD preferentemente en su estado inactivado (Hsu and Hsueh, 2000). La proteína P11 también se puede unir a BAD para frenar o reducir la actividad apoptótica de BAD. Ésta es una proteína temprana inducida en respuesta a factores de supervivencia.

Bad es solamente funcional luego de una falta de señales de supervivencia seguida de una desfosforilación.

- Bod (Bcl-2 Related Ovarian Death) posee 3 variantes (larga, media y corta) y todas contienen el dominio BH3. Interactúa con Bcl-2, Mcl-1, Bcl-xL, Bcl-w y BHRF-1 (Hsu et al., 1998).
- Mcl-1 (Myeloid Cell Leukemia-1) posee los dominios BH1, 2 y 3, así como también el dominio transmembrana. Interactúa fuertemente con Bax, Bak, Bok, Bik y Bod, y débilmente con Bcl-w, Bfl-1, CED-9 y BHRF-1).

Las proteínas de la súper familia de Bcl-2 se pueden dividir en tres grandes grupos (Fig 7) :

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

Proteínas antiapoptóticas formadoras de canales



Bcl-2, Bcl-xL,
Mcl-1, Bcl-w

Proteínas proapoptóticas formadoras de canales



Bax, Bak, Bok

Ligandos proapoptóticos



Bik, Blk, Hrk



Bad, Bid, Bod

Los dos primeros grupos de proteínas se cree que se anclan a la membrana mitocondrial, mientras que el tercer grupo de proteínas actúa como ligando que dimeriza con los receptores de la familia de Bcl-2 formadores de canales, anclados en la membrana.

Las proteínas de la familia de Bcl-2 ancladas en la membrana mitocondrial (representadas por Bcl-2 y Ced-9) forman probablemente canales iónicos capaces de mantener la homeostasis y evitar la liberación de citocromo c, favoreciendo la supervivencia celular. Estas proteínas también interactúan con Apaf-1 (factor activador de la apoptosis) a través del dominio BH4 para evitar su activación de caspasas asociadas, suprimiendo la cascada de caspasas y por lo tanto la apoptosis. Además de Ced-9 y Bcl-2 muchas otras proteínas de la familia de Bcl-2 (Bcl-xL, Bcl-w, Mcl-1 y Bfl-1) tienen una actividad antiapoptótica y arreglos funcionales similares pero con un patrón de distribución de tejidos únicos o superpuestos.

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

Los miembros de la familia de Bcl-2 son proteínas multifuncionales y las interacciones proteína-proteína cumplen un importante rol en la regulación de la apoptosis. Uno de los mecanismos por los cuales las proteínas de Bcl-2 regulan la apoptosis es a través de la homodimerización y heterodimerización con proteínas de la misma familia. El dominio BH3 en las proteínas proapoptóticas funciona como un ligando para unirse al dominio receptor de las proteínas antiapoptóticas.

La relación existente entre las proteínas antiapoptóticas (Bcl-2, Bcl-xL) respecto a las proteínas proapoptóticas (Bax, Bcl-xS) funciona como un "reostato" que determina la susceptibilidad de la célula a la apoptosis (Oltvai et al., 1993; Korsmeyer et al., 1993).

El patrón de expresión de los homólogos de Bcl-2 en los distintos tejidos parece estar bien determinado, algunos se encuentran ampliamente distribuidos mientras otros se encuentran limitados. Los homólogos de Bcl-2 regulan la apoptosis de una manera tejido-específica (Hsu and Hsueh, 2000).

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

Al menos 3 mecanismos pueden ser propuestos para la acción proapoptótica de las proteínas Bcl-2 (Fig 8):

- 1) El subgrupo de las proteínas proapoptóticas con solamente el dominio BH3 heterodimerizan con las proteínas antiapoptóticas unidas a membrana para regular la apoptosis.
- 2) El subgrupo de las proteínas proapoptóticas formadoras de canal con los dominios BH1, BH2, BH3 y el dominio transmembrana heterodimerizan con las proteínas antiapoptóticas (Mcl-1/Bfl-1) o funcionan como un canal mitocondrial para regular la apoptosis.
- 3) La única variante de Bok que no dimeriza con proteínas antiapoptóticas (Bcl-2) pero que probablemente forme canales mitocondriales para regular la apoptosis.

Aunque múltiples trabajos sugieren un rol por parte de las proteínas de la familia de Bcl-2 en la formación de canales mitocondriales, no existen evidencias directas *in vivo* para dichos canales de modo que se necesitan estudios adicionales para confirmar esta hipótesis (Hsu and Hsueh, 2000).

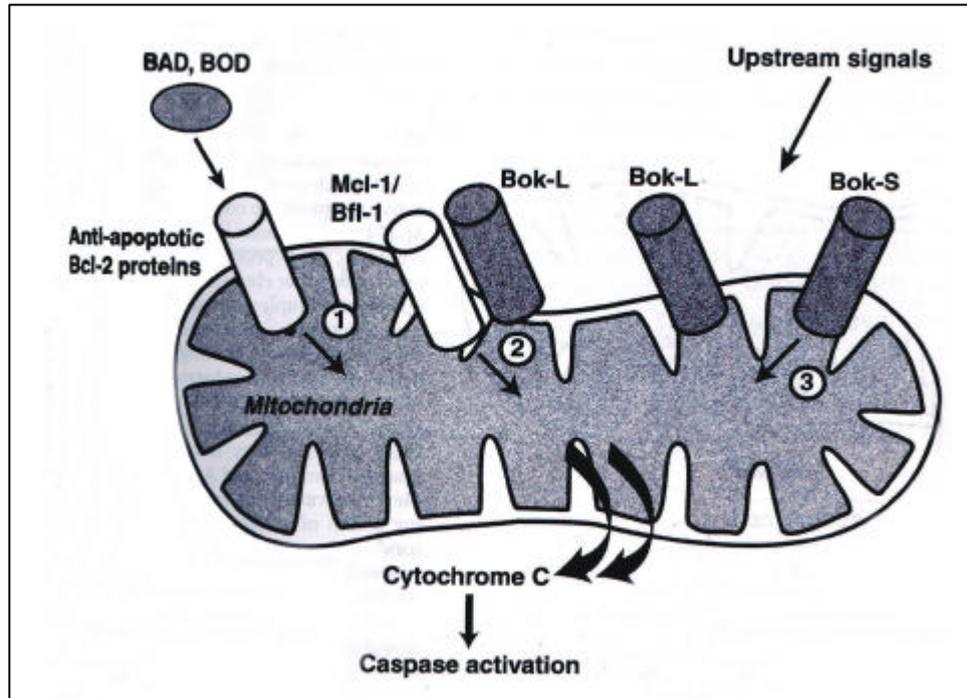


Figura 8: Modelo de la regulación de la apoptosis por proteínas de la familia de Bcl-2 (Hsu and Hsueh, 2000).

Caspasas como ejecutoras de la apoptosis

Las caspasas son proteasas intracelulares que actúan como reguladores de la muerte celular. Estas proteasas presentan una alta homología con gen de muerte de *Caenorhabditis elegans*, *ced-3* y contribuyen a la iniciación o progresión de la apoptosis en las células de granulosa durante la atresia (Hengartner and Horvitz, 1994). Las proteínas de muerte codificadas por miembros de esta familia de genes en vertebrados incluyen a la enzima convertidora de interleukina-1b (ICE), al homólogo-1-*ced-3* y ICE (ICH-1), a la proteasa cisteína P32 (CPP32), ICE_{rel} II (TX, ICH-2), ICE_{rel} III y MCH-2. Estas proteasas comparten una secuencia conservada QACRG que actúa como un dominio que cliva proteínas en residuos aspartato. Los miembros de esta familia degradan a un diverso espectro de proteínas específicas estructurales y homeostáticas como la polimerasa ADP-ribosa (enzima que repara ADN), ribonucleoproteínas nucleares (factores responsables del ensamblaje del spliceosoma y procesamiento del ARN) y proteínas estructurales responsables del plegamiento nuclear (Martin and Green, 1995). En ovario de rata, la expresión y la regulación por gonadotrofinas de ICE, CPP32 y ICH-1 ha sido demostrada por varios trabajos (Flaws et al., 1995). La enzima convertidora de interleukina-1b (ICE) *per se* no intervendría en la apoptosis de células de granulosa ya que se observaron bajos niveles de RNAm de ICE en ovario y ausencia de actividad de ICE en folículos cultivados *in vitro* para inducir la apoptosis. En cuanto a la familia de genes de *bcl-2* se conoce muy poco acerca de la participación de las caspasas y otras proteasas posibles en la muerte celular de las células de granulosa. El primer trabajo publicado sobre este tema evalúa el efecto de las gonadotrofinas en los niveles de RNAm de la caspasa-1 (ICE), caspasa-2 (Ich-1) y caspasa-3 (CPP32) en el ovario de ratas inmaduras (Flaws et al., 1995). Los niveles de RNAm de la caspasa-1 fueron extremadamente bajos y no fueron afectados por el tratamiento *in vivo* de gonadotrofinas. Lo que descarta la posibilidad de que mecanismos post-traduccionales sean la forma primaria de regulación de estas enzimas en el ovario. En cambio, el tratamiento *in vivo* de gonadotrofinas redujo los niveles de RNAm de las caspasas 2 y 3 en el ovario de ratas inmaduras. Los niveles abundantes de RNAm de las caspasas 2 y 3 en homogenatos de ovario humano así como en células de granulosa-luteínicas humanas purificadas en colchón de Percoll sugieren que estas enzimas son moléculas efectoras importantes en las células de granulosa (Kugu et al., 1998).

Los cambios mitocondriales juegan un papel central en la regulación de la apoptosis en un modelo de apoptosis de 3 pasos (Hsu and Hsueh, 2000) (Fig. 9):

- 1) **Paso Premitocondrial:** Durante el cuál se activan los caminos de trasducción de señales "upstream" para regular a las proteínas de Bcl-2.
- 2) **Paso Mitocondrial:** Durante el cuál la homeostasis mitocondrial se pierde, provocando la liberación de proteínas que activan a las caspasas así como también una disrupción del transporte de electrones mitocondrial, de la fosforilación oxidativa y de la producción de ATP.
- 3) **Paso Postmitocondrial:** Durante el cuál la liberación de proteínas de la mitocondria produce la activación del Apaf-1 y de las caspasas iniciadoras seguido de una activación secuencial de la cascada de caspasas.

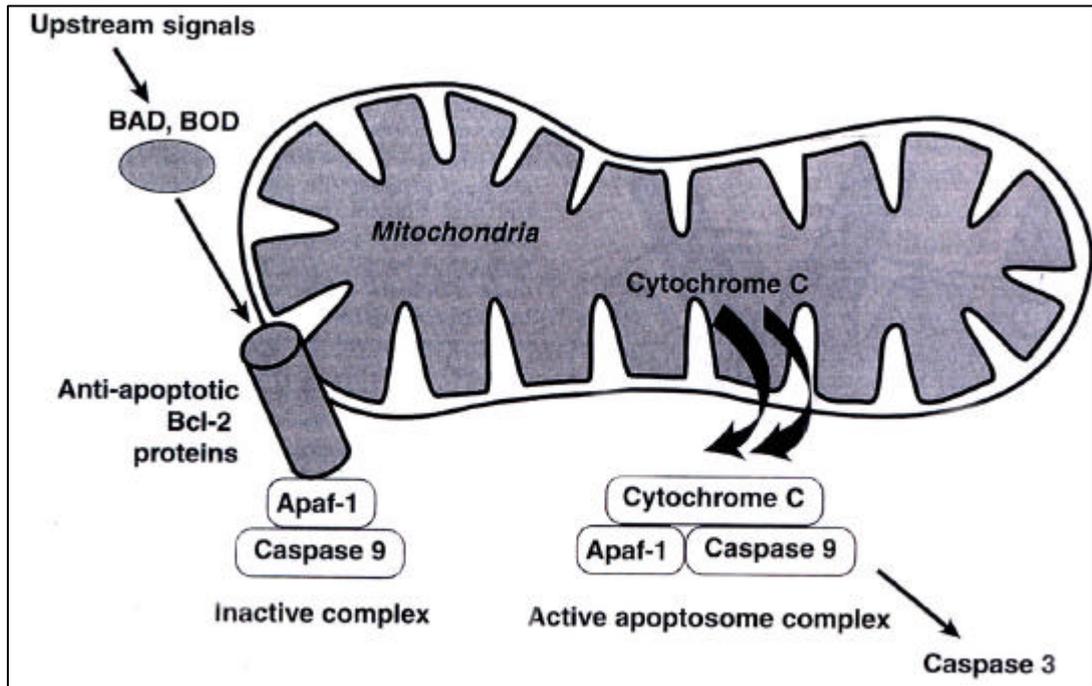


Figura 9: Formación del complejo apoptosoma activo para la iniciación de la cascada de caspasas (Hsu and Hsueh, 2000).

La regulación de la homeostasis mitocondrial por las proteínas de la familia de Bcl-2 formadoras de canales anti y proapoptóticas controla la liberación del citocromo c de la superficie externa de la membrana interna mitocondrial al citoplasma. La liberación del citocromo c se asocia al Apaf-1 y a la procaspasa-9 para formar el complejo **apoptosoma** activo.

Un incremento en la permeabilidad de la membrana mitocondrial puede causar la liberación de activadores de caspasas y caspasas una vez activadas, pudiendo aumentar la permeabilidad de la membrana mitocondrial a través de la conversión de proteínas de la familia de Bcl-2 antiapoptóticas en proapoptóticas y de la activación de ligandos proapoptóticos.

El rol potencial de diferentes iones como el Na⁺ y el K⁺ debería ser considerado en la activación de las caspasas además del rol del citocromo c.

Se han identificado dos familias adicionales importantes en la regulación de la actividad de las caspasas (Hsu and Hsueh, 2000):

- El primer grupo incluye a las NIAP, cIAP-1 (Inhibitor of Apoptosis Protein), cIAP-2, xIAP, survivinas y actúan como sustratos inhibidores de las caspasas para bloquear su activación por los distintos efectores.
- El segundo grupo incluye a las proteínas inhibidoras del FLICE (FLIP) y a la proteína efectora de muerte en los testículos (DEFT) e interactúan directamente con los iniciadores de las caspasas a través de sus dominios efectores de muerte.

Sistema Fas/Fas ligando y proteína p53

El antígeno Fas (Fas) pertenece a la familia de glicoproteínas integrales de membrana que incluyen al receptor del factor de crecimiento nervioso y al receptor del factor de necrosis tumoral. Su ligando (FasL) es una proteína integral de membrana de tipo II homóloga al factor de necrosis tumoral cuya función es ser un potente factor de muerte celular (Suda et al., 1993). Se ha demostrado la presencia de la proteína Fas y su mensajero en células de granulosa (Hakuno et al., 1996; Quirk et al., 1995).

Otro componente importante en el mecanismo de señales de muerte en células, particularmente en células tumorales expuestas a radioterapia o quimioterapia, es la proteína p53. Este factor transcripcional se comporta como una proteína bifuncional en cuanto a la regulación de la proliferación y muerte celular (Tilly JL, 1998). El p53 puede interactuar con otros factores regulatorios de muerte celular a nivel transcripcional. Por ejemplo, existe un elemento de respuesta a p53 en el promotor del gen de *bax*, produciendo altos niveles de expresión de *bax* cuando este elemento de respuesta está activado (Miyashita and Reed, 1995). Además, el promotor del gen de *bcl-2* posee un elemento represor que interactúa con p53, suprimiendo la expresión génica (Miyashita et al., 1994). En el ovario, se ha identificado la presencia nuclear de p53 en células de granulosa de folículos ováricos destinados a la atresia.

Estos resultados son consistentes con el rol de p53 en promover la apoptosis mediante la expresión inducida de *bax* en este tipo de células (Tilly et al., 1995). Además, Kim y col. (1999) demostraron la participación del sistema Fas/FasL en la apoptosis de células de granulosa mediada por p53 durante el desarrollo y la atresia folicular.

GnRH como regulador de la síntesis y liberación de gonadotrofinas

El sistema hipotálamo-hipófisis coordina el proceso que destina a un folículo a ser ovulado mediante el control del ciclo menstrual en la mujer y el estral en las ratas.

El factor que regula la función reproductiva es un decapeptido, *GnRH*, (*Hormona liberadora de las gonadotrofinas*) (Fig 10) y el área del cerebro responsable de su secreción, es el núcleo arcuato en el hipotálamo medio basal.

La molécula tiene una configuración en horquilla, haciendo los aminoácidos 6-7 más vulnerables a la degradación por las endopeptidasas hipofisiarias. La acción de las peptidasas hipofisiarias es responsable de la vida media corta de la GnRH (2-8 minutos). Los aminoácidos 1, 6 y 10 son esenciales en el mantenimiento de la configuración necesaria para la unión de la hormona a las células gonadotropas. La capacidad de la GnRH para inducir la síntesis y liberación de las gonadotrofinas (FSH y LH) reside en el segundo y tercer aminoácido.

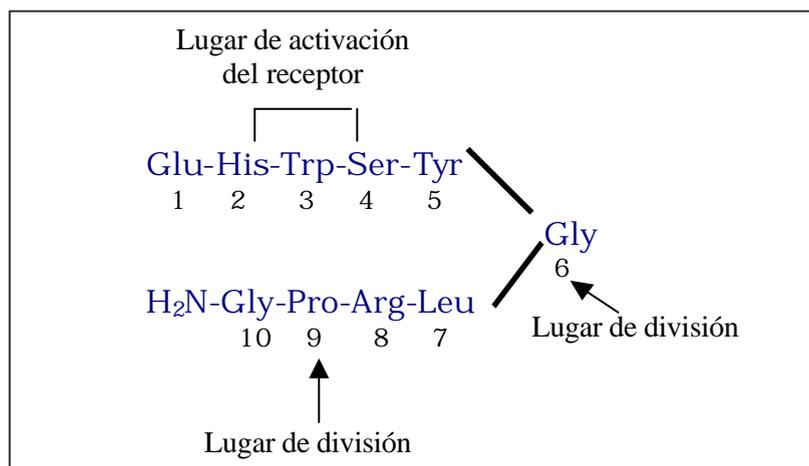


Figura 10: Molécula de GnRH

La liberación de este factor se encuentra influenciada por neuronas ubicadas en otras regiones cuyas terminales nerviosas contactan con el núcleo arcuato. Este recibe factores estimuladores como epinefrina y norepinefrina (que aumentan su secreción) ó factores inhibidores como dopamina, serotonina y opioides endógenos (que disminuyen su secreción).

Este factor liberador actúa en las células gonadotropas de la hipófisis anterior encargadas de sintetizar LH y FSH, y tras su unión a receptores de alta afinidad expuestos en membrana, estimula la liberación de las gonadotropinas. La respuesta inducida por GnRH, es dependiente de la activación de proteína kinasa C (PKC) y requiere calcio. El rol de PKC en la secreción de gonadotropinas, se sugiere por la capacidad de GnRH de causar la traslocación de la enzima citosólica a la membrana (Stojilkovic et al., 1989).

Además es indispensable que su secreción se dé en forma pulsátil, para la secreción normal de gonadotropinas hipofisarias. La administración continua de altas dosis de GnRH resultan en una supresión gonadal o **“castración química o farmacológica”**, la cual puede ser mantenida indefinidamente en respuesta a la administración crónica del péptido (Imai et al., 1992). La hormona liberadora de gonadotropinas (GnRH) regula la síntesis y el almacenamiento de las gonadotropinas y la activación o movimiento de los pools de reserva para su secreción.

Gonadotropinas

La FSH y la LH comparten características estructurales y químicas similares. Ambas son glicoproteínas compuestas por dos cadenas polipeptídicas a y b asociadas de forma no covalente. La subunidad a es idéntica y se la conoce como una subunidad glicoproteica “común”, expresada por un único gen. Mientras la subunidad b es única y confiere actividad específica sobre el heterodímero ab. los tamaños moleculares de la LH y la FSH son de alrededor 28 KDa y 33 KDa respectivamente.

La biosíntesis y la secreción de las gonadotropinas están estrictamente reguladas a través del ciclo reproductivo. La expresión se encuentra regulada por factores hipotalámicos (GnRH), factores intrahipofisarios (principalmente los péptidos, las activina y la folistatina) y la retroalimentación gonadal (tanto de esteroides como de péptidos). Además la expresión de estas hormonas puede ser modulada en muchos niveles que incluyen alteraciones en las tasas de transcripción, estabilización del mensajero, modificaciones post-traduccionales y cambios en el número de gonadotropos.

La hormona foliculo estimulante y la LH son liberadas de forma coordinada y regulan el desarrollo folicular, la ovulación y el mantenimiento del cuerpo lúteo.

Además de requerir la pulsatilidad de GnRH, existe una regulación de parte de hormonas ováricas en la hipófisis como en el hipotálamo. A todo este sistema de regulación que comprende el factor liberador del hipotálamo, gonadotropinas liberadas por la hipófisis y síntesis y secreción de hormonas ováricas, se lo denomina **eje-hipotálamo-hipófiso-ovárico**

GnRH y receptores de GnRH

La exposición prolongada ó continua a la GnRH ó a sus agonistas determina una supresión profunda de la liberación de gonadotropinas conocida como **“down-regulation”** y como consecuencia la deficiencia resultante de hormonas sexuales (Imai et al., 1992).

Se han propuesto dos mecanismos mediante los cuales se explica la acción antigonadotrófica de GnRH: la desensibilización y la regulación inhibitoria. El primero se refiere a un desacoplamiento de la unión GnRH-receptor de la liberación de las gonadotropinas. El segundo se refiere a un número reducido de receptores disponibles debido a una internalización de los complejos hormona-receptor por un mecanismo de “down regulation”. Aunque puede existir síntesis de novo de receptores, la administración continua de GnRH no permitiría la restitución de receptores no ocupados (Friedman et al., 1988).

Del total de receptores presentes en la célula, sólo se requiere el 10% ocupado para producir la máxima liberación de gonadotropinas; posteriormente se produce una microagregación de los complejos hormona-receptor, lo cual amplifica la acción de GnRH. Luego de la activación, los complejos son internalizados en la célula, donde la GnRH es degradada y el receptor, reciclado o degradado.

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

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

Péptidos similares a GnRH producidos en el ovario

Los niveles circulantes de GnRH son muy bajos para interactuar con el receptor ya que se requieren niveles constantes y altos de hormona para desencadenar una respuesta. Para ello, se ha propuesto la presencia de péptidos que serían sintetizados en el ovario y tendrían un rol autócrino o parácrino en la función gonadal.

Varios estudios demostraron la presencia de ARNm para péptidos similares a GnRH, cuya secuencia presenta alta homología con la hormona hipotalámica (Oikawa et al., 1990; Goubau et al., 1992; Minaretzis et al., 1995; Whitelaw et al., 1995). La afirmación de que estos péptidos similares a GnRH son hormonas gonadales se basa en sus efectos estimulatorios e inhibitorios sobre el ovario y en las células ováricas aisladas. Los péptidos similares a GnRH en el ovario serían también una señal atrésica ya que una mera interferencia en su acción con la administración de un antagonista competitivo resulta en un aumento en el número de folículos capaces de ser ovulados (Birnbaumer et al., 1985).

Análogos de GnRH

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

Los agonistas se sintetizaron inicialmente mediante la sustitución del sexto aminoácido por un D-aminoácido con o sin la supresión y con un reemplazo del décimo aminoácido por una media etilamida (NH-Et). El reemplazo de Gly10-NH₂ por NH-Et produce un análogo cinco veces más potente que la GnRH original debido a una menor degradación por las peptidasas hipofisarias y a una mayor resistencia a la filtración glomerular. Por lo tanto, se unen a los receptores en forma más prolongada y poseen un mayor efecto en la liberación de LH y FSH. La combinación de 2 sustituciones efectivas producirán agonistas 15 veces más potentes que el original. En general se observa una mayor potencia cuando se usan en la posición 6 la mayor cantidad de residuos hidrofóbicos. Los agonistas poseen una mayor vida media que varía desde 80 a 480 minutos.

La alta afinidad de los agonistas por los receptores y su mayor vida media lleva a una unión más prolongada y a una mayor pérdida de receptores. Esta situación imita a la administración continua de altas dosis de GnRH, produciendo una estimulación inicial de liberación de gonadotrofinas, seguido de una supresión crónica de las mismas y de esteroides gonadales. Este efecto se conoce como la **respuesta bifásica** de gonadotrofinas y esteroides ováricos producidos por la administración crónica de agonistas de GnRH (Tesone et al., 1999).

Los agonistas sintéticos de la hormona liberadora de gonadotrofinas (GnRH-a) se utilizan frecuentemente en la mujer para el tratamiento de enfermedades endócrinas reproductivas (pubertad precoz, endometriosis, leiomiomas, infertilidad, etc.). Como se ha explicado, estas moléculas reducen la secreción endógena de gonadotrofinas a través de un mecanismo de desensibilización hipofisaria, provocando un descenso en los niveles de los esteroides ováricos. En ciclos de hiperestimulación ovárica en pacientes sometidas a tratamientos de fertilización asistida, se administran junto a gonadotrofinas para inhibir el pico endógeno de LH y mejorar el reclutamiento folicular. Este tipo de tratamiento favorece a la sincronización del desarrollo folicular debido a que impide que maduren los folículos antrales tempranos de una manera asincrónica, mejorando el reclutamiento folicular de folículos preovulatorios al final del ciclo de estimulación. Varios trabajos demostraron que la administración del análogo junto a gonadotrofinas causa un mayor número de ovocitos recuperados, un aumento en el número de embriones y una frecuencia alta de embarazos. Sin embargo, cuando se administran análogos de GnRH son necesarias mayores dosis de gonadotrofinas para inducir la hiperestimulación, lo cual sugeriría una menor capacidad de respuesta a las gonadotrofinas ligado, probablemente, a un efecto inhibitorio en el ovario.

Actualmente, en algunos laboratorios de reproducción asistida, a las pacientes bajas respondedoras a FSH, se les reduce la dosis administrada de análogos de GnRH. Entre los análogos de GnRH más usados en la clínica, se encuentra el acetato de leuprolide (LA) que posee una sustitución de D-leucina en la posición 6 y una supresión de Glicina con una hemetilamida unida a la prolina en posición 9. Esta molécula es de 15 a 80 veces más potente que la GnRH original y tiene una vida media de 2,9 hs cuando se administra en forma subcutánea.

En nuestro laboratorio, se ha demostrado la acción inhibitoria del análogo de GnRH (LA) sobre los receptores de LH y la actividad de la aromatasa en células de granulosa (Guerrero et al., 1993), como también el aumento de apoptosis en folículos ováricos provenientes de ratas tratadas con el análogo (Andreu et al., 1998; Parborell et al., 2001). Otros trabajos demuestran que la busarelina, otro agonista de GnRH, estimula la diferenciación celular de folículos preovulatorios (Yano et al., 1997). Sin embargo, poco se sabe acerca del mecanismo de acción de estos agonistas sobre la proliferación y diferenciación de células foliculares.

Hipótesis y objetivos

En nuestro laboratorio, se ha demostrado que el tratamiento con LA produce un aumento en el porcentaje de células apoptóticas en folículos preantrales y antrales y preovulatorios. Sin embargo, poco se sabe acerca del mecanismo de acción de estos agonistas sobre el crecimiento y muerte celular programada de células foliculares.

Tilly et al (Tilly and Tilly, 1995) demostraron que la inhibición por gonadotropinas de la apoptosis de las células de granulosa que lleva a la atresia folicular está relacionada con la habilidad de las gonadotropinas en reducir la expresión de *bax* en las células de granulosa, produciendo un cambio en la relación entre *bax* y los niveles constitutivos de *bcl-2* y *bcl-xL*.

Hipótesis

La hipótesis a ser testeada en esta investigación es que el aumento de la apoptosis en células ováricas observado luego del tratamiento con un análogo de GnRH a ratas tratadas con gonadotropinas se debe a cambios en la expresión de genes pro o antiapoptóticos de la familia de *bcl-2*.

Objetivos

- ✓ Poner a punto la técnica de RT-PCR para la medición de los genes mencionados utilizando un kit de detección (Biosource International),
- ✓ Evaluar por medio de este kit los niveles de expresión de genes pro y antiapoptóticos en ovarios de ratas tratadas con PMSG y PMSG + LA.

Materiales y metodos

Animales

Para los experimentos realizados en este trabajo, se utilizaron ratas prepúberes (23-25 días) de la cepa Sprague-Dowley, provenientes del bioterio del Instituto de Biología y Medicina Experimental. Estos animales fueron mantenidos con periodos de 12 horas luz (7 a 19 horas) y 12 horas oscuridad, a temperatura controlada entre 21 y 24°C con alimento y agua *ad libitum*.

Tratamientos

Obtención de ratas superovuladas.

Los animales fueron superovulados con gonadotropinas: PMSG (Pregnant Mare Serum Gonadotrophin), la cual posee actividad de FSH y promueve el desarrollo de folicular hasta el estadio de folículo preovulatorio. La dosis única aplicada fue de 25 UI/rata.

Administración del análogo de GnRH

Los animales fueron divididos en dos grupos: Control (C) y tratados con Acetato de Leuprolide (LA). Los pertenecientes al primer grupo fueron inyectados, como se mencionó en el punto anterior, una única vez, subcutáneamente con PMSG.

El tratamiento del grupo LA, comenzó simultáneamente con la dosis única de PMSG, inyectando LA (1mg/rata/día) en dos inyecciones diarias durante 48 hs. Todas las ratas se sacrificaron por dislocación cervical a las 3, 6 y 12 hs después de la última inyección con LA.

Aislamiento del ARN

A partir de ovarios extraídos de ratas superovuladas con PMSG (Grupo control) o con PMSG + LA (Grupo LA) se aisló el ARN utilizando Trizol y el método de extracción desarrollado por Chomczynski y Sacchi (1987). Se homogenizaron los ovarios en Trizol, se incubaron a temperatura ambiente para disociar los complejos núcleoproteicos y se agregó cloroformo para separar las proteínas del ARN. Luego se precipitó el ARN, se lavó y se midió la absorbancia a 260 nm. Finalmente se corrieron en un gel de agarosa 1% teñido con bromuro de etidio para verificar la integridad de las muestras.

Tratamiento con ADNasa

Antes de utilizar las muestras se trataron con ADNasa libre de ARNAsas para eliminar los restos de ADN que pudieran haber quedado.

Se utilizaron las siguientes condiciones:

En la mezcla de reacción se utilizaron 0,75 µl de ADNasa por cada µg de ARN y se realiza el siguiente protocolo:

- Incubación 10 minutos a temperatura ambiente
- Agregado de 1 µl de EDTA por cada µg de ARN
- Incubación 10 minutos a 65°C.

RT-PCR para b-actina

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

Antes de realizar la PCR múltiple se evaluó la integridad del ADN y la eliminación de contaminación, luego del tratamiento con ADNasa, para el gen de β -actina.

Se realizó la RT-PCR siguiendo las siguientes condiciones, las cuales fueron las mismas que para la RT-PCR múltiple:

- Desnaturalización inicial a 96°C durante 1 minuto.
- 2 ciclos : - Paso de desnaturalización a 96°C durante 1 minuto.
- Paso de hibridación a 59°C durante 4 minutos.
- 30 ciclos: - Paso de desnaturalización a 94°C durante 1 minuto.
- Paso de hibridación a 59°C durante 2,5 minutos.
- Polimerización a 70°C durante 10 minutos.

RT-PCR múltiple (RT-MPCR)

A partir del ARN aislado se realizó una RT-PCR múltiple cuantitativa utilizando un kit de detección (Biosource International), el cual proporciona un método alternativo y preciso para detectar la expresión de múltiples genes amplificando todos los genes bajo las mismas condiciones (Chamberlain et al., 1994). Variaciones en el aislamiento del ARN, errores de cuantificación iniciales o variaciones entre tubos en la RT y en la PCR se compensaron incluyendo un gen de expresión constitutiva como el *GAPDH* (glucosa 6 fosfato deshidrogenasa) en la RT-MPCR.

Se realizó la RT-PCR siguiendo las mismas condiciones que para la RT-PCR para β -actina.

Gel de agarosa 1%

Se realizó un gel de agarosa 1 % para chequear la RT-PCR de b-actina y se tiñó con Bret (bromuro de etidio).

Gel de poliacrilamida 8%

Se realizó un gel de poliacrilamida 8% a partir de una solución de acrilamida-bisacrilamida 29:1. Se corrió a 10mV constantes durante 1-1:30 hs.

Tinción con plata

Una vez desmontado el gel se procedió a la tinción con plata según el siguiente protocolo:

- Fijación en EtOH 10% durante 10 minutos.
- Incubación en HNO 3% durante 3 minutos.
- 2 lavados con agua destilada.
- Tinción con AgNO₃ (2,02 g/l) durante 20 minutos.
- 2 lavados con agua destilada.
- Revelado con Na₂CO₃ (29,6 g/l) + formaldehído 37% (540µl/l).
- Detención con ácido acético 10%.
- Montado en papel Whatmann 3MM y secado durante 2 hs a 80°C.

Análisis de los datos

Los experimentos se repitieron dos veces con 6 animales por grupo experimental, obteniéndose resultados semejantes en las corridas electroforéticas para ambos experimentos, mostrándose en resultados un gel representativo de dichos experimentos.

La densitometría se realizó utilizando el programa Scion Image beta 4.02 win.

Resultados y discusión

Puesta a punto de la técnica de RT-PCR

Nuestro primer objetivo fue poner a punto la técnica de RT-PCR para poder evaluar la expresión de genes pro y anti apoptóticos en ovarios de ratas prepúberes tratadas con PMSG y PMSG + LA. Después de haber corroborado que no hubo degradación del ARNm luego de su extracción (dato no mostrado), se procedió a realizar un control de la integridad del ADNc obtenido luego de la transcripción reversa. Para esto se realizó una PCR utilizando primers de b-actina, un gen de expresión constitutiva. Al obtener contaminación con ADN en sucesivas PCRs se procedió entonces a tratar las muestras con ADNasa (libre de ARNasas), una vez extraído el ARN. Se tuvo que poner a punto el tratamiento con dicha enzima utilizando distintas condiciones debido a que con las condiciones recomendadas se produjo también la degradación del ARN, como se muestra en la Fig. 1. Mientras que con las condiciones ajustadas la integridad del ARN permanece, pudiéndose observar en la Fig. 2 la subunidad 18S y la 28S. A continuación se detallan las distintas condiciones ensayadas:

Condiciones recomendadas por Invitrogen:

En la mezcla de reacción se utilizan 1 μ l de ADNasa por cada μ g de ARN y se realiza el siguiente protocolo:

- Incubación 15 minutos a temperatura ambiente
- Agregado de 1 μ l de EDTA por cada μ g de ARN
- Incubación 10 minutos a 65°C.

Condiciones ajustadas:

En la mezcla de reacción se utilizan 0,75 μ l de ADNasa por cada μ g de ARN y se realiza el siguiente protocolo:

- Incubación 10 minutos a temperatura ambiente
- Agregado de 1 μ l de EDTA por cada μ g de ARN
- Incubación 10 minutos a 65° C.

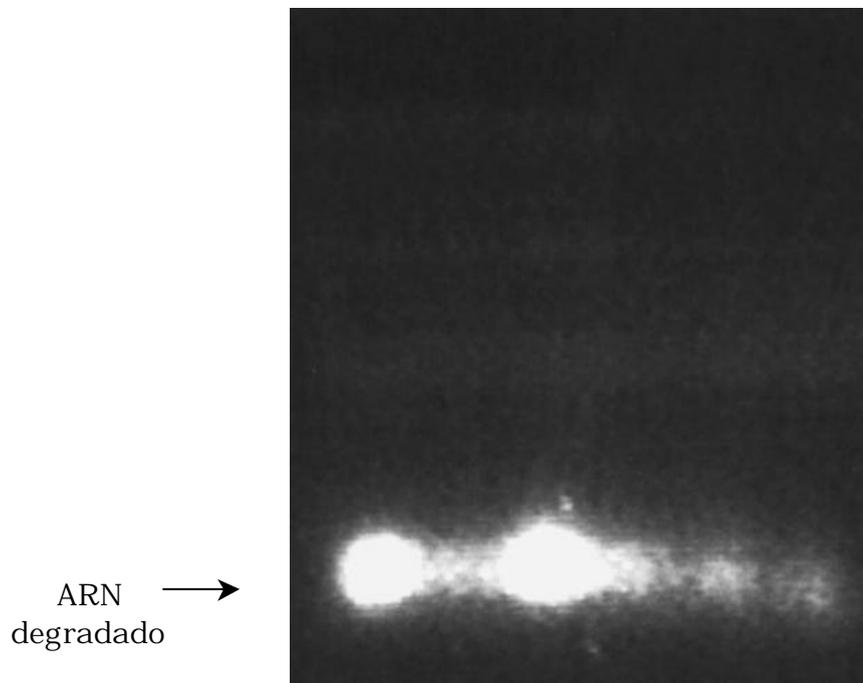


Figura 1: Gel de agarosa 1% de ARN de las muestras tratadas con la ADNasa en las condiciones recomendadas. El ARN se obtuvo de ovarios de ratas tratadas con PMSG (Control) y con PMSG + LA (LA) sacrificadas a las 3, 6, y 12 hs. después de la última inyección con LA. Cada calle representa a las distintas muestras.

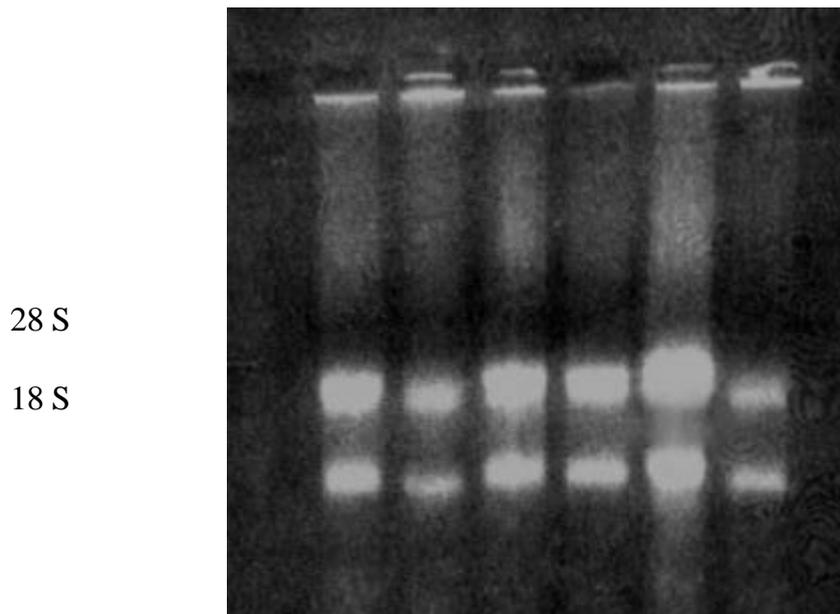


Figura 2: Gel de agarosa 1% de ARN de las muestras tratadas con la ADNasa en las condiciones ajustadas. Cada calle representa a las distintas muestras:

1- Control 3hs, 2- LA 3hs, 3- control 6hs, 4- LA 6hs, 5- Control 12hs, 6- LA 12hs.

RT-PCR de b-actina

Luego de encontrar las condiciones óptimas del tratamiento con ADNasa se procedió a realizar una PCR de b-actina para chequear tanto la integridad del ADNc obtenido así como también la ausencia de contaminación. En la Fig. 3 podemos observar que tanto las muestras como los controles negativos dieron los resultados esperados.

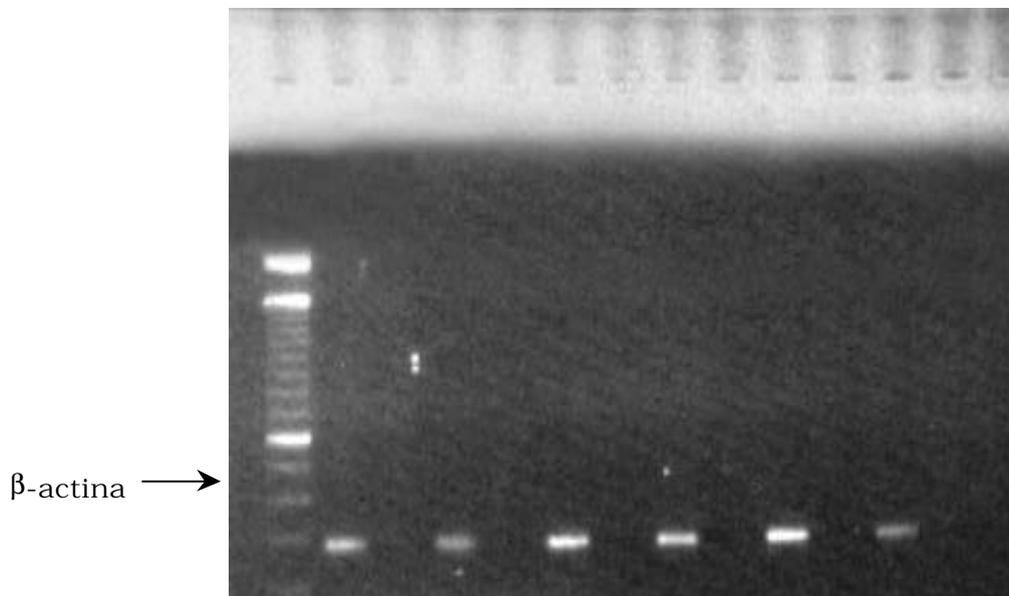


Figura 3: Gel de agarosa 1% de los productos de la RT-PCR para β -actina teñido con bromuro de etidio. A partir del ARN extraído se realizó una RT-PCR para β -actina de las distintas muestras con sus respectivos controles negativos.

1- Marcador de PM, 2- Control 3hs, 3- Control 3hs sin TR, 4- LA 3hs, 5- LA 3hs sin TR, 6- Control 6hs, 7- Control 6hs sin TR, 8- LA 6hs, 9- LA 6hs sin TR, 10- Control 12hs, 11- Control 12hs sin TR, 12- LA 12hs, 13- LA 12hs sin TR

Ensayos preliminares

Al no obtener una buena resolución en los geles de agarosa con el producto de una PCR múltiple con muestras de prueba (Fig. 4) y por lo tanto no poder realizar la densitometría de las bandas se procedió a correr las muestras en un gel de poliacrilamida 8% (Fig. 6). La mayoría de las especies de ADN de doble cadena migran, en los geles de poliacrilamida no desnaturalizados a una distancia que es inversamente proporcional al \log_{10} de su tamaño. Sin embargo, se encontraron diferencias en la migración de algunas bandas en el gel de poliacrilamida respecto al de agarosa. Esto se debería a que su movilidad se encuentra también afectada por su secuencia y composición de bases. De esta manera, ADNs de doble cadena de exactamente el mismo tamaño pueden migrar con una movilidad que difiere en un 10%. Este efecto se cree que está causado por el superenrollamiento que se forma en secuencias específicas de la doble cadena (Sambrook et al., 1989).

Con los valores obtenidos de las distancias de migración en el gel de agarosa de las bandas del marcador del peso molecular y el \log_{10} del número de pares de bases de las mismas, se realizó una regresión lineal (Fig. 5). Esto se realizó para corroborar que las bandas obtenidas en el control del correspondieran a los fragmentos de amplificación esperados (*GAPDH*, *LICE*, *bcl-xL*, *bax*, *bcl-2*).

Para mejorar aún más la resolución y poder así cuantificar se procedió a hacer una tinción con plata debido a que ésta posee una mayor sensibilidad (Fig. 7).

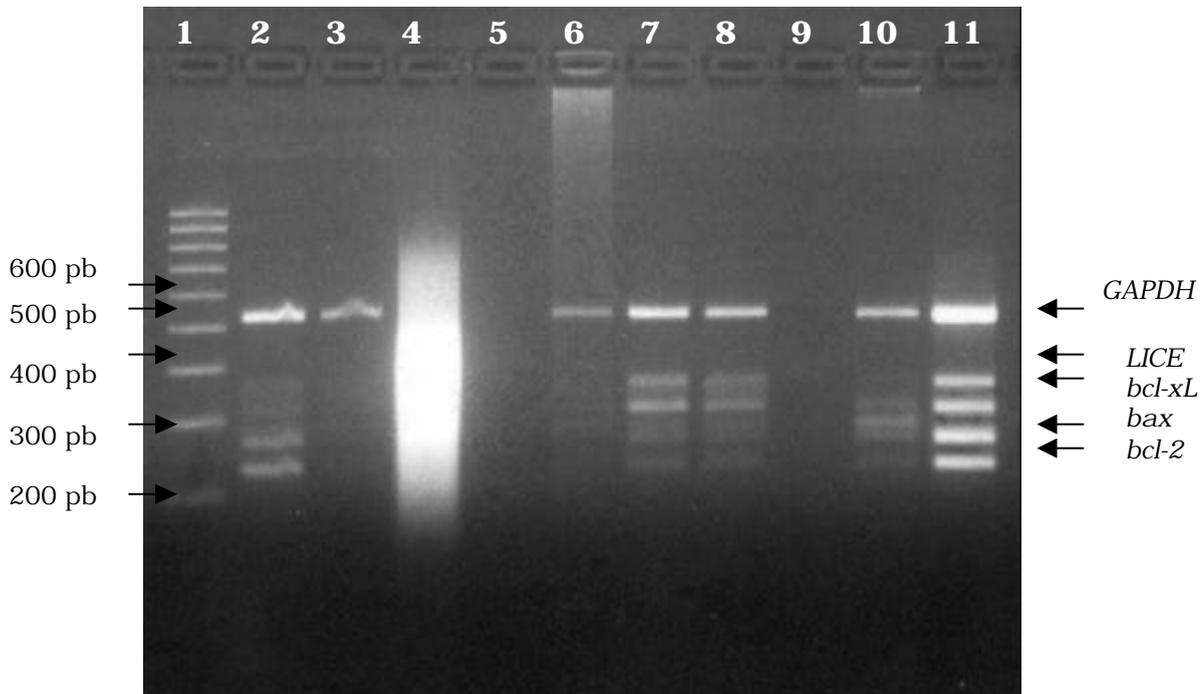


Figura 4: Gel de agarosa 2.5 % de los productos de la PCR Múltiple teñido con bromuro de etidio.

1- Marcador de PM, 2- Control kit lote 2, 3- Control 3hs, 4- LA 3hs, 5- Control 6hs, 6- LA 6hs, 7- Control 12hs, 8- LA 12hs, 9- Sin ADNc, 10- Control kit lote 1.

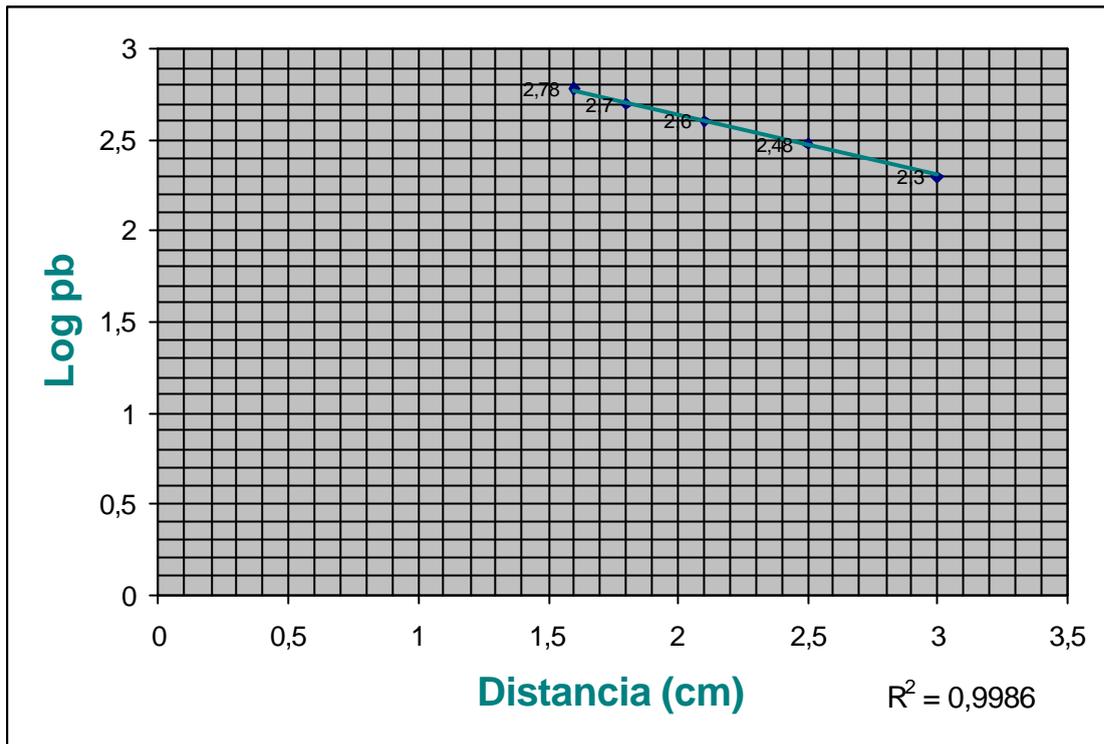


Figura 5: Gráfico de migración de las bandas del marcador del peso molecular.

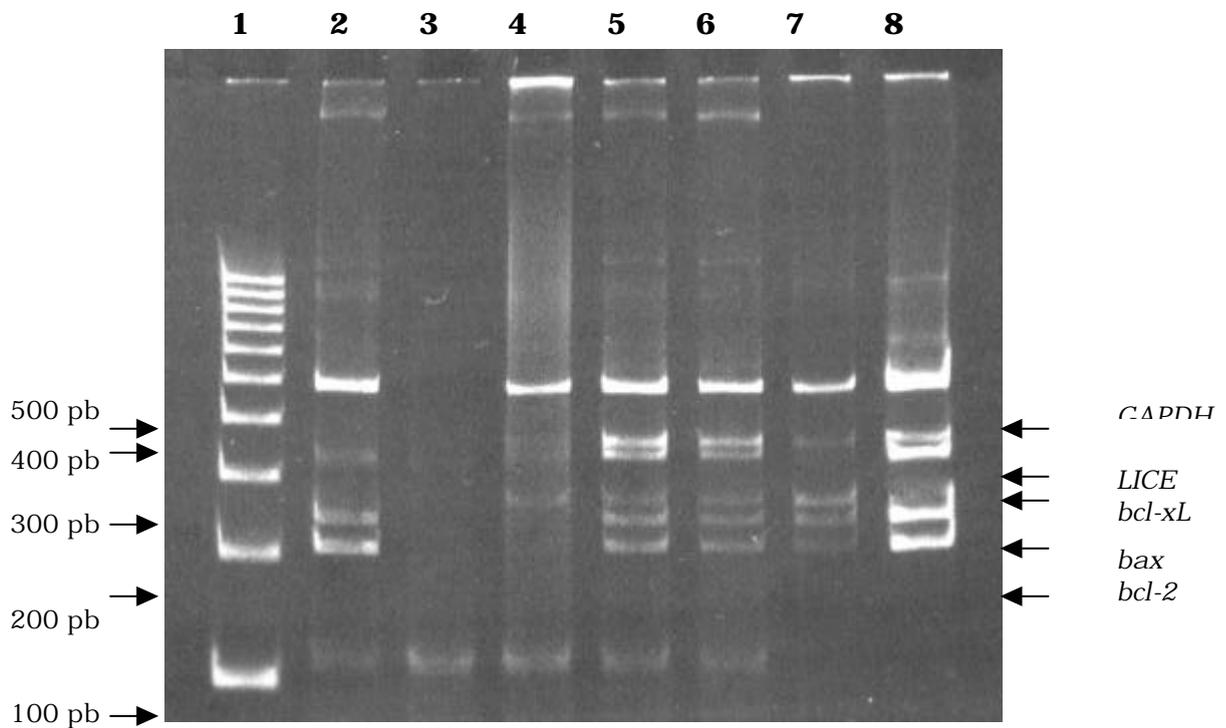


Figura 6: Gel de poliacrilamida 8 % de los productos de la PCR Múltiple teñido con bromuro de etidio.
 1- Marcador de PM, 2- Control kit lote 2, 3- Control 6hs, 4- LA 6hs, 5- Control 12hs, 6- LA 12hs, 7- Control 3hs, 8- Control kit lote 1.

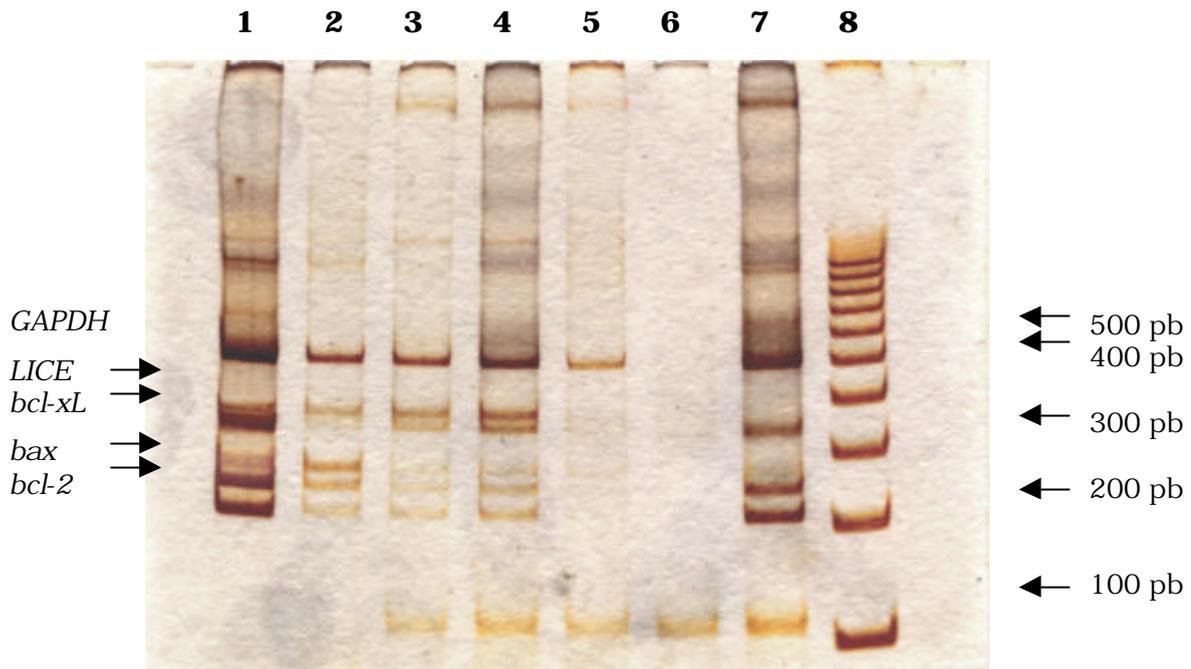


Figura 7: Gel de poliacrilamida 8 % de los productos de la PCR Múltiple teñido con plata.
 1- Control kit lote 1, 2- Control 3hs, 3- LA 12hs, 4- Control 12hs, 5- LA 6hs, 6- Control 6hs, 7- Control kit lote 2, 8 - Marcador de PM.

RT-PCR múltiple de las muestras C y LA

Se sometieron muestras de ARN obtenidos de ovarios de ratas del grupo C y LA, obtenidos a distintos tempos de sacrificio luego de la última inyección de LA. Se realizó la RT-PCR múltiple en geles de poliacrilamida teñidos con plata. La Figura 8 (Panel A) muestra el gel obtenido y el panel B la densitometría de las bandas.

Con los valores de esta densitometría se analizó la expresión de cada gen o pares de genes a los distintos tiempos estudiados.

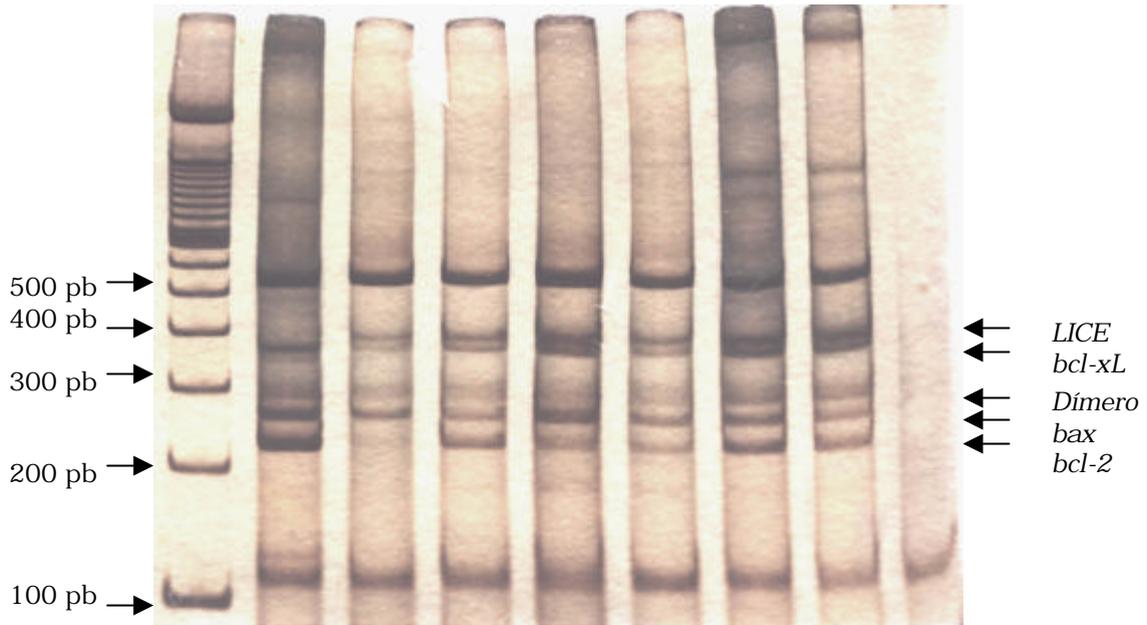


Figura 8. A. Gel de poliacrilamida 8 % de los productos de la PCR Múltiple teñido con plata
 1- Marcador de PM, 2- Control kit, 3- Control 3hs, 4- LA 3hs, 5- Control 6hs, 6- LA 6hs, 7- Control 12hs, 8- LA 12hs, 9- Sin ADNc.

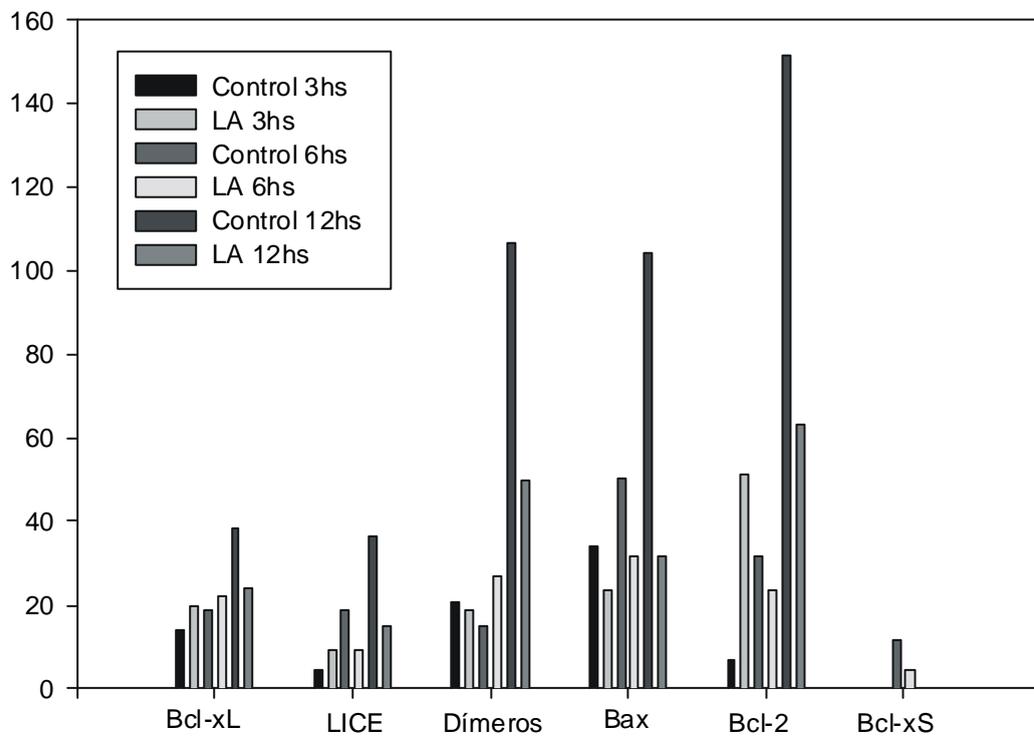


Figura 8. B. Niveles de ARNm a los distintos tiempos de sacrificio.

Expresión de *bax* y *bcl2*. Análisis de la relación entre ambos genes

Como se mencionó en la Introducción Bax (proteína proapoptótica) forma heterodímeros con Bcl-2 (proteína antiapoptótica), y de esta relación en parte depende la sobrevida o muerte celular. De manera que se graficó la relación entre la expresión de estos genes, especulando que una relación mayor a 1 lleva a la muerte celular y menor a la sobrevida.

En la figura 9 se observa una disminución de la relación *bax-bcl-2* con el tratamiento *in vivo* de PMSG (Control) a los distintos tiempos de sacrificio. Este resultado explica un posible mecanismo por el cual las gonadotropinas producen el rescate de la atresia folicular. Además, corrobora los estudios de Tilly et al (Tilly and Tilly, 1995), que describen un aumento en la expresión de *bax* sin cambios en *bcl-2* en ovario de ratas estimuladas con gonadotropinas. El tratamiento *in vivo* con PMSG+LA (LA) en cambio, produjo una gran disminución a las 3 hs de sacrificio en la relación de *bax* y *bcl-2* comparando con el dato obtenido para PMSG. Este resultado es totalmente opuesto al esperado, porque indicaría una tendencia a la sobrevida celular, siendo nuestra hipótesis que LA sería un factor atretogénico. En cambio, a las 6 y 12 hs la relación es la misma que para el control, lo que descartaría a estos genes como mediadores de la acción de LA.

En trabajos previos del laboratorio (Parborell et al., 2002), se demostró que no se observan cambios en los niveles de la proteína Bax en folículos preovulatorios de ratas tratadas con PMSG+LA, lo que apoya nuestros resultados.

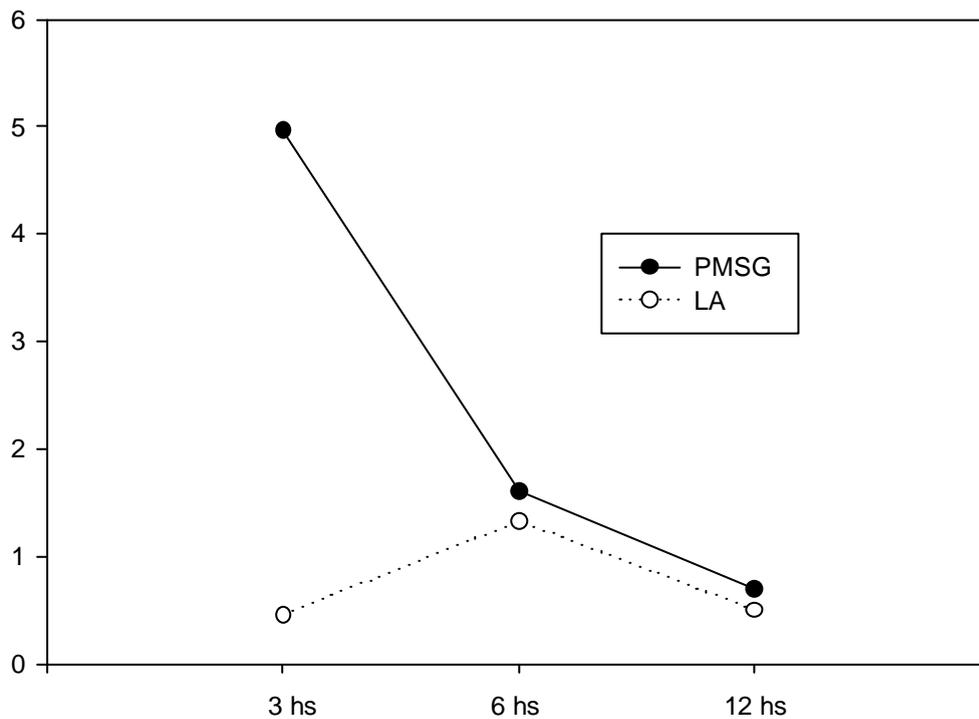


Figura 9: Relación *bax/bcl-2* a los distintos tiempos de sacrificio.

Expresión de *bcl-xL*

En la Figura 10 se muestra un aumento en la expresión de *bcl-xL* (gen antiapoptótico) con el tratamiento *in vivo* de PMSG a los distintos tiempos de sacrificio. Estos resultados, junto con la disminución en la relación *bax-bcl-2* son concordantes con trabajos previos que demuestran que PMSG tendría un efecto protector de la apoptosis ovárica. El tratamiento *in vivo* con LA produce una importante disminución de la expresión de *bcl-xL* luego de 12 hs de sacrificio. Este resultado sugiere que este gen podría estar involucrado en el mecanismo de interferencia que ejercería LA sobre el rescate de la apoptosis ejercido por la gonadotrofina.

Cabe mencionar que en un trabajo previo del laboratorio (Parborell et al., 2002), se describe una disminución, en folículos preovulatorios, en la estabilidad de la proteína Bcl-xL luego del tratamiento con LA, lo cual, junto con los resultados mostrados en esta tesina confieren un importante rol de esta proteína en la muerte celular inducida por LA.

Por otro lado, en este punto hay que tomar en consideración que *bcl-xS* y *bcl-xL* forman dímeros *in vitro*, lo cual sería una limitación del método utilizado, sin embargo, la formación de dímeros a 3 y 6 hs es muy semejante, o sea que los resultados igual serían válidos. A las 12 hs hay mayor formación de dímeros en el control (casi 100%), sin embargo esto favorece nuestros resultados ya que si estos dímeros no se produjeran, la diferencia entre los dos grupos se amplificaría.

Con respecto a *bcl-xS*, éste no fue tomado en cuenta, ya que se encontró su expresión a un solo tiempo estudiado (6 hs)

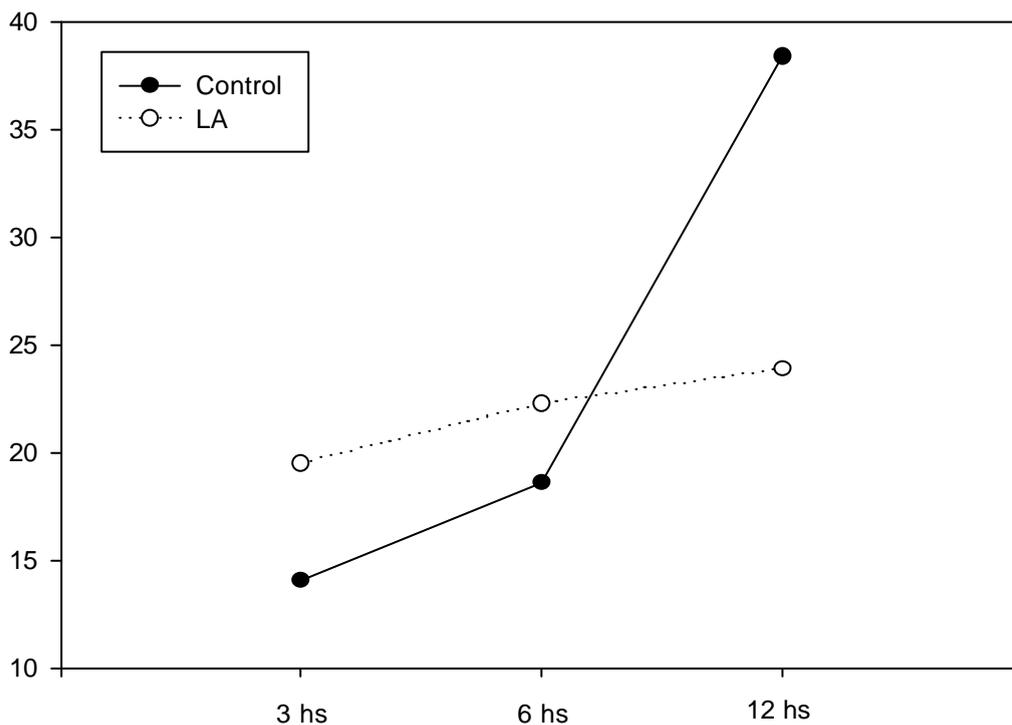


Figura 10: Niveles de ARNm de *bcl-xL* a los distintos tiempos de sacrificio.

Expresión de la caspasa-3

En la Figura 11 se observa un importante aumento de la expresión de la caspasa-3 en el grupo PMSG, lo cual no se observa en el grupo PMSG+LA. Esta enzima, entre otras acciones, activa a nucleasas provocando la fragmentación del ADN por apoptosis. Estos resultados en el grupo PMSG podrían deberse a que esta caspasa no sólo interviene en la vía de la apoptosis mediada por la familia de Bcl-2 sino que también se encuentra en otras vías de activación como ser la vía de los receptores de muerte como FAS y FAS ligando. Otra alternativa sería que la PMSG no sólo tiene un efecto en los folículos que llegan a ovular, sino que muchos de los folículos no alcanzan a desarrollarse y sufren atresia. De esta manera, al ser mayor la cantidad de folículos que sufren atresia que los que sobreviven se puede observar un aumento en la expresión de esta caspasa-3. Alternativamente, que aumenten los niveles de ARNm de esta caspasa no significa que se desencadene la apoptosis debido a que para ésto se debe producir la traducción y posteriormente el clivaje de dicha enzima a su forma activa. Sin embargo, se describió que la expresión de esta caspasa se ve disminuida por el tratamiento in vivo de gonadotropinas (Flaws et al., 1995), pudiéndose deber esta discrepancia al modelo experimental utilizado, que difiere en el tiempo de análisis luego de la administración de PMSG, que fue menor al utilizado en este trabajo. Los resultados obtenidos para el grupo LA descartarían, en nuestro modelo experimental un efecto mediador del agonista sobre la expresión de la caspasa-3.

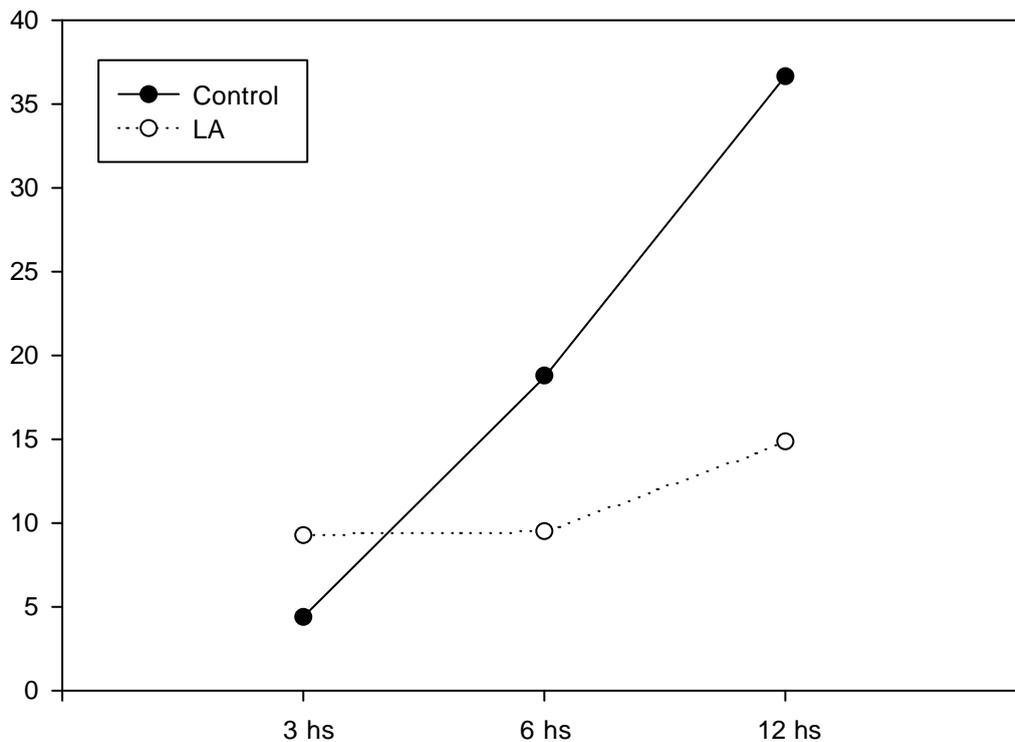


Figura 11: Niveles de ARNm de la *caspasa-3* a los distintos tiempos de sacrificio.

Conclusión

En esta tesina se ha puesto a punto la medición de la expresión de genes de la familia de *bcl-2* y de la *caspara 3* por RT-PCR utilizando el kit de detección (Biosource International).

En base a estudios previos del laboratorio que demuestran un aumento de la apoptosis ovárica luego del tatamiento in vivo con LA a ratas superovuladas con gonadotrofinas, se propuso estudiar si la expresión diferencial de estos genes estaría involucrada en este proceso. Se comparó la expresión ovárica de estos genes en los dos grupos experimentales estudiados: PMSG y PMSG+LA.

Se encontró una disminución en la expresión de *bcl-xL* en el grupo tratado con LA, con lo cual se propone que, de los genes estudiados, éste podría estar involucrado en el mecanismo apoptótico inducido por el agonista de GnRH, LA.

Bibliografía

- Adashi,E.Y., Resnick,C.E., Rosenfeld,R.G., Powell,D.R., Koistinen,R., Rutanen,E.M., and Seppala,M. (1993). Insulin-like growth factor (IGF) binding protein-1 is an antigonadotropin: evidence that optimal follicle-stimulating hormone action in ovarian granulosa cells is contingent upon amplification by endogenously-derived IGFs. *Adv. Exp. Med. Biol.* 343, 377-385.
- Andreu,C., Parborell,F., Vanzulli,S., Chemes,H., and Tesone,M. (1998). Regulation of follicular luteinization by a gonadotropin-releasing hormone agonist: relationship between steroidogenesis and apoptosis. *Mol. Reprod. Dev.* 51, 287-294.
- Baffy,G., Miyashita,T., Williamson,J.R., and Reed,J.C. (1993). Apoptosis induced by withdrawal of interleukin-3 (IL-3) from an IL-3- dependent hematopoietic cell line is associated with repartitioning of intracellular calcium and is blocked by enforced *bcl-2* oncoprotein production. *J. Biol. Chem.* 268, 6511-6519.
- Banka,C.L. and Erickson,G.F. (1985). Gonadotropin-releasing hormone induces classical meiotic maturation in subpopulations of atretic preantral follicles. *Endocrinology* 117, 1500-1507.
- Birnbaumer,L., Shahabi,N., Rivier,J., and Vale,W. (1985). Evidence for a physiological role of gonadotropin-releasing hormone (GnRH) or GnRH-like material in the ovary. *Endocrinology* 116, 1367-1370.
- Bloom W. and Fawcett W.D. (1975). *Tratado de Histología*.
- Chamberlain,J.S., Mullis,K., Ferre,F., and Gibbs,R. (1994). *The Polymerase Chain Reaction*. Birkhauser Boston Press 38-46.
- Cuende,E., Ales-Martinez,J.E., Ding,L., Gonzalez-Garcia,M., Martinez,C., and Nunez,G. (1993). Programmed cell death by Bcl-2-dependent and independent mechanisms in B lymphoma cells. *EMBO J.* 12, 1555-1560.
- Curtis H. and Barnes N.S. (2000). *Biología*.
- Flaws,J.A., Kugu,K., Trbovich,A.M., DeSanti,A., Tilly,K.I., Hirshfield,A.N., and Tilly,J.L. (1995). Interleukin-1 beta-converting enzyme-related proteases (IRPs) and mammalian cell death: dissociation of IRP-induced oligonucleosomal endonuclease activity from morphological apoptosis in granulosa cells of the ovarian follicle. *Endocrinology* 136, 5042-5053.
- Fraser,H.M., Bramley,T.A., Miller,W.R., and Sharpe,R.M. (1986). Extra pituitary actions of LHRH analogues in tissues of the human female and investigation of the existence and function of LHRH-like peptides. *Prog. Clin. Biol. Res.* 225, 29-54.
- Friedman,A.J., Barbieri,R.L., Doubilet,P.M., Fine,C., and Schiff,I. (1988). A randomized, double-blind trial of a gonadotropin releasing-hormone agonist (leuprolide) with or without medroxyprogesterone acetate in the treatment of leiomyomata uteri. *Fertil. Steril.* 49, 404-409.
- Goldenberg,R.L., Vaitukaitis,J.L., and Ross,G.T. (1972). Estrogen and follicle stimulation hormone interactions on follicle growth in rats. *Endocrinology* 90, 1492-1498.
- Goubau,S., Bond,C.T., Adelman,J.P., Misra,V., Hynes,M.F., Schultz,G.A., and Murphy,B.D. (1992). Partial characterization of the gonadotropin-releasing hormone (GnRH) gene transcript in the rat ovary. *Endocrinology* 130, 3098-3100.
- Guerrero,H.E., Stein,P., Asch,R.H., de Fried,E.P., and Tesone,M. (1993). Effect of a gonadotropin-releasing hormone agonist on luteinizing hormone receptors and steroidogenesis in ovarian cells. *Fertil. Steril.* 59, 803-808.
- Hakuno,N., Koji,T., Yano,T., Kobayashi,N., Tsutsumi,O., Taketani,Y., and Nakane,P.K. (1996). Fas/APO-1/CD95 system as a mediator of granulosa cell apoptosis in ovarian follicle atresia. *Endocrinology* 137, 1938-1948.

- Hazum, E. and Nimrod, A. (1982). Photoaffinity-labeling and fluorescence-distribution studies of gonadotropin-releasing hormone receptors in ovarian granulosa cells. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A* 79, 1747-1750.
- Hengartner, M.O. and Horvitz, H.R. (1994). Programmed cell death in *Caenorhabditis elegans*. *Curr. Opin. Genet. Dev.* 4, 581-586.
- Hillier, S.G., Knazek, R.A., and Ross, G.T. (1977). Androgenic stimulation of progesterone production by granulosa cells from preantral ovarian follicles: further in vitro studies using replicate cell cultures. *Endocrinology* 100, 1539-1549.
- Hirshfield, A.N. (1988). Size-frequency analysis of atresia in cycling rats. *Biol. Reprod.* 38, 1181-1188.
- Hsu, S.Y. and Hsueh, A.J. (2000). Tissue-specific Bcl-2 protein partners in apoptosis: An ovarian paradigm. *Physiol Rev.* 80, 593-614.
- Hsu, S.Y., Lin, P., and Hsueh, A.J. (1998). BOD (Bcl-2-related ovarian death gene) is an ovarian BH3 domain-containing proapoptotic Bcl-2 protein capable of dimerization with diverse antiapoptotic Bcl-2 members. *Mol. Endocrinol.* 12, 1432-1440.
- Hsueh, A.J., Billig, H., and Tsafri, A. (1994). Ovarian follicle atresia: a hormonally controlled apoptotic process. *Endocr. Rev.* 15, 707-724.
- Imai, A., Iida, K., and Tamaya, T. (1992). Tight coupling of gonadotropin-releasing hormone receptor to stimulated phosphoinositide turnover and antigonadotropic action in granulosa cells. *Gynecol. Obstet. Invest* 33, 36-41.
- Kaipia, A., Hsu, S.Y., and Hsueh, A.J. (1997). Expression and function of a proapoptotic Bcl-2 family member Bcl-XL/Bcl-2-associated death promoter (BAD) in rat ovary. *Endocrinology* 138, 5497-5504.
- Knobil, E. and Neill, J.D. (1994). *Physiology of Reproduction*.
- Knudson, C.M., Tung, K.S., Tourtellotte, W.G., Brown, G.A., and Korsmeyer, S.J. (1995). Bax-deficient mice with lymphoid hyperplasia and male germ cell death. *Science* 270, 96-99.
- Korsmeyer, S.J., Shutter, J.R., Veis, D.J., Merry, D.E., and Oltvai, Z.N. (1993). Bcl-2/Bax: a rheostat that regulates an anti-oxidant pathway and cell death. *Semin. Cancer Biol.* 4, 327-332.
- Kugu, K., Ratts, V.S., Piquette, G.N., Tilly, K.I., Tao, X.J., Martimbeau, S., Aberdeen, G.W., Krajewski, S., Reed, J.C., Pepe, G.J., Albrecht, E.D., and Tilly, J.L. (1998). Analysis of apoptosis and expression of *bcl-2* gene family members in the human and baboon ovary. *Cell Death Differ.* 5, 67-76.
- M de Fátima Horta, J Dig, and E Young (1999). Apoptosis. Cuando la célula programa su muerte. *Ciencia Hoy* 9 nº 53.
- Maekawa, A. (1990). Pathology of tumours in laboratory animals. Tumours of the rat. Tumours of the ovary. *IARC Sci. Publ.* 473-497.
- Martin, S.J. and Green, D.R. (1995). Protease activation during apoptosis: death by a thousand cuts? *Cell* 82, 349-352.
- McDonnell, T.J., Nunez, G., Platt, F.M., Hockenberry, D., London, L., McKearn, J.P., and Korsmeyer, S.J. (1990). Deregulated *bcl-2-immunoglobulin* transgene expands a resting but responsive immunoglobulin M and D-expressing B-cell population. *Mol. Cell Biol.* 10, 1901-1907.
- McGee, E.A. and Hsueh, A.J. (2000). Initial and cyclic recruitment of ovarian follicles. *Endocr. Rev.* 21, 200-214.
- Minaretzis, D., Jakubowski, M., Mortola, J.F., and Pavlou, S.N. (1995). Gonadotropin-releasing hormone receptor gene expression in human ovary and granulosa-lutein cells. *J. Clin. Endocrinol. Metab* 80, 430-434.
- Miyashita, T., Krajewski, S., Krajewska, M., Wang, H.G., Lin, H.K., Liebermann, D.A., Hoffman, B., and Reed, J.C. (1994). Tumor suppressor p53 is a regulator of *bcl-2* and *bax* gene expression in vitro and in vivo. *Oncogene* 9, 1799-1805.
- Miyashita, T. and Reed, J.C. (1995). Tumor suppressor p53 is a direct transcriptional activator of the human *bax* gene. *Cell* 80, 293-299.
- Moon, Y.S., Dorrington, J.H., and Armstrong, D.T. (1975). Stimulatory action of follicle-stimulating hormone on estradiol-17 beta secretion by hypophysectomized rat ovaries in organ culture. *Endocrinology* 97, 244-247.
- Nunez, G., Hockenberry, D., McDonnell, T.J., Sorensen, C.M., and Korsmeyer, S.J. (1991). Bcl-2 maintains B cell memory. *Nature* 353, 71-73.
- O'Hara A, Mori T, Taii S, Ban C, and Narimoto K (1987). Functional differentiation in steroidogenesis of two types of luteal cells isolated from mature human corpora lutea of the menstrual cycle. *J. Clin. Endocrinol. Metab.* 65, 1192-1200.
- Oikawa, M., Dargan, C., Ny, T., and Hsueh, A.J. (1990). Expression of gonadotropin-releasing hormone and prothymosin-alpha messenger ribonucleic acid in the ovary. *Endocrinology* 127, 2350-2356.

- Oloffson, J.I., Conti C.C., L.C., K.J., and L.P.C. (1994). Tissue-specific regulation of gonadotropin-releasing hormone (GnRH) receptor gene expression during the periovulatory period. *Endocrine Journal* 2, 471-476.
- Oltvai, Z.N., Millman, C.L., and Korsmeyer, S.J. (1993). Bcl-2 heterodimerizes in vivo with a conserved homolog, Bax, that accelerates programmed cell death. *Cell* 74, 609-619.
- Parborell, F., Dain, L., and Tesone, M. (2001). Gonadotropin-releasing hormone agonist affects rat ovarian follicle development by interfering with FSH and growth factors on the prevention of apoptosis. *Mol. Reprod. Dev.* 60, 241-247.
- Parborell, F., Pecci, A., Gonzalez, O., Vitale, A., and Tesone, M. (2002). Effects of a gonadotropin-releasing hormone agonist on rat ovarian follicle apoptosis: Regulation by EGF and the expression of *bcl-2*-related genes. *Biol. Reprod.* (en prensa).
- Parmer T.G., Roberts CT, LeRoith D, Adashi EY, Khan I, Solan N, Nelson S, Zilberstein M, and Gibori G (1991). Expression, action and steroidal regulation of insulin-like growth factor-I (IGF-1) receptor in the rat corpus luteum: their differential role in the two cell populations forming the corpus luteum. *Endocrinology* 129, 2924-2932.
- Quirk, S.M., Cowan, R.G., Joshi, S.G., and Henrikson, K.P. (1995). Fas antigen-mediated apoptosis in human granulosa/luteal cells. *Biol. Reprod.* 52, 279-287.
- Reed, J.C., Cuddy, M., Haldar, S., Croce, C., Nowell, P., Makover, D., and Bradley, K. (1990a). BCL2-mediated tumorigenicity of a human T-lymphoid cell line: synergy with MYC and inhibition by BCL2 antisense. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A* 87, 3660-3664.
- Reed, J.C., Stein, C., Subasinghe, C., Haldar, S., Croce, C.M., Yum, S., and Cohen, J. (1990b). Antisense-mediated inhibition of *bcl2* protooncogene expression and leukemic cell growth and survival: comparisons of phosphodiester and phosphorothioate oligodeoxynucleotides. *Cancer Res.* 50, 6565-6570.
- Rueda, B.R., Tilly, K.I., Botros, I.W., Jolly, P.D., Hansen, T.R., Hoyer, P.B., and Tilly, J.L. (1997). Increased *bax* and *interleukin-1beta-converting enzyme* messenger ribonucleic acid levels coincide with apoptosis in the bovine corpus luteum during structural regression. *Biol. Reprod.* 56, 186-193.
- Sambrook, Fritsch, and Maniatis (1989). *Molecular Cloning: a laboratory manual*.
- Seguin, C., Pelletier, G., Dube, D., and Labrie, F. (1982). Distribution of luteinizing hormone-releasing hormone receptors in the rat ovary. *Regul. Pept.* 4, 183-190.
- Stojilkovic, S.S., Chang, J.P., Ngo, D., Tasaka, K., Izumi, S., and Catt, K.J. (1989). Mechanism of action of GnRH: the participation of calcium mobilization and activation of protein kinase C in gonadotropin secretion. *J. Steroid Biochem.* 33, 693-703.
- Suda, T., Takahashi, T., Golstein, P., and Nagata, S. (1993). Molecular cloning and expression of the Fas ligand, a novel member of the tumor necrosis factor family. *Cell* 75, 1169-1178.
- Tesone, M., Vitale, A., and Parborell, F. (1999). Gonadotropin-releasing hormone action on ovarian steroidogenesis and apoptosis. *Current Topics in Steroid Research* 2, 81-91.
- Thibault, C., Levasseur, M.C., and Hunter, R.H.F. (1993). *Reproduction in Mammals and Man*. Editorial Ellipses).
- Tilly, J.L. (1998). *Cell death and species propagation: Molecular and genetic aspects of apoptosis in the vertebrate female gonad. When cells die*, Wiley-Liss, Inc. 431-452.
- Tilly, J.L. and Tilly, K.I. (1995). Inhibitors of oxidative stress mimic the ability of follicle-stimulating hormone to suppress apoptosis in cultured rat ovarian follicles. *Endocrinology* 136, 242-252.
- Tilly, J.L., Tilly, K.I., Kenton, M.L., and Johnson, A.L. (1995). Expression of members of the *bcl-2* gene family in the immature rat ovary: equine chorionic gonadotropin-mediated inhibition of granulosa cell apoptosis is associated with decreased *bax* and constitutive *bcl-2* and *bcl-xlong* messenger ribonucleic acid levels. *Endocrinology* 136, 232-241.
- Tilly, J.L., Tilly, K.I., and Perez, G.I. (1997). The gene of cell death and cellular susceptibility to apoptosis in the ovary: a hypothesis. *Cell Death and Differentiation* 4, 180-187.
- Tsujimoto, Y., Cossman, J., Jaffe, E., and Croce, C.M. (1985). Involvement of the *bcl-2* gene in human follicular lymphoma. *Science* 228, 1440-1443.
- Vanhaesebroeck, B., Reed, J.C., De Valck, D., Grooten, J., Miyashita, T., Tanaka, S., Beyaert, R., Van Roy, F., and Fiers, W. (1993). Effect of *bcl-2* proto-oncogene expression on cellular sensitivity to tumor necrosis factor-mediated cytotoxicity. *Oncogene* 8, 1075-1081.
- Whitelaw, P.F., Eidne, K.A., Sellar, R., Smyth, C.D., and Hillier, S.G. (1995). Gonadotropin-releasing hormone receptor messenger ribonucleic acid expression in rat ovary. *Endocrinology* 136, 172-179.
- Williams (1998). *Textbook of Endocrinology*.
- Yano, T., Yano, N., Matsumi, H., Morita, Y., Tsutsumi, O., Schally, A.V., and Taketani, Y. (1997). Effect of luteinizing hormone-releasing hormone analogs on the rat ovarian follicle development. *Horm. Res.* 48 Suppl 3, 35-41.