



Universidad de Buenos Aires

Facultad de Ciencias Exactas y Naturales

Departamento de Biodiversidad y Biología Experimental

“Rol de los receptores nucleares activados por proliferadores peroxisomales gamma frente al exceso de andrógenos durante la foliculogénesis temprana”

Tesis para optar al título de Doctor de la Universidad de Buenos Aires en el área de
CIENCIAS BIOLÓGICAS

Lic. Mónica Faut

Directora: Dra Alicia Beatriz Motta

Consejero de Estudios: Dr. Enrique Rodríguez

Lugar de Trabajo: Laboratorio de Fisiopatología Ovárica-CEFyBo (CONICET-UBA)

Buenos Aires, 2013

El contenido de este trabajo de Tesis ha sido parcialmente publicado en:

- *“Peroxisome proliferator-activated receptor gamma and early folliculogenesis during an acute hyperandrogenism condition”* (2011). **Faut, M.**, Elia, E.M.; Parborell F.; Tesone, M.; Motta, A.B. fértil. Steril 95(1):333-337. Manuscrip ID: F and S9583.

“Rol de los receptores nucleares activados por proliferadores peroxisomales frente al exceso de andrógenos durante la foliculogénesis temprana”

La reproducción es uno de los procesos fisiológicos con mayor costo energético, tal es así que los mecanismos fisiológicos que controlan el balance energético se hallan ligados a la fertilidad. Existen múltiples endocrinopatías asociadas a desbalances metabólicos, entre ellas el *Síndrome de Ovario Poliquístico (SOP)*. Esta es una de las patologías más frecuentes en mujeres en edad reproductiva y cuya alteración principal es el hiperandrogenismo. Estas pacientes presentan alteraciones en la foliculogénesis temprana dado que, por mecanismos aun no conocidos, no ocurre la selección de folículos dominantes. Con el propósito de dilucidar estos mecanismos, en el laboratorio se ha generado un modelo murino de hiperandrogenización con dehidroepiandrosterona (DHEA) para el estudio del desarrollo folicular temprano. El objetivo principal de este trabajo es evaluar si *“es el exceso de andrógenos durante la vida peripuberal el que genera alteraciones en la funcionalidad ovárica”* y *“cuál es el rol de los receptores nucleares activados por proliferadores peroxisomales de tipo γ (PPAR γ) en esta alteración”*.

En el presente trabajo encontramos que el estímulo con eCG indujo un aumento en el número de folículos, disminuyendo la atresia folicular de manera controlada, sin alterar los procesos apoptóticos. Por otro lado, el aumento en los niveles de progesterona sérica (P_4), indica la capacidad esteroideogénica de estos ovarios, permitiéndonos estudiar los efectos del hiperandrogenismo sobre las primeras etapas de la foliculogénesis y la regulación de la esteroideogénesis. En ovarios provenientes de animales hiperandrogenizados, encontramos un aumento en la expresión de proteínas fundamentales, como StAR, mientras que otras enzimas reguladoras, como P450_{scc}, se encuentran disminuídas. Esta alteración provocó una disminución en la producción de P_4 , generando un efecto deletéreo en estos folículos. Los PPAR γ actuarían como factores de transcripción, regulando la expresión de estas enzimas y estimulando la producción de P_4 en las primeras etapas de la foliculogénesis, pero no siendo capaz de hacerlo en un ambiente hiperandrogénico. En estas condiciones, se produce un desbalance oxidativo en donde el GSht es consumido rápidamente generándose daño a lípidos, lo cual alteraría la estructura de las membranas, provocando que las células no respondan correctamente al ambiente que las rodea, y entrando en un estado proapoptótico. De esta manera, el folículo entra en atresia.

Palabras Claves: Hiperandrogenismo, foliculogénesis temprana, esteroideogénesis ovárica, estrés oxidativo, PPAR γ , DHEA.

"Role of the nuclear receptor peroxisome proliferator activated in front of androgen excess during early folliculogenesis"

Reproduction is one of the physiological processes with higher energy costs, that is so the physiological mechanisms that control energy balance are linked to fertility. There are multiple metabolic imbalances associated endocrinopathies, including Polycystic Ovary Syndrome (PCOS). This is one of the most frequent pathology in women of childbearing age and whose main alteration is hyperandrogenism. Women with PCOS have many troubles during early folliculogenesis given that, by unknown mechanisms, the dominant follicles can't be selected. To try to elucidate this phenomenon, in the laboratory we have generated a rat model of early follicular development with dehydroepiandrosterone (DHEA). The main objective of this work is to evaluate if *"it's the excess of androgens during peripubertal life that generates alterations in ovarian function"* and *"Which is the role of peroxisome proliferator-activated receptors γ (PPAR γ) in this condition"*.

In this work, we found that ECG stimulation induces an increase in the number of follicles, decreasing the follicular atresia in a controlled manner, without exacerbating apoptotic processes. In the other hand, an increase in the serum progesterone (P_4) indicates the steroidogenic capacity of these follicles, allowing us to study the effects of hyperandrogenism on the early stages of folliculogenesis and the regulation of the steroidogenic pathway. Ovaries from animals treated with DHEA, we found an increase in the expression of key proteins such as StAR, while others regulatory enzymes are diminished, such as P450_{scc}. This alteration causes a decrease of P_4 , producing a deleterious effect on these follicles. PPAR γ act as transcription factor of these enzymes by stimulating the production of P_4 in the early stages of folliculogenesis, but not being able to do so in a hyperandrogenic environment. In these conditions, GSHT is rapidly consumed which increases the damage to lipids, altering the membrane structure and causing the cells do not respond to the surrounding environment, and entering into a proapoptotic state. In this manner, the follicle is leading to atresia.

Keywords: Hyperandrogenism, early folliculogenesis, ovarian steroidogenesis, oxidative stress, PPAR γ , DHEA.

Abreviaturas

20αHSD: 20 α - hidroxioesteroide deshidrogenasa	hs: horas.
3βHSD: 3 β -hidroxioesteroide deshidrogenasa.	IMC: Índice de Masa Corporal.
ADN: Ácido Desoxirribonucleíco.	ip: intraperitoneal.
ADNc: Ácido Desoxirribonucleíco copia.	LDL: Lipoproteína de Baja Densidad.
AMPc: Adenosin-monofosfato cíclico.	LH: Hormona luteinizante.
AMPK: Quinasa Dependiente de AMP.	MDA: Malodialdehído.
ARNm: Ácido Ribonucleico mensajero.	mg: miligramos.
ATP: Adenosin Trifosfato	MMLV: virus Maloney de leukemia murino.
BSA: Albúmina Bovina Sérica,	P₄: Progesterona.
CAT: Catalasa.	P450aro: P450 aromatasa.
CG: Células de la granulosa.	P450c17: 17 α -hidroxilasa/17,20- liasa.
CGP: Células Germinales Primordiales.	P450scc: citocromo P450 de corte de cadena lateral.
CL: Cuerpo luteo.	PCR: Reaccion en Cadena de la Polimerasa.
COX2: Ciclooxygenasa 2.	PG: Prostaglandinas.
CT: Células de la teca.	PGE: prostaglandina E.
DHEA: Dehidroepiandrosterona.	PPAR: Receptores nucleares activados por agentes proliferadores peroxisomales.
DHT: Dehidotestosterona.	R: Radical Libre.
dNTPs: deoxi-nucleótidos trifosfato.	RIA: Radioinmuno Ensayo.
DTNB: 5'5-ditiobis-2-ácido nitrobenzóico.	ROS: Especies Reactivas de Oxígeno.
E₂: Estradiol.	RT: Retrotranscripción.
eCG: Gonadotrofina Coriónica equina.	sc: subcutánea.
ESHRE/ASRM: European Society of Human Reproduction and Embryology/American Society for Reproductive Medicine.	SOD: Superoxido Dismutasa.
FITC: Isocianato de Fluoresceína.	SOP: Síndrome de Ovario Poliquístico.
FSH: Hormona foliculo estimulante.	StAR: Proteína reguladora de la esteroideogénesis aguda.
GnRH: Hormona liberadora de gonadotrofinas.	T: Testosterona.
GPx: Glutation peroxidasa.	TBA: Ácido Tiobarbitúrico.
GR: Glutation reductasa.	UI: Unidades Internacionales.
GSH: Glutation reducido.	WB: Western Blot.
GSHt: Glutation total.	
GSSG: Glutation oxidado.	
H₂O₂: Peróxido De Hidrógeno.	

Agradecimientos

*Cuando el objetivo te parezca difícil,
no cambies de objetivo; busca un
nuevo camino para llegar a él.
Confucio*

Índice

INTRODUCCIÓN	13
1. EL OVARIO	15
1.1. Morfología del ovario	
1.1.1 Las células germinales	
1.1.2 Las células somáticas	
1.2. Estructura del ovario de los mamíferos	
1.3. Foliculogénesis ovárica	
1.4. Esteroidogénesis ovárica	
1.5. Ciclo Ovárico	
1.5.1. Ciclo estral en la rata	
1.5.2. Ciclo menstrual en la mujer	
2. RECEPTORES ACTIVADOS POR AGENTES PROLIFERADORES DE PEROXISOMAS	34
2.1. PPARy y su rol en el ovario	
3. ESTADO OXIDATIVO	37
3.1. Radicales libres y especies reactivas del oxígeno	
3.2. Toxicidad de xenobióticos mediados por ROS	
3.3. Reacciones con biomoléculas	
3.3.1. Proteínas	
3.3.2. Lípidos	
3.3.3. Ácidos nucleicos	
3.3.4. Hidratos de carbono	
3.4. Antioxidantes	
3.4.1. Sistemas de defensa enzimáticos	
3.4.2. Sistema de defensas no enzimáticas	
3.5. Estrés oxidativo en el ovario	
4. SÍNDROME DEL OVARIO POLIQUÍSTICO	48
4.1. Criterio de diagnóstico	
4.2. Desórdenes asociados	
4.2.1. Desórdenes metabólicos	
4.2.2. Desórdenes reproductivos	
5. HIPERANDROGENISMO	52
5.1. Modelos animales de hiperandrogenismo	
5.2. Foliculogénesis, esteroidogénesis e hiperandrogenismo	
5.3. Adolescencia e hiperandrogenismo	
HIPOTESIS Y OBJETIVOS	59
MATERIALES Y MÉTODOS	60
1. Modelo experimental	
1.1. Animales	
1.2. Tratamientos	

2. Obtención de tejidos	
3. Preparación de muestras	
3.1. Disgregación celular de los folículos	
3.2. Aislamiento de ARN y proteínas totales	
4. Determinaciones experimentales	
4.1. Cuantificación de la producción de progesterona y estradiol	
4.2. Procesamiento del tejido ovárico para la realización de técnicas histológicas	
4.3. Obtención de ARN para la realización de RT-PCR	
4.4. Obtención de proteínas para la realización de Western Blot	
4.5. Cuantificación del porcentaje de células apoptóticas	
4.6. Determinación de la fragmentación del ADN	
4.7. Determinación de parámetros relacionados con el balance oxidativo	
4.7.1. Actividad de la enzima Superóxido Dismutasa	
4.7.2. Actividad enzimática de Catalasa	
4.7.3. Contenido total de glutatión	
4.7.4. Contenido de malondialdehído	
5. Análisis estadístico	

RESULTADOS..... 76

Cuantificación de la producción de progesterona.....	
Cuantificación de la producción de estradiol	

Primera Parte: Caracterización fisiológica de la foliculogénesis temprana 77

Determinación del peso relativo	
Análisis histológico del tejido ovárico	
1. Porcentaje de folículos sanos y atrésicos.....	
2. Porcentaje de folículos en distintos estadios de desarrollo	
Análisis de la expresión de PPAR γ	
1. Análisis de la expresión génica de PPAR γ	
2. Análisis de la expresión proteica de PPAR γ	
Expresión de enzimas reguladoras de la esteroidogénesis	
1. Expresión génica de StAR.....	
2. Expresión génica de P450scc	
3. Expresión génica de 3 β HSD	
4. Expresión génica de P450aro	
Caracterización del estado oxidativo en el tejido ovárico.....	
1. Niveles de apoptosis	
2. Actividad de la enzima superóxidodismutasa	
3. Actividad de la enzima catalase	
4. Niveles de glutatión total.....	
5. Contenido de malondealdehído	

Segunda Parte: Efecto del hiperandrogenismo sobre el foliculogénesis temprana 95

Efecto sobre el peso relativo	
Efecto sobre la histología ovárica.....	

1. Efectos del hiperandrogenismo sobre la atresia folicular	
2. Efectos del hiperandrogenismo sobre las poblaciones foliculares	
Efecto sobre la expresión de PPAR γ	
1. Efecto sobre expresión génica de PPAR γ	
2. Efecto sobre expresión proteica de PPAR γ	
Efecto sobre expresión de las enzimas reguladoras de la esteroidogénesis	
1. Expresión génica de StAR	
2. Expresión génica de P450scc	
3. Expresión génica de 3 β HSD	
4. Expresión génica de P450aro	
Efecto sobre los parámetros de estrés oxidativo	
1. Porcentaje de células apoptóticas y fragmentación del ADN	
2. Actividad de la enzima superoxidodismutasa	
3. Actividad de la enzima catalasa	
4. Niveles de glutatión total	
5. Contenido de malondealdehído	
DISCUSIÓN	110
CONCLUSIÓN	125
PERSPECTIVAS	129
APÉNDICE	131
BIBLIOGRAFÍA	

Índice de figuras y esquemas

Figura 1..... 18

Figura 2.....

Figura 3.....

Figura 4.....

Figura 5.....

Figura 6.....

Figura 7.....

Figura 8.....

Figura 9.....

Figura 10.....

Figura 11.....

Figura 12.....

Figura 13.....

Figura 14.....

Figura 15.....

Figura 16.....

Figura 17.....

Figura 18.....

Figura 19.....

Figura 20.....

Figura 21.....

Figura 22.....

Figura 23.....

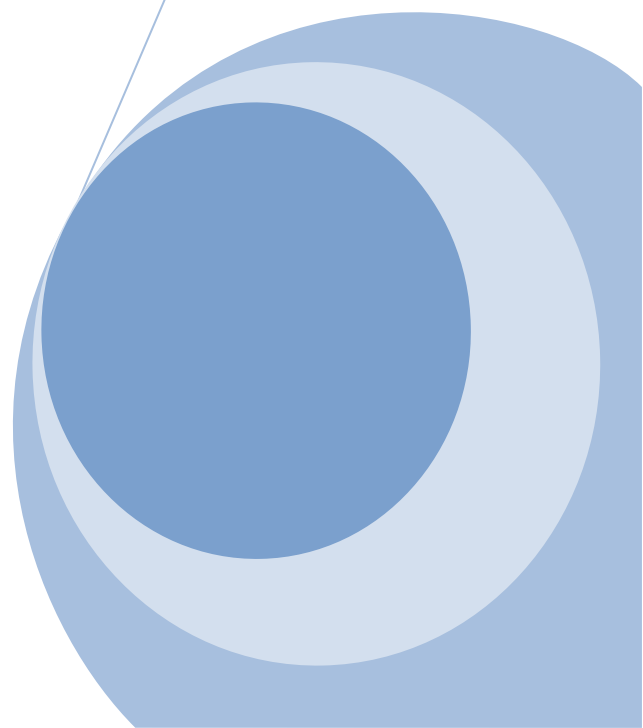
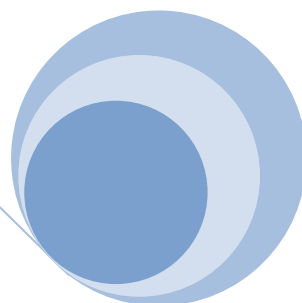
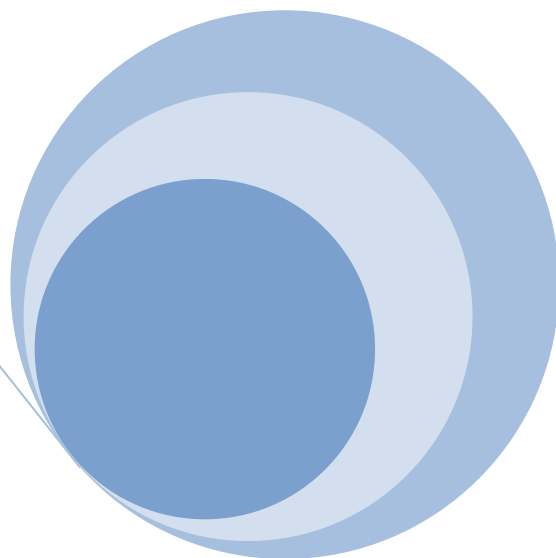
Figura 24.....

Figura 25.....

Figura 26.....

Figura 27
Figura 28
Figura 29
Figura 30
Esquema I
Esquema II
Esquema III
Esquema IV
Esquema V
Esquema VI
Esquema VII

Introducción



Alrededor del mundo y a través de la historia, se celebra la fertilidad y, junto con ella, se venera a la juventud. Las civilizaciones más antiguas han considerado a la mujer como el símbolo de la fertilidad, y la han representado y reverenciado como deidad, siendo la más famosa de ellas, Venus, que invocaba la fertilidad y la prosperidad.

Por el contrario, la infertilidad es uno de los mayores problemas sociales y médicos. Desde los albores de la humanidad, la infertilidad pasó de ser una simple enfermedad en la época de los egipcios, a ser vivida como una amenaza para la supervivencia del clan, para la transmisión del poder y el mantenimiento de las estructuras sociales entre los hebreos y árabes. Durante casi toda la historia de la humanidad, el hombre tuvo un desconocimiento total de cómo era el proceso de reproducción natural, pero desconocía los motivos de la infertilidad, de allí que, durante la Edad Media, se consideraba a la infertilidad como un castigo divino y a la mujer como la encargada de la reproducción, mientras que el hombre era un mero espectador.

En la actualidad, se sabe que la infertilidad tiene bases multifactoriales. Existen factores masculinos, femeninos o una combinación de ambos que generen alguna insuficiencia que impide la concepción. De aquí, es que se han planteado diversas terapias, pasando desde las psicológicas y/o ambientales hasta las terapias moleculares.

En la mujer, una de las endocrinopatías más frecuentes que llevan a la esterilidad es el *Síndrome del Ovario Poliquístico* (SOP), cuyas características principales son la presencia de múltiples quistes en los ovarios y el hiperandrogenismo. Esta patología reproductiva está asociada a alteraciones metabólicas (diabetes tipo 2, obesidad, dislipidemias) y de la salud en general como cáncer endometrial y riesgo cardiovascular incrementado.

1. EL OVARIO

En los mamíferos los órganos sexuales femeninos están compuestos por los ovarios, las trompas uterinas, el útero y la vagina. La mayor parte de los componentes de estas estructuras se originan del mesodermo intermedio y del mesodermo lateral.

La función primitiva del ovario es la de originar y almacenar oocitos. Sin embargo, posee capacidades endocrinas que gobiernan la reproducción, es decir, se convierte en un órgano de secreción interna.

El ovario es el encargado de la producción de *hormonas esteroideas* como los estrógenos, progesterona y andrógenos; y de *hormonas no esteroideas*, las cuales pueden llegar a comportarse como verdaderas hormonas, esto es que pueden actuar sobre órganos lejanos, como la relaxina, la inhibina y la activina. Una gran cantidad de estos factores peptídicos actúan de forma parácrina, esto es que su acción se ejerce sobre el ovario mismo.

Durante el desarrollo embriológico, la gónada pasa por un estado indiferenciado en donde puede desarrollarse a ovarios o testículos, según sea la carga genética. Luego de este estado, comienza la diferenciación propiamente dicha, durante la cual las *oogonias* se reproducirán hasta generar millones de oocitos. En los primates esta etapa comienza hacia la mitad de la vida embrionaria con la meiosis de las oogonias, desarrollándose hacia folículos primarios. En los roedores las oogonias se siguen multiplicando hasta el nacimiento. De cualquiera de las dos formas, las crías tienen un número fijo de oocitos, conocido como *reserva foliculogénica*. De estos, muy pocos llegan a madurar completamente y a ser ovulados. La mayoría experimentará un fenómeno conocido como *atresia folicular*.

1.1. *Morfogénesis del ovario*

La morfogénesis del ovario es un evento sumamente complejo que involucra tanto interacciones génicas como cascadas de señalización que surgen tras la citodiferenciación. Su complejo desarrollo se manifiesta con claridad cuando en el mismo interactúan células de distintos orígenes para constituir la gónada adulta.

1.1.1. *Las células germinales*

Las células germinales son también denominadas *células germinales primordiales* (CGP) o *gonocitos*, y sus células hijas constituyen la línea germinal. El origen de las células germinales no está bien establecido. Es posible detectarlas en embriones humanos a partir del estadio 11 (24 días post-fecundación) situadas en el endodermo del saco vitelino, cerca de la cara posterior del alantoides. Esto hizo que se consideraran como células del endodermo, siendo su origen extraembrionario y extragonadal¹.

Las CGP son fácilmente identificables. Tienen un tamaño mayor al de las células endodérmicas que las rodean, dan una intensa reacción a la fosfatasa alcalina y poseen un alto contenido de glucógeno (PAS+). Estas dos últimas reacciones son positivas en células germinales de estadios posteriores del desarrollo, gónadas embrionarias en estadios de indiferenciación o diferenciadas en ovarios o testículos. En embriones humanos, a los 17-20 días post-fecundación, las CGP son indiferenciables de las células somáticas. En el ratón, se ha demostrado la situación de territorio prospectivo de las CGP en el epiblasto, cerca de la región en donde se sitúan las células epiblasticas que van a dar lugar al endodermo del saco vitelino de la alantoides y del intestino posterior².

Cada uno de los blastómeros tiene la potencialidad de formar tanto células somáticas como germinales durante el estadio de blástula³. Se ha propuesto que las células germinales podrían recuperar su pluripotencialidad en el momento de la meiosis, sobre todo en las gónadas femeninas, ya que en ese momento tiene lugar la reactivación del cromosoma X^{4,5}.

Desde la zona en donde aparecen localizadas por primera vez, las CGP deben sufrir un proceso de migración para alcanzar el esbozo gonadal. Durante este proceso de migración activa, adquieren características particulares, como la capacidad de realizar movimientos ameboideos. Esta capacidad es mantenida, incluso, hasta estadios avanzados de desarrollo⁶. Junto con esta capacidad de migración activa, existe otra pasiva que se debe a los cambios dados por el crecimiento del embrión. En conjunto, estos movimientos permiten que las CGP se sitúen en el interior del cuerpo embrionario y que, a través de la vía mesentérica, alcancen el esbozo gonadal. Estos fenómenos se llevan a cabo durante los estadios 13 y 16 (entre los 17 y 23 días post-fecundación) provocando una gran actividad mitótica en las CGP. Existe evidencia que demuestra que el esbozo gonadal secretaría sustancias difusibles que atraerían a estas CGP, pero dichas sustancias no serían especie-específicas⁷⁻⁹.

1.1.2. Las células somáticas

Las fases iniciales de la formación de las gónadas se detectan por un engrosamiento que sufre el epitelio que recubre la cavidad celómica, esta formación se denomina *cresta genital*. Si bien el por qué de este engrosamiento no está esclarecido, se postula que el epitelio posterior de la cavidad celómica proliferaría luego de perder su membrana basal por la invasión de células mesonéfricas en degeneración¹⁰. De esta manera, la gónada tendría un origen mesodérmico, desarrollándose junto con el sistema renal.

El inicio de la diferenciación gonadal en embriones humanos ocurre alrededor de la séptima semana post-fecundación. Se puede identificar la diferenciación testicular del embrión, mientras que si se desarrolla a ovario no se observan cambios morfológicos con respecto a la gónada indiferenciada. Esto ha llevado a la conclusión de que la diferenciación de la gónada en testículo debe estar dominada por un factor en particular, nombrado *determinante testicular*. Este factor está ubicado en el brazo corto del cromosoma Y en una pequeña zona conocida como *región determinante del sexo del cromosoma Y* (SRY). Su actuación sería a nivel de las células de soporte del sistema

gonadal, diferenciándolas a células de Sertoli. Hasta el momento no se encontró en gen análogo en la gónada femenina, de hecho se ha demostrado que para el mantenimiento de las *oogonias*, estas células deben poseer el genotipo XX¹¹. En la diferenciación de un ovario normal, las CGP desarrollan un papel fundamental en la organización del mesénquima de la gónada que se determinará en ovario (figura 1).

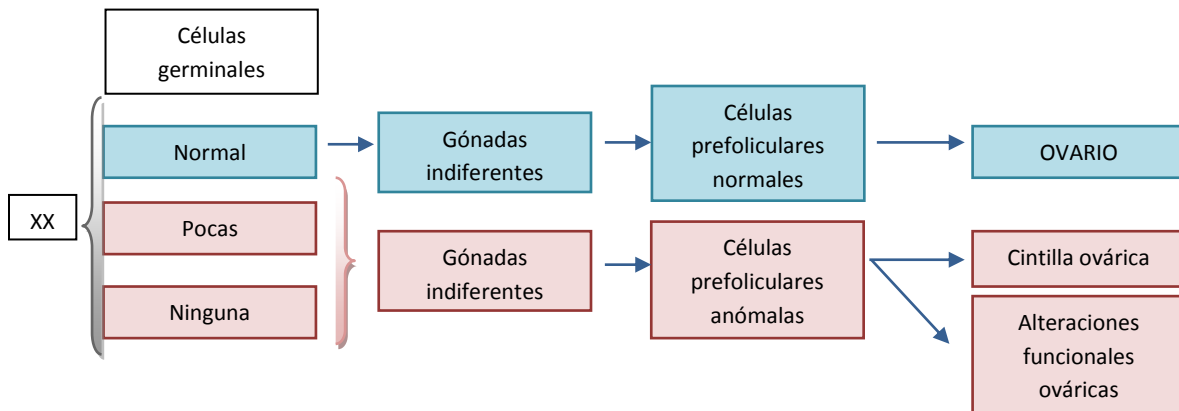


Figura 1: Diferencias en la actuación de las células germinales sobre el desarrollo del ovario.

1.2. Estructura del ovario de los mamíferos

El ovario está constituido por tejido en constante transformación. Posee una estructura compartimental caracterizada por propiedades biológicas diferentes y dinámicas. Es el sitio de almacenamiento y desarrollo de los oocitos formados durante la vida embrionaria/fetal o 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 especie¹². Para esto, genera un ambiente propicio para albergar al cigoto, ligado a cambios inducidos por la transformación del folículo ovulatorio en el cuerpo lúteo^{13, 14}. 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.

Los ovarios de los mamíferos son estructuras pares y ovaladas. Constan de una zona periférica gruesa, la corteza, que rodea a una zona central conocida como médula.

En la corteza se localizan los folículos de diferentes tamaños dependiendo de la fase de desarrollo en la que se encuentran. Cuando un folículo alcanza su madurez se “rompe” en la superficie del ovario para dejar libre al oocito. La médula está formada básicamente por tejido conectivo laxo y por una masa de vasos sanguíneos (figura 2).

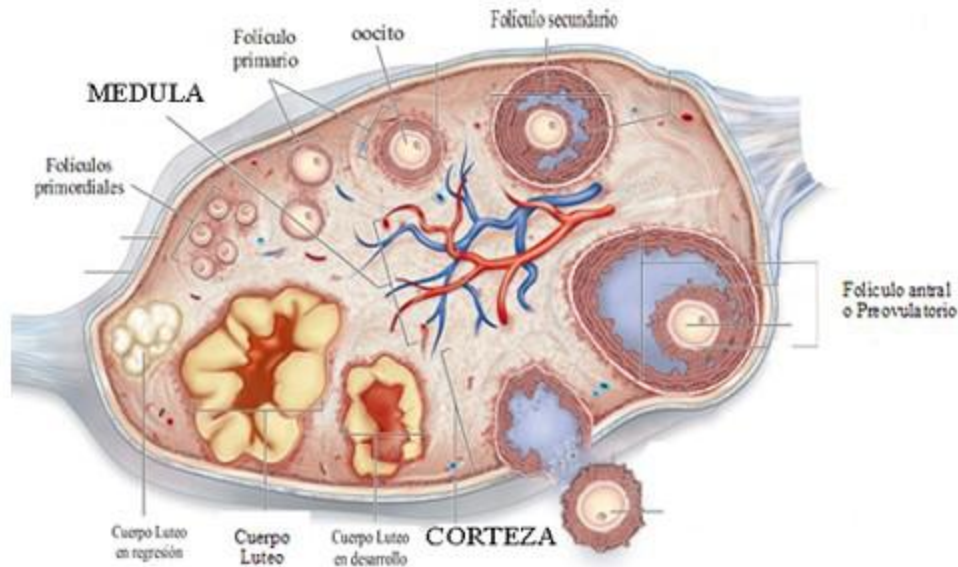


Figura 2: Estructura del ovario y desarrollo folicular. Adaptado de McGraw Hill Companies.

Durante la adultez, la superficie del ovario es nodular y se encuentra cubierta por una capa simple de células cúbicas o poliédricas, llamada *epitelio germinal*¹⁵. Esta cubierta epitelial está frecuentemente invaginada hacia el tejido conectivo subyacente llamado *túnica albugínea*, formando pequeños pliegues, hoyos o criptas. Por debajo se encuentran dos zonas: la *zona cortical* y la *zona medular*, pero el límite entre ambas no está bien definido. La primera comprende al estroma ovárico, formado por tejido conectivo laxo, fibroblastos y precursores de células de la teca, y folículos en distintos estadios de maduración, atrésicos y cuerpos lúteos. Mientras que la zona medular se encuentra muy vascularizada e innervada y contiene células de tipo muscular y tejido conectivo laxo¹⁶ (figura 2).

El ovario es, por lo tanto, un órgano heterogéneo en cuanto a la población celular presente en un momento dado y se mantiene así a lo largo de la vida del individuo. A

partir de la pubertad, se producen variaciones hormonales cíclicas que afectarán tanto al ovario como al cuerpo lúteo y al útero, preparándolos para la expulsión del oocito y la potencial implantación del blastocisto.

1.3. Folliculogénesis ovárica

Cada uno de los folículos alberga un oocito (en algunos casos puede albergar a dos) y está formado por dos tipos de células diferentes, las cuales forman capas características: las **células de la teca** (CT), que darán origen a la capa externa e interna, dependiendo de su ubicación; y las **células de la granulosa** (CG), que rodean al oocito. Tanto la capa de CT interna como las CG tienen capacidades endócrinas. Cuando el folículo alcanza un volumen determinado, se “rompe” dejando salir al oocito. Este fenómeno se conoce como *ovulación*. En el lugar donde estaba ubicado ese folículo, se forma ahora lo que conocemos como *cuerpo lúteo*, el cual se transformará en *cuerpo albicans*. Todas estas estructuras se encuentran presentes en el ovario de cualquier mamífero. Lo que diferencia a estos ovarios es si durante la ovulación uno o varios oocitos son ovulados, y si este proceso es espontáneo o inducido.

Los folículos están incluidos en el estroma de la corteza. En una mujer adulta joven hay hasta unos 400.000 folículos. Sin embargo, de todos ellos solo unos 500 oocitos serán liberados a lo largo de su vida reproductiva. Durante cada ciclo menstrual comienzan a madurar de 5 a 15 folículos, pero lo normal es que sólo uno finalice el proceso, mientras que el resto degenerará de acuerdo a la atresia folicular.

La citodiferenciación de las CGP y de las oogonias ocurre en las profundidades del ovario. Ambos tipos celulares comienzan a multiplicarse y migrar hacia la corteza donde se diferencia hacia **folículos primordiales**. Estos están formados por un oocito grande rodeado de una capa de células foliculares aplanadas (figura 3). En mujeres, el oocito se encuentra estabilizado en la profase I de la meiosis y los folículos primordiales continuarán su desarrollo en la pubertad. En la rata, en cambio, los folículos primordiales

pueden apreciarse a partir del 3º día postnatal, a partir de este momento comenzarán a madurar hasta que se produzca el primer **estro** (período en el que la hembra es capaz de recibir al macho).

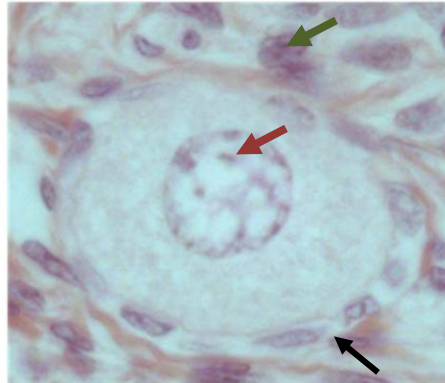


Figura 3: Folículo primordial (H-E). Aumento: 400x. La flecha en negro indica a las células foliculares aplanadas. La flecha roja indica el oocito. La flecha verde indica el estroma ovárico.

A medida que los folículos maduran las capas de células foliculares pasan de ser planas a cúbicas y por proliferación mitótica adquieren nuevas capas de células foliculares con características propias, se las denomina CG. Los **folículos primarios** pueden poseer una (unilaminar) o varias (multilaminar) capas de CG (figura 4). La capa folicular externa descansa sobre la membrana basal, la cual actúa como “barrera” a ciertos factores externos. A esta membrana se adhieren las células del tejido conectivo que darán origen a las CT. En estos folículos se puede observar la membrana o **zona pelúcida**, situada entre el oocito y las CG, la cual está compuesta por diferentes glicoproteínas y puede apreciarse claramente en los cortes histológicos utilizando tinciones adecuadas. En mujeres, estas diferenciaciones ocurren durante la pubertad.

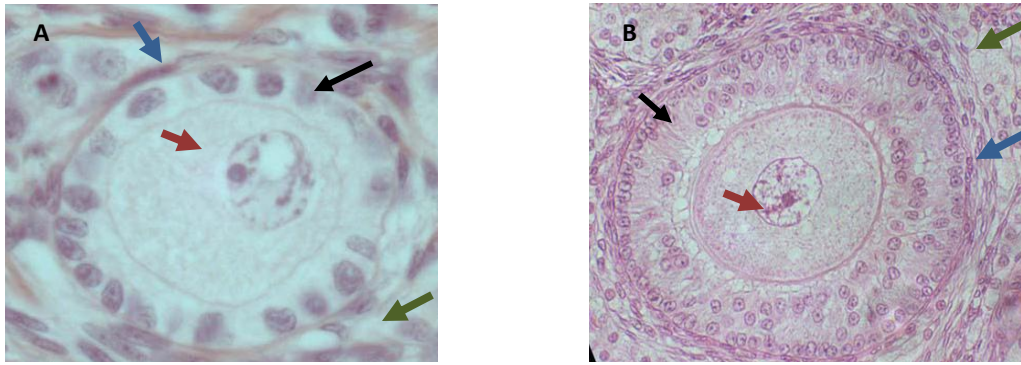


Figura 4: Folículos primarios (H-E). A) Folículo primario con una única capa de CG cúbicas (flecha negra). Aumento: 400x. B) Folículo primario con múltiples capas de CG cilíndricas (flecha negra). Aumento: 200x. Las flechas rojas indican al oocito. Las flechas verdes muestran el estroma ovárico. Las flechas azules indican la membrana basal.

A medida que el crecimiento folicular continúa, éstos aumentan de tamaño y entre las CG comienzan a formarse cavidades, las cuales se llenan de líquido, denominado **líquido folicular**. Estas cavidades crecen hasta lograr fusionarse originando el antro folicular o **cavidad antral**. Estos folículos reciben el nombre de **folículos secundarios** o **folículos antrales** (figura 5). En la rata, a partir del 7^º día postnatal pueden comenzar a observarse este tipo de folículos bien desarrollados.

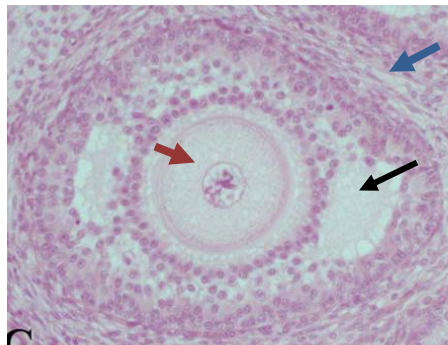


Figura 5: Folículo Secundario o antral (H-E)- Aumento: 400x. La flecha negra indica la cavidad antral. La flecha roja indica al oocito. La flecha azul indica a las células de la teca.

El oocito comienza a situarse en uno de los lados de la cavidad antral rodeado por una capa de CG denominada **corona radiata**. Este folículo maduro es conocido como **folículo de de Graaf** (figura 6) y se caracteriza por poseer numerosas capas de CG y el oocito que protruye hacia la cavidad antral formando el **cumulus ooforus**. Está rodeado por tejido conectivo, las CT, que forman una capa interna y otra externa. En la mujer, el

oocito de este folículo se encuentra detenido en la metafase II de la meiosis y solamente finalizará el proceso meiótico si es fecundado. En la rata, estos folículos pueden ser observados en la 3ª semana (aproximadamente 19 días) post natal.

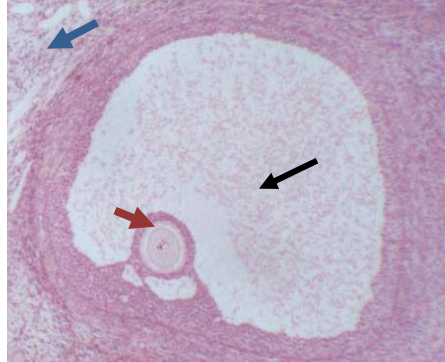


Figura 6: Folículo de de Graaf. Aumento: 400x. La flecha negra indica la cavidad antral. La flecha roja indica al oocito rodeado de la corona radiata. La flecha azul indica a las células de la teca.

Luego de la ovulación, los restos de las CG y CT forman el **cuerpo lúteo** (CL). En la etapa inicial de la formación del CL pueden distinguirse dos tipos celulares, unas células externas y pequeñas y otras internas. Estas últimas constituyen la mayor parte del CL y presentan un mayor tamaño. La función principal del CL es la producción de progesterona y la mantención del cigoto, en caso de que haya ocurrido la fecundación.

1.4. **Esteroidogénesis ovárica**

En los mamíferos, durante la vida intrauterina, el ovario no posee función esteroidogénica, es la placenta la encargada de la producción de *estrógenos*. Luego del nacimiento, la función ovárica comienza a ser gobernada por el eje hipotálamo-hipófisis, y las vías esteroidogénicas comienzan a desarrollarse.

Las hormonas sexuales femeninas producidas en el ovario son fundamentalmente el *estradiol* (E_2) y la *progesterona* (P_4), aunque también se producen pequeñas cantidades de *estrona*, *androstendiona*, *testosterona* y *17 α -hidroxiprogesterona*. Así como varias hormonas no esteroideas como la *inhibina*, *relaxina* y algunos factores locales. Todos los

esteroides ováricos se producen fundamentalmente en las células foliculares y del CL. Son derivados del colesterol, compuesto de 27 átomos de carbono (C₂₇), el cual se obtiene a través de tres fuentes principales:

1. El colesterol que circula en sangre en forma de lipoproteínas.
2. El colesterol que se sintetiza *de novo* dentro del ovario a partir de acetil-CoA.
3. El colesterol que se libera de las gotas lipídicas.

En el ovario, la principal fuente de colesterol deriva de la captación de colesterol lipoproteico, concretamente de las lipoproteínas de baja densidad (LDL). Existen receptores para LDL en las membranas de las células ováricas, los cuales una vez que unen LDL pasan al interior de la célula a través de mecanismos de endocitosis, y sistemas enzimáticos en el interior de la misma emplean el colesterol para la síntesis de hormonas esteroideas.

El colesterol, independientemente de su origen, se transporta desde las membranas mitocondriales mediante una proteína transportadora de esteroides activada por AMPc, la *proteína reguladora de la esteroidogénesis aguda* (StAR, sus siglas en inglés)¹⁷. Allí comienza la biosíntesis esteroidea, cuyo paso limitante es la producción de *pregnenolona*, catalizada por una enzima que corta la cadena lateral del colesterol, la enzima *citocromo P450 de corte de cadena lateral* (P450_{scc}, sus siglas en inglés), que tiene como cofactores a la adrenodoxina y otras flavoproteínas (figura 7).

A partir de la pregnenolona, la biosíntesis de esteroides puede seguir dos vías diferentes:

1. Vía delta 4: Lleva aparejada la conversión de pregnenolona a P₄ y es característica del CL.
2. Vía delta 5: Encargada de metabolizar pregnenolona a 17 α -hidroxipregnenolona y ocurre preferentemente en las CT.

En la mitocondria, el colesterol es liberado por la acción de la proteína StAR, éste es transformado en pregnenolona por la acción de P450_{scc}. Este paso es el limitante y es

donde comienzan a formarse los *progestágenos*, son compuestos de 21 átomos de carbono (C_{21}). La pregnenolona es transportada al citoplasma, donde puede ser transformada directamente a P_4 mediante la acción de la enzima *3 β hidroxisteroide-deshidrogenasa (3 β HSD)*. Por otro lado, la pregnenolona también puede sufrir la acción consecutiva de las enzimas *citocromo P450 17 α -hidroxilasa/17,20-liasa o desmolasa (P450_{c17 α})* y 3 β HSD formándose *17 α -hidroxiprogesterona* y *dehidroepiandrosterona (DHEA)*, para luego formar *androstenediona*. Estos últimos son andrógenos, esteroides de 19 carbonos (C_{19}), los cuales serán transformados a *testosterona*. Finalmente, por acción de la enzima *P450 aromatasa (P450aro)*, los andrógenos se aromatizarán a estrógenos (figura 7), como el *17 β -estradiol (E₂)* y la *estrona (E₁)*, son esteroides de 18 carbonos (C_{18}).

Se ha descrito, mediante la determinación de la expresión de los ARNm de estas enzimas, la presencia de grandes cantidades de P40scc en CT interna y CL, mientras que la cantidad de 3 β HSD es escasa en los folículos y abundante en CL¹⁸. Por tal motivo, se considera a la vía delta 5 como predominante en los folículos, mientras que la vía delta 4 lo es para las células del CL, donde, en comparación, la producción de P_4 es mayor. La P450_{c17 α} es igualmente abundante en células de la CT y del CL, pero está ausente en CG. Esto hace suponer que tanto las CT como del CL son capaces de sintetizar elevadas dosis de andrógenos, mientras que las CG no. El último paso para la biosíntesis de los estrógenos es la aromatización del anillo A de los andrógenos (ver figura 7) mediante la acción de la enzima P450aro, que está presente en grandes cantidades en las CG, por lo que estas últimas son capaces de transformar andrógenos en estrógenos.

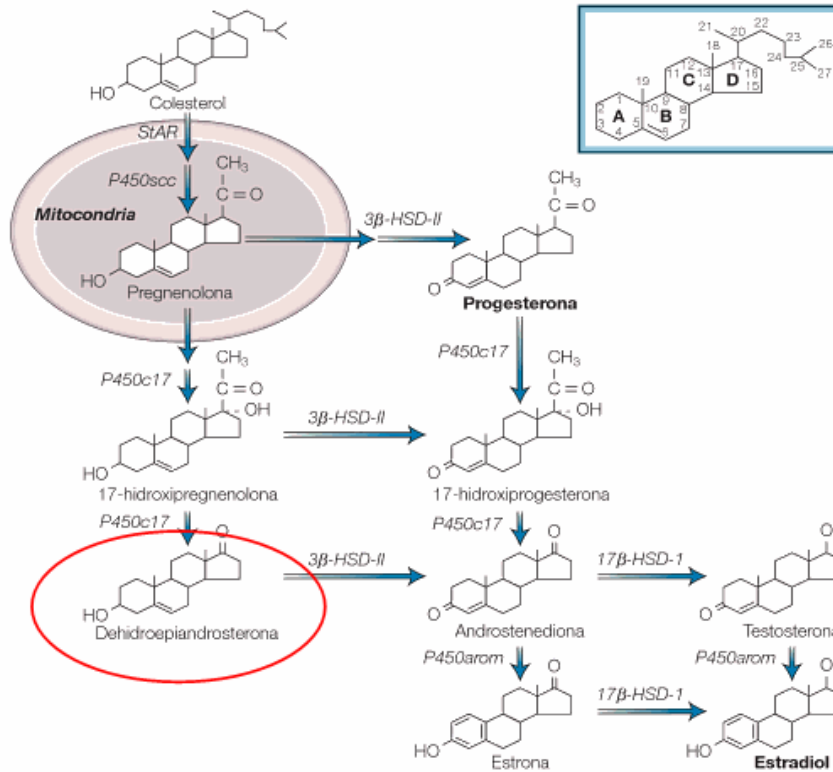


Figura 7: Vía de la esteroidogénesis en el ovario. Marcando la posición de la dehidroepiandrosterona. Los cuatro anillos de las moléculas de colesterol se identifican con las 4 primeras letras del alfabeto y los carbonos se enumeran en la secuencia que se muestra en la representación. Clave de la figura, 3β -HSD-II: 3β -hidroxiesteroide deshidrogenasa $\Delta 5,4$ isomerasa tipo II, 17β -HSD-I: 17β -hidroxiesteroide deshidrogenasa tipo I, P450arom: citocromo P450 aromatasa, P450c17: 17α -hidroxilasa/ $17,20$ -liasa, P450scc: citocromo P450 de corte de cadena lateral, StAR: proteína reguladora de la esteroidogénesis aguda. Adaptado de Kronenberg y col.(2009)¹⁹.

Además de las diferencias mencionadas anteriormente, las CG no están vascularizadas y, por tanto, tienen un acceso limitado al colesterol en forma de LDL, lo cual hace que el proceso de biosíntesis sea cuantitativamente inferior al de los otros tipos celulares. Por otro lado, las CT con suficiente vascularización, receptores para LDL y sistemas enzimáticos adecuados son capaces de transformar pregnenolona a andrógenos, pero no poseen enzimas aromatizantes para llegar a la síntesis de E_2 (figura 8). Por lo expuesto, es que se requiere la interacción entre las CT interna y las CG para conseguir la biosíntesis de estrógenos.

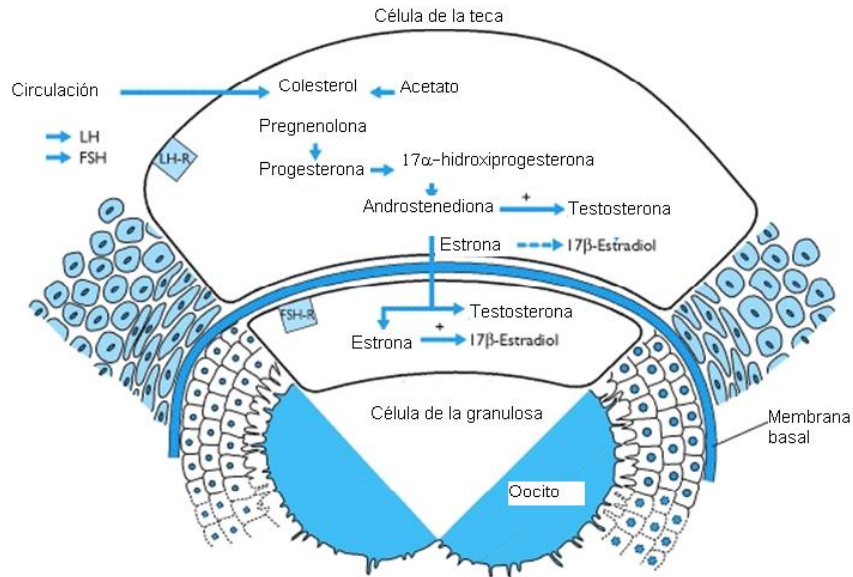


Figura 8: Principal ruta esteroidogénica en el folículo ovárico. La androstenediona, formada en las CT bajo la acción estimuladora de la LH, difunde a través de la membrana basal hacia las CG, donde bajo la acción de la FSH, es convertida a E_2 . En los folículos en desarrollo, los receptores de LH se expresan sólo en las CT, mientras que los de FSH sólo lo hacen en las CG. El folículo preovulatorio desarrolla receptores de LH en las células de la granulosa de manera previa al pico de LH. Las CT adquieren la capacidad de sintetizar E_2 (líneas punteadas), la cual persistirá cuando estas células se incorporen al CL. Adaptado de Nussey y Whitehead (2001)²⁰.

Por lo expuesto previamente, se deduce que la producción de esteroides durante el ciclo menstrual está relacionada a la actividad de cuatro enzimas claves: $P450_{scc}$, $3\beta HSD$, el complejo enzimático formado por la $P450_{c17\alpha}$ y $P450_{aro}$. Estas enzimas reguladoras catalizan la conversión de colesterol a pregnenolona, de pregnenolona a P_4 , de pregnenolona a andrógenos y, finalmente, de andrógenos a estrógenos (figuras 7 y 8). Estos procesos ocurren de manera paralela al proceso de maduración folicular. Durante el mismo se producen una serie de cambios hormonales, por un lado se sintetiza el E_2 en forma creciente hasta el momento de la ovulación, disminuyendo sus niveles plasmáticos en el momento de la misma y elevándose los niveles de P_4 plasmática, gracias a la contribución del CL en la segunda fase del ciclo. Por otro lado, también se producen ciertos niveles de andrógenos.

1.5. Ciclo ovárico

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

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

Para que exista un ciclo normal se requiere la liberación pulsátil y periódica de la *hormona liberadora de gonadotrofinas (GnRH)* desde el hipotálamo. En la parte anterior de la hipófisis se encuentran los receptores de GnRH, en un tipo celular denominado *gonadotrofos*. La unión de esta hormona con sus receptores induce una serie de respuestas hipofisarias que culminan con la síntesis y secreción de LH y la FSH. Los receptores para gonadotrofinas se encuentran en el ovario y se ha demostrado que los receptores de LH y FSH se expresan en las CG de los folículos primordiales y preantrales, mientras que en las CT solo lo hacen los receptores para LH. Conforme el folículo madura, las CG comienzan a expresar receptores para LH^{21, 22}. Ambas gonadotrofinas, LH y FSH, inducen la foliculogénesis ovárica, y con ella, la esteroidogénesis (figura 9).

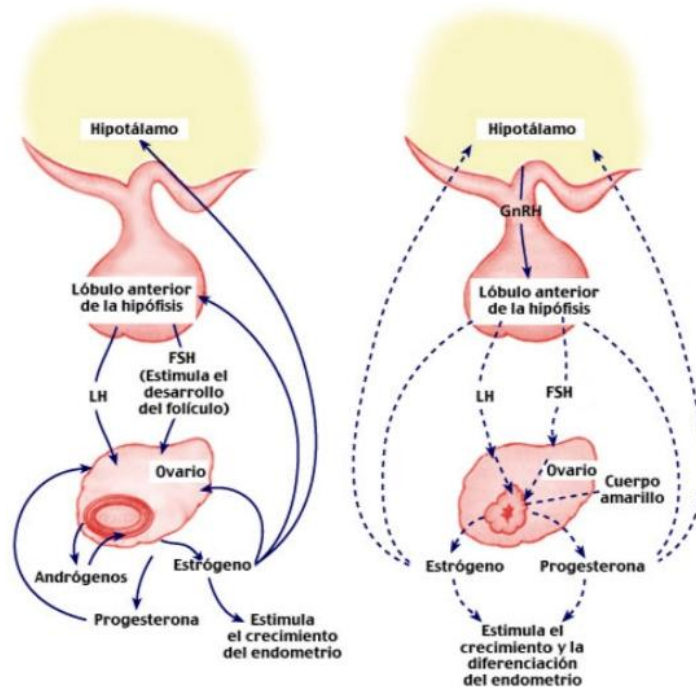


Figura 9: Eje Hipotálamo-Hipófisis-Ovario. Regulación endócrina y parácrina de las hormonas sexuales. GnRH: hormona liberadora de gonadotrofinas; LH: hormona luteinizante; FSH: hormona folículo estimulante.

La FSH desempeña un papel fundamental en la foliculogénesis estimulando los procesos proliferativos y la síntesis de enzimas esteroidogénicas. Mientras que la LH es característica durante la formación del CL (tabla I).

Tabla I: Principales efectos de las gonadotrofinas en el ovario.

Hormona Folículo Estimulante (FSH)	Hormona Luteinizante (LH)
Mitogénesis de las células de la granulosa.	Favorece la esteroidogénesis en las células de la teca.
Favorece la actividad de la P450 aromatasa.	Favorece la ovulación.
Favorece la expresión de los receptores de FSH y LH en células de la granulosa.	Favorece la esteroidogénesis y función en el cuerpo lúteo.
Favorece la presencia de uniones gap entre las células de la granulosa.	
Favorece la esteroidogénesis en el cuerpo lúteo.	

El ciclo ovárico consta de una *fase folicular*, en la cual se suceden una serie de eventos en cascada que propician un número adecuado de folículos para la ovulación, y una *fase lútea*, en la que, luego de la ovulación, comienza la formación del CL (figura 10).

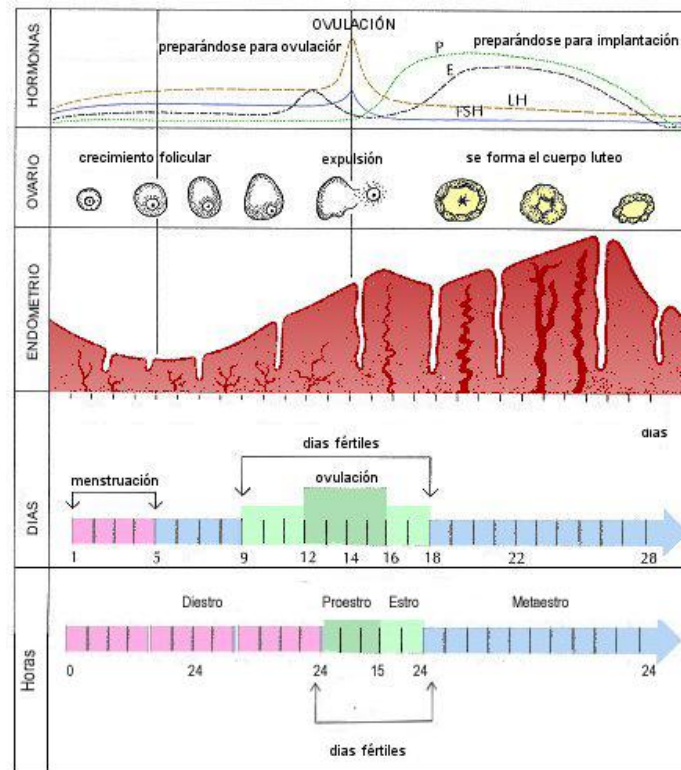


Figura 10: Esquema de los eventos fisiológicos y anatómicos durante el ciclo menstrual y estral. Se muestran las curvas hormonales, la maduración de los folículos en el ovario, el estado del endometrio a lo largo de los días (para las mujeres) o de las horas (para las ratas). P: Progesterona; E: Estradiol; FSH: Hormona folículo estimulante; LH: Hormona luteinizante.

Durante la fase folicular, ocurren tres eventos caracterizados por la dependencia o independencia a las gonadotrofinas (figura 11). El primero de ellos es el *reclutamiento folicular*, el cual posee dos etapas: el *reclutamiento primario* (I reclutamiento), independiente de gonadotrofinas, y el *reclutamiento secundario* (II reclutamiento), dependiente de gonadotrofinas. Durante el reclutamiento primario, los folículos primordiales comienzan a crecer estimulados por factores intraováricos. Sin embargo, no son capaces de mantener este desarrollo folicular y, aquellos que no respondan al estímulo de FSH, caerán en atresia, dando comienzo a la segunda etapa del reclutamiento. En esta etapa solo aquellos folículos que sean capaces de responder a FSH seguirán creciendo y madurando. Por lo que una de las principales funciones de la FSH sobre los

folículos en crecimiento es el *rescate folicular*, permitiendo que sigan madurando y comiencen a sintetizar y secretar E_2 . Si bien existe un efecto de retroalimentación positiva del E_2 sobre la secreción de FSH, luego de un tiempo, los altos niveles de E_2 comienzan a inhibir la secreción de FSH debido al efecto de retroalimentación negativa (figura 9 y 10). Por lo tanto, solo aquel folículo que tenga la suficiente cantidad de receptores de FSH podrá continuar con su crecimiento. Este evento es conocido como *selección*, y aquellos folículos que sobrevivan se convertirán en *dominantes*, pasando a la etapa de *dominancia*, mientras que el resto de los folículos reclutados caerán en atresia. En este último proceso, el folículo que va a ser ovulado continúa desarrollándose, propiciando un ambiente que condiciona la supresión de los otros folículos que estén en desarrollo.

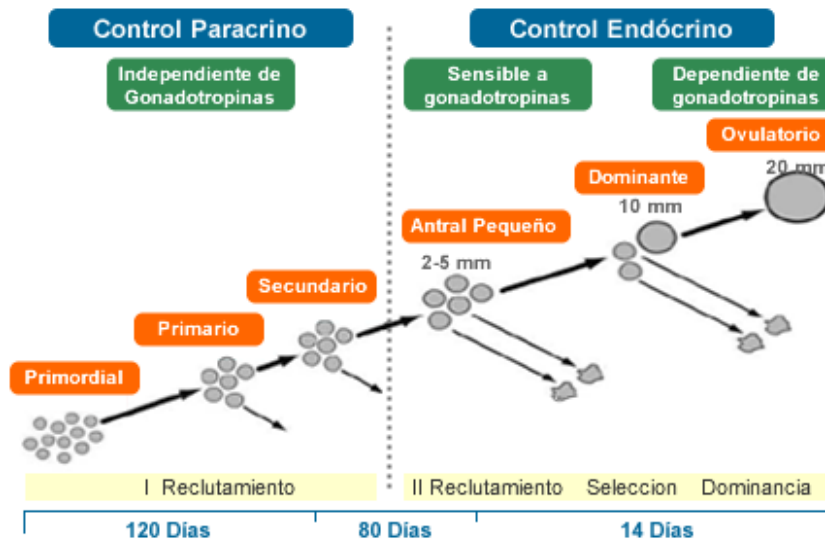


Figura 11: Etapas de la fase folicular. La barra temporal indica la cantidad de días, en una mujer, que transcurre entre las diferentes etapas de la foliculogénesis.

1.5.1 Ciclo estral en la rata

En la rata los folículos primordiales se forman al tercer día de edad postnatal y el primer grupo que llegará al estadio antral, lo hará a partir de la tercera semana de edad. En el séptimo día a partir del nacimiento se pueden encontrar folículos secundarios bien desarrollados. La pubertad o primer **estro**, periodo en el cual la hembra está dispuesta a recibir al macho, ocurre alrededor del día 34 luego del nacimiento, y continúa regularmente hasta aproximadamente 10-12 meses de edad, momento en el cual los

animales entran en ciclos irregulares. El tiempo que lleva el desarrollo de los folículos primordiales hacia folículos preovulatorios es alrededor de 60 días o 15 ciclos estrales. Dentro de este período se necesitan más de 30 días para que los folículos primordiales se desarrollen en folículos secundarios e igual cantidad de tiempo tarda el desarrollo de los folículos secundarios al estadio en el cual serán ovulados. El período anterior al estro (momento de la ovulación) se lo denomina **proestro** y se caracteriza por el momento en el cual el animal entra en celo. En ausencia de concepción, el estro es seguido por el **metaestro**. Al periodo siguiente se lo denomina **diestro** y es el tiempo durante el cual la secreción ovárica prepara a los tejidos reproductivos para la recepción del óvulo fertilizado luego del coito durante el estro. El diestro dura 1-2 días determinando que el ciclo estral tenga una duración de 4-5 días (figura 10). Si la fertilización no ocurre, el animal vuelve al período de proestro y un nuevo ciclo se inicia. Los distintos estadios pueden determinarse según el tipo y predominancia de distintas células en el extendido vaginal, bajo el microscopio óptico. La rata es un mamífero no estacional, de ovulación espontánea y poliéstrica, esto quiere decir que el ciclo ovárico ocurre durante todo el año y la ovulación no depende del estímulo de la cópula. Dichas características, sumadas a su fácil reproducción y mantenimiento en el bioterio, hacen que sea un buen modelo para el estudio de la fisiología ovárica gonadal.

1.5.2. Ciclo menstrual en la mujer

El desarrollo folicular en humanos comienza alrededor de la semana 12 de gestación. En este momento las oogonias comienzan a transformarse en folículos primordiales cuando son rodeados por una capa única de células foliculares, denominadas *de la pre-granulosa*. Estos maduran a folículos primarios, entrando en los primeros estadios de la meiosis. La maduración de folículos primordiales a folículos secundarios, pasando por el estadio de folículos primarios, requiere un período mayor a los 120 días. Aproximadamente 70 días es el tiempo necesario para el desarrollo de los folículos secundarios a folículos antrales, y solamente 14 días para que estos maduren hacia el estadio preovulatorio o de folículos de de Graff. El período completo que abarca el

crecimiento folicular es mayor a los 220 días u 8 ciclos menstruales¹². Desde la semana 12 de gestación y hasta el momento del nacimiento, los folículos se desarrollan continuamente. Mostrando un pico máximo alrededor de la semana 20 de gestación, donde el número total de células germinales llega a 6-7 millones, momento en el cual la tasa de división comienza a declinar hasta el momento del nacimiento, cuando el número de oocitos es de 300.000-400.000 aproximadamente.

2. RECEPTORES NUCLEARES ACTIVADOS POR PROLIFERADORES PEROXISOMALES

Los peroxisomas son organelas en eucariotas que remueven sustancias tóxicas, están especializadas en funciones oxidativas, muchas de ellas relacionadas con el metabolismo de los lípidos. Los *receptores nucleares activados por proliferadores peroxisomas* (PPARs) son una familia de receptores nucleares que se activan por unión de diversos factores. Algunos de estos factores son naturales como insulina, ácido araquidónico y metabolitos eicosanoides, entre otros; mientras que otros son sintéticos como fibratos, herbicidas, plasticidas industriales y diferentes drogas como las glitazonas (figura 12).

Desde su descubrimiento en la década del 90²³ se les han atribuido numerosas funciones. Han sido identificados como miembros de la superfamilia de receptores de hormonas esteroideas²⁴.

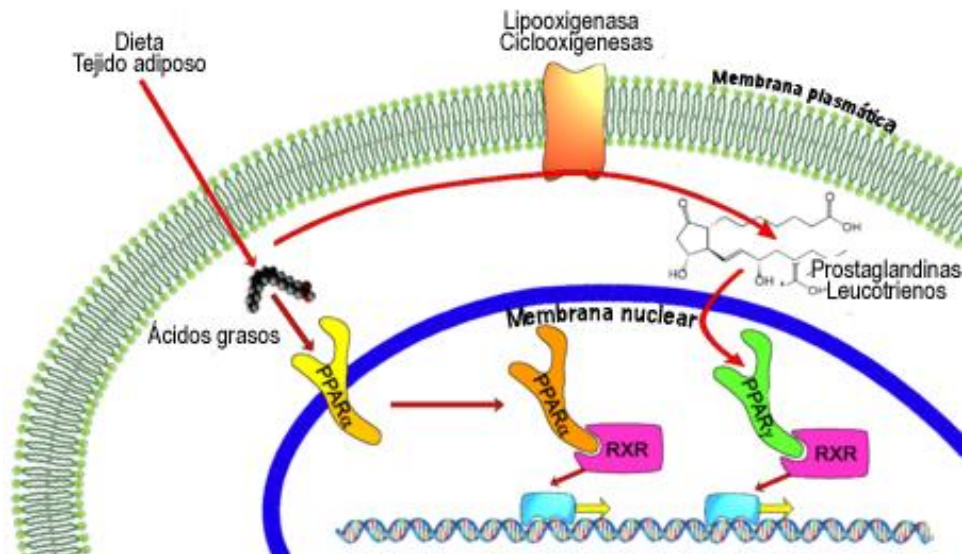


Figura 12: Esquema de los distintos factores que activan a los receptores activados por agentes proliferadores de peroxisomas (PPAR). Se indican los diferentes factores que activan a las isoformas de PPAR.

La familia de receptores PPAR está formada por tres miembros: PPAR α , PPAR δ/β y PPAR γ , cada uno de ellos es transcrito por un gen diferente²⁵. Particularmente, el gen de PPAR γ genera dos isoformas dadas por *splicing alternativo* del ARNm y por el empleo de promotores diferentes.

2.1. PPAR γ y su rol en el ovario

En el ovario, están expresados los tres isotipos de PPAR. Se ha demostrado la expresión de PPAR en cavidad antral y cuerpo lúteo²⁶⁻²⁸. Particularmente, se ha determinado PPAR γ en CG de rata²⁵, ratón²⁹, oveja²⁶, cabra³⁰, peces³¹ y humano³². Sin embargo, según la especie a la que estemos haciendo referencia, podemos encontrar variantes de PPAR γ dadas por splicing alternativo²⁵. Así, se han identificado cuatro variantes: PPAR γ_1 , PPAR γ_2 , PPAR γ_3 y PPAR γ_4 . Las isoformas PPAR γ_1 , PPAR γ_3 y PPAR γ_4 dan origen al mismo producto proteico, mientras que la variante PPAR γ_2 da origen a una proteína de mayor tamaño (30 aminoácidos adicionales en ratón³³, 28 aminoácidos adicionales en humanos³⁴).

Este isotipo, PPAR γ , se encuentra en folículos, se observa en el pasaje de folículos primarios o secundarios a folículos preovulatorios, y su expresión se incrementa a mediada que avanza el desarrollo folicular. Luego del pico de LH, el ARNm que codifica para PPAR γ disminuye²⁵, sugiriendo una ciclicidad junto con las hormonas reguladoras del ciclo femenino. La activación de PPAR γ en CG está regulada por hormonas sexuales y es por eso que se supone que podría estar involucrado en la proliferación de las CG, la esteroidogénesis y la maduración del oocito³⁵. Indirectamente, esto se ha demostrado por el hecho que la delección del gen que codifica para PPAR γ provoca subfertilidad³⁶.

Las *glitazonas* son utilizadas para el tratamiento de la diabetes tipo 2 y atenúan síntomas asociados con la insulina-resistencia, por lo que son utilizadas en el tratamiento de SOP³⁷. En cuanto a la relación directa de los PPAR γ sobre la maduración del oocito, se ha visto que la *rosiglitazona*, fármaco perteneciente a la familia de las *glitazonas*, estimula la activación de la *quinasa dependiente de AMP* (AMPK) y la consecuente activación del oocito en ratones³⁸. En SOP los tratamientos con troglitazonas, perteneciente a la misma familia de fármacos, son capaces de inhibir la secreción de P₄ y E₂^{27, 39}. Esta acción estaría basada en la acción directa de PPAR γ sobre los promotores de los genes correspondientes a dos enzimas de la esteroidogénesis: 3 β HSD y P450aro.

Por otro lado, se ha observado que PPAR γ regula la producción de prostaglandinas, las cuales están involucradas en la maduración folicular y la ovulación a través de la regulación del estrés oxidativo. También se ha descrito que COX2, enzima que cataliza la producción de prostaglandinas, está regulada en forma negativa por PPAR γ ⁴⁰. Asimismo, las prostaglandinas juegan un rol fundamental en el desarrollo folicular y la ovulación⁴¹⁻⁴³ ejerciendo estos efectos vía la modulación de las especies reactivas del oxígeno^{44, 45} que a su vez están modulados por los PPARs.

Recientemente, activadores de PPAR γ han sido utilizados para inducir la ovulación en mujeres con SOP⁴⁶, y esto es lógico, dado que los receptores PPAR γ regulan el metabolismo lipídico y desórdenes asociados a la glucosa. Sin embargo, se desconoce la totalidad de acciones de estos receptores en reproducción, así como su uso terapéutico en el tratamiento de la infertilidad y los posibles efectos colaterales.

Con respecto a la preñez, se ha observado que PPAR γ es necesario durante la fase en la cual el embrión debe anclarse en el endometrio y en el desarrollo y funcionalidad de la placenta⁴⁷. En el trofoectodermo de blastocitos, se detectó una fuerte expresión de PPAR γ ³⁰, y la inactivación del mismo lleva a la reabsorción embrionaria⁴⁷. Fallas en la preñez pueden prevenirse subsanando la deficiencia de PPAR γ en células de placenta de ratones⁴⁷. Se ha demostrado que la expresión de PPAR α , PPAR β/δ y PPAR γ depende del tejido en la gestación: amnios, decidua y placenta⁴⁸. Los PPAR β/δ se encuentran fuertemente expresados durante la decidualización y regula la implantación⁴⁹, así como también se expresan en los sitios de implantación.

3. ESTADO OXIDATIVO

El estado o equilibrio oxidativo en un sistema es mantenido por un fino equilibrio entre la producción de especies reactivas del oxígeno (ROS, su sigla en inglés) y la capacidad de los sistemas biológicos de detoxificar rápidamente los productos intermedios o, en su defecto, reparar el daño resultante. Los entornos intracelulares de la mayoría de los organismos se mantienen en un estado reductor y es preservado por enzimas con un constante consumo energético. Desbalances en este estado, conocidos como estrés oxidativo, pueden causar efectos tóxicos a través de la producción de peróxidos y radicales libres que dañan a todos los componentes de la célula, incluyendo proteínas, lípidos y ADN.

Si bien, el estrés oxidativo está involucrado en muchas enfermedades⁵⁰⁻⁵², las ROS pueden resultar beneficiosas ya que pueden ser utilizadas, por ejemplo, por el sistema inmune. También son empleadas como moléculas de señalización celular⁵³.

3.1. Radicales libres y especies reactivas del oxígeno

Un radical libre ($R\cdot$) es una especie química que contiene uno o más electrones desapareados en sus orbitales externos. Un compuesto puede convertirse en $R\cdot$ captando o perdiendo un electrón. Asimismo, los $R\cdot$ también pueden formarse cuando un enlace covalente se rompe y cada electrón de la pareja compartida permanece en un átomo (fisión homolítica). Como consecuencia de poseer electrones desapareados, estas especies químicas son extremadamente reactivas, tienen, por tanto, vida media corta y su concentración en el estado estacionario es baja⁵⁴⁻⁵⁷.

La molécula de oxígeno (O_2), como tal, puede ser calificada de birradical puesto que tiene dos electrones desapareados, cada uno de ellos localizados en un orbital antienlazante π^* . Sin embargo, la reactividad de esta molécula es más baja de la que cabría esperar debido a que los espines de estos dos electrones presentan direcciones paralelas. Para que el O_2 pudiese oxidar un átomo o molécula que no fuese $R\cdot$ aceptando un par de electrones, estos deberían tener espines paralelos^{55, 57}. Según el principio de

exclusión de Pauli, los electrones de un orbital atómico o molecular nunca tienen direcciones paralelas, por tanto, para que el O_2 aumente su reactividad tendría que invertirse el espín de uno de los electrones de sus orbitales externos, o bien, sufrir una reducción secuencial y univalente produciendo especies reactivas de oxígeno (ROS) (figura 13).



Figura 15: Reducción secuencial y univalente del oxígeno molecular. O_2 , oxígeno molecular; $O_2^{\cdot-}$, anión superóxido; H_2O_2 , peróxido de hidrógeno; $OH\cdot$, hidroxilo; H_2O , agua.

Cuando un único electrón reduce la molécula de O_2 se produce el anión superóxido ($O_2^{\cdot-}$) (figura 14, ecuación 1). Esta es una especie química muy reactiva pero inestable en soluciones acuosas, ya que reacciona consigo misma mediante una reacción de dismutación^{55, 58}. Si son dos los electrones que se incorporan al O_2 se forma el ión peróxido (O_2^{2-}), cuya forma protonada es el peróxido de hidrógeno (H_2O_2). Este compuesto es peligroso para las células, porque es un potente oxidante que atraviesa fácilmente las membranas biológicas y del que se puede originar el radical hidroxilo ($OH\cdot$)^{56, 59, 60}. La reducción de O_2 por tres electrones también da lugar al $OH\cdot$. Esta especie es una de las más reactivas que se conocen y, por tanto, presenta una vida media y un radio de acción muy cortos (microsegundos y ángstrom, respectivamente). Así, es improbable que el $OH\cdot$ formado en la mitocondria, por si mismo, tenga un efecto directo en otras partes de la célula⁵⁶. Una fuente importante de $OH\cdot$ es la reacción de Haber-Weiss que es, a su vez, el balance de dos reacciones (figura 14, ecuaciones 2, 3 y 4)⁶¹⁻⁶³. Finalmente, la reducción tetravalente del O_2 origina una molécula de agua (H_2O).

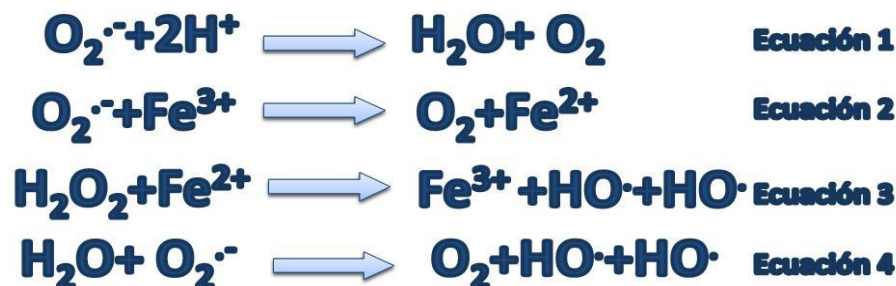


Figura 14: Formación de radicales libres. La ecuación 1 es llevada a cabo por el enzima superóxido dismutasa (SOD). La reacción 3 es conocida como el de Reacción de Fenton. La reacción 4 es conocida como Reacción de Haber-Weiss.

3.2. Toxicidad de xenobióticos mediada por ROS

La formación de $\text{R}\cdot$ está implicada en la toxicidad de un amplio rango de xenobióticos. Realmente muchos compuestos químicos, para ejercer su acción tóxica, requieren una activación metabólica a intermediarios reactivos que pueden ser $\text{R}\cdot$.⁶⁴⁻⁶⁶

La activación de muchos xenobióticos a intermediarios radicales se puede realizar por mecanismos enzimáticos o no enzimáticos. La mayor parte de los compuestos se activan por una vía catalizada enzimáticamente. Distintas reductasas están implicadas en esta activación de xenobióticos a $\text{R}\cdot$.⁶⁷ En cualquier caso, el $\text{R}\cdot$ puede sufrir una reducción adicional y convertirse en un metabolito capaz de interactuar con distintas biomoléculas, o bien, en presencia de O_2 , puede transferir el electrón a este último, produciendo $\text{O}_2^{\cdot-}$ y regenerando la molécula original.

La formación de intermediarios $\text{R}\cdot$ de muchos compuestos químicos está catalizada por la NAD(P)H-citocromo P450 reductasa, una flavoproteína que utiliza NADPH como dador de electrones⁶⁸. En estos casos, se establece un ciclo redox en el que hay un gran consumo de NAD(P)H y O_2 y generación de $\text{O}_2^{\cdot-}$ y otras ROS. Este ciclo redox conduce una situación de estrés oxidativo y, en casos extremos, a la muerte celular⁶⁹.

3.3. Reacciones con biomoléculas

La mayoría de los R[•] de interés biológico suelen ser extremadamente reactivos e inestables, por lo que tienen un período de vida media muy corto, que se puede medir incluso en fracciones de microsegundos. No obstante, cuando un R[•] reacciona con un compuesto no radical pueden formarse otros R[•], de manera que es posible que se generen reacciones en cadena y den lugar a efectos biológicos lejos del sistema que los originó. Un ejemplo lo constituye la peroxidación de lípidos^{56, 57, 70-72}.

Las proteínas, los lípidos insaturados, los ácidos nucleicos y los hidratos de carbono son los blancos fundamentales de las ROS.

3.3.1. Proteínas

Las proteínas son modificadas de diferentes maneras por las ROS. Estas, por ejemplo, pueden reaccionar directamente con el ligando metálico de muchas metaloproteínas. Se ha comprobado que el hierro de la oxihemoglobina puede reaccionar con el O₂^{-•} o con H₂O₂ para formar metahemoglobina⁷³. Otra importante hemoproteína citoplasmática, la catalasa (CAT), es inhibida por el O₂^{-•}, que la convierte en sus formas inactivas ferroxí y ferrilo⁷⁴. Por último, el H₂O₂, producto de la dismutación del O₂^{-•}, también puede reducir el Cu⁺² de la superóxido dismutasa CuZn (SODCuZn) a Cu⁺¹ reaccionado después con él y generando OH[•]. A su vez, este ataca a un residuo adyacente de histidina del centro activo de la enzima, necesario para la actividad catalítica⁷⁵. Debido a la reactividad de las ROS con las moléculas insaturadas o que contienen azufre, las proteínas con proporciones elevadas de triptofano (Trp), tirosina (Tyr), fenilalanina (Phe), histidina (His), metionina (Met) y cisteína (Cys) pueden sufrir modificaciones aminoacídicas. Estas reacciones dan lugar a alteraciones estructurales provocando entrecruzamientos y fenómenos de agregación, que se ven favorecidos por la formación de puentes disulfuro intra e intermoleculares^{57, 76, 77}. Los enlaces peptídico también son susceptibles de ser atacados por las ROS. Estos enlaces pueden romperse tras la oxidación de residuos de prolina (Pro) por OH[•] o O₂^{-•78}. Finalmente, las ROS pueden generar

subproductos al reaccionar con las proteínas que amplificarían el daño inicial. Un ejemplo lo constituye la oxidación de Trp hasta H_2O_2 y N-formil kinureina, un compuesto que, al reaccionar con grupos amino, provoca entrecruzamiento entre proteínas y/o lípidos^{73, 79}.

3.3.2. Lípidos

El OH^\cdot e $O_2^{\cdot-}$, así como el oxígeno singlete pueden reaccionar con los ácidos grasos de los fosfolípidos y otros componentes lipídicos de las membranas para formar hidroperóxidos lipídicos^{80, 81}. Este proceso de peroxidación lipídica comienza cuando la ROS quita el átomo de hidrógeno de uno de los carbonos metilenos de la cadena carbonada para formar un radical libre lipídico (L^\cdot). Los ácidos grasos poliinsaturados de membrana son especialmente susceptibles de ser atacados por ROS, puesto que contienen grupos metilenos separados por dobles enlaces que debilitan el enlace C-H metileno. El L^\cdot se combina con otra molécula de O_2 y así se establece una cadena de propagación del daño peroxidativo. Por su parte, el $O_2^{\cdot-}$ puede entrar en contacto con iones metálicos de transición, produciendo más ROS que iniciarán y propagarán otras reacciones en cadena. Así, las membranas resultarán seriamente dañadas y, por tanto, su funcionalidad se verá alterada⁸². Los productos finales del proceso de peroxidación lipídica, entre los que se incluyen hidrocarburos volátiles, alcoholes o aldehídos, pueden difundir lejos del lugar donde se originaron y causar edema celular e influir en la permeabilidad vascular, inflamación y quimiotaxis^{60, 70, 72}. Uno de los productos finales de la peroxidación de ácidos grasos con tres o más dobles enlaces, el malodialdehído (MDA), puede causar entrecruzamientos y polimerización de distintos componentes de la membrana⁸³. Así pues, las propiedades de las membranas resultan aún más alteradas.

3.3.3. Ácidos nucleicos

La citotoxicidad de estas especies químicas, en gran parte, es una consecuencia de las aberraciones cromosómicas producidas por las modificaciones que sufren las bases y los azúcares del ADN al reaccionar con las ROS, especialmente el OH^\cdot ^{57, 84}. Las modificaciones químicas de los nucleótidos provocan, en muchos casos, la ruptura de la

hebra de ADN. Si el daño que se origina es grande y no puede ser reparado, se produce una mutación, o bien, la muerte celular^{85, 86}. Se ha comprobado, por ejemplo, que la ruptura del ADN que ocurre durante la explosión respiratoria producida por los neutrófilos en respuesta a determinados estímulos, puede causar la muerte de estas células e inducir procesos autoinmunes⁸⁷.

3.3.4. *Hidratos de carbono*

Los hidratos de carbono son dañados por las ROS en menor proporción que otras moléculas. Azúcares tales como la glucosa, el manitol o ciertos desoxiazúcares pueden reaccionar con el OH[•] para producir sustancias reactivas⁷⁰. Asimismo, los polisacáridos que sufren el ataque de las ROS, se fragmentan en unidades más sencillas.

3.4. **Antioxidantes**

A pesar de que las ROS son extremadamente reactivas, las células disponen de sistemas de protección frente a ellos (figura 16). De hecho las ROS se están produciendo continuamente en el organismo⁶⁴, el problema solo surge cuando hay una sobreproducción o cuando los sistemas antioxidantes están debilitados^{62, 88}.

El organismo tiene un eficiente sistema para protegerse del daño oxidativo. Los mecanismos antioxidantes con que operan los seres vivos, particularmente los seres humanos, son múltiples, y dependen del tipo de especie reactiva y del lugar donde ésta se genera. Dentro de las células, el sistema antioxidante es principalmente de tipo enzimático y en el espacio extracelular, es decir, en los fluidos biológicos como el plasma, el sistema antioxidante es principalmente de tipo no enzimático. De este modo, contamos con antioxidantes específicos capaces de actuar oportunamente en distintos lugares.

3.4.1 Sistema de defensa enzimático

La primera defensa antioxidante en el interior de la célula está dada por las enzimas antioxidantes. Son endógenas y su acción depende de la presencia de un metal que puede ser cobre, hierro, magnesio, zinc o selenio. Actúan de dos formas: evitando la formación de ROS a partir de otras moléculas o convirtiendo las ROS existentes en moléculas menos perjudiciales, con menos capacidad para reaccionar y dañar otras moléculas vecinas.

Dentro de los sistemas enzimáticos se halla:

a) *Familia de las superóxido dismutasas (SOD)*. Esta familia está constituida por metaloenzimas que convierten al $O_2^{\cdot -}$ a H_2O_2 , se encuentran virtualmente en todos los organismos aerobios. Son cuatro tipos de enzimas, y cada una de ellas se nombra según el metal que se encuentra en su sitio activo: CuZnSOD, CuSOD, FeSOD y MnSOD.

b) *Catalasa (CAT)* y las *peroxidasas* que transforman el H_2O_2 en agua y están ampliamente distribuidas en bacterias aerobias, plantas y animales. La glutatión peroxidasa (GPx) y la glutatión S-transferasa participan en la detoxificación de xenobióticos como herbicidas, y usan el glutatión reducido (GSH) como sustrato. Las peroxidasas no específicas se han encontrado en plantas y bacterias y pueden usar una amplia gama de sustratos⁸⁹.

En los fluidos extracelulares no se encuentran CAT ni peroxidasas y la SOD se encuentra en cantidades muy pequeñas. Sin embargo, la lista de reductores extracelulares es amplia e incluye a proteínas con capacidad de prevenir reacciones catalizadas por iones metálicos, uniéndose a metales y complejos metálicos biológicos de hierro y cobre⁹⁰. Entre estos se cuentan:

a) *Ceruloplasmina*: tiene actividad ferroxidasa, se une a cobre e inhibe reacciones tipo Fenton (figura 14, ecuación 3).

b) *Transferrina y lactoferrina*: se unen al hierro e inhiben reacciones tipo Haber-Weiss (figura 14, ecuación 4).

c) *Haptoglobina y Hemopexina* participan en la inhibición de la peroxidación lipídica catalizada por la hemoglobina.

d) *Albumina* que tiene una función poco clara, se une al hierro y al cobre pero no inhibe las reacciones Fenton.

3.4.2. Sistema de defensa no enzimático

A la primera defensa antioxidante se suma otra: los antioxidantes no enzimáticos

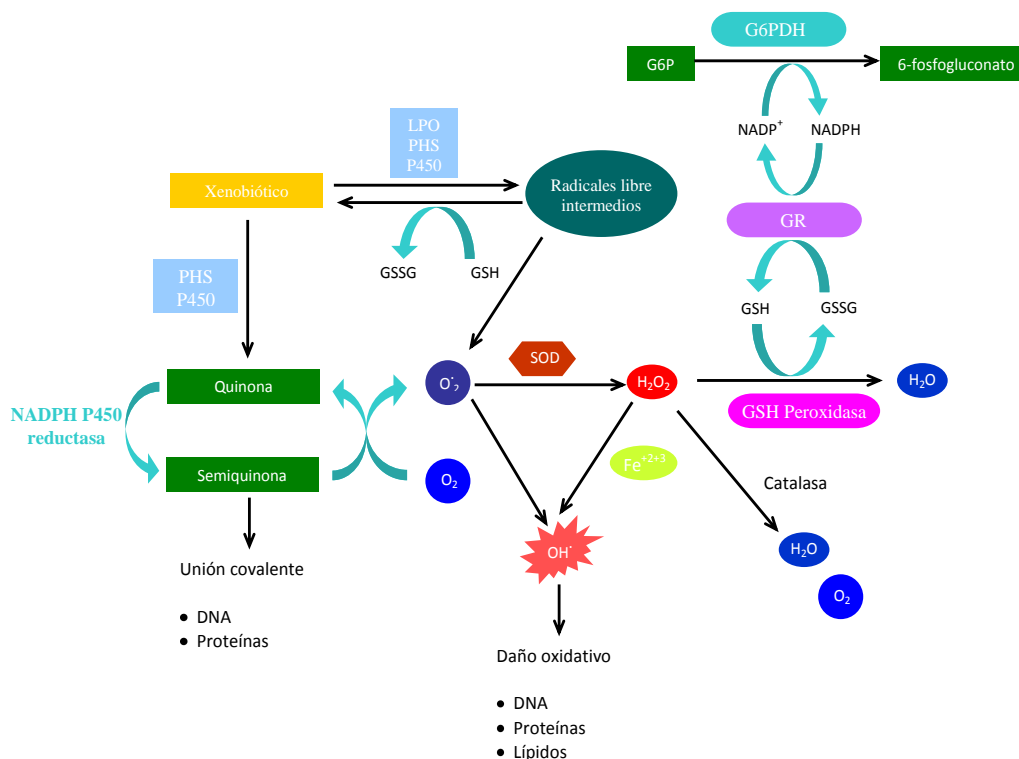


Figura 16: Sistemas antioxidantes. Los ROS pueden generarse a través del metabolismo de xenobióticos o mediante el ciclo de las quinonas. Las enzimas superóxido dismutasa (SOD), catalasa (CAT), GSH peroxidasa y los complejos citocromos P450 son los responsables de la neutralización de las ROS generadas, mientras las enzimas glucosa-6-fosfato deshidrogenasa (G6PDH) y la glutatión reductasa (GR) producen NADPH y glutatión reducido (GSH), respectivamente, actuando como reductores de los sistemas (defensas no enzimáticas).

que actúan tanto a nivel celular como extracelular. Son los responsables de la capacidad antioxidante de los fluidos biológicos, como el plasma, y de la protección del daño oxidativo de las distintas partículas y macromoléculas circulantes. Estos antioxidantes son sustancias de diverso tipo que previenen o demoran el daño molecular. Para lograrlo, ceden un electrón a las ROS, con lo cual las desactivan y “apagan” el proceso. Al hacer esto se consumen, ya que la estructura molecular del antioxidante sufre daño o modificación química, transformándose en ROS inactivos o menos efectivos. Sin embargo, ello tiene un costo mucho menor para el organismo que si esa modificación o daño la sufriera una molécula con una función biológica más importante. Por ejemplo, es preferible la alteración química de una molécula de vitamina E, que puede ser reconstituida por otro antioxidante o reemplazada a través de la dieta, que el daño al material genético y sus consecuencias.

3.4.2.1. Metabolitos

a) El *glutación* (γ -glutamil-cisteinil-glicina) en su forma reducida (GSH), es el antioxidante que se encuentra en mayor concentración intracelular. A través de distintas vías no enzimáticas puede eliminar ROS. Actúa, también, como cofactor de la GPx para detoxificar H_2O_2 . El GSH está involucrado en otros procesos metabólicos, como el mantenimiento de comunicación intercelular, el transporte intracelular de cobre y es cofactor de algunas reacciones enzimáticas. Participa en la regulación del estado redox de los disulfuros en proteínas con otras moléculas como la tioredoxina y glutaredoxina entre otros tioles. La restauración de la molécula de GSH está a cargo de la enzima glutación reductasa (GR), la cual mediante la oxidación del NADPH reduce al glutación. El GSH está sujeto a control hormonal y a su vez puede modular la expresión hormonal al regular los receptores hormonales que contienen grupos tioles o disulfuros, como por ejemplo el receptor NMDA (N-metil D-aspartato), el cual tiene grupos sulfhidrilos y está sujeto a control redox⁸⁹.

b) La *bilirrubina* y el *ácido úrico* se han propuesto como antioxidantes al unirse a metales e impedir reacciones tipo Fenton (figura 14, ecuación 3). El ácido úrico también es eficiente protegiendo contra el ataque del ozono y NO_2^- .

c) Los aminoácidos con capacidad para secuestrar iones metálicos, son susceptibles a la oxidación en presencia de H_2O_2 ⁹¹.

d) La *melatonina* atrapa al radical OH^\cdot , además de estimular enzimas antioxidantes importantes (SOD, GPx y GR), se considera actualmente como un importante antioxidante. En dosis farmacológicas es efectiva para reducir el daño ocasionado por agentes tóxicos⁹².

3.4.2.2. Antioxidantes derivados de la dieta

Los antioxidantes derivados de la dieta parecen ser importantes para mantener una buena salud complementando las funciones de las defensas celulares. Entre los más importantes antioxidantes obtenidos a partir de la dieta están los carotenoides, el α -tocoferol y el ácido ascórbico, los dos primeros son antioxidantes liposolubles que disminuyen el daño fotoquímico en la oxidación de lípidos en el ojo y en la piel. El ácido ascórbico es requerido como cofactor por diferentes enzimas. Existen enfermedades en las cuales se produce una disminución del ácido ascórbico y, por lo tanto, se genera un estado de estrés oxidativo, como por ejemplo la artritis reumatoide⁹⁰. Algunos antioxidantes tienen funciones paradójicas en tanto que pueden funcionar como prooxidante, como el ácido ascórbico cuando está en presencia de hierro o cobre⁹⁰.

3.5. Estrés oxidativo en el ovario

Existen más de 100 enfermedades producidas por el desbalance oxidativo y las especies reactivas que se generan⁹³⁻⁹⁶. Existe una extensa bibliografía que analiza el rol que juegan las ROS sobre el tracto femenino, especialmente los ovarios (revisado en Agarwal y col., 2005⁹⁷). Modelos animales y estudios en humanos plantean un papel fundamental de las ROS sobre el desarrollo y maduración de los oocitos, la formación,

funcionalidad y muerte del CL y cómo estas afectan la viabilidad del embrión y, por lo tanto, las tasas de implantación⁹⁸. Por otro lado, son fundamentales durante la interacción entre gametas y en el proceso de fertilización.

Las ROS poseen tanto una acción fisiológica como fisiopatológica en el tracto femenino. Durante el ciclo femenino, el embarazo⁹⁹, el parto¹⁰⁰ y la menopausia¹⁰¹ cumple un rol de moléculas señal, actúan como mensajeros celulares si se encuentran en niveles bajos. Sin embargo, si se produce un desbalance oxidativo, estas especies poseen una acción fisiopatológica caracterizada por daño a lípidos, inhibición de la síntesis proteica y depleción de ATP. Esta doble capacidad de las ROS existe gracias a una adecuada cantidad de antioxidantes, como el GSH, y a la acción de diferentes enzimas, como SOD.

Combelles y colaboradores (2010)¹⁰² han detectado la expresión de tres isoformas de SOD en oocitos, células del cumulus y en CG, así como en el líquido folicular de bovinos, encontrando diferencias entre los estadios foliculares y la expresión de las diferentes isoformas. De la misma forma se han detectado las actividades de otras enzimas antioxidantes, como CAT y GPx, que protegen tanto a oocitos como a embriones¹⁰³.

4. SÍNDROME DEL OVARIO POLIQUÍSTICO

El *Síndrome del Ovario Poliquístico* (SOP) es una patología endocrinológica muy frecuente en mujeres en edad reproductiva, afectando entre el 4-18% de esta población a nivel mundial¹⁰⁴. Las alteraciones que presentan estas mujeres son heterogéneas e incluyen anovulación crónica, amenorrea, infertilidad, evidencias clínicas y bioquímicas de hiperandrogenismo y quistes en los ovarios. A pesar de los esfuerzos para definir su etiología y conocer su patogénesis, estas aún permanecen sin ser totalmente aclaradas. Sin embargo, existe evidencia que apoya la base genética del mismo, por tratarse de un síndrome fuertemente familiar, en donde varios genes estarían involucrados, dada la cantidad de fenotipos existentes^{105, 106}. Tanto la expresión clínica como bioquímica de SOP está afectada ampliamente por factores ambientales como la dieta y el ejercicio (figura 17)¹⁰⁷.

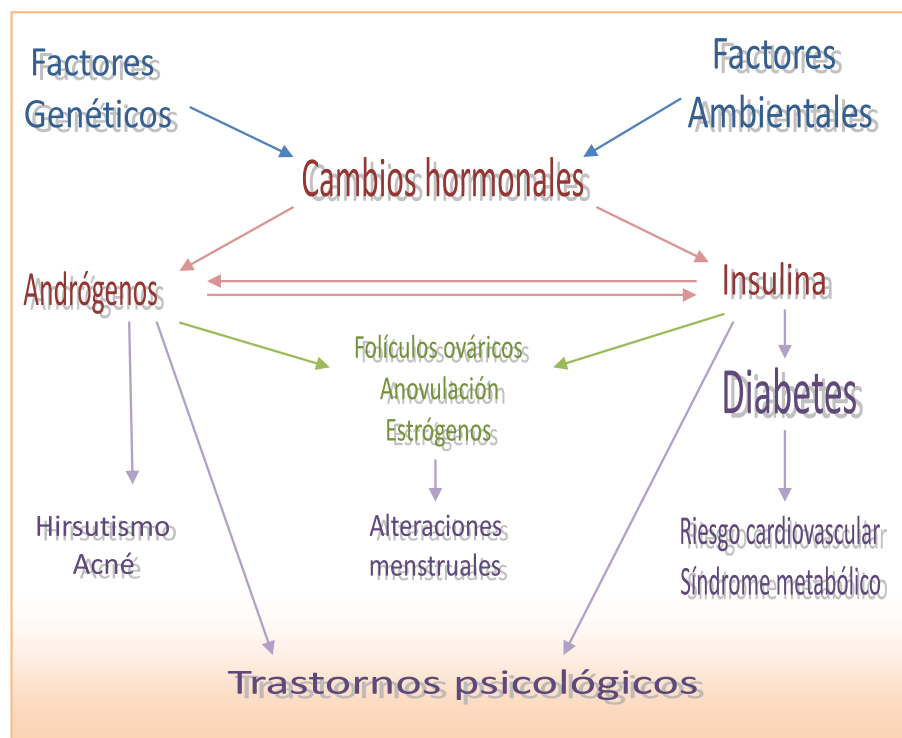


Figura 17: Esquema de etiología y características clínicas del Síndrome del Ovario Poliquístico (SOP). Se mencionan caracteres genéticos y ambientales, relacionándolos entre sí, mediante las flechas (azules: repercusión sobre los cambios hormonales; rojos: endocrinopatías generadas; violetas: trastornos metabólicos y sistémicos; verdes: repercusiones sobre el sistema reproductor femenino). Adaptado de Teede 2010.

Las mujeres con SOP pueden presentar secuelas de diferentes índole (figura 17), como trastornos psíquicos: baja autoestima, alteraciones en el estilo de vida, depresión, ansiedad, entre otros^{108, 109}; alteraciones reproductivas: infertilidad y complicaciones durante el embarazo¹¹⁰, y alteraciones metabólicas: dislipidemia, resistencia a la insulina, síndrome metabólico, riesgo cardiovascular¹¹¹⁻¹¹³.

Si bien la fisiopatología de este síndrome no ha sido totalmente aclarada, Yen y colaboradores (1970)¹¹⁴ describieron las anomalías en el eje hipotálamo-hipófisis-ovarios evidenciadas por la secreción anormal de la *hormona folículo estimulante* (FSH) y la hipersecreción de la *hormona luteinizante* (LH), convirtiéndose este hallazgo en uno de los parámetros de diagnóstico del SOP: la relación LH/FSH. Junto con esto, el desarrollo de ensayos sensibles y específicos para la determinación de andrógenos convierte a la hiperandrogenemia en el pilar de dicho diagnóstico¹¹⁵, detectándose entre el 60 a 80% de los casos. Más tarde, a inicios de 1980, se descubrió la asociación de este síndrome con la hiperinsulinemia entre el 50 y 80% de los casos, especialmente en aquellos más severos, a través de la relación con el hiperandrogenismo¹¹⁶.

4.1. Criterio de diagnóstico

El SOP fue descrito por primera vez hace más de 70 años¹¹⁷ y en la actualidad es la endocrinopatía más común en la edad reproductiva de la mujer¹¹⁸. Es la principal causa de desordenes en la ovulación¹¹⁹. Sin embargo, la falta de una definición consensuada ha limitado de manera importante el avance en el conocimiento científico con respecto a su epidemiología, etiopatología, genética, terapéutica y comprensión. Es probable que el mayor obstáculo para alcanzar este consenso se deba a la marcada heterogeneidad, complejidad y dinámica del fenotipo de este síndrome¹²⁰, lo cual hace imposible establecer un diagnóstico utilizando un criterio único, por lo que es necesaria la aproximación por combinación de ellos¹²¹.

En Mayo de 2003, los miembros de la Sociedad Europea de Reproducción Humana y Embriología (ESRHE) y la Sociedad Americana de Medicina Reproductiva (ASRM) establecieron el Consenso del Síndrome del Ovario Poliquístico, en Rotterdam. En dicha reunión, se concluyó que SOP es un síndrome de disfunción ovárica cuyas características más importantes son el hiperandrogenismo y la morfología de los ovarios poliquísticos en la ultrasonografía, y cuyas manifestaciones clínicas incluyen irregularidades menstruales, signos de excesos de andrógenos y obesidad. Así, se estableció que el diagnóstico estaría dado por la presencia de dos de los siguientes criterios:

1. Oligo o anovulación.
2. Signos de hiperandrogenismo clínico o bioquímico.
3. Ovarios poliquísticos en la ultrasonografía.

Se debe excluir otras patologías que causen irregularidades menstruales e hiperandrogenismo, como ser el Síndrome de Cushing, hiperprolactinemia, neoplasia o hiperplasia adrenal.

4.2. Desórdenes asociados

Al amplio espectro de alteraciones clínicas de SOP las podemos dividir en *desórdenes metabólicos, reproductivos y de la salud en general*, donde sus combinaciones y grado de expresión varían entre los diferentes individuos e incluyen a parientes de primer grado¹²².

4.2.1. Desórdenes metabólicos

Entre los más comunes se encuentra la insulina-resistencia e hiperinsulinemia compensadora, alteraciones en las células β pancreáticas secretoras de insulina y diabetes mellitus II y obesidad abdominal y dislipidemia. Esta última se traduce como un aumento en los triglicéridos séricos y una disminución en el colesterol de baja densidad (LDL)^{123, 124}. La resistencia a la insulina pareciera tener un efecto pivote, ya que estimula la lipólisis y altera la expresión de las lipasas. Pueden o no estar asociadas a un aumento del índice de

masa corporal (IMC, definido como el peso corporal en relación al cuadrado de la altura del individuo). La insulina-resistencia posee un efecto paradójico, por un lado genera hiperinsulinemia compensadora, asociada al metabolismo de lípidos y proteínas y modulación del metabolismo de los andrógenos¹²⁵. Eventualmente, estas pacientes pueden desarrollar *diabetes mellitus del tipo II*.

4.2.2. *Desórdenes reproductivos*

Las disfunciones reproductivas generalmente se traducen en oligo/amenorrea como resultado de oligo/anovulación. Generalmente, están asociadas con la generación de quistes en los ovarios e hiperplasia uterina. Alrededor del 60% de las mujeres con SOP diagnosticado son fértiles, esto quiere decir que logran el embarazo luego de 12 meses de mantener relaciones sexuales sin protección¹²⁶, aunque este tiempo muchas veces suele ser superior dada la alta incidencia de los abortos prematuros. Las alteraciones del ciclo menstrual se encuentran altamente relacionadas con alteraciones hormonales que marcan este síndrome: hipersecreción de LH e hiperandrogenismo.

5. HIPERANDROGENISMO

Las funciones fisiológicas de los andrógenos en las mujeres son diversas e importantes, destacando su papel en la fisiología del hueso, en particular de la adquisición y mantenimiento de la densidad mineral ósea^{127, 128}. Tienen un conocido rol en el proceso reproductivo, que va desde las características sexuales secundarias durante la pubertad, donde actúan como precursores de las hormonas esteroideas femeninas, hasta su controversial función en el desarrollo sobre la libido¹²⁹. Actualmente, se investigan otras funciones sobre el sistema cardiovascular¹³⁰, el sistema nervioso central e incluso un papel inhibitorio en el desarrollo del cáncer de mama¹²⁹.

En la mujer, la síntesis de andrógenos ocurre en los ovarios, estimulados por las gonadotropinas hipofisarias, FSH y LH, y la glándula suprarrenal, estimulados por la *adenocorticotrofina hipofisaria* (ACTH). No se ha demostrado regulación negativa que module la homeostasis de los andrógenos^{128, 131}. Los principales andrógenos producidos en la mujer son: dehidroepiandrosterona-sulfato (DHEA-S), *dehidroepiandrosterona* (DHEA), *androstenediona*, *testosterona* y *dehidrottestosterona* (DHT). A medida que aumenta la potencia de un andrógeno en particular, la concentración sérica del mismo disminuye, de esta manera DHEA-S y DHEA son los más representados en la circulación pero los menos potentes como andrógenos. En rigor, DHEA-S y DHEA son proandrógenos, ya que deben ser convertidos a T (figura 7).

El SOP está caracterizado fisiopatológicamente por un hiperandrogenismo ovárico funcional caracterizado por un aumento de los precursores de testosterona en las CT: *17-hidroxiprogesterona* y *androstenediona*, tanto a nivel basal como en respuesta a LH^{132, 133}. Esta desregulación de la esteroidogénesis ovárica está dada por un aumento en la actividad enzimática de la P450_{c17α} y la 3βHSD¹³⁴. Ambas enzimas están hiperactivadas tanto a nivel adrenal como ovárico. Sin embargo, el peso de la evidencia sugiere que la mayoría de los casos es el ovario el principal contribuyente del exceso en la secreción androgénica.

5.1. Modelos animales de hiperandrogenismo

Se han desarrollado diferentes modelos murinos¹³⁵⁻¹³⁷ de SOP empleando DHEA. La elección de este andrógeno para la inducción de SOP se debe a que, por un lado, es el principal producido por el ovario de mujeres con SOP¹³⁸, y por otro, posee propiedades inmunomoduladoras¹³⁹⁻¹⁴² permitiendo estudiar aspectos inmunológicos de esta patología.

Lee y colaboradores (1991)¹³⁶ desarrollaron un modelo de hiperandrogenización en ratas administrando DHEA durante 10 ó 20 días para el estudio de los cambios en el ovario y el perfil hormonal. Identificando grupos de animales experimentales heterogéneos con respecto a la histología ovárica, con y sin quistes en los ovarios. Las secciones histológicas de estos ovarios mostraron folículos sanos y atrésicos en diferentes estadios de citomorfosis y degeneración. Estos grupos también resultaron heterogéneos con respecto a sus perfiles hormonales. Anderson y colaboradores (1992)¹³⁷, llegaron a conclusiones similares, mostrando que DHEA genera irregularidades en el ciclo ovárico, induciendo a la anovulación, y formación de quistes, por unión estrecha entre las CG y aumento de células de músculo liso que comprimen la pared de los quistes. Ambos grupos establecieron que la formación de quistes en los ovarios de ratas se desarrolla luego del tratamiento con DHEA, asociado a altos niveles de andrógenos, E₂ y prolactina circulantes.

El empleo de un modelo de hiperandrogenismo con DHEA durante 20 días en ratones BALB/c^{135, 143-145} mostró un desbalance oxidativo y aumento en los niveles séricos de P₄, E₂ y prostaglandina E (PGE). Por otro lado, se observó que DHEA altera la expresión fenotípica de linfocitos T (CD4⁺ y CD8⁺) del ovario y de los ganglios drenantes del mismo^{135, 146}. Se demostró que en tejido ovárico, la administración de DHEA genera desórdenes endócrinos a través de la señalización de AMP-quinasa (AMPK), del sistema prostaglandinas/ciclooxigenasa 2 (PGs/COX2) y del sistema óxido nítrico/óxido nítrico sintasa (NO/NOS) causados por el hiperandrogenismo¹⁴⁴.

5.2. *Foliculogénesis, esteroidogénesis e hiperandrogenismo*

Existen factores, muchos de ellos no conocidos, en la fisiología del ovario 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. Estos factores regulan el *reclutamiento inicial* y el *reclutamiento cíclico* del ovario. El primero de ellos se da de forma continua, comenzando en el preciso momento en que se han formado los folículos, antes de la pubertad, y es el responsable de que los folículos primordiales abandonen su estado de reposo y comiencen la etapa de crecimiento. Durante este proceso, los 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 los folículos en reposo¹². Por otro lado, el reclutamiento cíclico comienza después de llegada la pubertad como resultado de un aumento en los niveles de FSH circulante, que durante los ciclos reproductivos se secretará de forma pulsátil. Esto permite que una cohorte de folículos antrales sea rescatada del proceso de atresia (figura 11). En este momento los folículos han completado su crecimiento, adquirido la zona pelúcida y se encuentran competentes para reasumir la meiosis. De este modo solo un número de folículos sobrevivirá, mientras que el resto entrara en atresia.

En mujeres con SOP todo este fenómeno “cíclico” se encuentra alterado, lo que produce que en el ovario el número de folículos pequeños sea excesivo, y por razones hasta ahora desconocidas, el proceso de selección no ocurre y el desarrollo folicular se detiene¹⁴⁷.

En el intento de poder conocer cómo se producen las alteraciones ováricas que originarían al SOP, se han desarrollado diferentes teorías. Cada una de ellas ha sido postula para explicar cómo diferentes alteraciones primarias conducirían a la expresión de un síndrome que, si bien es muy heterogéneo, se expresa como anovulación e hiperandrogenismo.

De esta forma, la Teoría Central¹⁴⁸, explica que un desacople en la regularidad secretora entre gonadotrofinas, especialmente LH, y esteroides ováricos, como los andrógenos, alterarían la función ovárica. Por su lado, se ha postulado la Teoría Adrenal¹⁴⁹, en la cual se tiene en cuenta que entre el 50 y 70% de las mujeres con SOP presentaría un exceso de andrógenos adrenales, los que incidirían en la atresia folicular y disfunción ovulatoria. Factores como los genéticos y ambientales han sido tenidos en cuenta al momento de postular un origen genético para el SOP¹⁵⁰ o una disrupción metabólica dada los malos hábitos alimenticios¹⁵¹, respectivamente.

El origen multifactorial de este síndrome ha llevado a que diferentes grupos de estudio establezcan que una alteración ovárica primaria conduciría a una hipertrofia tecal y sobreproducción de andrógenos. Abbot y colaboradores (2002)¹²² han planteado que el desarrollo de SOP es un proceso linear con origen anterior a la adolescencia. Sugiriendo que una secreción anormal de LH y andrógenos, ciclicidad menstrual y secreción y acción de la insulina son representantes de la exposición de fetos femeninos a altos niveles de andrógenos. Sin embargo, este fenómeno parece poco probable en SOP dado que no hay ninguna fuente materna que produzca andrógenos en exceso y que estos afecten al feto femenino. Más aún, mujeres embarazadas con elevados niveles de testosterona circulante (por ejemplo, tumores de ovario) es poco probable que den a luz a niñas con características masculinas¹⁵². Juntos, altas concentraciones de proteína de unión a hormonas sexuales y un eficiente metabolismo placentario de andrógenos proveen un buffer previniendo que el exceso de andrógenos provenientes de la madre llegue al feto. En otras palabras, es difícil imaginar que el exceso de andrógenos traspase la barrera placentaria desde una madre con SOP hacia una niña sin dicha patología, a menos que existan circunstancias que comprometan la funcionalidad placentaria, como la deficiencia de aromatasa placentaria, el estrés o una dieta inadecuada. Los andrógenos producidos durante la diferenciación son potentes factores de transcripción de genes e inducen la transcripción de otros factores (tales como c-fos) que interactúan con sus propios receptores en muchos tejidos fetales.

Se ha encontrado evidencia de la asociación entre las variantes del locus de CYP11a (gen que codifica para la enzima P450_{scc}) con el hiperandrogenismo en mujeres con SOP¹⁵³. Si bien, es poco probable que genere SOP de manera exclusiva, variaciones de este locus pueden contribuir a la producción excesiva de andrógenos, apoyando la hipótesis de que la función ovario puede ser consecuencia de una determinación genética alterada. Es posible que una función anormal en las células de la teca sea la causa de un desarrollo folicular alterado. La hiperinsulinemia también contribuye al mecanismo de anovulación en mujeres con SOP, en hembras Rhesus y ovejas hiperandrogenizadas prenatalmente. La insulina-resistencia disminuye la esteroidogénesis ovárica. La insulina actúa de manera sinérgica con LH aumentando la esteroidogénesis e induciendo un arresto prematuro de los folículos en desarrollo¹⁵⁴. Este exceso de andrógenos fetales (y/o prepuberal¹⁵⁵) “programa” el control hipotálamo-hipófisis de LH, aumentando la distribución visceral de las grasas, además de predisponer a la insulina-resistencia y la anovulación, causando manifestaciones clínicas de hiperandrogenismo en adultos. Otros factores genéticos secundarios o el ambiente (como los malos hábitos alimenticios) pueden interactuar con este proceso y generar tantos fenotipos heterogéneos de este síndrome que aflige a tantas mujeres.

5.3. *Adolescencia e hiperandrogenismo*

La adolescencia ha sido considerada como un período crítico de desarrollo en nuestra cultura. Tanto en la conversación vulgar como en las obras novelistas, los autores dramáticos y los poetas han abundado en referencias a los "años tormentosos" comprendidos entre el final de la niñez y la edad adulta nominal. Los que han estudiado científicamente la conducta han señalado que la adolescencia representa un período de tensiones particulares en nuestra sociedad. Los de mayor espíritu biológico, han hecho hincapié en los ajustes que exigen los cambios fisiológicos enfocados a la pubertad, sin exceptuar los aumentos de las hormonas sexuales y los cambios en la estructura y función del cuerpo. Aunque existen diferencias de opinión con respecto a la importancia relativa de los factores biológicos, sociales y psicológicos, existe un acuerdo general en lo tocante

a que el período de la adolescencia ha presentado tradicionalmente problemas especiales de ajuste en nuestra sociedad.

En la mujer, la **menarca** (del griego: mes y principio) es el primer episodio de sangrado vaginal de origen menstrual, o primera “*menstruación*”. Marca el comienzo de la adolescencia y, desde las perspectivas sociales, psicológicas y ginecológicas, es frecuentemente considerada el evento central de la pubertad femenina, como la señal de la posibilidad de fertilidad. Este fenómeno está influido por factores genéticos y ambientales, especialmente nutricionales.

El SOP es un síndrome crónico, el cual comienza durante la adolescencia generando tanto trastornos psicológicos como reproductivos, deviniendo, durante la vida adulta, en complicaciones metabólicas e infertilidad. Es un desorden que se hace aparente e identificable en mujeres en edad reproductiva, pero se puede presentar desde la menarca hasta la menopausia. De igual forma sus características clínicas podrían aparecer de forma temprana, con una prevalencia en la adolescencia entre el 8-26%, de acuerdo con el criterio de clasificación. La presentación clínica de este síndrome en adolescentes es muy similar a la que se manifiesta en adultos¹⁵⁶.

Los signos clínicos típicos del SOP se generan desde antes de la adolescencia, lo cual puede ser caracterizado como una transición anormal y exagerada a la pubertad en cuatro procesos fisiológicos importantes:

1. Maduración del patrón de secreción de LH.
2. Incremento en la producción adrenal de andrógenos.
3. Incremento en la masa corporal.
4. Inicio de un patrón de resistencia a la insulina.

La expresión clínica podría reflejar cambios en la maduración del eje hipotálamo-hipófisis-ovario que normalmente ocurre en la pubertad, generando cambios en el patrón de secreción de LH (aumento en la amplitud de los pulsos) estimulando a las células de la

teca con una posible hiperestimulación de la producción de andrógenos ováricos en adolescentes con este síndrome.

Las manifestaciones clínicas del SOP pueden pasar desapercibidas durante la adolescencia, dado que estas son similares a esta etapa del desarrollo¹⁵⁷. Uno de los primeros signos de SOP en adolescentes son los ciclos irregulares, principalmente oligomenorrea, persistiendo por más de tres años. Asimismo, estas pacientes pueden presentar amenorrea primaria, secundaria o, por el contrario, hemorragia uterina anormal^{156, 157}.

En el presente proyecto nos propondremos estudiar algunas de las alteraciones que se podrían generar durante la foliculogénesis temprana en un estado hiperandrogénico, el cual es el rasgo fundamental en el diagnóstico de SOP. Nuestro objetivo es relacionar cómo la expresión anómala de PPAR γ sería responsable de la alteración en la esteroidogénesis e incremento del estrés oxidativo generando un incremento en la atresia folicular.

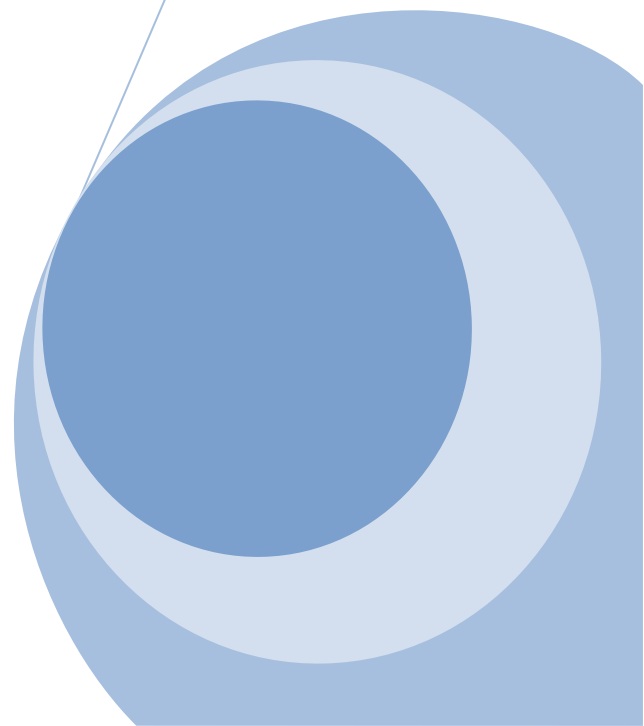
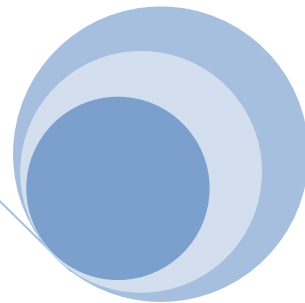
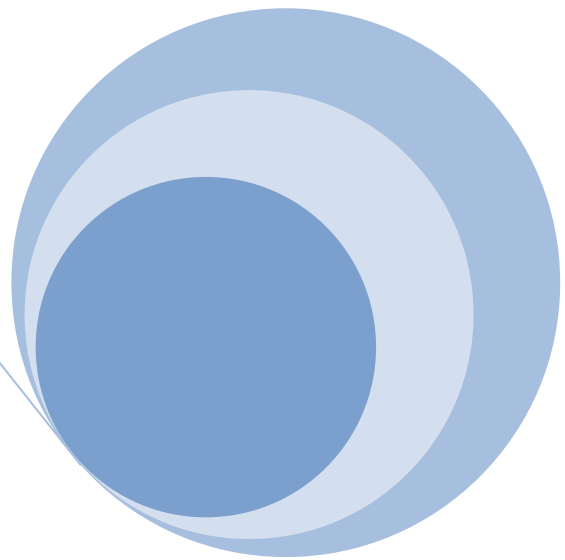
Según lo expuesto, la **HIPÓTESIS** de trabajo es que ***el hiperandrogenismo alteraría la función folicular a través de la alteración de la expresión de PPAR γ , en ovarios de rata prepúberes. Esto modificaría la esteroidogénesis ovárica, alterando la expresión de las enzimas reguladoras de esta vía y generaría un aumento en los niveles de apoptosis, a través de las especies reactivas del oxígeno generadas. Estos fenómenos se traducirían en una disminución de la actividad folicular y aumento de la atresia.***

Para ello se planteó como **OBJETIVO GENERAL** estudiar al sistema PPAR γ durante la foliculogénesis temprana y establecer su relación con el metabolismo lipídico y la apoptosis folicular. Así como evaluar cuál es su relación con el estado oxidante-antioxidante y analizar las alteraciones durante la esteroidogénesis en un ambiente hiperandrogénico.

Los **OBJETIVOS ESPECÍFICOS** de este trabajo de tesis fueron:

- ✓ Estudiar la expresión génica y proteica de PPAR γ durante la foliculogénesis temprana en condiciones de hiperandrogenismo.
- ✓ Estudiar alteraciones en la esteroidogénesis folicular en condiciones de hiperandrogenismo.
- ✓ Estudiar las posibles alteraciones en el estado oxidativo del ovario en condiciones de hiperandrogenismo.
- ✓ Evaluar la relación entre alteraciones del sistema PPAR γ e incremento de la apoptosis durante la foliculogénesis temprana.

***Materiales
y
Métodos***



1. MODELO EXPERIMENTAL

1.1. Animales

En este trabajo de tesis se emplearon ratas hembras de la colonia Sprague-Dawley prepúberes (21-23 días de edad). Los animales fueron mantenidos bajo condiciones controladas de temperatura ($23\pm 2^\circ\text{C}$) y luz (14 h luz: 10 h oscuridad, luces encendidas a las 7:00 am) y tuvieron acceso ad-libitum a comida y agua. Todos los procedimientos que involucraron animales fueron llevados a cargo de acuerdo con la “Guía para el cuidado y uso de animales de laboratorio” (Conicet, 1996).

1.2. Tratamientos

Inducción de la foliculogénesis

A los animales empleados en este trabajo se les administró 25UI/rata, de manera intraperitoneal (*ip*), de gonadotropina coriónica equina (eCG, Novormon). Esta hormona posee actividad FSH, estimulando la foliculogénesis, generando múltiples folículos, y posterior reclutamiento, en los ovarios¹⁵⁸.

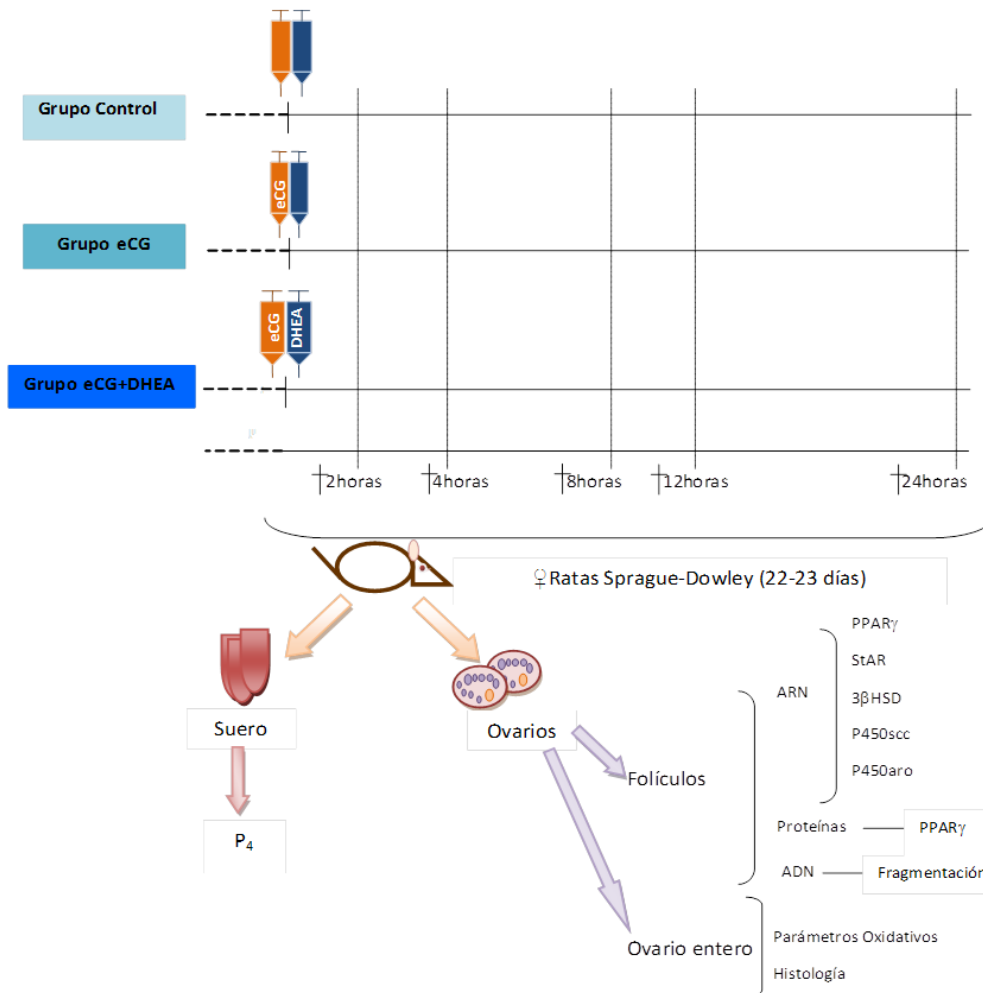
Hiperandrogenismo

El estado de hiperandrogénico se logró mediante la inyección, de forma subcutánea (*sc*), de 60mg/kg de peso de dehidroepiandrosterona (DHEA, Sigma Aldrich) preparada en aceite de maíz. La elección de este andrógeno se debe a que es el principal producido por el ovario de mujeres con SOP¹³⁸. La dosis de DHEA inyectada fue aquella utilizada previamente por Lee y col. (1991¹³⁶, Henmi y col. (2001)¹⁵⁹, Luchetti y col. (2004¹³⁵, 2008¹⁶⁰), Elia y col. (2006)¹⁴⁴, Solano y col. (2006)¹⁴⁵ y Sander y col. (2005¹⁴³, 2006¹⁴⁶) y es adecuada para promover un estado de hiperandrogenización.

Grupos de trabajo

Los animales fueron separados en distintos grupos y sacrificados a diferentes tiempos (esquema I):

- *Grupo eCG*: animales tratados con 25 UI/animal de eCG (*ip*).
- *Grupo eCG+DHEA*: animales tratados con eCG 25UI/ animal, (*ip*) y con DHEA 60mg/Kg peso corporal, (*sc*).
- *Grupo Control*: animales tratados con solución fisiológica (*ip*) y aceite de maíz (*sc*).



Esquema I: Grupos de trabajo. Cada animal fue tratado según se describe arriba. Fueron sacrificados a las 2, 4, 8, 12 y 24 hs post-tratamiento. Se emplearon los sueros y ovarios para las diferentes técnicas.

Se determinó el peso corporal de cada animal. Inmediatamente fueron anestesiados en cámaras de dióxido de carbono (CO₂) y sacrificados por decapitación. Se separaron el suero y los ovarios. Una vez determinado el peso de cada ovario, parte de estos fueron rápidamente procesados, según la determinación a realizar, o congelados a -80°C hasta su utilización.

Para la determinación de progesterona (P₄) y el análisis histológico, los animales fueron sacrificados mediante decapitación a diferentes tiempos post-inyección. Esto se realizó con el propósito de determinar en qué momento se producía la máxima actividad folicular.

Para el estudio de la expresión de PPAR γ , la vía esteroideogénica, el estado oxidativo y los niveles de apoptosis los animales fueron sacrificados en el momento de máxima actividad folicular.

Un grupo de animales (n=6) fue sacrificado inmediatamente (tiempo: 0hs) sin ningún tratamiento. Este grupo fue empleado como referencia para la comparación de los niveles de P₄ sérica y la expresión génica y proteica de PPAR γ .

2. OBTENCIÓN DE TEJIDOS

Los animales sometidos a los distintos tratamientos fueron sacrificados por decapitación a las 0, 2, 4, 8, 12 y 24 hs post-inyección. Los tejidos obtenidos fueron los siguientes:

- **Suero**: Luego de la decapitación, por exsanguinación se obtuvo la sangre. Inmediatamente, fue centrifugada a 3000 rpm durante 20 minutos, con el fin de obtener el suero. El mismo fue almacenado a -20°C para su posterior utilización.
- **Ovarios**: Se extrajeron inmediatamente después del sacrificio del animal mediante incisión longitudinal medio-ventral. Se determinó el peso de cada uno de ellos para luego procesarlos según la determinación a realizar. Aquellos que fueron utilizados para técnicas histológicas fueron inmediatamente fijados en paraformaldehído 4% (v/v) en PBS y almacenados a 4°C. Los ovarios que fueron empleados para determinar parámetros de estrés oxidativo fueron almacenados a -80°C hasta su uso. Los ovarios empleados para otras técnicas, fueron colocados en una placa de Petri conteniendo PBS (137 mM NaCl, 2.7 mM KCl, 4.3 mM Na₂HPO₄·7H₂O, 1.4 mM KH₂PO₄, pH 7.4) y, mediante la observación bajo microscopio

estereoscópico, se separaron los folículos sanos del resto del tejido conectivo según la técnica de Andreu y col. (1998)¹⁶¹. Para las determinaciones en las cuales se extrajo ADN, ARN y proteínas, los folículos correspondientes a ambos ovarios de un mismo animal fueron reunidos en un grupo y almacenados a -80°C. En el caso de las determinaciones de apoptosis por la técnica de Anexina V/Ioduro de Propidio, se emplearon ambos ovarios de dos animales, los cuales fueron disgregados enzimáticamente y utilizados de forma inmediata.

3. PREPARACIÓN DE MUESTRAS

3.1. Disgregación celular de los folículos

Los grupos de folículos de ratas (cada grupo contenía todos los folículos sanos de ambos ovarios de dos ratas) obtenidos previamente a partir de los animales de cada grupo de estudio fueron disociados tal como fue descrito previamente por Luchetti y col. (2004)¹³⁵. Brevemente, los folículos fueron disgregados enzimáticamente en medio de cultivo 199, suplementado con NaHCO₃ 25 mM, HEPES 25 mM y penicilina 50 IU/ml, con colagenasa libre de tripsina (740IU/100 mg tejido) y DNAsa (14 IU/100 mg tejido). Fueron lavados dos veces en medio de cultivo, dos veces en PBS y dos veces con PBS-EDTA 1 mM. Para eliminar los eritrocitos, las suspensiones celulares fueron sometidas a un gradiente Ficoll-Hystopaque 1.083 (Sigma, St. Louis, USA), centrifugadas a 1500 rpm por 20 minutos y lavadas con PBS-BSA 0.1% (p/v). Las células se contaron en un hemocitómetro, se verificó que la viabilidad fuera mayor al 80% por el método de exclusión de Azul de Tripano y se resuspendieron hasta obtener una concentración de 1×10^6 células/ml.

3.2. Aislamiento de ARN y proteínas totales

El contenido total de ARN y proteínas de cada grupo de folículos (los correspondientes a ambos ovarios de cada animal) de los distintos tratamientos fueron obtenidos utilizando Trizol® (Invitrogen Life Technologies), siguiendo las instrucciones del productor. Se trabajó en esterilidad para evitar contaminación de las muestras. Brevemente, las muestras fueron homogeneizadas en Trizol®. Se incubaron por 5 minutos a temperatura ambiente, se agregó cloroformo y se dejaron en reposo durante 3 minutos. Se centrifugó a 12000g por 15 minutos a 4°C y se transfirió la fase

acuosa (superior) a otro tubo para proseguir con la extracción de RNA, mientras que la fase orgánica (inferior) se recuperó para la posterior extracción de proteínas.

Aislamiento de ARN: El ARN se obtuvo por precipitación de la fase acuosa con isopropanol (1:1) y posterior centrifugación a 4°C durante 10 minutos a 12000 g. Se realizaron lavados con etanol 75%. Se resuspendió en agua bidestilada estéril y cuantificó por absorbancia a 260 nm. Las muestras fueron fraccionadas y almacenadas a -70°C para ser utilizadas posteriormente.

Aislamiento de proteínas totales: Se separó el ADN de las proteínas en la fase orgánica mediante precipitación con etanol absoluto e incubación durante 30 minutos. Posterior centrifugación a 4°C, se recuperó el sobrenadante y se agregó alcohol isopropílico para la precipitación de las proteínas. Luego de centrifugar a 12000 g por 10 minutos a 4°C se obtuvo un pellet de proteínas, el cual se lavo con una solución 0.3M de hidrocloreuro de guanidina en etanol 95%. Se resuspendieron en etanol absoluto, incubaron por 20 minutos y centrifugaron a 7500 g por 5 minutos a 4°C. Se descartó el sobrenadante y el pellet se secó por 5 minutos en bomba de vacío y fue resuspendido en SDS 1% (p/v) en agua. El contenido proteico de las muestras se determinó por absorbancia a 280 nm. Se fraccionaron y almacenaron a -20°C para ser utilizadas posteriormente.

4. DETERMINACIONES EXPERIMENTALES

4.1. Cuantificación de la producción de progesterona y estradiol por radioinmunoanálisis.

Los sueros de las hembras fueron obtenidos por centrifugación de la sangre (como se detalló anteriormente) y las hormonas esteroideas totales fueron extraídas realizando tres lavados con éter dietílico en un volumen 1:3 y luego evaporadas en estufa de vacío. La concentración de progesterona (P_4) y estradiol (E_2) en dichas muestras se evaluaron por la técnica de radioinmunoanálisis (RIA) con anticuerpos específicos provistos por el Dr. GD Niswender (Colorado State University, Fort Collins, CO), tal como fue descrito previamente por Motta y col. (2001)¹⁶². Brevemente, los reactivos y muestras fueron reconstituidos en el Buffer RIA correspondiente (para P_4 : 40mM $Na_2HPO_4 \cdot 2H_2O$, 34 mM NaH_2PO_4 , 154 mM NaCl, 0.1% Gelatina, 0.002% Azida Sódica, pH=7. Para E_2 : 0.05M Tris HCl, 0.1M NaCl, 0.1% Gelatina, 0.1% Azida Sódica, pH=8). Tanto los patrones como las muestras se incubaron a 4°C toda la noche en presencia del anticuerpo y del metabolito marcado con tritio correspondiente. En el caso de P_4 el metabolito fue 17 α -Hidroxi-

[1,2,6,7-³H] Progesterona, 60 Ci/mmol, 1 mCi/ml (Amersham Corporation, Arlington Heights, USA), y para el caso de E₂ se empleó [2,4,6,7,16,17-³H] Estradiol, 250μCi (Amersham Corporation, Arlington Heights, USA). Las uniones inespecíficas se separaron mediante el agregado de una suspensión de carbón activado-dextrán (Carbón 1%, Dextrán 0,1 % en Buffer de RIA) y posterior centrifugación a 2000g durante 15 minutos a 4°C. El sobrenadante se recogió en viales conteniendo líquido de centelleo, y se cuantificó la radioactividad en un contador de centelleo líquido beta. Los resultados se calcularon a partir de una curva patrón y se expresaron en pg de P₄ o E₂/ml de suero.

Nota: El anticuerpo para P₄ posee una alta especificidad, con baja reactividad cruzada: <2% para la 20α-hidroxi progesterona y para deoxicorticosterona y <1% para el resto de los esteroides presentes en suero. La sensibilidad es de 5-10 pg por tubo. Los buffers y metabolitos marcados radiactivamente utilizados fueron específicos para P₄. El anticuerpo para E₂ presentaba baja reactividad cruzada: <1% para P₄ y testosterona, <5% para estriol y <10% para estrona.

4.2. Análisis histológico por tinción con hematoxilina-eosina

Se emplearon ovarios de los tres grupos: control, eCG y eCG+DHEA para realizar el análisis histológico. Para ello, los animales fueron sacrificados como se detalla anteriormente y los ovarios aislados. Luego de limpiarlos de todo tejido graso, fueron fijados inmediatamente en paraformaldehído 4% durante 12 hs. La inclusión se realizó en parafina, cada ovario fue cortado en secciones seriadas de 6 micrones y con intervalos de 50 micrones y montados en portaobjetos, según¹⁶³. De esta forma se evitó contar el mismo folículo dos veces. Las secciones de tejido se desparafinaron en xileno y rehidrataron realizando lavados con alcoholes con graduación decrecientes (100%-70%). Los núcleos se tiñeron con hematoxilina de Harris durante 1 minuto, luego se procedió con la tinción del citoplasma mediante el empleo de eosina.

A través de esta técnica, clasificamos los folículos según la presencia o ausencia de antro y la cantidad de capas de CG como: folículos primarios, secundarios, pre-antrales y antrales. Para clasificarlos como folículos atrésicos, nos valimos de las características morfológicas de los mismo a ser: degeneración y desprendimiento de la capa de CG de la membrana basal, presencia de núcleos poli-picnóticos en CG y degeneración del oocito¹⁶⁴. El análisis y clasificación de los distintos estadios foliculares se llevó a cabo empleando un microscopio óptico y fue corroborado

por un segundo investigador. La cuantificación se realizó teniendo en cuenta el área del ovario y un factor de corrección de 300, según Tilly, 2003¹⁶⁵, para determinar el número total de folículos.

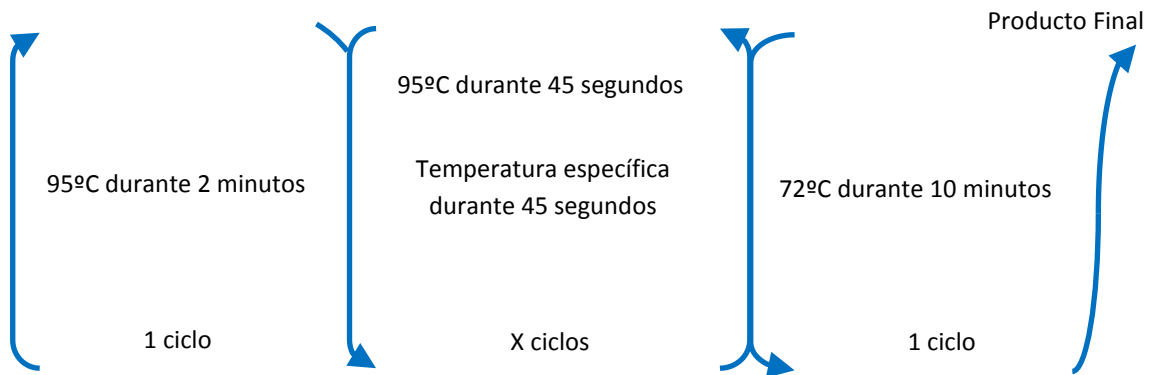
4.3. Análisis de la expresión génica por RT-PCR

La expresión de los genes, a través de la detección de los ARN mensajeros (ARNm), que codifican para PPAR γ , StAR, 3 β -HSD, P450scc y P50aro en los folículos de ratas pertenecientes a los distintos tratamientos fue evaluada por la técnica de retrotranscripción seguido por la reacción en cadena de la polimerasa (RT-PCR) semicuantitativa.

RT: A partir del ARNm total obtenido se obtuvo ADN copia (ADNc) mediante retrotranscripción (RT) con la enzima *Transcriptasa Reversa del Virus de Leucemia Murina Moloney* (M-MLV RT, Promega Corporation, Madison, USA), siguiendo las especificaciones del productor. Brevemente, 4 μ g de ARNm se incubaron con *random primers* (Promega Corporation, Madison, USA), en un volumen final de 14 μ l, a 70°C por 5 minutos. Posteriormente, se agregó una concentración final de Buffer RT-MMLV 1X (Tris-HCl 250 mM; KCl 375 mM, MgCl₂ 15 mM y DTT 50 mM), dNTPs 1 μ M (dATP 10mM; dGTP 10mM, dCTP 10mM, dTTP 10mM) y 1,25 U de RT-MMLV, se incubó durante 60 minutos a 37°C. Las muestras de ADNc sintetizadas se guardaron a -70°C hasta la realización de la PCR correspondiente.

PCR: Las condiciones para la realización de la PCR fueron tales que la intensidad del producto de amplificación se encontrara en fase exponencial y el ensayo fuese lineal con respecto a la cantidad de ADNc utilizado. El control de contaminación con ADN fueron muestras de ARN a las cuales se les practicó la reacción de PCR sin previa RT. Para la realización se incubaron los productos de RT junto a una mezcla de reacción, según se detalla en la tabla II. El programa de amplificación general se detalla en el esquema II.

La amplificación se realizó con *primers*, temperatura y cantidad de ciclos específicos para cada gen de interés (tabla III). El diseño de *primers* se realizó mediante las secuencias que se detallan en el banco genético. Aquellos *primers* diseñados por otros investigadores poseen la referencia bibliográfica adecuada (tabla III).



Esquema II: Programa de amplificación general por RT-PCR. Entre las flechas están indicadas las diferentes etapas del programa. Se realiza un único ciclo a 95°C para separa las hebras del ADN (izquierda). El número de ciclos y la temperatura se establecen para cada set de primers (se especifican en la tabla II, centro). Por ultimo, se realiza un único ciclo a 72°C para que se termine de amplificar aquellos que no logró hacerse en ciclo anteriores. Las flechas indican el sentido de cada ciclo.

Tabla II: Volúmenes y concentraciones finales de los reactivos utilizados en las reacciones de PCR. 1: Reactivos adquiridos en Promega (Promega Corporation, Madison, USA); 2: Reactivos adquiridos en IDT (Integrated DNA Technologies, Illinois, USA).

Reactivo	Volumen Final (μ l)	Concentración Final
Buffer 5X verde GoTaq ¹	6	1X
MgCl ₂ 25mM ¹	1,2	1.5 mM
Mix de Nucleótidos (dNTPs) ¹	0,6	0.2 mM de cada dNTP
Primer foward ²	1	1 μ M
Primer reverse ²	1	1 μ M
ADN polimerasa GoTaq ¹	0,15	1,25 UI
ADNc	1	2-3 μ g
H ₂ O bidestilada	19,05	-
Volumen final	30	

Los productos de amplificación se visualizaron en un gel de agarosa 2% conteniendo bromuro de etidio (0,5 mg/ml) y empleando un marcador de peso molecular de DNA de 80-1031 pb (MassRuler Low Range DNA Ladder, Fermentas Life Science). Se fotografiaron mediante un equipo Image Quant (GE HealthCare Life Science). La intensidad de las bandas se analizó mediante un software específico, ImageJ (Wayne Rasband, National Institute of Health, EEUU). Los niveles de ARNm se relativizaron en función de la intensidad del producto de PCR del gen constitutivo L30.

Tabla 2: Detalle de las secuencias de los primers, el tamaño de sus productos, la temperatura de annealing y el número de ciclos específicos utilizados en cada protocolo de PCR. *La secuencia fue obtenida de dicha cita.

ARNm	Secuencia	pb	PCR		Código del banco de genes
			Temperatura de annealing (°C)	Ciclos	
PPAR γ	F:5'-TGACACAGAGATGCCATTCTGG-3'	184	60	35	NM_013124.1
	R:5'-GTAATCAGCAACCATTGGGTGAGCTC-3'				
StAR	F:5'-GGCCTTGGGCATACTCA-3'	206	50	40	NM_011485.4
	R:TCCTTGACATTTGGGTTC-3'				
P450scc	F:5'-TTGTGCCCCCTGGG-3'	176	54	40	NM_017286.2
	R:5'-TTTGATGAAGCTCTGAGCTACACC-3'				
3 β HSD	F:5'-AGTCCTGATCTGAGGGCTGA-3'	218	53	40	NM_001042619.1
	R:5'-GCAGTTCTTTCTCTGCACC-3'				
P450aro	F:5'-GCTTCTCATCGCAGAGTATCCGG-3'	290	54	45	Hickey et al.(1990) ¹⁶⁶
	R:5'-CAAGGGTAAATTCATTGGGCTTGG-3'				
L30	F:5'-GTGGAGCAGGAAGCAAAGTC-3'	208	52	40	NM_001106903.1
	R:5'-GGGCCTAATGGGAGCTATTC-3'				

4.4. Análisis de la expresión proteica por Western Blot

La presencia del receptor PPAR γ en los distintos grupos de trabajo fue evaluada por la técnica de Western Blot. Las muestras fueron obtenidas a partir de folículos de ratas pertenecientes a los distintos grupos de trabajo mediante la extracción de las proteínas totales como se detalló previamente.

Corrida electroforética: 200 μ g de proteínas totales fueron diluidos y desnaturalizados en Buffer Muestra 5X-SDS (10 mM Tris-HCl pH 6.8; SDS 2% p/v; glicerol 10% v/v; azul de Bromofenol 0.06 % p/v; β -mercaptoetanol 1% v/v) y calentadas a 100°C durante 5 minutos. Posteriormente fueron cargadas en un gel de poliacrilamida con SDS-PAGE al 10%. Las fracciones proteicas se separaron electroforéticamente por 4 horas a corriente constante (25 mA) en Buffer Tris-glicina 0.1% (p/v) con SDS. Se cargó un marcador de peso molecular de proteínas (Rainbow-coloured protein mass markers 14.3-200 kDa, BioRad) para determinar las bandas correspondientes a PPAR γ_1 (52KDa),

PPAR γ_2 (57 KDa) y β -actina (43 KDa), como control de carga. Se empleó una muestra correspondiente a musculo esquelético como control positivo.

Transferencia: Las proteínas fueron transferidas a una membrana de nitrocelulosa (Sigma Chemical Co, St Louis, MO, USA) en buffer de transferencia (metanol 20% v/v; glicina 150 mM; Tris-HCl 20 mM; pH= 8.3) durante 50 minutos a 4°C a voltaje constante (100V), utilizando una celda de transferencia mini-electroforética (Bio-Rad Laboratories, Hercules, CA). Para verificar que la transferencia se haya llevado a cabo correctamente, se realizó una tinción reversible con una solución de Rojo Ponceau S (Ponceau 0,2%, ácido tricloroacético 3%, ácido sulfosalicílico 3%). Las membranas fueron lavadas en TBS e incubadas durante toda la noche a 4°C en solución de bloqueo conteniendo leche descremada 5% (p/v) en Buffer TBS-Tween 20 0.1% (v/v) para bloquear las uniones inespecíficas.

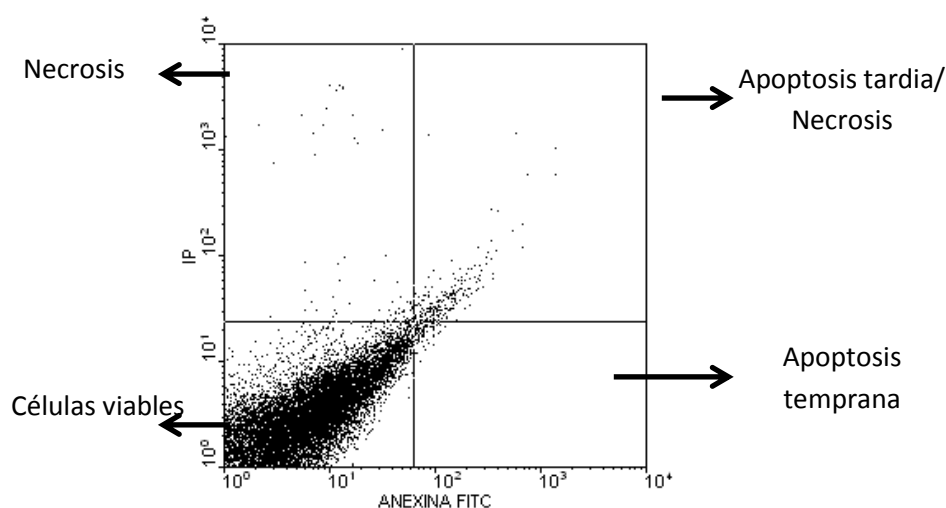
Inmunodetección: La presencia de las proteínas de interés se confirmó incubando a 4°C durante toda la noche con un anticuerpo específico policlonal anti-PPAR γ desarrollado en conejo (Santa Cruz Biotechnology, Santa Cruz, CA, USA, dilución 1:100). Se realizaron lavados sucesivos en TBS-Tween 20 y TBS e incubaron con anticuerpo secundario anti-conejo IgG (Santa Cruz Biotechnology, Santa Cruz, CA, USA, dilución 1:4000), durante 1 hora a temperatura ambiente con agitación suave. En los controles negativos, que se realizaron omitiendo la incubación con anticuerpos primarios, no se observaron bandas. Las bandas inmunoreactivas fueron visualizadas empleando una solución de luminol (Sigma-Aldrich) fotografiadas en un equipo Image Quant (GE HealthCare Life Science). Los niveles relativos de las proteínas fueron obtenidos por análisis densitométricos utilizando el programa ImageJ (Wayne Rasband, National Institute of Health, EEUU). Los datos se expresaron como densidad óptica de las bandas inmunoreactivas de PPAR γ con respecto a las de β -actina detectadas con un anticuerpo policlonal de vertebrados (Sigma Chemical Co, St Louis USA, dilución 1:500) desarrollado en conejo.

4.5. Análisis del porcentaje de células apoptóticas por Anexina V/Ioduro de propidio

El porcentaje de células apoptóticas fue determinado por la técnica de Anexina V/Ioduro de propidio (IP) mediante la utilización de un kit de anexina V (Calbiochem, Gibbstown, NJ, USA). El kit contenía IP y Anexina-V conjugada con isocianato de fluoresceína (FITC-anexina V). La técnica se basa en la capacidad de la anexina V para unirse a la molécula de *fosfatidilserina*, componente de la membrana plasmática que se mantiene en la cara citosólica de la misma en células viables.

Cuando una célula sufre apoptosis, la fosfatidilserina queda expuesta a la superficie de la misma. Así, la Anexina V no se une a las células viables, mientras que sí lo hace a aquellas que presentan apoptosis temprana. Por otro lado, cuando las membranas celulares se permeabilizan, por ejemplo durante el proceso de necrosis, el IP es capaz de ingresar a la célula e intercalarse entre los ácidos nucleídos del ADN, determinando la población de células necróticas. En el caso en que la célula se encuentre marcada con ambos compuestos (Anexina V e IP) se la considera en apoptosis tardía o necrosis.

Los procedimientos fueron llevados a cabo como fue descrito previamente por Solano y col. (2008)¹⁶⁷. Brevemente, 1×10^6 células en 1 ml de medio 199 (obtenidas como fue descrito anteriormente) de cada grupo de trabajo fueron incubadas con 1,5 ml de FITC-Anexina V durante 15 minutos a temperatura ambiente en oscuridad. Luego de centrifugadas, el medio fue removido y las células resuspendidas en 500 μ l de PBS. Posteriormente, en hielo y fuera del alcance de la luz, se adicionó 10 μ l de IP. Inmediatamente se realizó el análisis de fluorescencia a través de un equipo FACScan® y empleando el software Winmdi 2.8. La cuantificación se realiza mediante un citómetro de flujo. La señal de FITC puede ser detectada por FL1 a 518 nm, mientras que el IP puede ser detectado a 620 nm por FL2. En un análisis dot-plot (esquema IV), las células viables se muestran en el cuadrante inferior izquierdo, las células en apoptosis temprana en el cuadrante inferior derecho, las células necróticas en el cuadrante superior izquierdo y aquellas en apoptosis tardía/necrosis en el cuadrante superior derecho.



Esquema IV: Análisis Dot-Plot. Esquema de los cuadrantes establecidos para el conteo del porcentaje de células viables, apoptóticas y necróticas. En el eje horizontal se marca la cantidad de células positivas para Anexina V. En el eje vertical se marcan las células positivas para IP. En el cuadrante inferior izquierdo se encuentran aquellas células que son negativas para Anexina V/IP.

Los resultados se expresaron como porcentaje de células correspondiente a los diferentes estados de viabilidad sobre el total de células.

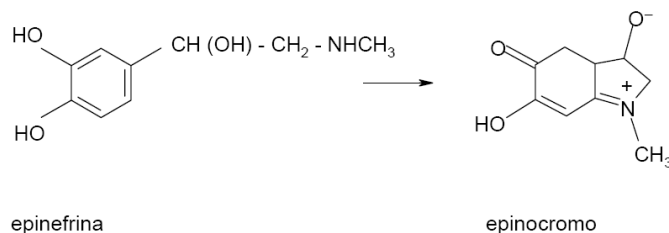
4.6. Análisis del daño al ADN

El análisis de fragmentación del ADN fue realizado según Parborell (2008)¹⁶⁸. Brevemente, los folículos extraídos fueron incubados durante 24 h a 37°C en medio DMEN:F12 (1:1)+10mM HEPES, suplementado con fungizona y gentamicina y gaseado con 95%O₂-5% CO₂, estas condiciones mantienen la integridad de los folículos, además de evitar la fragmentación de ADN generada por la técnica, la cual se observa como presencia múltiples de fragmentos internucleosomales de 180 pb. Los folículos de cada cultivo fueron homogenizados en buffer conteniendo proteinasa K a 55°C durante 4 h para facilitar la ruptura de membranas y proteínas. Los restos celulares y proteicos fueron eliminados mediante centrifugación. Del sobrenadante se extrajo el ADN mediante el empleo de etanol y posterior centrifugación. La muestra de ADN fue incubada con RNasa durante 1 h. Se cuantificó a 260 nm. Se sembró 4 µg de cada muestra en un gel de agarosa 1,9% conteniendo bromuro de etidio (0,4 µg/ml) en Buffer TBE. El ADN se visualizó en un transluminador UV (302 nm) y la imagen fue captada por un sistema de cámara Polaroid. El análisis densitométrico de fragmentos de bajo peso molecular (<15 Kb) fue realizado con un scanner (Genius) empleando el software Scion Image para Windows (Scion Corp., Worman's Mill, CT). Los resultados se expresan como la cantidad de fragmentos pequeños presentes en cada tratamiento.

4.7. Determinación de parámetros relacionados con el balance oxidativo

4.7.1. Actividad de la enzima Superóxido Dismutasa

Las enzimas Superóxido Dismutasa (SOD) son un grupo de metaloenzimas que detoxifican las especies reactivas del oxígeno (EROs, ROS sus siglas en inglés) mediante la conversión de anión superóxido (O₂^{•-}) a peróxido de hidrógeno (H₂O₂) y oxígeno (O₂). La actividad se determinó por un método espectrofotométrico descrito por Misra y Fridovich (1972)¹⁶⁹, el cual se basa en la capacidad de la SOD para inhibir la autooxidación de la epinefrina, la cual produce como intermediario al O₂^{•-}. La reacción se sigue a través de la formación del epicromo, el cual tiene un máximo de absorbancia a 480 nm (esquema V), en condiciones de reacción (pH=10,2 a 30°C).



Esquema V: Oxidación de la epinefrina. La enzima superóxido dismutasa (SOD) evita la formación del epinocromo, detectable a 480 nm, generado por la auto-oxidación de la epinefrina.

Se evaluó la actividad de esta enzima en los ovarios de los animales pertenecientes a los distintos grupos de trabajo. Brevemente, cada ovario fue homogeneizado en Buffer de homogenización (EDTA 1 mM; KCl 150 mM; Trizma base 20mM; sacarosa 500 mM, β -mercaptoetanol 1mM; pH=7.6) y centrifugado a 9000 g. Se fraccionó el sobrenadante y almacenó a -20° C. En el momento de la determinación, a cada fracción se agregó Buffer glicina 50 mM (pH=10,2) y epinefrina 30 mM en ácido acético 0.05% (v/v). Se midió la formación del epinocromo a 480 nm durante 4 minutos. Se determinó la cantidad de enzima que inhibía al 50% la oxidación de la epinefrina, la cual corresponde a una unidad de SOD (USOD). Los resultados se expresaron como USOD/mg proteína.

4.7.2. Actividad enzimática de Catalasa

Este método se basa en el rol de la enzima catalasa (CAT) para catalizar la conversión de peróxido de hidrógeno (H₂O₂) en agua y oxígeno (H₂O + O₂). Dado que el H₂O₂ absorbe a 240 nm, el consumo de este compuesto puede medirse espectrofotométricamente¹⁷⁰.

Se determinó la actividad de la enzima CAT en ovarios pertenecientes a animales provenientes de los distintos grupos de trabajo. Brevemente, se homogeneizó y fraccionó el sobrenadante del homogenato de un ovario tal como fue descrito para la determinación de SOD. En el momento de la determinación se agregó Buffer fosfato 50 mM (pH=7,2) a cada fracción (1:30) junto con H₂O₂ 0,1M, registrándose la absorbancia a 240 nm durante 1 minuto en intervalos de 10 segundos. La cantidad de CAT se calculó mediante una serie de cálculos descriptos y fundamentados por Maehly (1954)¹⁷⁰. Los resultados fueron expresados como nmol CAT/mg of proteína.

4.7.3. Contenido total de glutatión

El método utilizado para la determinación del contenido de glutatión se basa en la reacción de reducción del ácido 5,5,-ditiobis-2 nitrobenzoico (DTNB) por el glutatión reducido (GSH), el cual forma un compuesto coloreado, el 5-tio-2-nitrobenzoato (TNB), que es posible cuantificar a 412 nm. Para determinar glutatión total (GSht) se agrega glutatión reductasa (GR), enzima que reduce el glutatión oxidado (GGSG)¹⁷¹.

Se determinaron los niveles de GSht en ovarios pertenecientes a animales correspondientes a los distintos grupos. Brevemente, cada ovario fue homogeneizado en ácido tricloroacético (TCA 0.5% p/v) y posteriormente centrifugado a 9000 g. Luego, se incubó cada muestra con Buffer fosfato 50 mM, 5 mM NADPH, 70 μ M del reactivo de Ellman (DTNB). La reacción se inició con el agregado de 6 UI de GR. Considerando la linealidad de la reacción, se registró la absorbancia durante los primeros 6 minutos a fin de determinar la pendiente de la reacción. Para determinar el contenido de GSht, se comparó la pendiente obtenida frente a una obtenida en una reacción con concentración de GSH conocida. Los resultados se expresaron como μ M GSH/mg proteínas.

4.7.4. Contenido de malondialdehído

Los radicales libres producidos en las células actúan provocando la ruptura de los ácidos grasos poliinsaturados de las membranas celulares. Este tipo de reacciones tienen entre sus subproductos al malondialdehído (MDA). Es así, que la concentración de este compuesto puede ser tomada como un indicador de peroxidación lipídica¹⁷². El MDA es capaz de combinarse con el ácido tiobarbitúrico (TBA) formando un reactivo de color que puede cuantificarse a 535 nm, permitiendo estimar de esta manera la concentración de MDA.

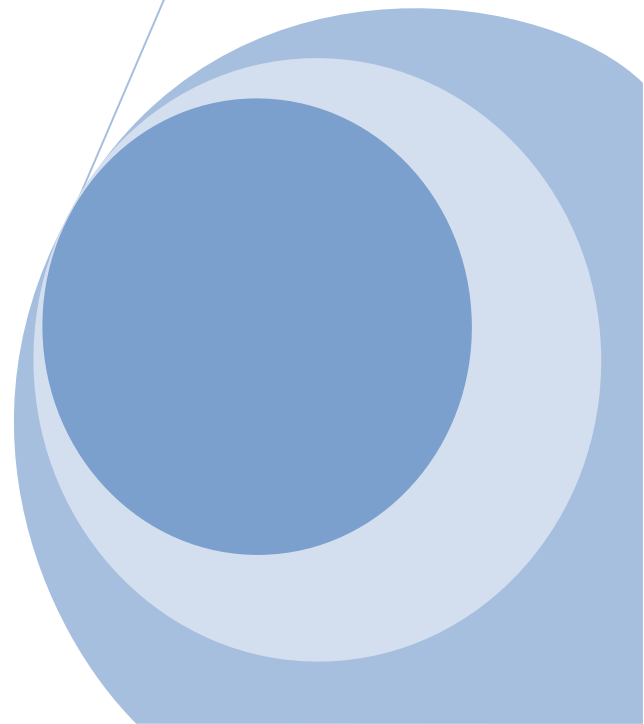
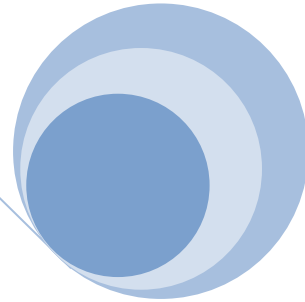
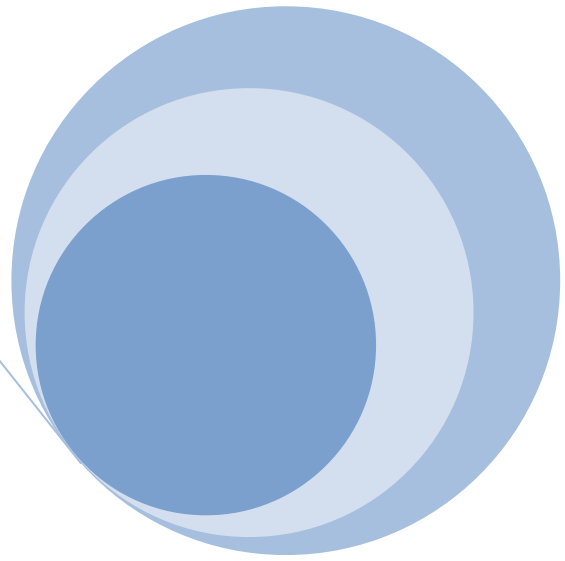
Se evaluó el contenido de MDA en ovarios pertenecientes a animales provenientes de los distintos grupos de trabajo. Brevemente, cada ovario fue homogeneizado y fraccionado tal como se especificó en el protocolo correspondiente a GSH. Se incubó cada muestra con TBA 0,67 % p/v (1:2) por 20 minutos a 100°C. La reacción se detuvo por inmersión en hielo, leyéndose la absorbancia a 535 nm dentro de los siguientes 5 minutos. Se realizó una curva patrón de MDA, y los resultados se expresaron como mM MDA.

5. **ANÁLISIS ESTADÍSTICO**

El análisis estadístico de cada experimento se realizó mediante el programa Prism 4.03 (GraphPad software, San Diego, CA, USA). Se empleó mediante el test de Mann-Whitney en el caso de comparar dos grupos. Cuando se compararon los tres grupos se empleó el Análisis de ANOVA de un factor seguido del test de Tukey. Para el caso de la comparación de las poblaciones foliculares se empleó Análisis de ANOVA de dos factores seguido del test de Bonferroni. Cada uno fue aclarado al pie de cada resultado. Se consideró significativo un valor de $p < 0,05$. Los resultados fueron expresados como media \pm error estándar de la media (SEM) de los resultados obtenidos en cada uno de los experimentos.

En caso que se aclare lo contrario, todos los experimentos se realizaron, como mínimo, 3 (tres) veces, empleándose 3 (tres) animales (un ovario de cada uno) por grupo. En aquellos experimentos donde se utilizó un solo ovario por animal, se empleó siempre el ovario izquierdo. Los geles fueron obtenidos de experimentos representativos.

Resultados



Cuantificación de la producción de progesterona

Para evaluar la funcionalidad ovárica en las primeras etapas de la foliculogénesis, la misma se indujo con una única dosis de eCG (ver Materiales y Métodos) y los animales fueron sacrificados a diferentes tiempos. De esta manera, se determinó el pico máximo de producción de progesterona (P_4). De la misma manera se evaluó la alteración de la foliculogénesis temprana en un estado hiperandrogénico, mediante la inducción con una única dosis de eCG conjuntamente con la administración de dehidroepiandrosterona (DHEA).

Se determinaron los niveles séricos de P_4 en ratas prepúberes estimuladas con eCG y con eCG+DHEA (hiperandrogenizadas), sacrificadas a las 2, 4, 8, 12 y 24 hs (figura 18) post-estimulación, mediante la técnica de radioinmunoensayo (RIA).

En el suero de aquellos animales sacrificados a las 8 hs post-estimulación con eCG, se observó que los niveles de P_4 aumentaron (figura 18), produciéndose niveles máximos de esta hormona (grupo control: $37,77 \pm 7,07$ pg P_4 /ml suero; eCG: $57,45 \pm 1,61$ pg P_4 /ml suero). Sin embargo, en aquellos animales tratados con eCG+DHEA no se observó este pico hormonal ($40,16 \pm 1,08$ pg P_4 /ml suero).

No se observaron diferencias significativas a las 2, 4, 12 y 24 hs post-tratamiento (figura 18).

Los niveles de P_4 producidos por el grupo de referencia (animales sacrificados a las 0 hs sin tratamiento) no mostraron diferencias significativas con respecto a los niveles observados en animales control para ninguno de los tiempos analizados (los datos no se muestran en el gráfico).

Cuantificación de la producción de estradiol

Con el mismo objetivo, se determinaron los niveles séricos de estradiol (E_2) en ovarios obtenidos de los diferentes grupos experimentales mediante la técnica de radioinmunoensayo (RIA). Sin embargo, la sensibilidad de la técnica no fue suficiente para

determinar niveles significativos de este esteroide en el suero de animales sacrificados a las 2, 4, 8, 12 y 24 hs post- estimulación, mediante la técnica de radioinmunoensayo (RIA).

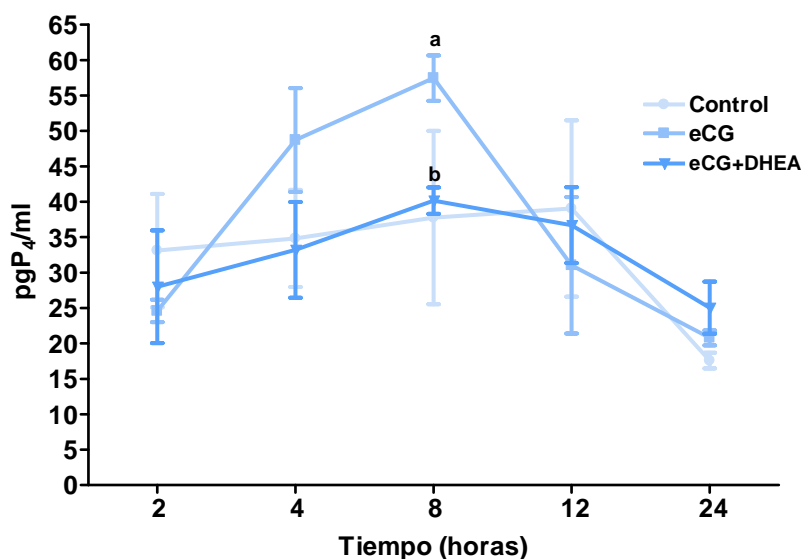


Figura 18: Niveles de P₄ sérico determinados por RIA. Los animales del grupo control recibieron como vehículo solución fisiológica, ip y aceite de maíz, sc. Los animales del grupo eCG fueron tratados con 25UI/ animal, ip. Los animales del grupo eCG+DHEA fueron tratados con 25UI/animal, ip + 60mg/kg peso de DHEA, sc. Los grupos fueron sacrificados a las 2, 4, 8, 12 y 24 hs post-tratamiento. Cada punto representa la media ± SEM para 10 animales, cada muestra fue determinada por duplicado. Los resultados se expresan en pg P₄/ml de suero.

a: $p < 0.01$ significativamente diferente respecto al grupo control; b: $p < 0.05$ significativamente diferente con respecto al grupo eCG. Las comparaciones se realizaron empleando ANOVA de dos vías seguido de test de Bonferroni.

Estos resultados nos permiten inferir que luego de 8 hs de la administración de eCG la actividad folicular, determinada por los niveles de P₄, es máxima. Sin embargo, cuando esta inducción sucede en un ambiente hiperandrogénico los niveles de dicha hormona no varían para ninguno de los tiempos ensayados.

A partir de esto se caracterizaron los mecanismos fisiológicos (primera parte) como los efectos del hiperandrogenismo (segunda parte) ovárico en animales sacrificados 8 hs post-tratamiento.

En aquellos casos en los cuáles la eutanasia fuese practicada en algún tiempo distinto a las 8 hs post-tratamiento, este dato será especificado.

Primera Parte

Caracterización fisiológica de la foliculogénesis temprana

1. Determinación del peso relativo

En cuanto al peso relativo de los ovarios de los animales respecto de su peso corporal (figura 19), se observó un aumento significativo en aquellos animales estimulados con eCG [$0,36 \pm 0,02$ (g de ovario/g peso corporal)*1000] con respecto al grupo control [$0,49 \pm 0,03$ g de ovario/g de peso corporal)*1000].

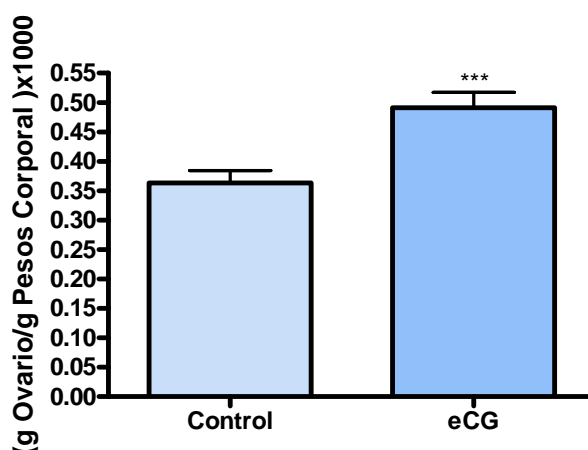


Figura 19: Peso relativo de animales 8 hs post-tratamiento. Los animales del grupo control recibieron como vehículo solución fisiológica, ip y aceite de maíz, sc. Los animales del grupo eCG fueron tratados con 25UI/ animal, ip. Ambos grupos fueron sacrificados a las 8 hs post-tratamiento. Cada barra representa la media \pm SEM para 20 animales. Los resultados se expresan en (g de ovario/ g de peso corporal)*1000.

***: $p < 0.001$ significativamente diferente respecto al grupo control. Las comparaciones se realizaron empleando la prueba de Mann-Whitney.

2. Análisis histológico por tinción con hematoxilina-eosina

Durante la foliculogénesis temprana transcurre lo que se conoce como *fase folicular*. Durante la misma, las poblaciones foliculares en el ovario varían dependiendo de la presencia o ausencia de gonadotrofinas.

Se caracterizó la presencia de las distintas poblaciones foliculares presentes en el momento de máxima capacidad esteroidogénica del ovario, determinada por los niveles de P_4 sérico. Así, mediante la tinción con hematoxilina-eosina, se estudió y analizó la morfología ovárica en aquellos animales estimulados con eCG y sacrificados 8hs después (figura 20).

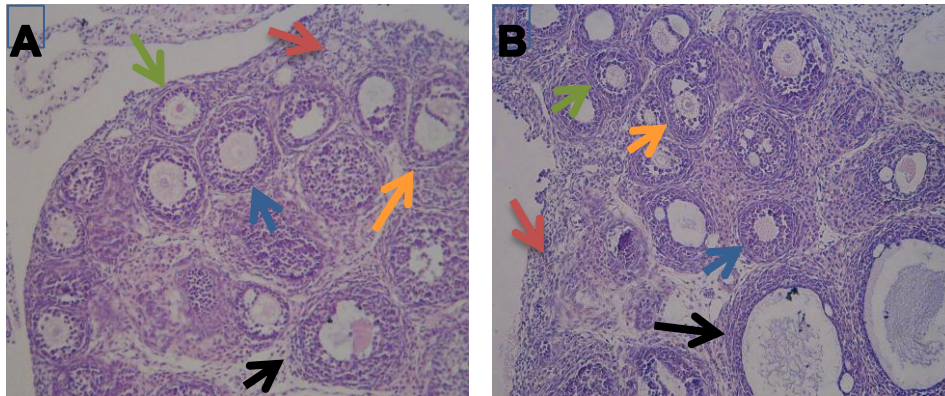


Figura 20: Cortes histológicas de ovarios 8 hs post-tratamiento: A: Sección de ovario correspondiente a animales del grupo control, los cuales recibieron como vehículo solución fisiológica, ip y aceite de maíz, sc (A: 100X). B: Sección de ovario correspondiente a animales grupo eCG, los cuales fueron tratados con 25UI/ animal, ip (A: 100X). Se indican un grupo de folículos primordiales (flecha roja), folículo primario (flecha verde), folículo preantral (flecha azul), folículo antral (flecha anaranjada) y folículo atrésico (flecha negra).

2.1. Porcentaje de folículos sanos y folículos atrésicos

Mediante la técnica de hematoxilina-eosina se determinó el número de folículos sanos y atrésicos en diferentes secciones del ovario, luego de 8 hs de haber sido estimulado con eCG (figura 21). La distinción se realizó mediante la observación de la integridad de las distintas partes del folículo, como ser las capas de células de la teca (CT) y de la granulosa (CG) y el oocito.

Se observó que luego de la administración de eCG el número de folículos sanos aumentó (control: $59,78 \pm 5,61\%$; eCG: $81,53 \pm 1,53\%$), mientras que el de folículos atrésicos disminuyó significativamente con respecto al control (control: $40,22 \pm 5,61\%$; eCG: $18,47 \pm 1,53\%$).

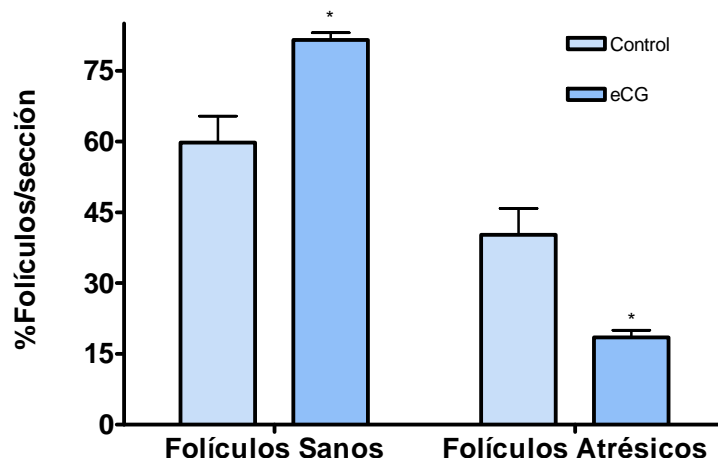


Figura 21: Porcentaje de Folículos sanos y atrésicos 8 hs post-tratamiento. Los animales del grupo control recibieron como vehículo solución fisiológica, ip y aceite de maíz, sc. Los animales del grupo eCG fueron tratados con 25UI/animal de eCG, ip. Ambos grupos fueron sacrificados a las 8 hs post-tratamiento. Cada barra representa la media \pm SEM de 6 ovarios, se determinaron los folículos en tres secciones diferentes de cada ovario (ver Materiales y Métodos). Los resultados se expresan en porcentaje de folículos/sección.

*: $p < 0.05$ significativamente diferente con respecto al grupo control. Las comparaciones se realizaron empleando ANOVA de dos vías seguido de test de Bonferroni.

2.2. Porcentaje de folículos en distintos estadios de desarrollo luego de 8 hs de estímulo

Se determinó el porcentaje de folículos sanos en diferentes etapas de desarrollo, mediante su conteo en distintas secciones de ovarios de animales estimulados con eCG y sacrificados a 8 hs después (figura 22). Para ello, se los clasificó en *Folículos Primordiales*, *Folículos Primarios*, *Folículos Preantrales*, *Folículos Antrales* según el siguiente criterio:

- Folículos Primordiales: formados por un oocito grande rodeado de una única capa de células foliculares planas.
- Folículos Primarios: dos o más capas de células foliculares (denominadas de la granulosa) cúbicas, sin cavidad antral.
- Folículos Preantrales (secundarios): numerosas capas de CG, las células del estroma se diferencian en capas, las CT, externa e interna.

- **Folículos Antrales:** las capas de CG se observan delgadas, distinción de las distintas capas de las CT, con pequeñas cavidades y el oocito céntrico o una gran cavidad con el oocito que protruye hacia la misma.

A las 8hs post-estimulación con eCG, se observaron diferencias significativas en cuanto al porcentaje de folículos sanos primordiales (figura 22). Este aumento fue de dos veces el porcentaje de folículos primordiales en el gupo estimulado ($37,24 \pm 1,53\%$) con respecto al grupo control ($18,09 \pm 2,10\%$).

Las demás poblaciones de folículos sanos no mostraron variaciones entre los grupo analizados.

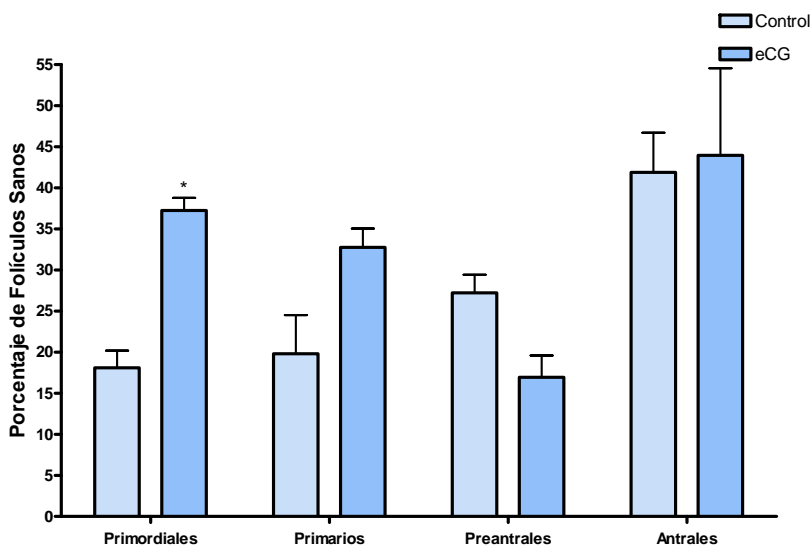


Figura 22: Porcentaje de folículos sanos en diferentes etapas de desarrollo 8 hs post-tratamiento. Los animales del grupo control recibieron como vehículo solución fisiológica, ip y aceite de maíz, sc. Los animales del grupo eCG fueron tratados con 25UI/animal de eCG, ip. Ambos grupos fueron sacrificados a las 8 hs post-tratamiento. Cada barra representa la media \pm SEM de 6 ovarios, se determinaron los folículos en tres secciones diferentes de cada ovarios (ver Materiales y Métodos). Los resultados se expresan en porcentaje de folículos/sección.

*: $p < 0.05$ significativamente diferente respecto al grupo control. Las comparaciones se realizaron empleando ANOVA de dos vías seguido de test de Bonferroni.

3. Análisis de la expresión de PPAR γ

Los PPAR γ (PPAR γ) se expresan en las CG de los folículos, incrementándose esta expresión a medida que los folículos maduran hacia folículos preovulatorios²⁵, y disminuye luego del pico de LH, sugiriendo una ciclicidad similar a la de las hormonas reguladoras del ciclo femenino. La activación de PPAR γ está regulada por hormonas sexuales y se supone que podrían estar involucrados en la proliferación de las CG, la esteroidogénesis y la maduración del oocito³⁵.

En base a lo expuesto anteriormente, se analizó la expresión génica y proteica de estos receptores durante las primeras etapas de la foliculogénesis. Para ello, se emplearon CG de ovarios provenientes de animales con una máxima capacidad esteroidogénica, esto es de aquellos provenientes de animales sacrificados 8 hs post-estimulación con eCG.

3.1. Análisis de la expresión génica de PPAR γ por la técnica de RT-PCR

A través de la técnica de RT-PCR, se analizó la expresión del ARNm de PPAR γ (figura 23). Se observó que la estimulación con eCG, luego de 8 hs de administrado el tratamiento, incrementa de manera significativa la expresión de este receptor ($1,12 \pm 0,10$ unidades relativas) con respecto al grupo control ($0,55 \pm 0,03$ unidades relativas).

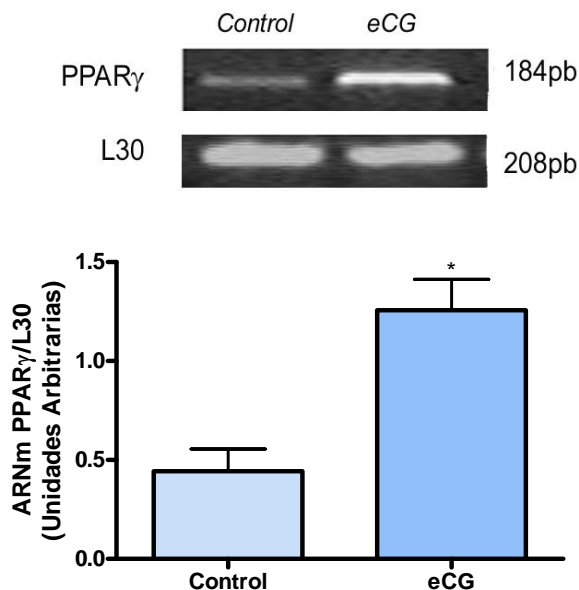


Figura 23: Expresión del ARNm de PPAR γ 8 hs post-tratamiento. Los animales del grupo control recibieron como vehículo solución fisiológica, ip y aceite de maíz, sc. Los animales del grupo eCG fueron tratados con 25UI/animal de eCG, ip. Ambos grupos fueron sacrificados a las 8 hs post-tratamiento. Cada barra representa la media \pm SEM para 3 animales, cada muestra fue realizada por triplicado. Los resultados se expresan en unidades relativas de ARNm PPAR γ /ARNm L30.

*: $p < 0.05$ significativamente diferente respecto del grupo control. Las comparaciones se realizaron empleando la prueba de Mann-Whitney.

3.2. Análisis de la expresión proteica de PPAR γ por la técnica de western blot

Mediante la técnica de western blot, se analizó la expresión proteica del receptor PPAR γ (figura 24).

A las 8 hs post-estimulación con eCG, PPAR γ aumentó significativamente ($1,34 \pm 0,16$ unidades relativas) con respecto al control ($0,31 \pm 0,08$ unidades relativas).

Si bien la literatura indica que, tanto en ratón¹⁷³ como humano³⁴, existen dos variantes proteicas de PPAR γ , PPAR γ_1 y PPAR γ_2 , en nuestro modelo esto no fue posible de determinar.

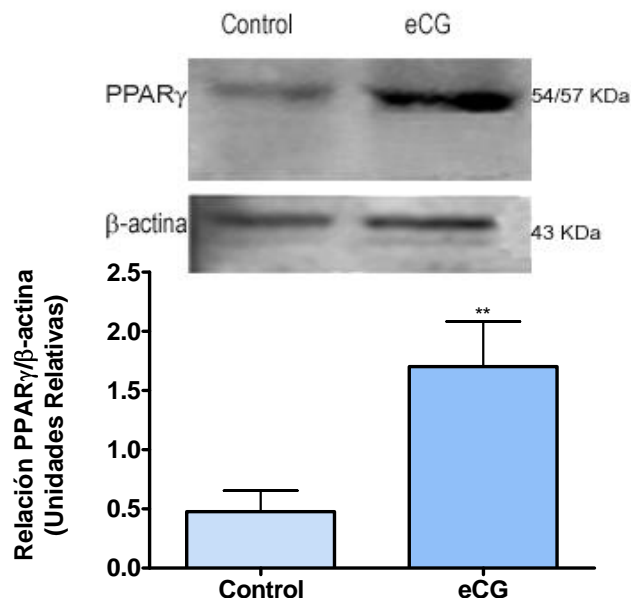


Figura 24: Expresión de la proteína de PPAR γ 8 hs post-tratamiento. Los animales del grupo control recibieron como vehículo solución fisiológica, ip y aceite de maíz, sc. Los animales del grupo eCG fueron tratados con 25Ul/animal de eCG, ip. Ambos grupos fueron sacrificados a las 8 hs post-tratamiento. Cada barra representa la media \pm SEM para 3 animales, cada muestra fue realizada por triplicado. Los resultados se expresan en unidades relativas de PPAR γ / β -actina.

** : $P < 0.01$ significativamente diferente respecto del grupo control. Las comparaciones se realizaron empleando la prueba de Mann-Whitney.

4. Expresión de enzimas reguladoras de la esteroidogénesis por la técnica de RT-PCR

Con el objeto de determinar si la expresión diferencial de PPAR γ se refleja en modificaciones de la expresión génica de algunas de las enzimas reguladoras de la esteroidogénesis 8 hs luego del tratamiento con eCG, se estudió la expresión génica de la proteína reguladora de la esteroidogénesis aguda (StAR, figura 25), la enzima citocromo P450 de corte de cadena lateral (P450_{scc}, figura 26), 3 β -hidroxiesteroide deshidrogenasa (3 β HSD, figura 27) y citocromo P450 aromatasa (P450_{aro}, figura 28), como parámetros de la función esteroidogénica de los folículos (evaluada según los niveles séricos de P₄).

4.1. Expresión génica de StAR

La proteína StAR ha sido identificada como una fosfoproteína mitocondrial, encargada de movilizar al colesterol hacia la membrana interna de la mitocondria, donde

puede ser transformado en pregnenolona. StAR es rápidamente inducida por gonadotrofinas, convirtiéndose, así, en una de las principales reguladoras de la esteroidogénesis en el ovario¹⁷⁴.

Se observó que, luego de 8 hs del estímulo con eCG, se produjo un aumento significativo en la expresión de los ARNm de StAR ($0,81 \pm 0,02$ unidades relativas), con respecto al grupo control ($0,65 \pm 0,01$ unidades relativas).

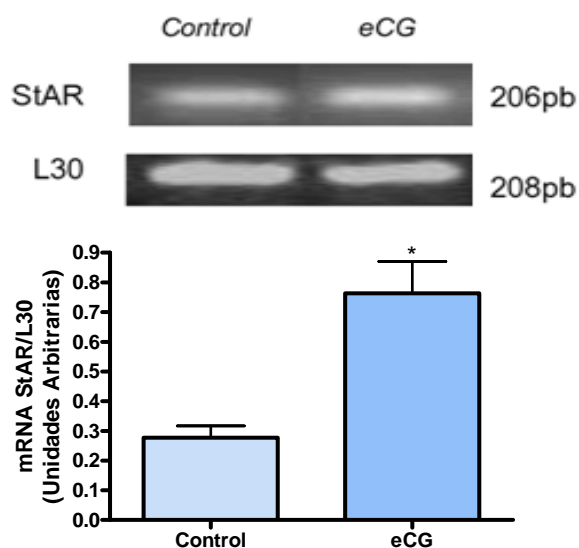


Figura 25: Expresión del ARNm de StAR 8 hs post-tratamiento Los animales del grupo control recibieron como vehículo solución fisiológica, ip y aceite de maíz, sc. Los animales del grupo eCG fueron tratados con 25UI/animal de eCG, ip. Ambos grupos fueron sacrificados a las 8 hs post-tratamiento. Cada barra representa la media \pm SEM para 3 animales, cada muestra fue realizada por triplicado. Los resultados se expresan en unidades relativas de ARNm StAR/ARNm L30.

*: $p < 0.05$ significativamente diferente respecto del grupo control. Las comparaciones se realizaron empleando la prueba de mann-Whitney.

4.2. Expresión génica de P450scc

La enzima P450scc es un complejo enzimático mitocondrial, dependiente de AMPc, encargado de transformar el colesterol en pregnenolona mediante el clivaje de la cadena lateral del primero. La actividad de P450scc depende de la actividad de StAR, y viceversa, ya que sin el sustrato brindado por la actividad de StAR, P450scc no podría sintetizar pregnenolona, y la velocidad de esta última repercute sobre la liberación de colesterol mediada por StAR¹⁷⁵.

Se estudió la expresión del ARNm de P450scc frente al estímulo con eCG. Al comparar con el grupo control ($0,41 \pm 0,06$ unidades relativas), el estímulo con eCG aumentó de manera significativa los niveles de del ARNm de P450scc ($1,73 \pm 0,38$ unidades relativas).

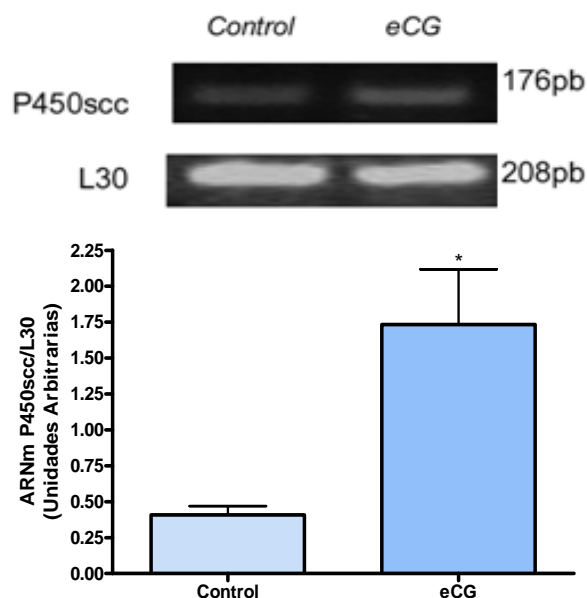


Figura 26: Expresión del ARNm de P450scc 8 hs post-tratamiento. Los animales del grupo control recibieron como vehículo solución fisiológica, ip y aceite de maíz, sc. Los animales del grupo eCG fueron tratados con 25UI/animal de eCG, ip. Ambos grupos fueron sacrificados a las 8 hs post-tratamiento. Cada barra representa la media \pm SEM para 3 animales, cada muestra fue realizada por triplicado. Los resultados se expresan en unidades relativas de ARNm P450scc/ARNm L30.

*: $p < 0.05$ significativamente diferente respecto del grupo control. Las comparaciones se realizaron empleando la prueba de Mann-Whitney.

4.3. Expresión génica de 3 β HSD

La enzima 3 β HSD es una proteína citoplasmática localizada en las CT de los folículos en desarrollo. En la mayoría de las especies, incluyendo a la rata, está ausente en CG hasta fases tardías de la foliculogénesis¹⁷⁶. Es la encargada de la síntesis de P₄, a partir de pregnenolona.

Con respecto al ARNm de 3 β HSD, se observó un aumento significativo entre el grupo control ($0,59 \pm 0,15$ unidades relativas) y el grupo estimulado con eCG ($1,68 \pm 0,48$ unidades relativas).

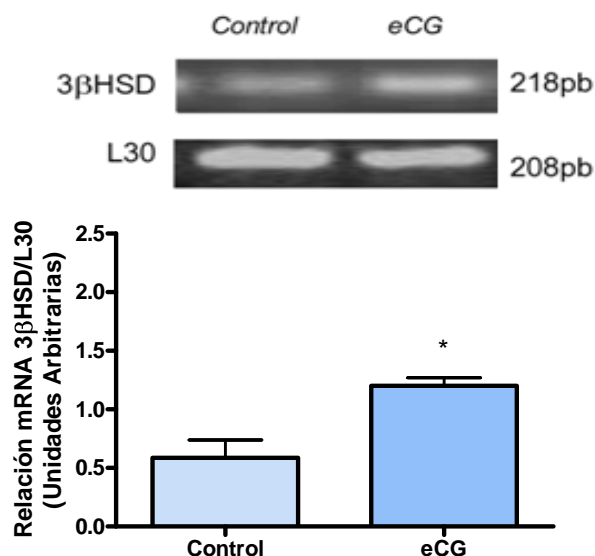


Figura 27: Expresión del ARNm de 3βHSD 8 hs post-tratamiento. Los animales del grupo control recibieron como vehículo solución fisiológica, ip y aceite de maíz, sc. Los animales del grupo eCG fueron tratados con 25UI/animal de eCG, ip. Ambos grupos fueron sacrificados a las 8 hs post-tratamiento. Cada barra representa la media \pm SEM para 3 animales, cada muestra fue realizada por triplicado. Los resultados se expresan en unidades relativas de ARNm 3βHSD/ARNm L30.

*: $p < 0.05$ significativamente diferente respecto del grupo control. Las comparaciones se realizaron empleando la prueba de Mann-Whitney.

4.4. Expresión génica de P450aro

El último paso para la biosíntesis de estrógenos, particularmente de E_2 , es la aromatización de los andrógenos. Este paso está regulado por la enzima P450aro, que está presente en grandes cantidades en las CG, por lo que estas últimas son capaces de transformar andrógenos en estrógenos¹⁷⁷.

Se observó que la expresión del ARNm de P450aro en ovarios obtenidos 8 hs post-tratamiento con eCG aumentó de manera significativa un 100% con respecto al grupo control (control: $0,71 \pm 0,12$ unidades relativas; eCG: $1,39 \pm 0,12$ unidades relativas).

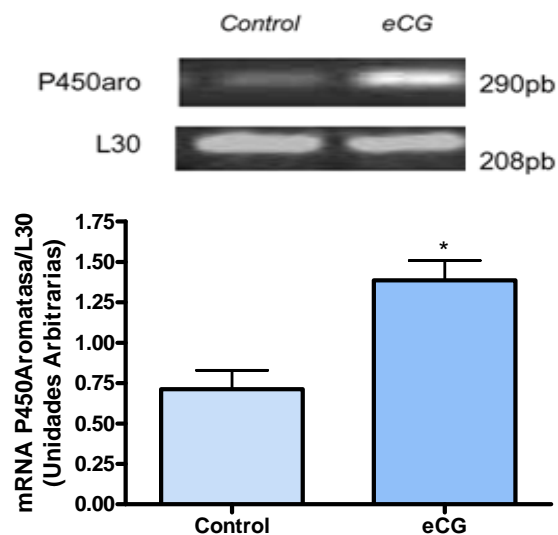


Figura 28: Expresión del ARNm de P450aro 8 hs post-tratamiento. Los animales del grupo control recibieron como vehículo solución fisiológica, ip y aceite de maíz, sc. Los animales del grupo eCG fueron tratados con 25U/animal de eCG, ip. Ambos grupos fueron sacrificados a las 8 hs post-tratamiento. Cada barra representa la media \pm SEM para 3 animales, cada muestra fue realizada por triplicado. Los resultados se expresan en unidades relativas de ARNm P450aro/ARNm L30.

*: $p < 0.05$ significativamente diferente respecto del grupo control. Las comparaciones se realizaron empleando la prueba de Mann-Whitney.

5. Niveles de apoptosis durante la foliculogénesis temprana

La apoptosis, o muerte celular programa, es uno de los fenómenos que controla tanto la cantidad como calidad de las células que forman un tejido en particular. Durante la foliculogénesis este fenómeno está altamente regulado, permitiendo que los distintos tipos celulares formen varias capas, haciendo que estos crezcan. De la misma forma, una vez ocurrida la ovulación, son los mecanismos de apoptosis, como factor principal, los que, luego de la formación del CL, permiten que este regrese dando lugar a un nuevo ciclo folicular.

Es por ello que se analizó los niveles de apoptosis fisiológicos en ovarios obtenidos 8 hs post-tratamiento con eCG. Se evaluó el porcentaje de células apoptóticas mediante la técnica de AnexinaV/ioduro de propidio seguida de citometría de flujo (figura 29).

El porcentaje de células ováricas que se encontraban en apoptosis 8 hs post-tratamiento con eCG ($3,95 \pm 0,30\%$ de células apoptóticas) no varió con respecto al porcentaje del grupo control ($2,95 \pm 0,29\%$ de células apoptóticas).

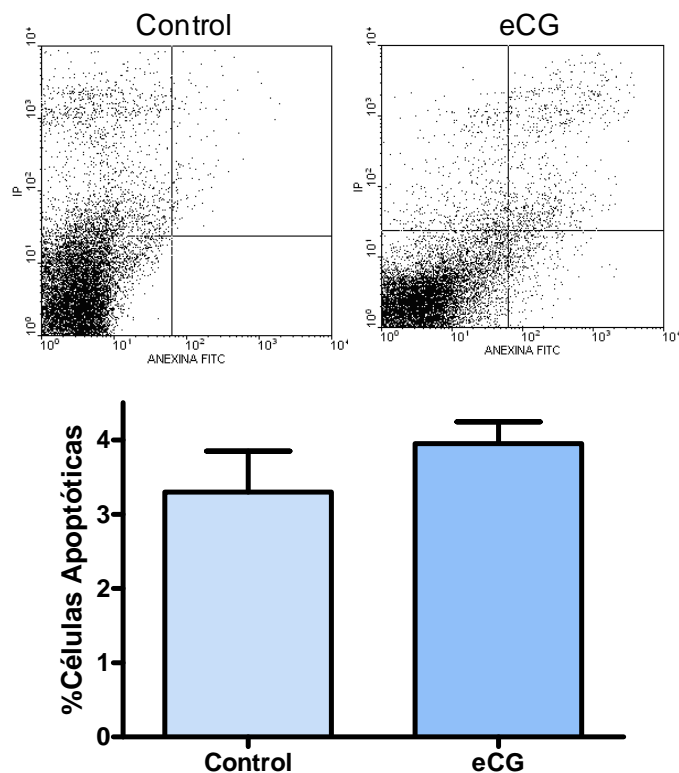


Figura 29: Porcentaje de células apoptóticas 8 hs post-tratamiento. Los animales del grupo control recibieron como vehículo solución fisiológica, ip y aceite de maíz, sc. Los animales del grupo eCG fueron tratados con 25UI/animal de eCG, ip. Ambos grupos fueron sacrificados a las 8 hs post-tratamiento. Cada barra representa la media \pm SEM para 8 animales, cada muestra fue determinada por duplicado. Los resultados se expresan en porcentaje de células apoptóticas.

Los grupos no mostraron diferencias significativas. Las comparaciones se realizaron empleando la prueba de Mann-Whitney.

6. Caracterización del estado oxidativo mediante técnicas espectrofotométricas

Las especies reactivas del oxígeno (ROS) se generan en todas las reacciones metabólicas del organismo, y en el ovario no es la excepción. De la misma forma en que se generan, nuestro organismo posee diferentes estrategias para controlarlas, como ser actividades enzimáticas, por ejemplo las de las enzimas superóxido dismutasa (SOD) y catalasa (CAT) para neutralizar a las ROS, o reacciones con otros metabolitos, como el glutatión (GSht), el cual las oxida. Ambas estrategias permiten neutralizar a las ROS y evitar que reaccionen con macromoléculas esenciales, como ser los lípidos, las proteínas y/o los ácidos nucleídos.

Se evaluaron algunos parámetros del estado oxidativo de ovario obtenidos 8 hs post-tratamiento con eCG, para analizar y caracterizar el estado oxidativo en el momento de máxima producción de P₄.

6.1. Actividad de la enzima superóxido dismutasa

SOD está involucrada en la neutralización de O₂⁻. Evitando la propagación de ROS en un sistema determinado.

La actividad de dicha enzima se encontró modificada por el tratamiento con eCG. Como se muestra en la figura 30, la actividad de SOD aumentó de manera significativa con la estimulación con eCG (0,081±0,004 Unidades de SOD/mg de proteínas) con respecto al grupo control (0,024±0,009 Unidades de SOD/mg de proteínas).

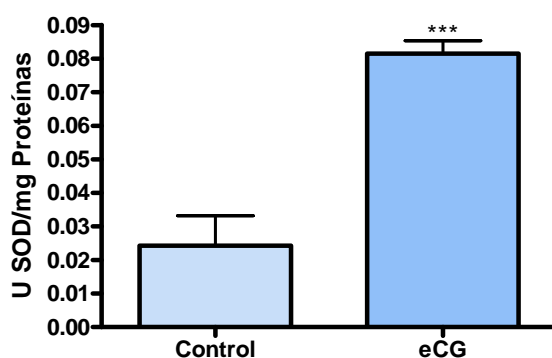


Figura 30: Actividad de SOD 8 hs post-tratamiento. Los animales del grupo control recibieron como vehículo solución fisiológica, ip y aceite de maíz, sc. Los animales del grupo eCG fueron tratados con 25UI/animal de eCG, ip. Ambos grupos fueron sacrificados a las 8 hs post-tratamiento. Cada barra representa la media ± SEM para 7 animales, cada muestra fue realizado por duplicado. Los resultados se expresan como unidades de SOD/mg de proteínas.

***: p<0.001 significativamente diferente respecto del grupo control. Las comparaciones se realizaron empleando la prueba de Mann-Whitney.

6.2. Actividad de la enzima catalasa

La enzima catalasa (CAT) se encuentra involucrada en la neutralización de otra ROS, el H₂O₂. En bajas concentraciones, el H₂O₂ actúa como molécula señal, participando

de distintas reacciones. Sin embargo, en altas concentraciones es deletéreo para las células.

En ovarios obtenidos 8 hs post-tratamiento con eCG, la actividad de CAT (figura 31) disminuyó de manera significativa ($4,48 \pm 1,39$ nmoles de CAT/mg de proteínas), al ser comparada con el control ($21,30 \pm 2,50$ nmoles de CAT/mg de proteínas).

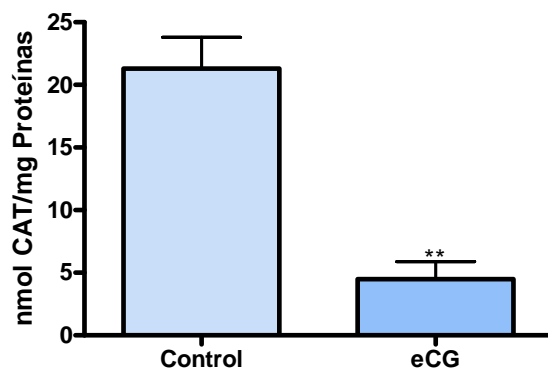


Figura 31: Actividad de CAT 8 hs post-tratamiento. Los animales del grupo control recibieron como vehículo solución fisiológica, ip y aceite de maíz, sc. Los animales del grupo eCG fueron tratados con 25UI/animal de eCG, ip. Ambos grupos fueron sacrificados a las 8 hs post-tratamiento. Cada barra representa la media \pm SEM para 7 animales, cada muestra fue realizado por duplicado. Los resultados se expresan como nmoles de CAT/mg de proteínas.

** : $p < 0.01$ significativamente diferente respecto del grupo control. Las comparaciones se realizaron empleando la prueba de Mann-Whitney.

6.3. Niveles de glutatión total

El glutatión es un tripéptido que reacciona rápidamente con las ROS, pasando de un estado reducido (GSSG) a uno oxidado (GSH), evitando que estas reaccionen con macromoléculas fundamentales para el correcto funcionamiento celular. Es considerado una de las defensas antioxidantes, tanto intra como extracelular, no enzimáticas más importante presentes en el organismo.

Se analizaron los niveles de glutatión total (GSht), como parámetro de defensa antioxidante no enzimática (figura 32). Se observó que la inducción con eCG generó un aumento significativo del contenido de dicho metabolito con respecto al control (grupo eCG: $0,14 \pm 0,01$ μ M GSht/ μ g de proteínas vs grupo control: $0,09 \pm 0,01$ μ M GSht/ μ g de proteínas)

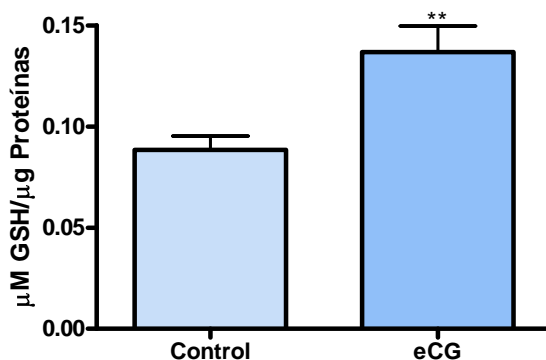


Figura 32: Niveles de GSht 8 hs post-tratamiento. Los animales del grupo control recibieron como vehículo solución fisiológica, ip y aceite de maíz, sc. Los animales del grupo eCG fueron tratados con 25UI/animal de eCG, ip. Ambos grupos fueron sacrificados a las 8 hs post-tratamiento. Cada barra representa la media \pm SEM para 7 animales, cada muestra fue realizado por duplicado. Los resultados se expresan como μM de GSht/ μg de proteínas.

** : $p < 0.01$ significativamente diferente respecto del grupo control. Las comparaciones se realizaron empleando la prueba de Mann-Whitney.

6.4. Contenido de malondealdehído

Las ROS pueden generar daño a diferentes moléculas, cuando éstas moléculas son lípidos al daño se lo denomina *peroxidación lipídica*. Durante este fenómeno, los lípidos se vuelven “radicalarios” siendo capaces de reaccionar con otras moléculas o lípidos vecinos. En estos casos las membranas citoplasmáticas, formadas por grandes cantidades de fosfolípidos, se alteran desensibilizándose del medio exterior. Uno de los productos finales de la peroxidación lipídica es una molécula denominada malondealdehído (MDA). La determinación de los niveles de MDA, o moléculas equivalentes, se emplea como parámetro de daño a las membranas por ROS.

El contenido de MDA (figura 33), empleado como marcador de daño a lípidos, no mostró diferencias significativas entre los grupos estimulados con eCG y control (control: $3,35 \pm 0,33$ mM de MDA; eCG: $3,00 \pm 0,40$ mM de MDA).

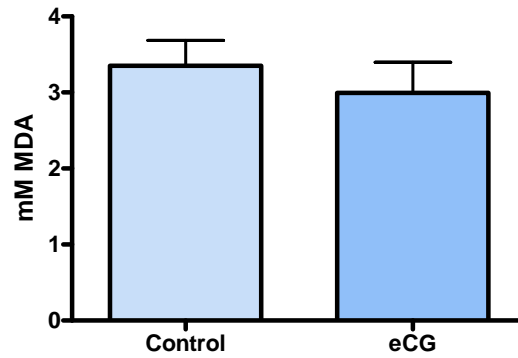


Figura 33: Contenido de MDA 8 hs post-tratamiento. Los animales del grupo control recibieron como vehículo solución fisiológica, ip y aceite de maíz, sc. Los animales del grupo eCG fueron tratados con 25UI/animal de eCG, ip. Ambos grupos fueron sacrificados a las 8 hs post-tratamiento. Cada barra representa la media \pm SEM para 7 animales, cada muestra fue determinada por duplicado. Los resultados se expresan como mM de MDA/ovario. Los grupos no mostraron diferencias significativas. Las comparaciones se realizaron empleando la prueba de Mann-Whitney.

Segunda Parte

Efecto del hiperandrogenismo sobre la etapa de foliculogénesis temprana

Se evaluó el efecto del hiperandrogenismo sobre la morfología ovárica, la expresión de PPAR γ y de las diferentes enzimas reguladoras de la esteroidogénesis, así como sobre los niveles de apoptosis y marcadores de estrés oxidativo. Como referencia para las distintas comparaciones se empleó al grupo de animales tratados con eCG y sacrificados 8 hs post-tratamiento, dado que a ese tiempo, como ya se aclaró, se observa el pico de P₄ sérica, indicando el estado de máxima esteroidogénesis del ovario.

7. Efecto del hiperandrogenismo sobre el peso relativo

En cuanto al peso relativo de los ovarios, con respecto al peso corporal (figura 34), se observó una disminución significativa en aquellos animales hiperandrogenizados [0,39 \pm 0,03 (g de ovario/g de peso corporal)*1000] con respecto a los que fueron estimulados únicamente con eCG [0,49 \pm 0,03 (g de ovario/g de peso corporal)*1000].

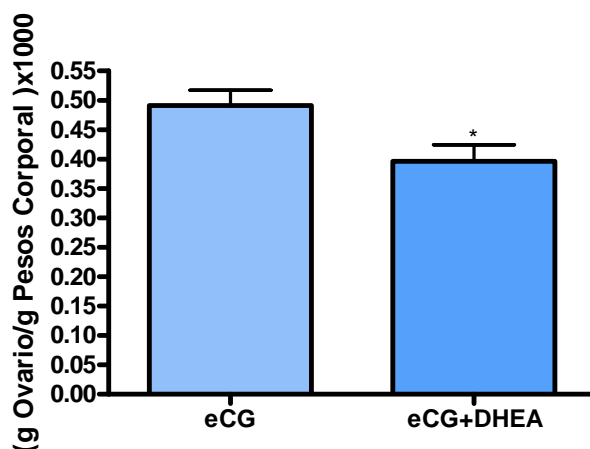


Figura 34: Peso relativo de animales 8 hs post-tratamiento. Los animales del grupo eCG fueron tratados con 25UI/ animal, ip. Los animales del grupo eCG+DHEA fueron tratados con 25UI/animal, ip + 60mg/kg peso de DHEA, sc. Ambos grupos fueron sacrificados a las 8 hs post-tratamiento. Cada barra representa la media \pm SEM para 20 animales, cada muestra fue realizada por duplicado. Los resultados se expresan en (g de ovario/ g de peso corporal)*1000.

*: p<0.05 significativamente diferente respecto al grupo control. Las comparaciones se realizaron empleando la prueba de Mann-Whitney.

8. Análisis histológico por tinción con hematoxilina-eosina

Se realizó una caracterización de la morfología ovárica (figura 35), así como un estudio y análisis de la presencia de las distintas poblaciones foliculares presentes en el momento de máxima capacidad esteroidogénica del ovario, cuando este se desarrolla en condiciones de hiperandrogenismo mediante la tinción con hematoxilina-eosina.

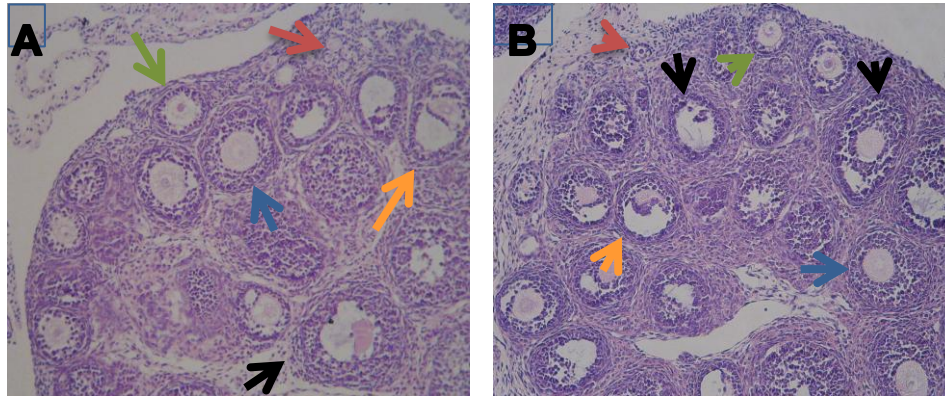


Figura 35: Cortes histológicos de ovarios 8 hs post-tratamiento: A: Sección de ovario correspondiente a animales del grupo control, los cuales recibieron como vehículo solución fisiológica, ip y aceite de maíz, sc (A: 100X). B: Sección de ovario correspondiente a animales grupo eCG+DHEA fueron tratados con 25UI/animal, ip + 60mg/kg peso de DHEA, sc. (A: 100X). Se indican un grupo de folículos primordiales (flecha roja), folículo primario (flecha verde), folículo preantral (flecha azul) y folículo atrésico (flecha negra).

8.1. Efectos del hiperandrogenismo sobre la atresia folicular

Al evaluar el número de folículos sanos y atrésicos (figura 36) en condiciones de hiperandrogenismo, se observó que el número de folículos sanos disminuyó de manera significativa ($6,36 \pm 1,88\%$) al ser comparado con el grupo eCG ($81,53 \pm 1,53\%$). Mientras que el número de folículos atrésicos, por su lado, mostró un aumento significativo cuando se compararon las condiciones de hiperandrogénicas ($29,24 \pm 0,52\%$) frente a las condiciones fisiológicas ($18,47 \pm 1,52\%$).

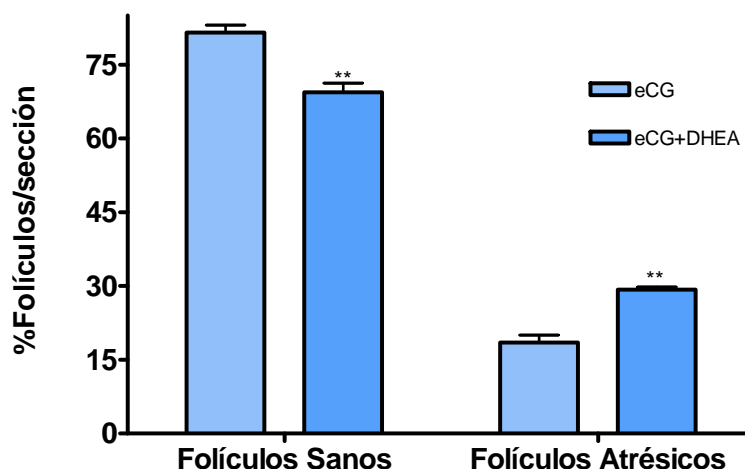


Figura 36: Porcentaje de Folículos sanos y atrésicos 8 hs post-tratamiento. Los animales del grupo eCG fueron tratados con 25UI/animal de eCG, ip. Los animales del grupo eCG+DHEA fueron tratados con 25UI/animal, ip + 60mg/kg peso de DHEA, sc. Ambos grupos fueron sacrificados a las 8 hs post-tratamiento. Cada barra representa la media \pm SEM de 6 ovarios, se determinaron los folículos en tres secciones diferentes de cada ovario (ver Materiales y Métodos). Los resultados se expresan en porcentaje de folículos/sección.

** : $p < 0.01$ significativamente diferente con respecto al grupo control. Las comparaciones se realizaron empleando el test de Bonferroni.

8.2. Efectos del hiperandrogenismo sobre las poblaciones foliculares

Mediante conteo folicular y clasificación de los folículos, realizado de igual manera que en la primera parte de estos resultados, se determinó el porcentaje de folículos en diferentes etapas de desarrollo. Se compararon los porcentajes de cada tipo folicular en las dos condiciones diferentes: fisiológica (tratamiento con eCG) y patológica (tratamiento con eCG+DHEA).

En condiciones de hiperandrogenismo, luego de 8hs de la administración conjunta de eCG y DHEA, se observó una representación diferente con respecto a la población de folículos en cada estadios al compararlos con el grupo eCG (figura 37). El porcentaje de folículos antrales disminuyó 2,43 veces (eCG+DHEA: $18,05 \pm 2,69\%$ vs eCG: $43,94 \pm 10,61\%$), mientras que el porcentaje de folículos primordiales, primarios y preantrales no variaron con respecto el grupo eCG.

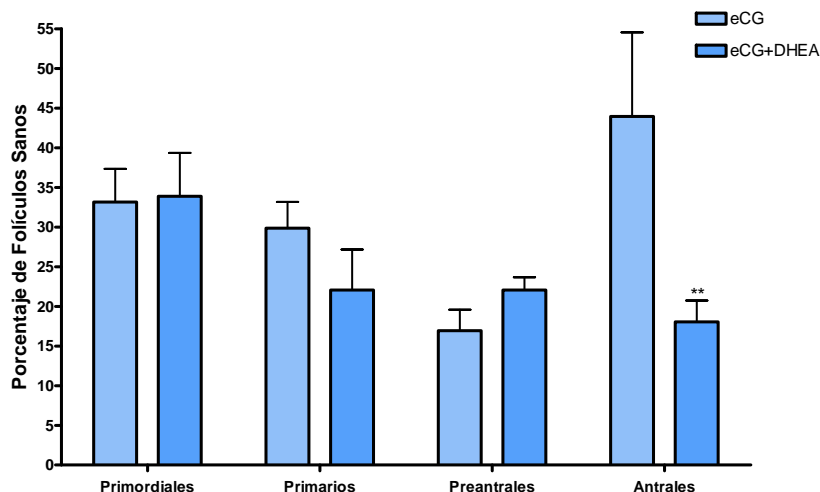


Figura 37: Porcentaje de folículos sanos en diferentes etapas de desarrollo 8 hs post-tratamiento. Los animales del grupo eCG fueron tratados con 25UI/animal de eCG, ip. Los animales del grupo eCG+DHEA fueron tratados con 25UI/animal, ip + 60mg/kg peso de DHEA, sc. Ambos grupos fueron sacrificados a las 8 hs post-tratamiento. Cada barra representa la media \pm SEM de 6 ovarios, se determinaron los folículos en tres secciones diferentes de cada ovario (ver Materiales y Métodos). Los resultados se expresan en porcentaje de folículos/sección.

** : $p < 0.01$ significativamente diferente respecto al grupo eCG. Las comparaciones se realizaron empleando ANOVA de dos vías seguido de test de Bonferroni.

9. Expresión génica y proteica de PPAR γ

9.1. Expresión génica de PPAR γ por la técnica de RT-PCR

A través de la técnica de RT-PCR, se analizó la expresión del ARNm de PPAR γ (figura 38) y se observó que el tratamiento con eCG+DHEA, 8 hs luego de la administración, provocó una disminución, de manera significativa, sobre la expresión de este receptor ($0,41 \pm 0,03$ unidades relativas) con respecto al grupo estimulado con eCG en las mismas condiciones ($1,26 \pm 0,16$ unidades relativas).

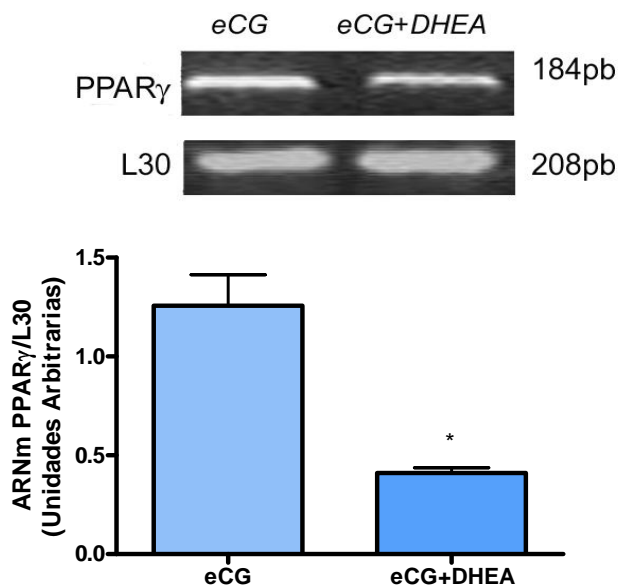


Figura 38: Expresión del ARNm de PPAR γ 8 hs post-tratamiento. Los animales del grupo eCG fueron tratados con 25UI/animal de eCG, ip. Los animales del grupo eCG+DHEA fueron tratados con 25UI/animal, ip + 60mg/kg peso de DHEA, sc. Ambos grupos fueron sacrificados a las 8 hs post-tratamiento. Cada barra representa la media \pm SEM para 3 animales, cada muestra fue realizada por triplicado. Los resultados se expresan en unidades relativas de ARNm PPAR γ /ARNm L30.

*: $p < 0.05$ significativamente diferente respecto del grupo eCG. Las comparaciones se realizaron empleando la prueba de Mann-Whitney.

9.2. Expresión proteica de PPAR γ por la técnica de western blot

Se analizó la expresión proteica de las dos isoformas de éste receptor mediante western blot (figura 39).

A las 8 hs post-tratamiento con eCG+DHEA, se observó una disminución significativa ($0,87 \pm 0,10$ unidades relativas vs eCG: $1,70 \pm 0,38$ unidades relativas).

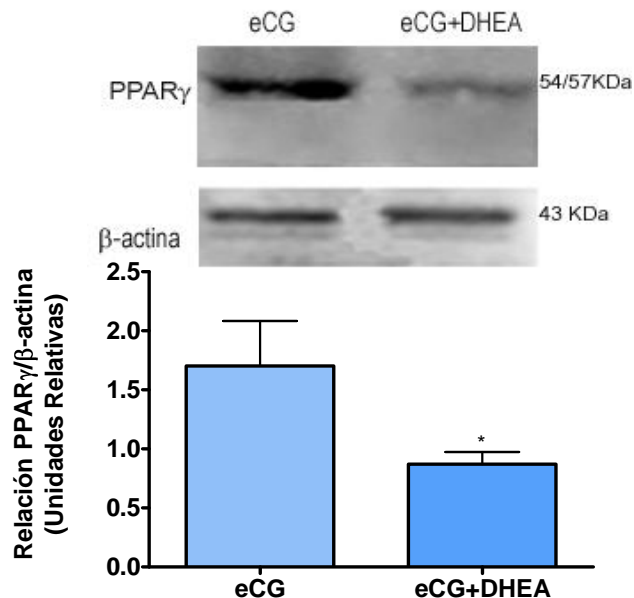


Figura 39: Expresión de la proteína de PPAR γ 8 hs post-tratamiento. Los animales del grupo eCG fueron tratados con 25UI/animal de eCG, ip. Los animales del grupo eCG+DHEA fueron tratados con 25UI/animal, ip + 60mg/kg peso de DHEA, sc. Ambos grupos fueron sacrificados a las 8 hs post-tratamiento. Cada barra representa la media \pm SEM para 3 animales, cada muestra fue realizada por triplicado. Los resultados se expresan en unidades relativas de PPAR γ / β -actina.

*: $P < 0.05$ significativamente diferente respecto del grupo eCG. Las comparaciones se realizaron empleando la prueba de Mann-Whitney.

10. Expresión de las enzimas reguladoras de la esteroidogénesis

Con el objeto de determinar si el efecto del hiperandrogenismo sobre la expresión diferencial de PPAR γ se refleja en modificaciones de la expresión génica de algunas enzimas reguladoras de la esteroidogénesis, se analizó la expresión de StAR, P450 $_{sc}$, 3 β HSD y P450 $_{aro}$, como parámetros de la función esteroidogénica de los folículos.

10.1. Expresión génica de StAR

Los niveles del ARNm de StAR no se modificaron de manera significativa en condiciones hiperandrogénicas ($0,65 \pm 0,07$ unidades relativas) frente a los observados en el grupo eCG ($0,76 \pm 0,11$ unidades relativas) (figura 40).

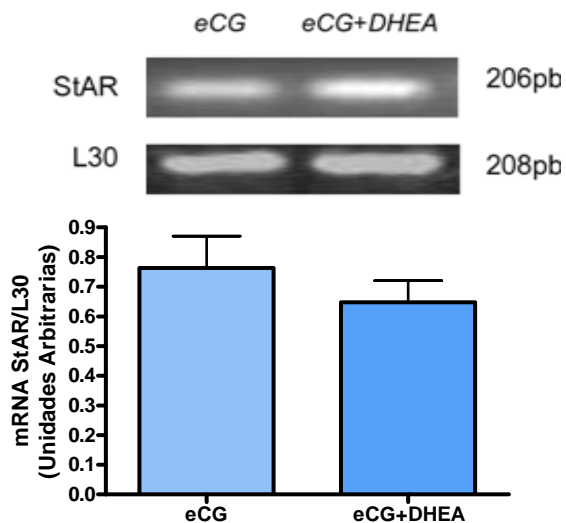


Figura 40: Expresión del ARNm de StAR 8 hs post-tratamiento Los animales del grupo eCG fueron tratados con 25UI/animal de eCG, ip. Los animales del grupo eCG+DHEA fueron tratados con 25UI/animal, ip + 60mg/kg peso de DHEA, sc. Ambos grupos fueron sacrificados a las 8 hs post-tratamiento. Cada barra representa la media \pm SEM para 3 animales, cada muestra fue realizada por triplicado. Los resultados se expresan en unidades relativas de ARNm StAR/ARNm L30.

Los grupos no mostraron diferencias significativas. Las comparaciones se realizaron empleando la prueba de Mann-Whitney.

10.2. Expresión génica de P450scc

Se analizó la expresión del ARNm de P450scc frente al estímulo con eCG en condiciones de hiperandrogenismo (figura 41). Al comparar el grupo hiperandrogenizado ($0,73 \pm 0,06$ unidades relativas) frente al grupo con eCG ($1,35 \pm 0,01$ unidades relativas), se observa una disminución significativa del primero frente al segundo.

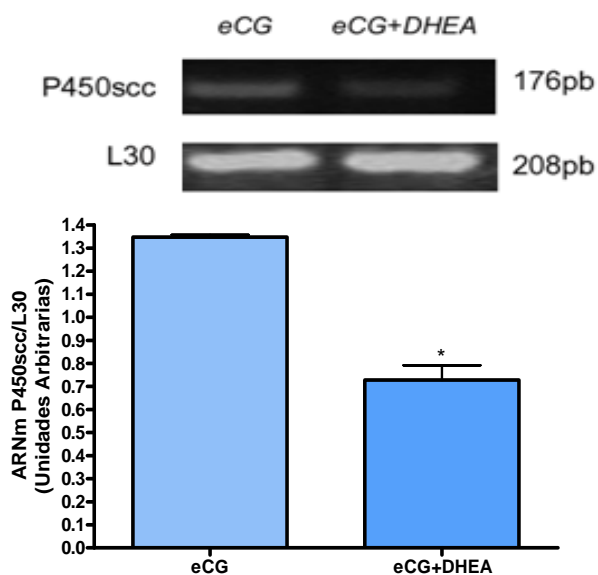


Figura 41: Expresión del ARNm de P450scc 8 hs post-tratamiento. Los animales del grupo eCG fueron tratados con 25UI/animal de eCG, ip. Los animales del grupo eCG+DHEA fueron tratados con 25UI/animal, ip + 60mg/kg peso de DHEA, sc. Ambos grupos fueron sacrificados a las 8 hs post-tratamiento. Cada barra representa la media \pm SEM para 3 animales, cada muestra fue realizada por triplicado. Los resultados se expresan en unidades relativas de ARNm P450scc/ARNm L30.

*: $p < 0.05$ significativamente diferente respecto del grupo eCG. Las comparaciones se realizaron empleando la prueba de Mann-Whitney.

10.3. Expresión génica de 3 β HSD

Con respecto al ARNm de 3 β HSD (figura 42), se observó una disminución en la expresión de esta enzima en condiciones de hiperandrogenismo ($0,80 \pm 0,15$ unidades relativas) frente al estímulo con eCG ($1,68 \pm 0,48$ unidades relativas).

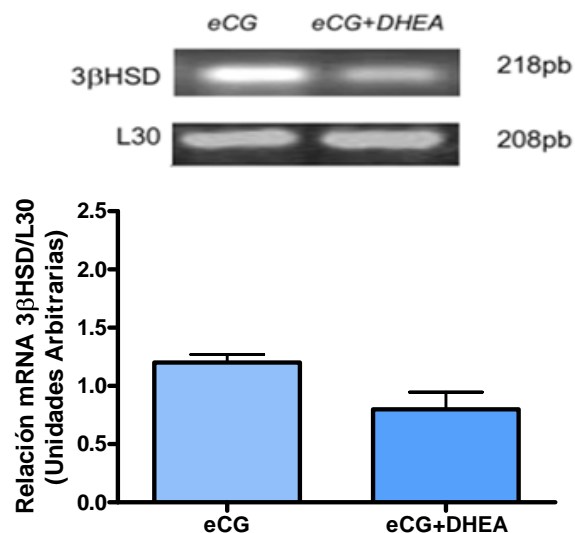


Figura 42: Expresión del ARNm de 3βHSD 8 hs post-tratamiento. Los animales del grupo eCG fueron tratados con 25UI/animal de eCG, ip. Los animales del grupo eCG+DHEA fueron tratados con 25UI/animal, ip + 60mg/kg peso de DHEA, sc. Ambos grupos fueron sacrificados a las 8 hs post-tratamiento. Cada barra representa la media \pm SEM para 3 animales, cada muestra fue realizada por triplicado. Los resultados se expresan en unidades relativas de ARNm 3βHSD/ARNm L30.

*: $p < 0.05$ significativamente diferente respecto del grupo eCG. Las comparaciones se realizaron empleando la prueba de Mann-Whitney.

10.4. Expresión génica de P450aro

Se analizó la expresión del ARNm de P450aro en condiciones de hiperandrogenismo (figura 43). Se observó que la expresión de esta enzima disminuyó cuando los animales fueron tratados con eCG+DHEA y sacrificados 8 hs después (eCG+DHEA: $1,12 \pm 0,11$ unidades relativas vs eCG: $1,50 \pm 0,08$ unidades relativas).

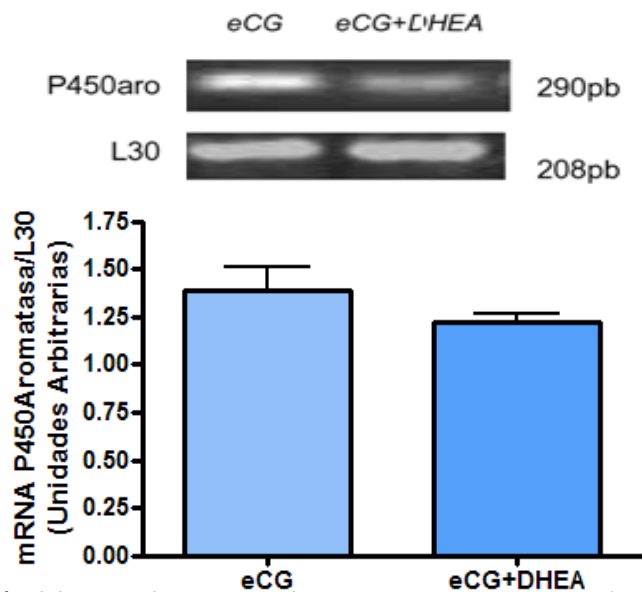


Figura 43: Expresión del ARNm de P450aro 8 hs post-tratamiento. Los animales del grupo eCG fueron tratados con 25UI/animal de eCG, ip. Los animales del grupo eCG+DHEA fueron tratados con 25UI/animal, ip + 60mg/kg peso de DHEA, sc. Ambos grupos fueron sacrificados a las 8 hs post-tratamiento. Cada barra representa la media \pm SEM para 3 animales, cada muestra fue realizada por triplicado. Los resultados se expresan en unidades relativas de ARNm P450aro/ARNm L30.

*: $p < 0.05$ significativamente diferente respecto del grupo eCG. Las comparaciones se realizaron empleando la prueba de Mann-Whitney.

11. Niveles de apoptosis en condiciones hiperandrogénicas

Dado que el hiperandrogenismo aumentó el número de folículos atrésico (figura 36), se analizó el porcentaje de células apoptóticas mediante la técnica de AnexinaV/ioduro de propidio seguida de citometría de flujo (figura 44) y los niveles de fragmentación del ADN mediante la técnica de "laddering" (figura 45).

11.1 Efecto del hiperandrogenismo sobre el porcentaje de células apoptóticas

El porcentaje de células que se encontraban en apoptosis luego de las 8 hs de tratamiento con eCG+DHEA aumentó alrededor de 1,5 veces ($8,07 \pm 1,17\%$ de células apoptóticas) con respecto a los grupo eCG ($3,95 \pm 0,30\%$ de células apoptóticas).

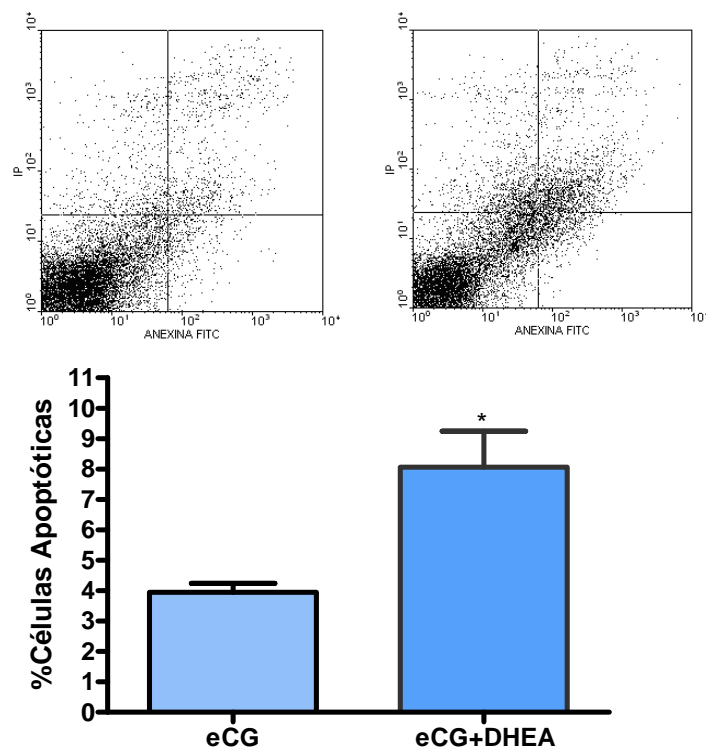


Figura 44: Porcentaje de células apoptóticas 8 hs post-tratamiento. Los animales del grupo eCG fueron tratados con 25UI/animal de eCG, ip. Los animales del grupo eCG+DHEA fueron tratados con 25UI/animal, ip + 60mg/kg peso de DHEA, sc. Ambos grupos fueron sacrificados a las 8 hs post-tratamiento. Cada barra representa la media \pm SEM para 8 animales, cada muestra fue determinada por duplicado. Los resultados se expresan en porcentaje de células apoptóticas.

*: $p < 0.05$ significativamente diferente con respecto al grupo eCG. Las comparaciones se realizaron empleando la prueba de Mann-Whitney.

11.2 Efecto del hiperandrogenismo sobre la fragmentación del ADN

Los procesos apoptóticos constan de diferentes etapas cada una de ellas caracterizadas por fenómenos particulares y, la mayoría de ellos, conocidos. La fragmentación del material genético, en particular, ocurre en etapas tardías de apoptosis, esto es cuando la muerte celular es irreversible.

Dado el aumento del porcentaje de células apoptóticas observado en ovarios de animales hiperandrogenizados (figura 44), se determinó el porcentaje de ADN fragmentado de bajo peso molecular mediante la técnica de “*laddering*” (figura 45) en ovarios provenientes de animales hiperandrogenizados con eCG+DHEA y sacrificados 8 hs después.

En condiciones de hiperandrogenismo se observó que el porcentaje de ADN fragmentado aumentó alrededor de 3 veces ($22,40 \pm 2,21\%$ de ADN fragmentado) respecto del grupo eCG ($7,99 \pm 0,74\%$ de ADN fragmentado).

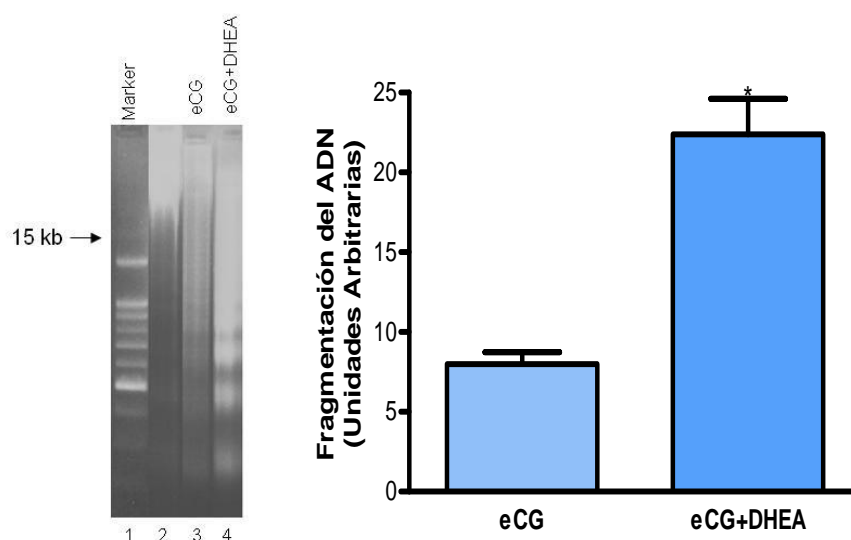


Figura 45: Fragmentación del ADN 8 hs post-tratamiento Los animales del grupo eCG fueron tratados con 25UI/animal de eCG, ip. Los animales del grupo eCG+DHEA fueron tratados con 25UI/animal, ip + 60mg/kg peso de DHEA, sc. Ambos grupos fueron sacrificados a las 8 hs post-tratamiento. Ambos grupos fueron sacrificados 8 hs post-tratamiento. Cada barra representa la media \pm SEM para 5 animales, cada muestra fue realizada por triplicado. Los resultados se expresan en fragmento de ADN de bajo peso molecular (unidades arbitrarias).

*: $p < 0.05$ significativamente diferente respecto del grupo eCG. Las comparaciones se realizaron empleando el test de Mann-Whitney.

12. Parámetros del estado oxidativo mediante técnicas espectrofotométricas

Para determinar a través de qué mecanismo se produce el aumento en los niveles de apoptosis en aquellos ovarios provenientes de animales hiperandrogenizados, se evaluaron las actividades de SOD (figura 46), CAT (figura 47), así como el contenido de GSht (figura 48) y MDA (figura 49), como parámetros del estado oxidativo del ovario.

12.1. Efecto del hiperandrogenismo sobre la actividad de la enzima superoxido dismutasa

Se analizó la actividad de la enzima superoxido dismutasa (SOD) en ovario de animales hiperandrogenizados. Se observó que la actividad de dicha enzima no varió en estas condiciones (figura 46).

La actividad de SOD mostró igual intensidad en aquellos ovarios provenientes de animales estimulados con eCG ($0,081 \pm 0,004$ Unidades de SOD/mg de proteínas) y de aquellos provenientes de animales hiperandrogenizados ($0,081 \pm 0,002$ Unidades de SOD/mg de proteínas).

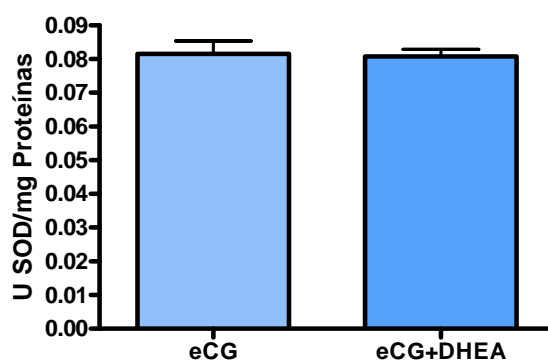


Figura 46: Actividad de SOD 8 hs post-tratamiento. Los animales del grupo eCG fueron tratados con 25UI/animal de eCG, ip. Los animales del grupo eCG+DHEA fueron tratados con 25UI/animal, ip + 60mg/kg peso de DHEA, sc. Ambos grupos fueron sacrificados a las 8 hs post-tratamiento. Cada barra representa la media \pm SEM para 7 animales, cada muestra fue realizado por duplicado. Los resultados se expresan como unidades de SOD/mg de proteínas.

Los grupos no mostraron diferencias significativas. Las comparaciones se realizaron empleando la prueba de Mann-Whitney.

12.2. Efecto del hiperandrogenismo sobre la actividad de la enzima catalasa

Por su lado, la actividad de la enzima CAT (figura 47), no mostró diferencias significativas entre los tratamientos evaluados. Así, se observó una actividad de $5,39 \pm 1,37$ nmoles de CAT/mg de proteínas para el grupo eCG y una actividad similar de $4,42 \pm 1,64$ nmoles de CAT/mg de proteínas para el grupo eCG+DHEA.

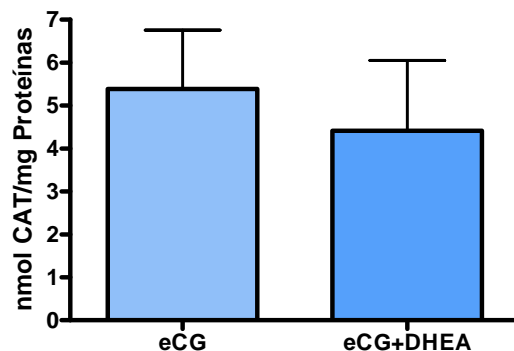


Figura 47: Actividad de CAT 8 hs post-tratamiento. Los animales del grupo eCG fueron tratados con 25UI/animal de eCG, ip. Los animales del grupo eCG+DHEA fueron tratados con 25UI/animal, ip + 60mg/kg peso de DHEA, sc. Ambos grupos fueron sacrificados a las 8 hs post-tratamiento. Cada barra representa la media \pm SEM para 7 animales, cada muestra fue realizado por duplicado. Los resultados se expresan como nmoles de CAT/mg de proteínas.

Los grupos no mostraron diferencias significativas. Las comparaciones se realizaron empleando la prueba de Mann-Whitney.

12.3. Niveles de glutatión total

Como parámetro de defensa antioxidante no enzimática, se analizó el contenido de glutatión total (GSht, figura 48). Se observó que la hiperandrogenización con eCG+DHEA generó una disminución significativa en los niveles de dicho metabolito ($0,07 \pm 0,01 \mu\text{M}$ GSht/ μg de proteínas) con respecto a los animales estimulados con eCG ($0,14 \pm 0,01 \mu\text{M}$ GSht/ μg de proteínas).

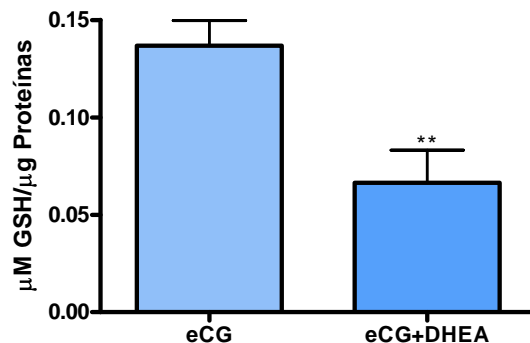


Figura 48: Niveles de GSht 8 hs post-tratamiento. Los animales del grupo eCG fueron tratados con 25UI/animal de eCG, ip. Los animales del grupo eCG+DHEA fueron tratados con 25UI/animal, ip + 60mg/kg peso de DHEA, sc. Ambos grupos fueron sacrificados a las 8 hs post-tratamiento. Cada barra representa la media \pm SEM para 7 animales, cada muestra fue realizado por duplicado. Los resultados se expresan como μM de GSht/ μg de proteínas.

** : $p < 0.01$ significativamente diferente respecto del grupo eCG. Las comparaciones se realizaron empleando la prueba de Mann-Whitney.

12.4. Contenido de malondealdehído

El contenido de malondealdehído (MDA, figura 49), empleado como marcador de daño a macromoléculas (específicamente, lípidos), aumentó significativamente alrededor del 71% en condiciones de hiperandrogenismo ($5,73 \pm 0,55$ mM de MDA vs eCG: $3,00 \pm 0,40$ mM de MDA).

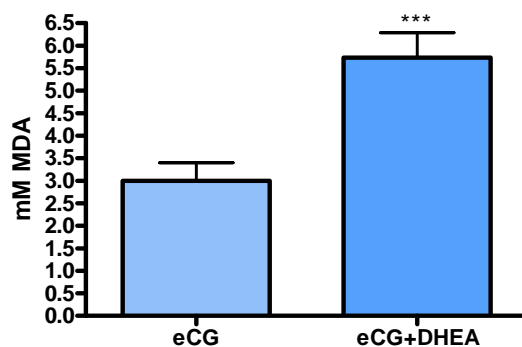
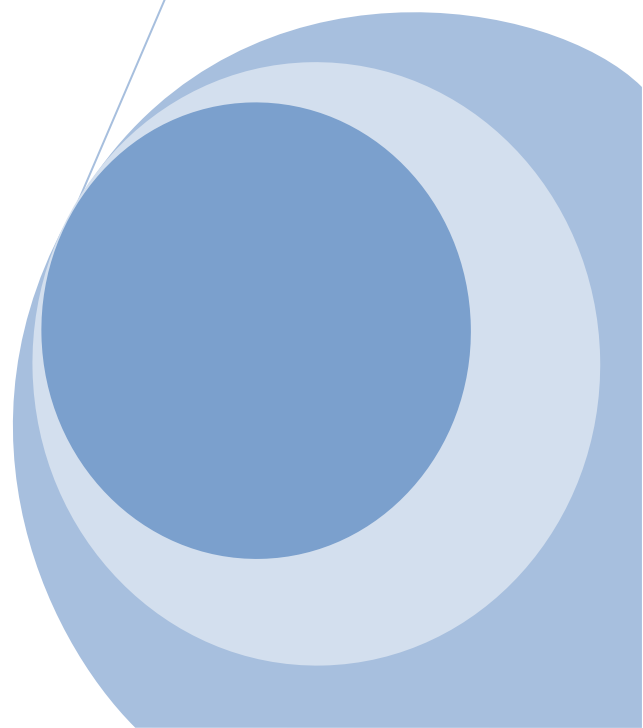
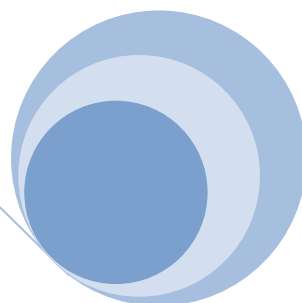
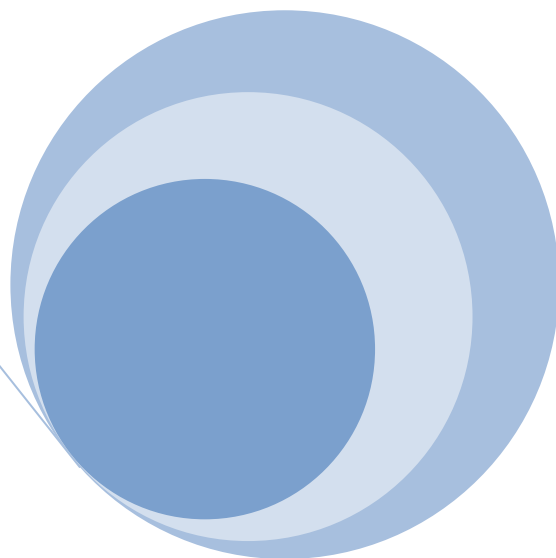


Figura 49: Contenido de MDA 8 hs post-tratamiento. Los animales del grupo eCG fueron tratados con 25UI/animal de eCG, ip. Los animales del grupo eCG+DHEA fueron tratados con 25UI/animal, ip + 60mg/kg peso de DHEA, sc. Ambos grupos fueron sacrificados a las 8 hs post-tratamiento. Cada barra representa la media \pm SEM para 7 animales, cada muestra fue determinada por duplicado. Los resultados se expresan como mM de MDA/ovario. ***: $p < 0.001$ significativamente diferente con respecto al grupo eCG. Las comparaciones se realizaron empleando la prueba de Mann-Whitney.



Discusión



La reproducción es, quizás, el proceso fisiológico de mayor costo energético. Particularmente, el desarrollo femenino es uno de los eventos más importantes y prolongados en la vida de la mujer. Comienza momentos después de la concepción con la migración de las células madres que darán origen a las gametas. Estas colonizan un nicho en particular donde, luego, se formarán los ovarios. En ese lugar, desde ese preciso momento, comenzarán a desarrollarse y madurar los oocitos.

Los mecanismos que regulan el proceso reproductivo están íntimamente relacionados con el balance energético. Esta relación, junto con otros factores, asegura que tanto el embarazo como la lactancia ocurran en condiciones favorables. De la misma manera, las alteraciones que puedan producirse durante el embarazo afectarán directamente el desarrollo del embrión, causando numerosas patologías. Entre ellas, patologías reproductivas. Estas, a su vez, pueden estar influenciadas por factores ambientales como la dieta, el ejercicio, el estrés peripuberal y las toxinas ambientales que inciden en individuos genéticamente susceptibles. Este conjunto de factores hace que la etiología de las mismas sea heterogénea, resultando difícil el diagnóstico temprano¹⁵⁶.

La infertilidad, según la Organización Mundial de la Salud (OMS), está definida como la incapacidad de concebir luego de 12 meses de tener relaciones sexuales sin protección. El rango de mujeres infértiles es del 7 al 28%, dependiendo de la edad. En promedio, alrededor del 84% de las parejas son capaces de concebir luego del año de relaciones sexuales¹⁷⁸. La infertilidad es considerada, por la OMS, como una enfermedad crónica. Sin embargo, posee características que la diferencia del resto de los padecimientos físicos: no afecta a la funcionalidad de ningún órgano y, por tanto, no impone limitaciones físicas a quienes la sufren, no hay sintomatología ni dolor asociado a la misma, no existe una amenaza real a la propia vida, y las parejas pueden elegir libremente someterse o no a tratamiento ya que su evolución no supone peligro alguno para la supervivencia. Pero la realidad es que, a pesar de todo esto, las personas con problemas de infertilidad, presentan reacciones emocionales que han sido igualadas a las que presentan pacientes con otras patologías crónicas graves, como por ejemplo la depresión¹⁷⁹.

El Síndrome del Ovario Poliquístico (SOP) es una de las endocrinopatías femeninas más comunes en mujeres en edad reproductiva. Este síndrome posee diversos fenotipos, dentro de los cuales pueden observarse alteraciones metabólicas, como hiperinsulinemia, y alteraciones sistémicas, siendo el hiperandrogenismo la característica más notable^{122, 180, 181}. Si bien se desconoce la génesis de esta patología, resultados recientes empleando animales de experimentación, junto con la evidencia clínica¹²², han permitido proponer que el desarrollo de SOP es un proceso lineal con origen anterior a la adolescencia. Se sugiere que las anormalidades en la secreción y acción de LH, insulina y andrógenos y en la ciclicidad menstrual observadas en niñas son representantes de la exposición durante la vida intrauterina a altos niveles de andrógenos. Eisner y colaboradores (2002)¹⁸² han demostrado que la exposición prenatal a un exceso de andrógenos genera un estado hiperandrogénico similar al observado en mujeres con SOP. En estas condiciones, existe un componente ovárico, como el aumento de la actividad de la 17 α -hidrolasa, pero estos autores postulan que este estado "ovárico hiperandrogénico" está acompañado y/o incrementado por otros factores como la hipersecreción de LH, hiperinsulinemia y exceso en la síntesis de andrógenos adrenales. Demostrando, así, un paralelismo endocrinopático con mujeres con SOP.¹⁸²

Algunos autores proponen que el exceso de andrógenos observados en el feto podrían ser generados por el ovario^{183,184} o la corteza de la glándula suprarrenal¹⁸⁵. Los andrógenos producidos durante la diferenciación son potentes factores de transcripción de genes e inducen la transcripción de otros factores (tales como c-fos) que interactúan con sus propios receptores en muchos tejidos fetales. Por otro lado, se ha encontrado evidencia de la asociación entre las variantes del locus de CYP11a, el cual codifica para la enzima P450_{scc}, con el hiperandrogenismo en mujeres con SOP¹⁵³. Si bien, es poco probable que genere SOP de manera exclusiva, variaciones de este locus pueden contribuir a la producción excesiva de andrógenos, apoyando la hipótesis de que la función ovárica puede ser consecuencia de una determinación genética alterada. La insulina, por su lado, actúa de manera sinérgica con LH aumentando la esteroidogénesis e induciendo un arresto prematuro de los folículos en desarrollo¹⁵⁴. Este exceso de

andrógenos fetales (y/o prepuberal)¹⁵⁵ “programa” el control hipotálamo-hipófisis de LH, aumentando la distribución visceral de las grasas, además de predisponer a la resistencia de insulina y la anovulación, causando manifestaciones clínicas de hiperandrogenismo en adultos. Otros factores genéticos secundarios o el ambiente, como los malos hábitos alimenticios, pueden interactuar con este proceso y generar fenotipos heterogéneos de este síndrome que aflige a tantas mujeres.

De aquí que se plantee una incógnita y esta sea si la alteración en la funcionalidad ovárica, asociada al SOP, es generada por un exceso de andrógenos durante el desarrollo de los ovarios en la vida intrauterina.

La adolescencia, definida por la OMS, comprende desde los 10-años hasta los 20 años y genera una serie de cambios fisiológicos que se expresan de forma física y bioquímica. Esta maduración biológica, la adquisición de la capacidad de procrear, es el logro por excelencia de la pubertad y los cambios que se desarrollan son normales solo si son transitorios y culminan al terminar este período. Este conjunto de condiciones genera al especialista un desafío a la hora de diagnosticar ciertas patologías, como por ejemplo SOP, cuya sintomatología semeja a este periodo de desarrollo^{156, 157}. Durante la adolescencia, se debe identificar en qué momento la presentación clínica de un síntoma o signo en una paciente es solo una manifestación normal de esta etapa o es un indicio de una alteración reproductiva.

Normalmente, las mujeres producen un solo folículo dominante que participa en una única ovulación durante cada periodo menstrual. Este evento ocurre principalmente como resultado de dos procesos ininterrumpidos del desarrollo folicular: el reclutamiento y la selección. Varios estudios clínicos y hormonales sugieren que este proceso no ocurre de manera normal en mujeres con SOP¹⁸⁶. El paso inicial en la formación del folículo antral, el reclutamiento folicular, se considera intacto en pacientes con SOP¹⁸⁷, pero el siguiente paso, la selección del folículo dominante, aparentemente es anormal¹⁸⁸.

El diseño, estudio, análisis y discusión de este trabajo de tesis tuvo como meta principal acotar la tan amplia pregunta que ha sido planteada a “cómo el exceso de

andrógenos durante la vida peripuberal altera la funcionalidad ovárica?” y “Cuál es el rol que desempeñan los PPAR γ en esta alteración?”. Para ello, generamos un modelo en donde ratas hembras prepúberes son estimuladas para acelerar el comienzo del desarrollo y ciclado folicular en condiciones hiperandrogénicas¹⁸⁹.

Así, nos propusimos estudiar qué ocurría en las primeras etapas del desarrollo folicular en un ambiente hiperandrogénico, esto es antes de que ocurra el ciclado estral en ratas hembras prepúberes. Para estimular el desarrollo folicular administramos gonadotrofina coriónica equina (eCG), esta hormona posee un tiempo de vida medio largo y es agonista de los receptores de FSH, lo que permite la estimulación ovárica con una única administración¹⁹⁰. Para desarrollar un ambiente hiperandrogénico, los animales fueron tratados con dehidroepiandrosterona (DHEA). El modelo experimental propuesto se basa en el desarrollado por Lee y colaboradores (1991)¹³⁶, en donde luego de un tratamiento prolongado con DHEA observaron la formación de quistes en los ovarios y alteración en las concentraciones séricas de andrógenos, estrógenos y progesterona (P₄). DHEA es una hormona sintetizada de manera endógena por la glándula suprarrenal en un 90% y solo el 10% proviene del ovario, específicamente de las células de la teca.

La principal función del ovario es la diferenciación y liberación de un oocito maduro para su posterior fertilización. Sumado a esto, el ovario produce distintas hormonas esteroideas, las cuales permiten esta diferenciación y maduración, pero también están involucradas en el desarrollo de las características secundarias femeninas y en la mantención del embarazo. En los mamíferos, cada folículo está formado por un oocito central rodeado por células de la granulosa y por fuera de la misma se encuentra las capas de células de la teca. El destino de cada folículo está controlado tanto por factores parácrinos como endócrinos, y de la capacidad que tenga el folículo en cuestión para responder a ellos¹⁹¹⁻¹⁹³. Los folículos se desarrollan atravesando diferentes estadios, cada uno de ellos caracterizados morfológica y funcionalmente en primordiales, primarios y secundarios, para luego adquirir una cavidad antral. En esta etapa la mayoría de los folículos caen en atresia, los pocos que “sobreviven” son aquellos capaces de responder a

la estimulación cíclicas de las gonadotrofinas, que ocurre durante la pubertad, llegando a la etapa preovulatoria^{191, 192}. El número de oocitos, por lo tanto, se encuentra determinado durante la vida temprana de las hembras. Por este motivo, la senescencia ovárica está relacionada con la disminución y eventual agotamiento de la reserva de folículos primordiales.

En el modelo animal que empleamos, se indujo a la foliculogénesis con una única dosis de eCG, evaluándose los niveles de P_4 a diferentes tiempos. En coincidencia con otros grupos de trabajo¹⁵⁸, luego de 8hs de administrado el agosnita de FSH (eCG) observamos un pico de P_4 , el cual indicó el momento de máxima capacidad progestágena en este modelo.

La inducción de la foliculogénesis temprana, luego de 8hs de la administración de eCG, en animales prepúberes produjo un aumento en el peso relativo de los ovarios de estos animales frente a aquellos que no fueron estimulados. Al realizar un análisis de la morfología de estos ovarios y de los folículos que en él estaban presentes, se observó que el porcentaje de folículos sanos fue mayor que en aquellos ovarios pertenecientes a animales controles.

De la misma forma, se analizaron las poblaciones de folículos en diferentes estadios de desarrollo que se encontraron 8hs luego de la inducción de la foliculogénesis. Observándose un incremento en el número de folículos primarios sanos en aquellos ovarios provenientes de animales estimulados con eCG, únicamente. Esta etapa de desarrollo folicular, denominada reclutamiento I, está caracterizada por un crecimiento en los folículos primarios estimulados por factores intraováricos. Si bien, esta etapa es independiente del estímulo de gonadotrofinas, solo aquellos folículos primarios que respondan a FSH (en este caso eCG) serán capaces de mantenerse en el tiempo y/o desarrollarse, evitando la atresia.

El estado hiperandrogénico en esta etapa de desarrollo, causado por la administración conjunta de eCG y DHEA, provocó una disminución del peso relativo de los ovarios, así como un aumento de folículos atrésicos, con respecto a los ovarios

provenientes de animales estimulados con eCG, únicamente. El análisis morfológico del porcentaje de folículos sanos en los distintos estadios de desarrollo mostró un decremento en el número de folículos antrales, comparándolo con aquellos ovarios provenientes de animales estimulados con eCG. Esto hace suponer que el estado hiperandrogénico alteraría la etapa de reclutamiento II, ya sea frenándola y evitando que los folículos antrales crezcan, lo cual aumentaría la atresia en esta etapa, o evitando que los folículos secundarios se vuelvan dependientes de gonadotrofinas, lo cual conduciría a un aumento en la atresia de esta población folicular ¹⁹⁴.

Aún más, cuando comparamos este estado hiperandrogénico con un estado prepuberal, sin inducción exógena, se observó que en cuanto al peso relativo y la morfología ovárica existían similitudes. El análisis de las poblaciones foliculares presentes mostró diferencias en las poblaciones de folículos sanos. En este caso, en ovarios provenientes de animales hiperandrogenizados el número de folículos primordiales aumentó mientras que el número de folículos antrales disminuyó.

Esto muestra que el hiperandrogenismo altera tanto la etapa de reclutamiento I como la de reclutamiento II, en la cual los folículos sobrevivientes de la primera etapa deberían ser capaces de responder a la ciclicidad hormonal característica de la pubertad. De esta manera, este estado hiperandrogénico generaría, por lo menos morfológicamente, ovarios que "mimifican" a los ovarios de la prepubertad ^{156, 157}.

Día a día se siguen buscando factores, moduladores o sustancias de diferentes orígenes para tratar de explicar cómo ocurre y se regula el ciclo ovárico. Así como factores que controlen y modifiquen la estructura ovárica que se modifica durante toda la vida de la hembra, donde esta dinámica implica la maduración de las estructuras y remodelación constante del tejido ovárico. La búsqueda de estas sustancias tiene como uno de sus objetivos principales el control o solución de diferentes patologías reproductivas que conducen a la infertilidad de las mujeres.

En los últimos años se comenzó a estudiar y analizar a los receptores activados por agentes proliferadores de peroxisomas (PPAR). Los cuales, desde su descubrimiento en la

década del 90²³, han cobrado gran importancia en el área de la fertilidad y se los consideran como miembros de la superfamilia de receptores esteroides²⁴. Dentro de esta gran familia, que incluye a PPAR α y PPAR β/δ , se encuentran los PPAR γ , los cuales han sido asociado a la mejora de la sensibilidad a la insulina, regulador de la proliferación de adipocitos y, por lo tanto, de la adiposidad corporal¹⁹⁵ y modulador de las reacciones antiinflamatorias. Sin embargo, su función y regulación no han sido dilucidadas totalmente. Komar y colaboradores (2001)²⁸ han descrito la presencia de ARMm de PPAR γ en ovarios de rata. Se han propuesto a estos receptores como reguladores de la homeostasis, estableciendo un vínculo entre el metabolismo y la reproducción¹⁹⁶⁻¹⁹⁸, siendo los mismos objetos de estudios y de diferentes terapias farmacológicas, dado que existen patologías reproductivas asociadas a desbalances metabólicos, como el SOP.

PPAR γ es activado por numerosas sustancias. Dentro de ellas, hay sustancias de origen natural, como los ácidos grasos poliinsaturados y algunas prostaglandinas (PGs), como 15-deoxy- Δ (12,14)-prostaglandina J(2), y otras de origen sintético, como algunos fármacos empleados en terapias reproductivas¹⁹⁹. Se ha descrito una ciclicidad en la expresión ovárica de estos receptores que se asemeja mucho a la que siguen la P₄, el E₂, la FSH y LH²⁸, adquiriendo una relevancia aún mayor en cuanto a su rol en el desarrollo y diferenciación del oocito.

Las características citadas de PPAR γ junto con las variaciones de P₄ observadas en los grupos experimentales, sumado a los cambios y alteraciones en la morfología y en las poblaciones de folículos presentes en cada grupo, nos llevó a estudiar el comportamiento de estos receptores tan particulares y a analizar su expresión durante la foliculogénesis temprana y si esta se modifica cuando los ovarios se desarrollan en un ambiente hiperandrogénico. De esta manera, estudiamos tanto la expresión génica como proteica de estos receptores en los ovarios de animales provenientes de los diferentes grupos experimentales, y encontramos que la inducción de la foliculogénesis, a través de la administración de eCG, genera un aumento tanto de la expresión génica como proteica de PPAR γ , en cuanto a la observada en ovarios pertenecientes a animales prepúberes

(administración de vehículos). Sin embargo, cuando el ambiente donde estos ovarios maduran es hiperandrogénico este aumento no se observa.

Por lo tanto, el comportamiento de PPAR γ , tanto en un estado fisiológico como patológico, muestra el mismo comportamiento que la producción de P₄, el peso relativo de los ovarios y el porcentaje de folículos sanos, haciendo suponer la existencia de una regulación génica por parte de PPAR γ sobre genes involucrados tanto en la foliculogénesis como en la producción de P₄ ovárica.

Se ha demostrado que, en los ovarios de roedores, PPAR γ se expresa fuertemente en las células de la granulosa, así como también en las células de la teca y del cuerpo lúteo pero con menor intensidad²⁶⁻²⁸. Junto con esto, varios estudios mostraron que la estimulación de PPAR γ , mediante la administración de sustancias agonistas, presenta acciones, aunque contradictorias, sobre la secreción de P₄ y E₂^{26,28}.

Dado que en este modelo se observó una variación en los niveles séricos de P₄ y en la expresión de PPAR γ , analizamos y comparamos la expresión génica de las distintas enzimas reguladoras de la vía esteroidogénica en ovarios prepúberes, en ovarios estimulados y en ovarios estimulados en condiciones hiperandrogénicas.

Así, en ovarios estimulados con eCG, la proteína reguladora de la esteroidogénesis aguda (StAR), la cual se encuentra involucrada en el clivaje del colesterol de la membrana mitocondrial, y la citocromo P450 de corte de cadena lateral (P450_{scc}), encargada de la síntesis de pregnenolona a través del colesterol liberado por StAR, mostraron un aumento durante esta estimulación temprana. Por otro lado, las enzimas 3 β hidroxisteroide-deshidrogenasa (3 β HSD), encargada de la síntesis de P₄ desde la pregnenolona, y P450 aromatasa (P450_{aro}), encargada de la síntesis de E₂, no mostraron diferencias frente a esta estimulación. Ronen Fuhrmann y col., 1998¹⁷⁴ demostraron que StAR aumenta a las 8 hs como un efecto agudo al estímulo de la esteroidogénesis y han postulado que este aumento ocurre en las células intersticiales y no en las células de la granulosa. El rápido aumento de la expresión de StAR, ya a las 2 hs post-tratamiento, provee el primer ejemplo

in vivo de la respuesta aguda de StAR en el ovario de la rata¹⁷⁴. Esta explosión inicial en la expresión de StAR, confinada en las células intersticiales y algunas células de la teca, concuerda con estudios previos realizados en ratas prepúberes sin estimular, en donde estas células (productoras de andrógenos) ya expresan P450scc y posee un gran reservorio de ésteres de colesterol^{200, 201}. Esto sugiere que la expresión de StAR en las células intersticiales completa el repertorio necesario para la esteroidogénesis²⁰², regulándola en sus etapas tempranas.

En nuestro modelo, en aquellos animales estimulados con eCG se observa un aumento en la expresión tanto de StAR como de P450scc junto con el aumento en la expresión de 3 β HSD explicaría, en principio, el aumento observado en los niveles séricos de P₄.

Cuando el ambiente en donde se desarrollan estos ovarios estimulados es hiperandrogénico, la expresión génica de StAR y 3 β HSD no se modifican con respecto a la observada en ovarios estimulados con eCG. Sin embargo, la expresión de P450scc disminuye. Esto sugeriría una menor cantidad de pregnenolona, ya sea por su baja síntesis por parte de P450scc o por una elevada actividad de 3 β HSD (no evaluada en este trabajo). Los niveles de P₄ en este grupo experimental son similares a los observados en animales prepúberes no estimulados, por lo que se podría esperar una disminución en la síntesis de pregnenolona más que a un aumento en su consumo. De la misma manera, se podría esperar un aumento en la expresión de enzimas que empleen P₄ como precursor de otras hormonas. Así, enzimas como la 20 α hidroxisteroide-deshidrogenasa (20 α HSD), encargada de la degradación de P₄ a 20 α -hidroxiprogesterona, generaría un déficit de P₄ lo cual alteraría la capacidad folicular de estos ovarios. Por otro lado, la enzima P450c17, encargada de la transformación de P₄ en distintos precursores androgénicos, podría estar alterada y, conducir a la síntesis de andrógenos en el compartimiento intersticial del ovario^{203, 204}. Sin embargo, quedaría por analizar el comportamiento de esta enzima en el modelo estudiado.

Por otro lado, la expresión génica de P450aro, enzima encargada de la síntesis de E₂, muestra un aumento significativo en el grupo estimulado. Sin embargo, la falta de sensibilidad para determinar E₂ mediante la técnica de RIA, no permite llegar a una conclusión tal como se realizó para P₄.

Por lo expuesto, uno de los factores que regularía la expresión génica de P450scc sería PPAR γ , lo que provocaría un aumento en los niveles de P₄ sérica. Sin embargo, esta regulación no sería únicamente sobre la expresión de P450scc, dado que el aumento en la expresión de 3 β HSD en los animales hiperandrogenizados generaría un incremento en los niveles de P₄ y esto no ocurre. Lo que hace suponer que la expresión de otras enzimas esteroideogénicas estaría siendo regulada por estos factores de transcripción en las diferentes condiciones experimentales.

En este mismo estado de hiperandrogenización, la capacidad esteroideogénica, entendida como la capacidad de secretar P₄, de los folículos disminuye, pero este decremento, ¿se debe únicamente a la desregulación de la vía esteroideogénica u ocurren otros fenómenos relacionados con estos? Para poder responder a esto analizamos, a través de distintos experimentos, los mecanismos apoptóticos y el balance oxidativo en ovarios pertenecientes a los distintos grupos de estudio.

El aumento de la atresia en aquellos ovarios hiperandrogenizados con respecto a aquellos estimulados únicamente con eCG, hace suponer una alteración en los mecanismos apoptóticos y del balance oxidativo, ambos mecanismos ligados entre sí. Por un lado, las especies reactivas del oxígeno (ROS), las cuales cumplen tanto un rol fisiológico como patológico en el tracto reproductivo femenino⁹⁷, junto con los mecanismos antioxidantes mantienen el balance oxidativo de las células, evitando que se generen daño a macromoléculas vitales⁹⁷. Por otro, los mecanismos pre- y pro-apoptóticos dependen de la concentración y modulación de diferentes sistemas para su activación y/o inhibición.

Es sabido que los receptores PPARs aumentan el número de peroxisomas al ser estimulados, lo que genera un desbalance en el estado oxidativo de la célula estimulando

mecanismos apoptóticos²⁰⁵. Así, por ejemplo, PPAR γ estimula la síntesis de PGs, estas moléculas están involucradas en la maduración folicular a través de la modulación de ROS⁹⁷.

Diferentes parámetros fueron evaluados para analizar el estado oxidativo y apoptótico de los ovarios de los tres grupos experimentales. Así, cuando los animales son estimulados con eCG la actividad de la enzima Superóxido Dismutasa (SOD) aumenta, la de la enzima Catalasa (CAT) disminuye y los niveles de glutatión total (GSht) se incrementan, con respecto a aquellos animales no estimulados. Esto muestra que el daño por la generación de ROS, estaría siendo controlado por los mecanismos de SOD, CAT y GSH, los cuales permitirían un incremento “controlable” necesario para que la foliculogénesis se lleve a cabo. Esto hace que los niveles de malondealdehído (MDA), como parámetro de daño a macromoléculas y de la estructura de las membranas, no se modifiquen. Indicando la normal fluidez de las membranas para la correcta señalización subcelular y sobrevivencia de las células, lo que se corrobora al no observar modificaciones en los niveles apoptóticos.

Cuando los animales son hiperandrogenizados, se observa un aumento en los niveles de apoptosis de estos ovarios, frente a los observados en los grupos no estimulado o estimulado con eCG. La alteración de los mecanismos apoptóticos, nos hizo suponer una variación en los parámetros oxidativos. Para probar esto, en estos mismos ovarios hiperandrogenizados, se determinaron y cuantificaron diferentes parámetros del estado oxidativo. Observamos que, tanto SOD como CAT se encuentran alteradas, al igual que en el grupo estimulado con eCG. Pero a diferencia de este último grupo, cuando la foliculogénesis se induce en un ambiente hiperandrogénico, los niveles de GSht disminuyen, generando una pérdida del control sobre el daño oxidativo. Esto se traduce en un incremento notable en los niveles de MDA, al compararlos con el grupo no estimulado y el grupo estimulado con eCG, lo que estarían indicando daño de las membranas celulares. Este desarreglo en las membranas alteraría las funciones fisiológicas de las mismas, como la generación de potencial, la fluidez y/o la permeabilidad

a ciertas sustancias y, consecuentemente se generaría una desensibilización de receptores²⁰⁶. Esto provocaría una insuficiencia en la estimulación hormonal, lo que conduciría a una falla en el reclutamiento de estos folículos, llevándolos a atresia.

Uno de los motivos por los que se observan altos niveles de apoptosis es que DHEA *per se*, tanto en las concentraciones empleada como en las encontradas en mujeres que sufren SOP, es pro-apoptótico²⁰⁵, generando un mayor número de folículos atrésicos. Esto produciría que, en los primeros estadios de este síndrome, estos ovarios se asemejen morfológica y funcionalmente a ovarios prepuberales.

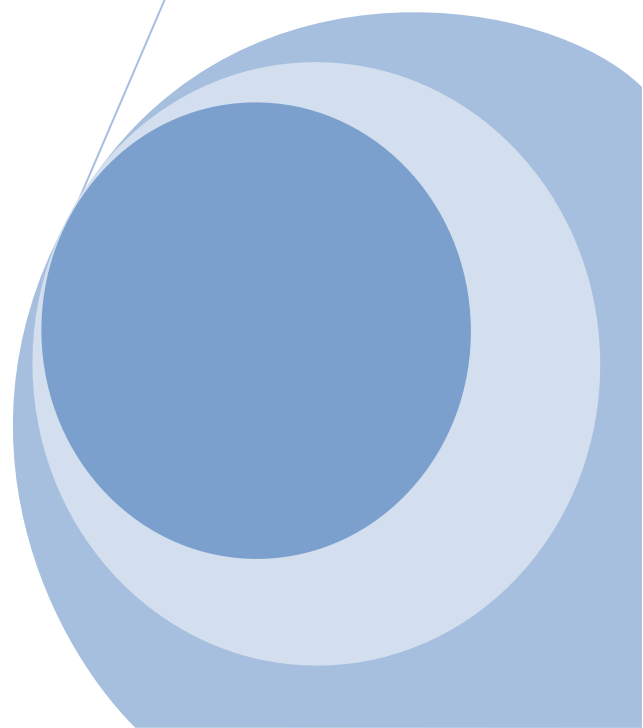
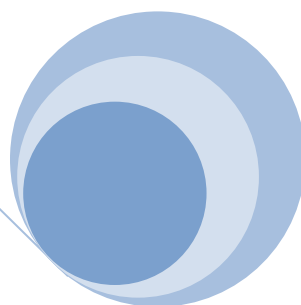
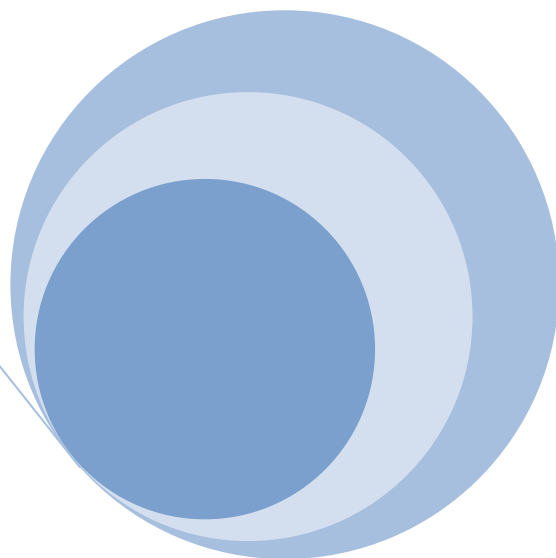
Por otro lado, se ha demostrado que la administración de DHEA en altas cantidades disminuye los niveles de ácido araquidónico y linoleico, ambos blancos de la peroxidación lipídica²⁰⁵. Esta posible disminución en los niveles de ácido araquidónico y ácido linoleico generada por el incremento de la peroxidación lipídica, ambos ligandos naturales de PPAR γ , contribuiría al efecto observado en la expresión génica y proteica de PPAR γ .

Es más, el estrés generado por este estado hiperandrogénico podría contribuir a que las células intersticiales no foliculares, ante la capacidad limitada de las células de la teca interna de expresar P450 scc , debieran asumir el rol de productores de andrógenos antes de diferenciarse en células de la teca en estados tardíos de desarrollo folicular¹⁷⁴. Esto quiere decir que estas células intersticiales serían funcionales aún cuando las células de la teca no se han diferenciado.

En conjunto, estos resultados, indican que el estímulo con eCG induce un aumento en el número de folículos seleccionados, disminuyendo de manera controlada la atresia folicular y sin exacerbar los mecanismos apoptóticos. La capacidad progestágena de estos folículos, indica su normal funcionalidad y desarrollo. Todo esto en conjunto indica que, los folículos de estos animales estimulados con eCG, se comportan de manera similar a folículos en desarrollo puberal, permitiéndonos estudiar los efectos del hiperandrogenismo sobre las primeras etapas de la foliculogénesis y esteroidogénesis. Teniendo en cuenta en qué momento se produce la máxima funcionalidad ovárica, entendida como un aumento de progesterona sérica.

En ovarios prepúberes no hay un desarrollo total de las enzimas de la vía esteroidogénica y la expresión de sus receptores de membrana es incompleta. En cambio, en los ovarios provenientes de animales estimulados con eCG e hiperandrogenizados, si bien existe cierto efecto de eCG sobre los mismos, este no es completo. La inducción de la esteroidogénesis estaría modulada por la síntesis y expresión proteica de PPAR γ . Este, muestra el mismo “comportamiento” que P450 scc , lo que provocaría una disminución de pregnenolona en condiciones hiperandrogénicas, no llegando a niveles control de progesterona. Este desbalance en la capacidad esteroidogénica del folículo generaría una alteración del balance oxidativo. En esta situación especies reactivas, como el H $_2$ O $_2$ regulado por CAT, actuarían como deletéreas en lugar de moduladoras. En este ambiente, el GSht es consumido rápidamente, con lo cual aumenta el daño a lípidos. Esto alteraría la estructura de las membranas, produciendo una desensibilización por parte de los receptores a las señales externas, con lo cual las células no responderían acorde al ambiente que las rodea entrando en un estado apoptótico, conduciendo al folículo a una atresia que, al igual que el desarrollo folicular, es prematura.

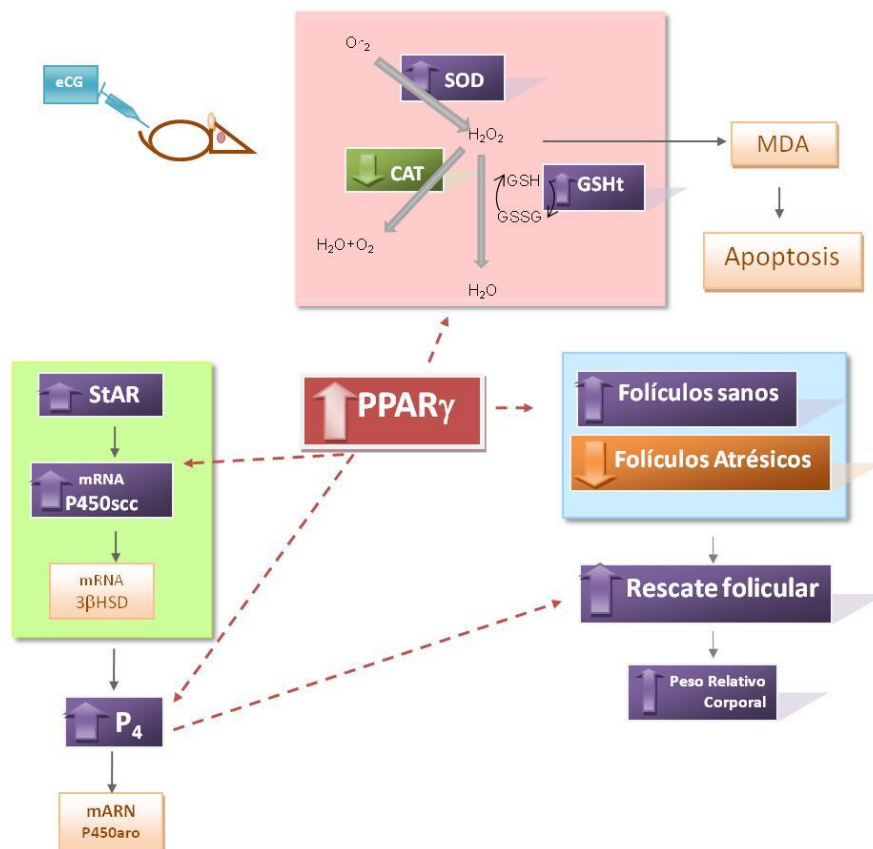
Conclusiones



En este trabajo de Tesis se estudiaron los principales efectos del hiperandrogenismo durante la foliculogénesis temprana y el rol que cumplirían los receptores activados por agentes proliferadores de peroxisomas-gama (PPAR γ) en un modelo murino.

Se caracterizaron los cambios fisiológicos que ocurren durante la foliculogénesis temprana, observándose que:

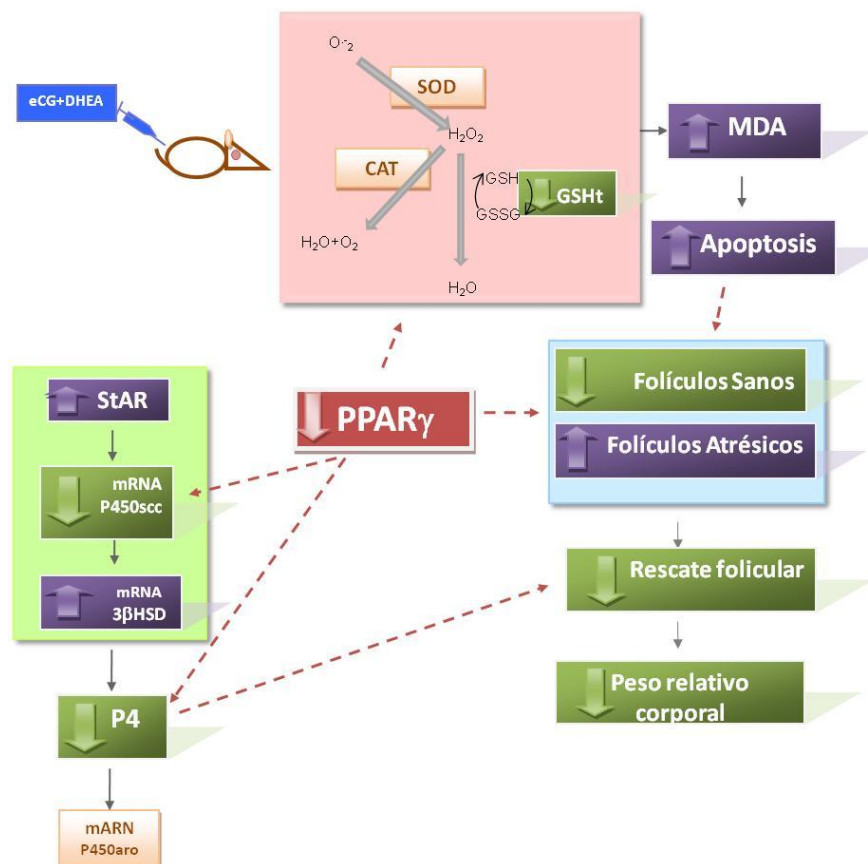
- Los niveles de progesterona sérica aumentan durante las primeras etapas de la foliculogénesis, mostrando un pico a la 8hs post-estimulación. Esto determina la funcionalidad máxima del ovario, traducida en una capacidad esteroideogénica óptima.
- Durante la funcionalidad máxima del ovario, el peso relativo de los mismos aumentan debido a un incremento en el número de folículos sanos. Durante las primeras 8 horas de la foliculogénesis, ocurre un incremento en el número de folículos primarios mostrando una aceleración en el reclutamiento folicular.
- Tanto la expresión génica como proteica de PPAR γ aumentan durante la foliculogénesis temprana, y esto se correlaciona con un aumento en la expresión de StAR y P450scc, ambas claves en la esteroideogénesis folicular. No ocurre así con la expresión de 3 β HSD.
- Los niveles de apoptosis se encuentran controlados durante la etapa temprana de foliculogénesis. Así como el estado oxidativo de estos ovarios, mostrando niveles basales de peroxidación lipídica.



Esquema VI: Diagrama de los cambios observados durante la foliculogenesis temprana (8h post-administración de eCG) frente a un estado prepuberal (sin inducción).

Durante la foliculogénesis temprana en un estado hiperandrogénico, se observaron alteraciones en la estructura y funcionalidad de los ovarios:

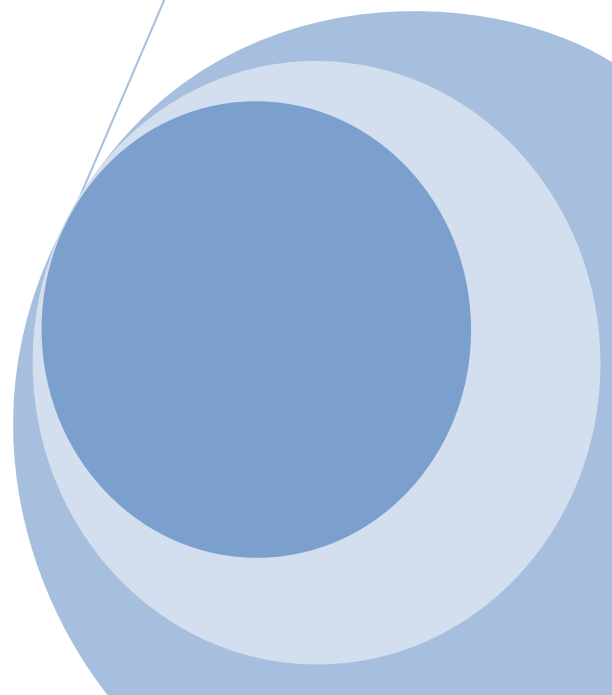
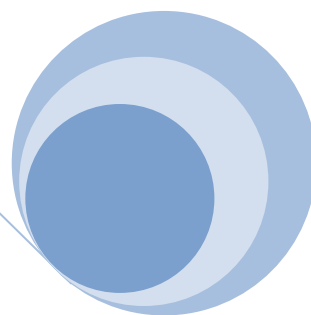
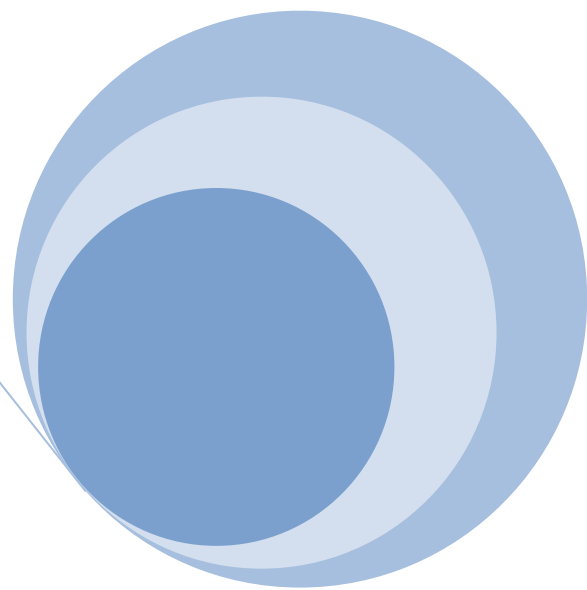
- Los niveles de progesterona sérica son similares a los observados en animales que no han sido estimulados. Esto se corresponde con una deficiencia funcional por parte de los folículos.
- El peso relativo de los ovarios disminuye, así como también lo hace el número de folículos sanos. Ocurre una disminución en la población de folículos primarios indicando arresto folicular. Asemejándose a lo observado en animales no estimulados.
- Los niveles del ARNm de P450scc disminuyen, al igual que la expresión proteica de PPAR γ . Esto indicaría que existe una regulación positiva por parte de PPAR γ sobre la expresión de P450scc, no así sobre StAR ni 3 β HSD.
- Existe un aumento en los niveles de apoptosis y en el estado oxidativo de estos ovarios, lo que se correlaciona con un aumento en el número de folículos atrésicos en estas condiciones.



Esquema VII: Diagrama de los cambios observados durante la foliculogénesis temprana en un estado hiperandrogénico (8hspost-administración de eCG+DHEA) frente a un estado puberal (8hspost-administración de eCG).

En vista de lo expuesto en este trabajo, podemos concluir que PPAR γ juega un rol fundamental durante la foliculogénesis temprana, actuando de manera directa o indirecta sobre la transcripción de distintos genes involucrados en la esteroidogénesis. Así como, aseverar, que en condiciones de hiperandrogenismo se altera la expresión de este receptor que, entre otros factores, modifica la funcionalidad ovárica, comprometiendo el correcto desarrollo folicular.

Perspectivas



El presente trabajo deja abierta la posibilidad del estudio y análisis de los siguientes objetivos con el fin de dilucidar el camino que ha emprendido:

1. Continuando con el modelo murino planteado, determinar los niveles de expresión génica y proteica de 20α HSD y P450c17, al fin de dilucidar por qué varían el nivel de P_4 en los diferentes tratamientos. Por el mismo motivo, determinar las actividades enzimáticas de 20α HSD y 3β HSD²⁰⁷.

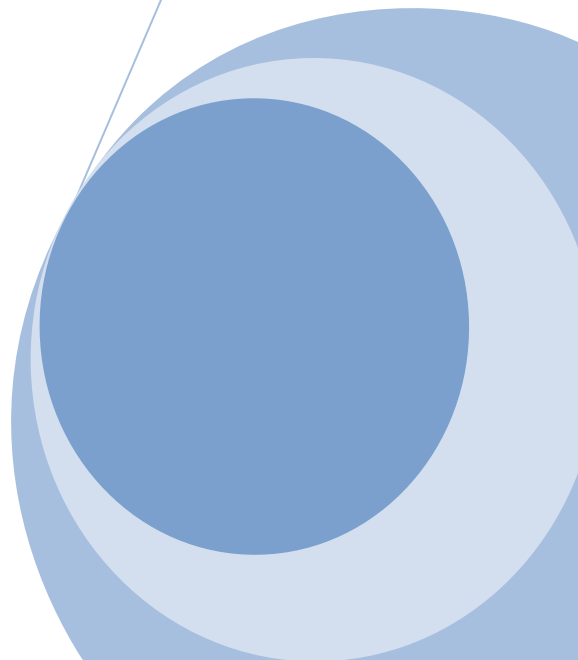
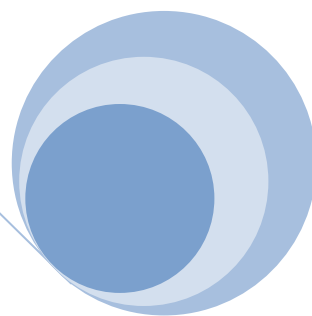
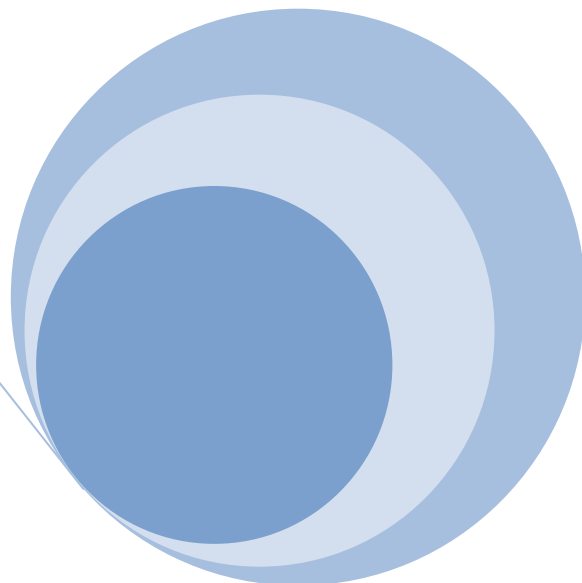
2. En el modelo planteado, determinación la capacidad de captura de $OH\cdot$ Por parte del tejido ovárico mediante el Ensayo de Resonancia de Espin Electronico (ESR), así como el daño a otras macromoléculas, como las proteínas (determiando los niveles de carbonilación, por ejemplo). Tratando de establecer a través de especies reactivas del oxígeno se mantiene o no el balance oxidativo.

3. En estos mismos grupos experimentales, determinación de la expresión proteica de P450aro y los niveles de estradiol. Tratando de establecer que ocurre en lo últimos pasos de la esteroidogénesis.

4. Determinar los niveles de glucosa e insulina. Estableciendo un posible desbalance metabólico en este modelo.

5. Estudiar la relación entre PPAR γ y moléculas sensoras de energía y su relación con la reproducción³⁷, mediante cultivos celulares primarios de células de la granulosa tratados con P_4 exógena y agonistas de PPAR γ .

Apéndice



Peso Relativo y Morfología ovárica

Tabla 1: Peso relativo y morfología ovárica de animales 8 hs post-tratamiento. Los animales del grupo control recibieron como vehículo solución fisiológica, ip y aceite de maíz, sc. Los animales del grupo eCG fueron tratados con 25UI/ animal, ip. Los animales del grupo eCG+DHEA fueron tratados con 25UI/animal, ip + 60mg/kg peso de DHEA, sc. Fueron sacrificados a las 8 hs post-tratamiento.

a: p<0.05 y b: p<0.01 significativamente diferente respecto al grupo control. c: p<0.05 y d: p<0.01 significativamente diferente respecto al grupo eCG. Para el peso relativo las comparaciones se realizaron empleando Análisis de Varianza de un Factor, seguida de la prueba de Tukey. Para la comparación entre las poblaciones foliculares se empleó Análisis de Varianza de dos factores, seguido de la prueba de Bonferroni. n: número de ovarios empleados. N: número de animales empleados.

		Control			eCG			eCG+DHEA		
		Media	SD	n	Media	SD	n	Media	SD	n
Peso relativo		0,3550	0,1047	28	0,4717 ^b	0,1176	26	0,3886 ^c	0,1424	26
		Media	SEM	N	Media	SEM	N	Media	SEM	N
Folículos	Sanos	59,7756	5,6089	3	81,5254 ^b	1,5254	3	68,2316 ^c	2,60167	3
	Atrésicos	40,2243	5,6089	3	18,4745 ^b	1,52542	3	29,6783 ^{a,c}	0,5116	3
Folículos	Primordiales	19,8178	2,2768	3	28,6592	5,3844	3	36,9593 ^a	2,4823	3
	Primarios	19,7955	4,7060	3	37,0662 ^a	4,5996	3	22,0695	5,1091	3
	Preantrales	27,2058	2,2058	3	16,9326	2,6448	3	26,6551	4,7481	3
	Antrales	41,8803	4,8159	3	43,9394	10,6061	3	18,0493 ^{b,d}	2,6866	3

Expresión génica y proteica de PPAR γ

Tabla 2: Expresión génica y proteica de PPAR γ . Los animales del grupo control recibieron como vehículo solución fisiológica, ip y aceite de maíz, sc. Los animales del grupo eCG fueron tratados con 25UI/ animal, ip. Los animales del grupo eCG+DHEA fueron tratados con 25UI/animal, ip + 60mg/kg peso de DHEA, sc. Fueron sacrificados a las 8 hs post-tratamiento.

a: p<0.05 y b: p<0.01 significativamente diferente respecto al grupo control. c: p<0.05 y d: p<0.01 significativamente diferente respecto al grupo eCG. Las comparaciones se realizaron empleando Análisis de Varianza de un Factor, seguida de la prueba de Tukey.

		Control			eCG			eCG+DHEA		
		Media	SD	N	Media	SD	N	Media	SD	N
ppary (mRNA)		0,4433	0,1954	3	1,257 ^b	0,3498	3	0,4105 ^d	0,0530	3
PPARγ (proteína)		0,4764	0,3562	4	1,929 ^b	0,7491	4	0,8711 ^c	0,2049	4

Enzimas reguladoras de la vía esteroideogénica

Tabla 3: Expresión génica de las enzimas de la vía esteroideogénica. Los animales del grupo control recibieron como vehículo solución fisiológica, ip y aceite de maíz, sc. Los animales del grupo eCG fueron tratados con 25UI/ animal, ip. Los animales del grupo eCG+DHEA fueron tratados con 25UI/animal, ip + 60mg/kg peso de DHEA, sc. Fueron sacrificados a las 8 hs post-tratamiento.

a: p<0.05 y b: p<0.01 significativamente diferente respecto al grupo control. c: p<0.05 y d: p<0.01 significativamente diferente respecto al grupo eCG. Las comparaciones se realizaron empleando Análisis de Varianza de un Factor, seguida de la prueba de Tukey.

	Control			eCG			eCG+DHEA		
	Media	SD	N	Media	SD	N	Media	SD	N
StAR	0,2768	0,0697	3	0,7635 ^a	0,1854	3	0,6474 ^a	0,1259	3
P450scc	0,4078	0,1226	3	1,7330 ^b	0,7689	3	0,7823 ^c	0,08904	3
3βHSD	0,5868	0,2626	3	1,2010 ^a	0,1194	3	0,7982	0,2589	3
P450	0,7129	0,2320	3	1,3860 ^b	0,2467	3	1,119	0,2148	3

Niveles apoptóticos y parámetros de estrés oxidativo

Tabla 4: Niveles apoptóticos. Los animales del grupo control recibieron como vehículo solución fisiológica, ip y aceite de maíz, sc. Los animales del grupo eCG fueron tratados con 25UI/ animal, ip. Los animales del grupo eCG+DHEA fueron tratados con 25UI/animal, ip + 60mg/kg peso de DHEA, sc. Fueron sacrificados a las 8 hs post-tratamiento.

a: p<0.05 y b: p<0.01 significativamente diferente respecto al grupo control. c: p<0.05 y d: p<0.01 significativamente diferente respecto al grupo eCG. Las comparaciones para el % de células apoptóticas se realizaron empleando Análisis de Varianza de un Factor, seguida de la prueba de Tukey, mientras que para la fragmentación del ADN se analizó mediante la prueba de Mann-Whitney.

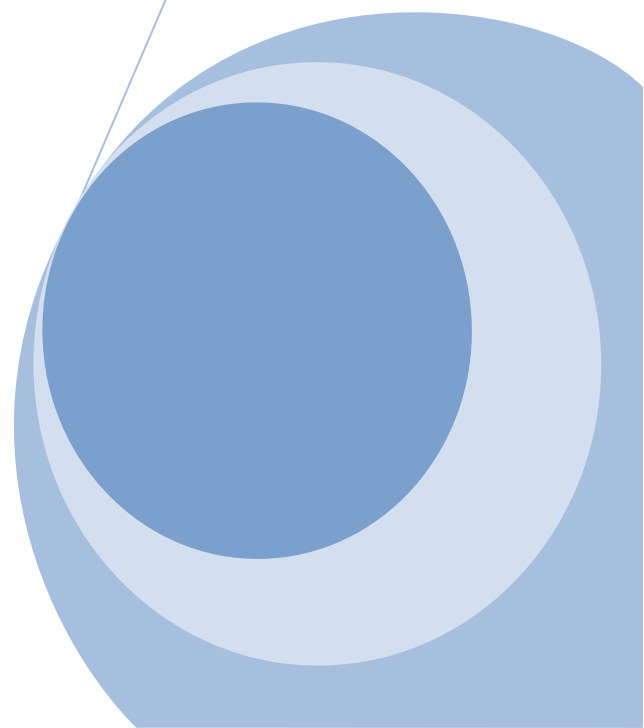
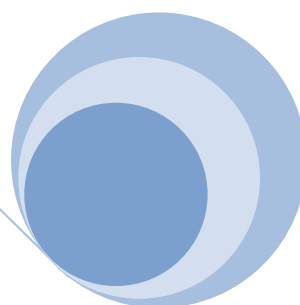
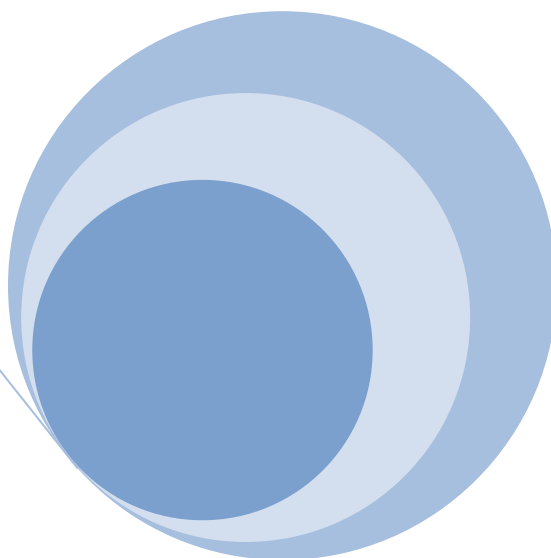
	Control			eCG			eCG+DHEA		
	Media	SD	N	Media	SD	N	Media	SD	N
%células apoptóticas	2,815	1,242	4	3,318	1,332	4	8,067 ^{b,d}	2,036	4
Fragmentación del ADN	---	---	---	7,988	1,487	4	22,40 ^c	4,421	4

Tabla 5: Parámetros de estrés oxidativo. Los animales del grupo control recibieron como vehículo solución fisiológica, ip y aceite de maíz, sc. Los animales del grupo eCG fueron tratados con 25UI/ animal, ip. Los animales del grupo eCG+DHEA fueron tratados con 25UI/animal, ip + 60mg/kg peso de DHEA, sc. Fueron sacrificados a las 8 hs post-tratamiento.

a: p<0.05 y b: p<0.01 significativamente diferente respecto al grupo control. c: p<0.05 y d: p<0.01 significativamente diferente respecto al grupo eCG. Las comparaciones para se realizaron empleando Análisis de Varianza de un Factor, seguida de la prueba de Tukey.

	Control			eCG			eCG+DHEA		
	Media	SD	N	Media	SD	N	Media	SD	N
SOD	0,0242	0,0253	7	0,0815	0,0108	7	0,0807 ^{b,d}	0,0055	7
CAT	21,301	5,591	5	4,481 ^b	3,120	5	4,416 ^b	3,278	5
GSht	0,0885	0,0168	5	0,1450 ^a	0,025	5	0,0664 ^d	0,0409	5
MDA	3,352	1,004	9	2,996	1,208	9	5,732 ^{b,d}	1,667	9

Bibliografía



1. Witschi, E. "Migration of the germ cells of human embryos from the yolk sac to the primitive gonadalfold". *Contrib Embryol.* . (1948). **32**: 67-80.
2. Snow, M. "Autonomous development of parts isolated from primitive streak stage mouse embryos. Is development clonal?" *J. Embryol. Exp. Morphol.* . (1981). **65**: 269-287.
3. Kelly, S. "Studies of the developmental potential of 4 and 8-cells stage mouse blastomeres." *J Exp Zool.* (1977). **200**: 365-376.
4. McLaren, A. "Primordial germ cells in mice". *Bibl Anat.* . (1983). **24**: 59-66.
5. McLaren, A. "Mouse germ cells. Fertilization to birth." *Arch Anat Microsc Morphol Exp.* . (1985). **74**: 5-9.
6. Blandaur RJ y Odor, D. *Observation on the behavior of oogonia and oocytes in tissue and organ culture in "Oogonies"*. (1972). University Park Press Baltimore. 301-302.
7. Gipouloux, J. "A diffusible substance emanating from dorsal mesodermal organs attracts germinal cells situated in the endoderm: experimental demonstration in the common toad (*Bufo bufo* L.)". *Compl Rend Acad Scien.* . (1964). **259**(21): 3844-3847. .
8. Kuwana, T; Maeda-Suga, H y Fugimoto, T. "Attraction of chick primordial germ cells by gonadal enlave in vitro." *Anat Rec.* . (1985). **215**: 403-406.
9. Rogulska, T; OÅ¼dÅ¼eÅ¼ski, Wa y Komar, A. "Behaviour of mouse primordial germ cells in the chick embryo". *J. Embryol. Exp. Morphol.* . (1971). **25**(2): 155-164.
10. Puerta, J; Prados, J y Perez-Miguelsanz, J. "Fisiología del desarrollo del aparato genital." *Acta Microscop.* . (1987). **10**(1-2): 203-221.
11. Singh, R y Carr, D. "The anatomy and histology of XO human embryos and fetuses." *Anat Rec.* (1966). **155**: 369-384.
12. McGee, EA y Hsueh, AJW. "Initial and Cyclic Recruitment of Ovarian Follicles". *Endocr Rev.* . (2000). **21**(2): 200-214.
13. Thibault, C y Levasseur, MC. "Ovulation". *Hum Reprod.* (1988). **3**(4): 513-523.
14. Knobil, E y Neill, J. *Physiology of Reproduction*. Elsevier **3º Ed.** (2005).
15. Maekawa, A. "Pathology of tumors in laboratory animals. Tumors of the rat. Tumors of the ovary". *IARC Sci Publ.* . (1990). **99**: 473-497.
16. Bloom, W y Fawcett, W. *Tratado de Histología*. Mc. Graw Hill - Interamericana. **11º Ed.** (1997). Madrid.
17. Carr, B; Sadler, R; Rochelle, D; Stalmach, M; Macdonald, P y Simpson, E. "Plasma Lipoprotein Regulation of Progesterone Biosynthesis by Human Corpus Luteum Tissue in Organ Culture". *J Clin Endocrinol Metab.* (1981). **52**(5): 875-881.
18. LaVoie, HA y King, SR. "Transcriptional Regulation of Steroidogenic Genes: *STARD1*, *CYP11A1* and *HSD3B*". *Exp Biol Med.* (2009). **234**(8): 880-907.
19. Kronenberg, H; Melmed, S; Polosky, K y Larsen, P. *Williams Tratado de Endocrinología*. Elsevier **11º Ed.** (2009).
20. Nussey, S y Whitehead, S. *Endocrinology An Integrated Approach* UK Oxford BIOS Scientific Publishers. (2001). St. George's Hospital Medical School, London
21. Uilenbroek, JTJ y Richards, JS. "Ovarian Follicular Development during the Rat Estrous Cycle: Gonadotropin Receptors and Follicular Responsiveness". *Biol Reprod.* (1979). **20**(5): 1159-1165.
22. Camp, TA; Rahal, JO y Mayo, KE. "Cellular Localization and Hormonal Regulation of Follicle-Stimulating Hormone and Luteinizing Hormone Receptor Messenger RNAs in the Rat Ovary". *Mol Endocrinol.* (1991). **5**(10): 1405-1417.
23. Issemann, I y Green, S. "Activation of a member of the steroid hormone receptor superfamily by peroxisome proliferators". *Nature* (1990). **347**: 645-650.
24. Desvergne, Ba y Wahli, W. "Peroxisome Proliferator-Activated Receptors: Nuclear Control of Metabolism". *Endocr Rev.* (1999). **20**(5): 649-688.
25. Komar, C. "Peroxisome proliferator-activated receptors (PPARs) and ovarian function--implications for regulating steroidogenesis, differentiation, and tissue remodelling". *Reprod Biol Endocrinol.* (2005). **30**: 3-41.
26. Froment, P; Fabre, Sp; Dupont, JI; Pisselet, C; Chesneau, D; Staels, B y Monget, P. "Expression and Functional Role of Peroxisome Proliferator-Activated Receptor- β in Ovarian Folliculogenesis in the Sheep". *Biol Reprod.* (2003). **69**(5): 1665-1674.
27. Gasic, S; Bodenbug, Y; Nagamani, M; Green, A y Urban, RJ. "Troglitazone Inhibits Progesterone Production in Porcine Granulosa Cells". *Endocrinology.* (1998). **139**(12): 4962-4966.
28. Komar, CM; Braissant, O; Wahli, W y Curry Jr, TE. "Expression and Localization of PPARs in the Rat Ovary During Follicular Development and the Periovarial Period". *Endocrinology.* (2001). **142**(11): 4831-4838.
29. Rong, JX; Qiu, Y; Hansen, MK; Zhu, L; Zhang, V; Xie, M; Okamoto, Y; Mattie, MD; Higashiyama, H; Asano, S; Strum, JC y Ryan, TE. "Adipose Mitochondrial Biogenesis Is Suppressed in db/db and High-Fat Diet Fed Mice and Improved by Rosiglitazone". *Diabetes.* (2007). **56**(7): 1751-1760.

30. Mohan, M; Malayer, N; Geisert, R y Morgan, G. "Expression patterns of retinoid X receptors, retinaldehyde dehydrogenase, and peroxisome proliferators activated receptor gamma in bovine preattachment embryos". *Biol Reprod.* (2002). **66**: 692-700.
31. Ibabe, A; Grabenbauer, M; Baumgart, E; Fahimi, H y Cajaraville, M. "Expression of peroxisome proliferator-activated receptors in zebrafish (*Danio rerio*)". *Histochem Cell Biol* (2002). **118**: 231-239.
32. Wood, JR; Dumesic, DA; Abbott, DH y Strauss, JF. "Molecular Abnormalities in Oocytes from Women with Polycystic Ovary Syndrome Revealed by Microarray Analysis". *J Clin Endocrinol Metab.* (2007). **92**(2): 705-713.
33. Zhu, Y; Qi, C; Korenberg, JR; Chen, XN; Noya, D; Rao, MS y Reddy, JK. "Structural organization of mouse peroxisome proliferator-activated receptor gamma (mPPAR gamma) gene: alternative promoter use and different splicing yield two mPPAR gamma isoforms". *Proceedings of the National Academy of Sciences.* (1995). **92**(17): 7921-7925.
34. Fajas, L; Auboeuf, D; RaspÃ©, E; Schoonjans, K; Lefebvre, A-M; Saladin, R; Najib, J; Laville, M; Fruchart, J-C; Deeb, S; Vidal-Puig, A; Flier, J; Briggs, MR; Staels, B; Vidal, H y Auwerx, J. "The Organization, Promoter Analysis, and Expression of the Human PPAR γ Gene". *Journal of Biological Chemistry.* (1997). **272**(30): 18779-18789.
35. Schoppee, PD; Garmey, JC y Veldhuis, JD. "Putative Activation of the Peroxisome Proliferator-Activated Receptor γ Impairs Androgen and Enhances Progesterone Biosynthesis in Primary Cultures of Porcine Theca Cells". *Biol Reprod.* (2002). **66**(1): 190-198.
36. Cui, Y; Miyoshi, K; Claudio, E; Siebenlist, UK; Gonzalez, FJ; Flaws, J; Wagner, K-U y Hennighausen, L. "Loss of the Peroxisome Proliferator-activated Receptor gamma (PPAR γ) Does Not Affect Mammary Development and Propensity for Tumor Formation but Leads to Reduced Fertility". *J Biol Chem* (2002). **277**(20): 17830-17835.
37. Froment, P; Gizard, F; Defever, D; Staels, B; Dupont, J y Monget, P. "Peroxisome proliferator-activated receptors in reproductive tissues: from gametogenesis to parturition". *J Endocrinol.* (2006). **189**(2): 199-209.
38. Han, K; Song, H; Moon, I; Augustin, R; Moley, K; Rogers, M y Lim, H. "Utilization of DR1 as true RARE in regulating the Ssm, a novel retinoic acid-target gene in the mouse testis". *J Endocrinol.* (2007). **192**(3): 539-551.
39. Mu, Y; Yanase, T; Nishi, Y; Waseda, N; Oda, T; Tanaka, A; Takayanagi, R y Nawata, H. "Insulin sensitizer, troglitazone, directly inhibits aromatase activity in human ovarian granulosa cells". *Biochem Biophys Res Commun* (2000). **271**: 710-713.
40. Subbaramaiah, K; Lin, D; Hart, J y Dannenberg, A. "Peroxisome proliferators activation of cyclooxygenase 2. Evidence for involvement of activator protein 1 and CREB binding protein /p300". *J Biol Chem.* (2001). **276**: 12440-12448.
41. Belgorosky, D; Sander, A; Di Yorio, P; Faletti, A y Motta, A. "Hyperandrogenism alters intraovarian parameters during early folliculogenesis in mice". *Reprod Biomed Online.* (2010). **20**(6): 797-807.
42. Husein, M y Kridli, R. "Effect of progesterone prior to GnRH-prostaglandin F2 alpha treatment on induction of oestrus and pregnancy in anoestrous Awassi ewes". *Reprod Dom Anim.* (2003). **38**: 228-232.
43. Medan, M; Watanabe, G; Sasaki, K; Nagura, Y; Sakai, H; Fujita, M; Scharaway, S y Taya, K. "Effect of passive immunization of goats against inhibin on follicular development, hormone profile and ovulation rate". *Reproduction* (2003). **125**: 751-757.
44. Sawada, M y Carlson, J. "Rapid plasma membrane changes in superoxide radical formation, fluidity, and phospholipase A2 activity in the corpus luteum of the rat during induction of luteolysis". *Endocrinology* (1991). **128** (6): 2992-2298.
45. Sugino, N; Shimamura, K; Tamura, H; Ono, M; Nakamura, Y y Kato, H. "Involvement of stimulatory effect of prostaglandin F2 alpha on superoxide radical production by macrophages in corpus luteum regression". *Nippon Sanka Fujinka Gakkai Zasshi.* (1996). **48**(6): 393-398.
46. Huang, J. "The role of peroxisome proliferator-activated receptors in the development and physiology of gametes and preimplantation embryos". *PPAR Res.* (2008). **2008**: 732303.
47. Barak, Y; Nelson, M; Ong, E; Jones, Y; Ruiz-Lozano, P; Chien, K; Koder, A y Evans, R. "PPAR gamma is required for placental, cardiac, and adipose tissue development". *Mol Cell.* (1999). **4**: 585-595.
48. Berry, E; Eykholt, R; Helliwell, R; Gilmour, R; Mitchell, M y Marvin, K. "Peroxisome proliferators-activated receptor isoform expression changes in human gestational tissues with labor at term". *Mol Pharm.* (2003). **64**: 1586-1590.
49. Lim, H y Dey, S. "A novel pathway of prostacyclin signaling-hanging out with nuclear receptors". *Endocrinology* (2002). **143**: 3207-3210.
50. Savini, I; Catani, M; Evangelista, D; Gasperi, V y Avigliano, L. "Obesity-Associated Oxidative Stress: Strategies Finalized to Improve Redox State". *International Journal of Molecular Sciences.* **14**(5): 10497-10538.
51. Hwang, O. "Role of Oxidative Stress in Parkinson's Disease". *Exp Neurobiol.* **22**(1): 11-17.
52. Gibson, G y Huang, H. "Mitochondrial enzymes and endoplasmic reticulum calcium stores as targets of oxidative stress in neurodegenerative diseases." *J Bioenerg Biomembr.* (2004). **36**(4): 335-340.

53. Nishimoto, T; Matsumoto, A; Kihara, T; Akaike, A y Sugimoto, H. "Protective effect of H₂O₂ against subsequent H₂O₂-induced cytotoxicity involves activation of the PI3K-Akt signaling pathway." *Cell Mol Biol (Noisy-le-grand)*. (2010). **56** 1447-1452.
54. Amstrong, R; Sohal, R; Cutler, R y Slater, T. "Free radicals molecular biology, aging and disease". Raven, New York. (1984).
55. Cadenas, E. "Biochemistry of oxygen toxicity". *Annu Rev Biochem* (1989). **51**: 79-110.
56. Pryor, W. "Oxy-radicals and related species: their formation, life-times, and reactions". *Annu Rev Physiol*. (1986). **48**: 657-667.
57. Webster, N y Nunn, J. "Molecular structure of free radicals and their importance in biological reactions". *Br J Anaesth*. (1988). **60**: 98-108.
58. Fridovich, I. "Superoxide radical: an endogenous toxicant". *Annu Rev Pharmacol Toxicol* (1993). **23**: 239-257.
59. Mello-Pilho, A; Hoffmann, M y Meneghini, R. "Cell killing and DNA damage by hydrogen peroxide are mediated by intracellular iron". *Biochem J*. (1984). **218**: 273-275.
60. Pryor, W y Church, D. "Aldehydes, hydrogen peroxide, and organic radical as mediators of oxygen toxicity". *Free Rad Biol Chem* (1991). **11**: 41-46.
61. Halliwell, B y Gutteridge, J. "Oxygen toxicity, oxygen radicals, transition metals and disease". *Biochem J*. (1984). **219**: 1-14.
62. Halliwell, B y Gutteridge, J. "Biologically relevant metal ion-dependent hydroxyl radical generation". *FEBS Lett*. (1992). **307**: 108-112.
63. King, T; Mason, H y Morrison, M. "Oxidases and related redox systems". Pergamon Press, Oxford. (1982).
64. Halliwell, B y Gutteridge, J. "Free radicals in biology and medicine". 2nd ed. Oxford University Press, Clarendon, Oxford. (1989).
65. Mason, R, *Free-radical intermediates in the metabolism of toxic chemicals*, in *Free radicals in biology* 1982, Academic Press New York. p. 161-173.
66. Proctor, P y Reynolds, E. "Free radicals and disease in man". *Physiol Chem Phys*. (1984). **16**: 175-195.
67. Kappuz, H. "Overview of enzyme system involved in bioreduction of drugs and in redox cycling". *Biochem Pharmacol*. (1986). **35**: 1-7.
68. Trush, M; Mimnaugh, E y Gram, T. "Activation of pharmacologic agents to radical intermediates. Implications for the roles of free radicals in drug action and toxicity". *Biochem Pharmacol*. (1982). **31**: 3335-3343.
69. Sies, H, *Oxidative stress*, in *Academic Press, London*. 1985.
70. Blake, D; Rallen, R y Lunec, J. "Free radicals in biological systems- A review orientated to inflammatory processes". *Br Med Bull* (1987). **45**: 371-385.
71. Harman, D. "Rol of free radicals in aging and disease". *Ann N Y Acad Sci USA* (1992). **673**: 126-141.
72. Southorn, P y Powis, G. "Free radicals in medicine. I. Chemical nature and biologic reactions". *Mayo Clin Proc*. (1988). **63**: 381-389.
73. Freeman, B y Grapo, J. "Biology of disease. Free radicals and tissue injury". *Lab Invest*. (1982). **47**: 412-426.
74. Kono, Y y Fridovich, I. "Superoxide radical inhibits catalase". *J Biol Chem*. (1982). **257**: 5751-5761.
75. Hodgson, E y Fridovich, I. "The interaction of bovine erythrocyte superoxide dismutase with hydrogen peroxide: chemiluminescence and peroxidation". *Biochemistry*. (1975). **14**(24): 5299-5303.
76. Gebicki, S y Gebicki, J. "Formation of peroxides in amino acids and proteins exposed to oxygen free radicals". *Biochem J* (1993). **289**: 743-749.
77. Smith, CD; Carney, JM; Tatsumo, T; Stadtman, ER; Floyd, RA y Markesbery, WR. "Protein Oxidation in Aging Brains". *Ann N Y Acad Sci*. (1992). **663**(1): 110-119.
78. Wolff, S y Dean, R. "Fragmentation of protein by free radicals and its effect on their susceptibility to enzymic hydrolysis". *Biochem J* (1986). **2234**: 399-403.
79. Stadtman, E. "Protein oxidation and aging". *Science*. (1992). **257**: 1220-1224.
80. Aikens, J y Dix, T. "Perhydroxyl radical (HOO.) initiated lipid peroxidation: the role of fatty acid hydroperoxides". *J Biol Chem*. (1991). **266**: 15091-15098.
81. Choe, M; Jackson, C y Yu, B. "Lipid peroxidation contributes to age-related membranes rigidity". *Free Radical Biol Med* (1995). **18**: 977-984.
82. Riceevans, C y Burdon, R. "Free radical lipid interaction and their pathological consequences". *Prog Lipid Res*. (1993). **37**: 37-110.
83. Valenzuela, A. "The biological significance of malondialdehyde determination in the assessment of tissue oxidative stress". *Life Sci*. (1991). **48**: 301-309.
84. Higuchi, Y y Linn, S. "Purification of All Forms of HeLa Cell Mitochondrial DNA and Assessment of Damage to It Caused by Hydrogen Peroxide Treatment of Mitochondria or Cells". *J Biol Chem*. (1995). **270**(14): 7950-7956.
85. Davies, K; Wiese, A; Sevanian, A y Kim, E. *Repair system in oxidative stress*. in "Molecular biology of aging". (1990). Wiley-Liss. New York.

86. Demple, B. "Oxidative DNA damage: repair and inducible cellular responses". *Prog Clin Biol Res.* (1990). **340**: 155-167.
87. Martínez-Cayuela, M. "Oxygen free radicals and human disease". *Biochimie.* (1995). **77**(3): 147-161.
88. Yu, BP. "Cellular defenses against damage from reactive oxygen species". *Physiol Rev* January (1994). **74**(1): 139-162.
89. Gamaley, I y Klyubin, I. "Roles of reactive oxygen species: signaling and regulation of cellular functions". *Int Rev Cytol.* (1999). **188**: 203-255.
90. Stocker, R; Bowry, V y Frei, B. "Ubiquinol-10 protects human low density lipoprotein more efficiently against lipid peroxidation than does alpha-tocopherol". *Proc Natl Acad Sci USA* (1991). **88**: 1646-1650.
91. Stadtman, E y Berlett, B. "Fenton chemistry. Amino acid oxidation". *J Biol Chem.* (1991). **266**: 17201-17211.
92. Reiter, RJ; Guerrero, JM; Escames, G; Pappolla, MA y Acuña-Castroviejo, D. "Prophylactic Actions of Melatonin in Oxidative Neurotoxicity". *Ann N Y Acad Sci.* (1997). **825**(1): 70-78.
93. Vasavada, N y Agarwal, R. "Role of oxidative stress in diabetic nephropathy". *Adv Chronic Kidney Dis.* (2005). **12**(2): 146-154.
94. Kelly-Aubert, M; Trudel, Sp; Fritsch, J; Nguyen-Khoa, T; Baudouin-Legros, M; Moriceau, S; Jeanson, L; Djouadi, F; Matar, C; Conti, M; Ollero, M; Brouillard, F y Edelman, A. "GSH monoethyl ester rescues mitochondrial defects in cystic fibrosis models". *Hum Mol Genet.* **20**(14): 2745-2759.
95. Choi, S-H; Aid, S; Kim, H-W; Jackson, SH y Bosetti, F. "Inhibition of NADPH oxidase promotes alternative and anti-inflammatory microglial activation during neuroinflammation". *J Neurochem.* **120**(2): 292-301.
96. Yao, H y Rahman, I. "Current concepts on oxidative/carbonyl stress, inflammation and epigenetics in pathogenesis of chronic obstructive pulmonary disease". *Toxicol Appl Pharmacol.* **254**(2): 72-85.
97. Agarwal, A; Gupta, S y Sharma, R. "Oxidative stress and its implications in female infertility - a clinician's perspective". *Reprod Biomed Online.* (2005). **11**(5): 641:650.
98. Guérin, P; El Mouatassim, S y Ménézo, Y. "Oxidative stress and protection against reactive oxygen species in the pre-implantation embryo and its surroundings". *Hum Reprod Update.* (2001). **7**(2): 175-189.
99. Cui, X-L; Chang, B y Myatt, L. "Expression and Distribution of NADPH Oxidase Isoforms in Human Myometrium - Role in Angiotensin II-induced Hypertrophy". *Biol Reprod* **82**(2): 305-312.
100. Mocatta, T; Winterbourn, C; Inder, T y Darlow, B. "The effect of gestational age and labour on markers of lipid and protein oxidation in cord plasma". *Free Radic Res.* (2004). **38**(2): 185:191.
101. Ha, B. "Oxidative stress in ovariectomy menopause and role of chondroitin sulfate." *Arch Pharm Res.* (2004). **27**(8): 867:872.
102. Combelles, CM; Holick, EA; Paoletta, LJ; Walker, DC y Qiaqia, W. "Profiling of SOD isoenzymes in compartments of the developing bovine antral follicle". *Reproduction.* (2010). **139**(5): 871:881.
103. Li, J; Foote, RH y Simkin, M. "Development of rabbit zygotes cultured in protein-free medium with catalase, taurine, or superoxide dismutase". *Biol Reprod.* (1993). **49**(1): 33-37.
104. Teede, H; Deeks, A y Moran, L. "Polycystic ovary syndrome: a complex conditions with psychological, reproductive and metabolic manifestations that impacts on health across the lifespan". *BMC Med* (2010). **30**(8): 41-51.
105. Franks, S; Gharani, N; Waterworth, D; Batty, S; White, D; Williamson, R y McCarthy, M. "The genetic basis of polycystic ovary syndrome". *Hum Reprod.* (1997). **12**(12): 2641-2648.
106. Urbanek, M; Legro, RS; Driscoll, DA; Azziz, R; Ehrmann, DA; Norman, RJ; Strauss, JF; Spielman, RS y Dunaif, A. "Thirty-seven candidate genes for polycystic ovary syndrome: Strongest evidence for linkage is with follistatin". *Proc Natl Acad Sci USA.* (1999). **96**(15): 8573-8578.
107. Huber-Buchholz, MM; Carey, DGP y Norman, RJ. "Restoration of Reproductive Potential by Lifestyle Modification in Obese Polycystic Ovary Syndrome: Role of Insulin Sensitivity and Luteinizing Hormone". *J Clin Endocrinol Metab.* (1999). **84**(4): 1470-1474.
108. Himelein, MJ y Thatcher, SS. "Depression and Body Image among Women with Polycystic Ovary Syndrome". *J Health Psychol.* (2006). **11**(4): 613-625.
109. Deeks, AA; Gibson-Helm, ME y Teede, HJ. "Anxiety and depression in polycystic ovary syndrome: a comprehensive investigation". *Fertil Steril.* **93**(7): 2421-2423.
110. Boomsma, CM; Eijkemans, MJC; Hughes, EG; Visser, GHA; Fauser, BCJM y Macklon, NS. "A meta-analysis of pregnancy outcomes in women with polycystic ovary syndrome". *Hum Reprod Update.* (2006). **12**(6): 673-683.
111. Moran, L y Teede, H. "Metabolic features of the reproductive phenotypes of polycystic ovary syndrome". *Hum Reprod Update.* (2009). **15**(4): 477-488.
112. Legro, RS; Kinselmann, AR; Dodson, WC y Dunaif, A. "Prevalence and Predictors of Risk for Type 2 Diabetes Mellitus and Impaired Glucose Tolerance in Polycystic Ovary Syndrome: A Prospective, Controlled Study in 254 Affected Women". *J Clin Endocrinol Metab.* (1999). **84**(1): 165-169.
113. Apridonidze, T; Essah, PA; Luorno, MJ y Nestler, JE. "Prevalence and Characteristics of the Metabolic Syndrome in Women with Polycystic Ovary Syndrome". *J Clin Endocrinol Metab.* (2005). **90**(4): 1929-1935.

114. Yen, SSC; Vela, P y Rankin, J. "Inappropriate Secretion of Follicle-Stimulating Hormone and Luteinizing Hormone in Polycystic Ovarian Disease". *J Clin Endocrinol Metab.* (1970). **30**(4): 435-442.
115. Raj, S; Thompson, I; Berger, M; Talert, L y Taymor, M. "Diagnostic value of androgen measurements in polycystic ovary syndrome". *Obstet Gynecol* (1978). **52**(2): 169-171.
116. Legro, R; Castracane, V y Kauffman, R. "Detecting insulin resistance in polycystic ovary syndrome: purposes and pitfalls". *Obstet Gynecol Surv.* (2004). **59**(2): 141-154.
117. Stein, I y Leventhal, M. "Amenorrhea associated with bilateral polycystic ovaries". *Am J Obstet Gynecol.* (1935). **29**: 181.
118. Carmina, E y Lobo, RA. "Polycystic Ovary Syndrome (PCOS): Arguably the Most Common Endocrinopathy Is Associated with Significant Morbidity in Women". *J Clin Endocrinol Metab.* (1999). **84**(6): 1897-1899.
119. Laven, J; Imani, B; Eijkemans, M y Fauser, B. "New approach to polycystic ovary syndrome and other forms of anovulatory infertility". *Obstet Gynecol Surv.* (2002). **57**(11): 755-767.
120. Hart, R; Hickey, M y Franks, S. "Definitions, prevalence and symptoms of polycystic ovaries and polycystic ovary syndrome". *Best Pract Res Clin Obstet Gynaecol.* (2004). **18**(5): 671-683.
121. Legro, RS. "Diagnostic Criteria in Polycystic Ovary Syndrome". *Semin Reprod Med.* (2003). **21**(03): 267,276.
122. Abbott, DH; Dumesic, DA y Franks, S. "Developmental origin of polycystic ovary syndrome - a hypothesis". *J. Endocrinol.* (2002). **174**(1): 1-5.
123. Wild, R y Bartholomew, M. "The influence of body weight on lipoprotein lipids in patients with polycystic ovary syndrome". *Am J Obstet Gynecol.* (1998). **159**(2): 423-427.
124. Wild, R; Painter, P; Coulson, P; Carruth, K y Ranney, G. "Lipoprotein lipid concentrations and cardiovascular risk in women with polycystic ovary syndrome". *J Clin Endocrinol Metab.* (1985). **61**(5): 946-951.
125. Dunaif, A. "Insulin Resistance and the Polycystic Ovary Syndrome: Mechanism and Implications for Pathogenesis". *Endocr Rev.* (1997). **18**(6): 774-800.
126. Zegers-Hochschild, F; Adamson, GD; de Mouzon, J; Ishihara, O; Mansour, R; Nygren, K; Sullivan, E y Vanderpoel, S. "International Committee for Monitoring Assisted Reproductive Technology (ICMART) and the World Health Organization (WHO) revised glossary of ART terminology, 2009". *Fertil Steril.* (2009). **92**(5): 1520-1524.
127. Riggs, BL; Khosla, S y Melton, LJ. "Sex Steroids and the Construction and Conservation of the Adult Skeleton". *Endocr Rev.* (2002). **23**(3): 279-302.
128. Zofková, I; Bahbouh, R y Hill, M. "The pathophysiological implications of circulating androgens on bone mineral density in a normal female population". *Steroids.* (2000). **65**(12): 857-861.
129. Labrie, F; Luu-The, V; Labrie, C; BÅlanger, A; Simard, J; Lin, S-X y Pelletier, G. "Endocrine and Intracrine Sources of Androgens in Women: Inhibition of Breast Cancer and Other Roles of Androgens and Their Precursor Dehydroepiandrosterone". *Endocr Rev.* (2003). **24**(2): 152-182.
130. Liu, PY; Death, AK y Handelsman, DJ. "Androgens and Cardiovascular Disease". *Endocrine Reviews.* (2003). **24**(3): 313-340.
131. Burger, HG. "Androgen production in women". *Fertil Steril.* (2002). **77**: 3-5.
132. Barnes, RB; Rosenfield, RL; Burstein, S y Ehrmann, DA. "Pituitary-Ovarian Responses to Nafarelin Testing in the Polycystic Ovary Syndrome". *N Engl J Med.* (1989). **320**(9): 559-565.
133. Gilling-Smith, C; Willis, DS; Beard, RW y Franks, S. "Hypersecretion of androstenedione by isolated thecal cells from polycystic ovaries". *J Clin Endocrinol Metab.* (1994). **79**(4): 1158-1165.
134. Nelson, VL; Qin, K-n; Rosenfield, RL; Wood, JR; Penning, TM; Legro, RS; Strauss, JF y McAllister, JM. "The Biochemical Basis for Increased Testosterone Production in Theca Cells Propagated from Patients with Polycystic Ovary Syndrome". *J Clin Endocrinol Metab.* (2001). **86**(12): 5925-5933.
135. Luchetti, C; Solano, M; Sander, V; Barreiro-Arcos, M; Gonzalez, C; Di Girolamo, G; Chiochio, S; Cremaschi, G y Motta, A. "Effects of dehydroepiandrosterone on ovarian cystogenesis and immune function". *J Reprod Immunol.* (2004). **64**(1-2): 59-74.
136. Lee, M; Anderson, E y Lee, G. "Changes in ovarian morphology and serum hormones in the rat after treatment with dehydroepiandrosterone". *Anat Rec.* (1991). **231**: 185-192.
137. Anderson, E; Lee, M y Lee, G. "Cystogenesis of the ovarian antral follicle of the rat: ultrastructural changes and hormonal profile following the administration of dehydroepiandrosterone". *Anat Rec.* (1992). **234**: 359-382.
138. Mahesh, VB y Greenblatt, RB. "Isolation of Dehydroepiandrosterone and 17β-Hydroxy-5-Pregnenolone from the Polycystic Ovaries of the Stein-Leventhal Syndrome". *J Clin Endocrinol Metab.* (1962). **22**(4): 441-448.
139. Araghi-Niknam, M; Zhang, Z; Jiang, S; Call, O; Eskelso, C y Watson, R. "Cytokine dysregulation and increased oxidation is prevented by dehydroepiandrosterone in mice infected with murine leukemia retrovirus". *Proc Soc Exp Biol Med.* (1997). **216**: 386:391.
140. Hernandez, P; De La Luz, S; Orozco; Arriaga; Pavon; Al, N y Rook. "The effects of androstenediol and dehydroepiandrosterone on the course and cytokine profile of tuberculosis in BALB/c mice". *Immunology.* (1998). **95**(2): 234-241.

141. Zhang; Araghi, N; Liang; Inserra; Ardestani; Jiang; Chow y Watson. "Prevention of immune dysfunction and vitamin E loss by dehydroepiandrosterone and melatonin supplementation during murine retrovirus infection". *Immunology*. (1999). **96**(2): 291-297.
142. Ben-Nathan, D; Padgett, DA y Loria, RM. "Androstenediol and dehydroepiandrosterone protect mice against lethal bacterial infections and lipopolysaccharide toxicity". *J Med Microbiol*. (1999). **48**(5): 425-431.
143. Sander, V; Solano, M; Gutierrez, M; Luchetti, C; Rearte, M; Gonzalez, C; Di Girolamo, G y Motta, A. "The influence of dehydroepiandrosterone on early pregnancy in mice". *Neuroimmunomodulation* (2005). **12**(5): 285- 292.
144. Elia, E; Sander, V; Luchetti, C; Solano, M; Di Girolamo, G; Gonzalez, C y Motta, A. "The mechanisms involved in the action of metformin in regulating ovarian function in hyperandrogenized mice". *Mol Hum Reprod* (2006). **2**(8): 475-481.
145. Solano, M; Sander, V; Elia, E; Luchetti, C; Di Girolamo, G; Gonzalez, C y Motta, A. "Metformin prevents embryonic resorption induced by hyperandrogenization with dehydroepiandrosterone in mice". *Reprod Fertil Dev*. (2006). **18**: 533-544.
146. Sander, V; Luchetti, C; Solano, M; Elia, E; Di Girolamo, G; Gonzalez, C y Motta, A. "Role of the N,N'-dimethylbiguanide metformin in the treatment of female prepuberal BALB/c mice hyperandrogenized with dehydroepiandrosterone". *Reproduction* (2006). **131**(3): 591-602.
147. Jonard, S; Robert, Y; Cortet-Rudelli, C; Pigny, P; Decanter, C y Dewailly, D. "Ultrasound examination of polycystic ovaries: is it worth counting the follicles?" *Hum Reprod*. (2003). **18**(3): 598-603.
148. Ropelato, MG; Garcia-Rudaz, MC; Castro-Fernandez, C; Ulloa-Aguirre, A; Escobar, ME; Barontini, M y Veldhuis, JD. "A Preponderance of Basic Luteinizing Hormone (LH) Isoforms Accompanies Inappropriate Hypersecretion of Both Basal and Pulsatile LH in Adolescents with Polycystic Ovarian Syndrome". *J Clin Endocrinol Metab*. (1999). **84**(12): 4629-4636.
149. Azziz, R; Black, VY; Knochenhauer, ES; Hines, GA y Boots, LR. "Ovulation After Glucocorticoid Suppression of Adrenal Androgens in the Polycystic Ovary Syndrome Is Not Predicted by the Basal Dehydroepiandrosterone Sulfate Level". *J Clin Endocrinol Metab*. (1999). **84**(3): 946-950.
150. Legro, RS, R; Urbanek, M; Driscoll, D; Strauss, Jr y Dunaif, A. "Phenotype and genotype in polycystic ovary syndrome". *Recent Prog Horm Res*. (1998). **53**: 217-256.
151. Poretsky, L; Seto-Young, D; Shrestha, A; Dhillon, S; Mirjany, M; Liu, H-C; Yih, MC y Rosenwaks, Z. "Phosphatidylinositol-3 Kinase-Independent Insulin Action Pathway(s) in the Human Ovary". *J Clin Endocrinol Metab*. (2001). **86**(7): 3115-3119.
152. McClamrock, H y Adashi, E. "Gestational hyperandrogenism". *Fertil Steril*. (1992). **57**(2): 257-274.
153. Gharani, N; Waterworth, DM; Batty, S; White, D; Gilling-Smith, C; Conway, GS; McCarthy, M; Franks, S y Williamson, R. "Association of the Steroid Synthesis Gene *Cyp11a* with Polycystic Ovary Syndrome and Hyperandrogenism". *Hum Mol Genet*. (1997). **6**(3): 397-402.
154. Willis, DS; Watson, H; Mason, HD; Galea, R; Brincat, M y Franks, S. "Premature Response to Luteinizing Hormone of Granulosa Cells from Anovulatory Women with Polycystic Ovary Syndrome: Relevance to Mechanism of Anovulation". *J. Clin. Endocrinol. Metab*. (1998). **83**(11): 3984-3991.
155. Ibáñez, L; Potau, N y De Zegher, F. "Endocrinology and metabolism after premature pubarche in girls". *Acta Paediatr Suppl*. . (1999). **88**(433): 73-77.
156. Driscoll, DA. "Polycystic Ovary Syndrome in Adolescence". *Ann N Y Acad Sci*. (2003). **997**(1): 49-55.
157. Pfeifer, S y Dayal, M. "Treatment of the adolescent patient with polycystic ovary syndrome". *Obstet Gynecol Clin North Am*. (2003). **30**(2): 337-352.
158. Irusta, G; Parborell, F; Peluffo, M; Manna, PR; Gonzalez-Calvar, SI; Calandra, R; Stocco, DM y Tesone, M. "Steroidogenic Acute Regulatory Protein in Ovarian Follicles of Gonadotropin-Stimulated Rats Is Regulated by a Gonadotropin-Releasing Hormone Agonist". *Biol Reprod*. (2003). **68**(5): 1577-1583.
159. H. Henmi; T. Endo; Nagasawa, K; Hayashi, T; Chida, M; Akutagawa, N; Iwasaki, M; Kitajima, Y; Kiya, T; Nishikawa, A; Manase, K y Kudo, R. "Lysyl Oxidase and MMP-2 Expression in Dehydroepiandrosterone-Induced Polycystic Ovary in Rats". *Biol Reprod*. (2001). **64**(1): 157-162.
160. Luchetti, CG; MikÅ³, E; Szekeres-Bartho, J; Paz, DA y Motta, AB. "Dehydroepiandrosterone and metformin modulate progesterone-induced blocking factor (PIBF), cyclooxygenase 2 (COX2) and cytokines in early pregnant mice". *J Steroid Biochem Mol Biol*. (2008). **111**(3&5): 200-207.
161. Andreu, C; Parborell, F; Vanzulli, S; Chemes, H y Tesone, M. "Regulation of follicular luteinization by a gonadotropin-releasing hormone agonist: Relationship between steroidogenesis and apoptosis". *Mol Reprod Dev*. (1998). **51**(3): 287-294.
162. Motta, AB; Estevez, A; Franchi, A; Perez-Martinez, S; Farina, M; Ribeiro, ML; Lasserre, A y Gimeno, MF. "Regulation of lipid peroxidation by nitric oxide and PGF2alpha during luteal regression in rats". *Reproduction*. (2001). **121**(4): 631-637.

163. Woodruff, TK; Lyon, RJ; Hansen, SE; Rice, GC y Mather, JP. "Inhibin and Activin Locally Regulate Rat Ovarian Folliculogenesis". *Endocrinology*. (1990). **127**(6): 3196-3205.
164. Abramovich, D; Parborell, F y Tesone, M. "Effect of a Vascular Endothelial Growth Factor (VEGF) Inhibitory Treatment on the Folliculogenesis and Ovarian Apoptosis in Gonadotropin-Treated Prepubertal Rats". *Biol Reprod*. (2006). **75**(3): 434-441.
165. Tilly, J. "Ovarian follicle counts - not as simple as 1, 2, 3". *Reprod Biol Endocrinol*. (2003). **1**(1): 11.
166. Hickey, GJ; Krasnow, JS; Beattie, WG y Richards, JS. "Aromatase Cytochrome P450 in Rat Ovarian Granulosa Cells before and after Luteinization: Adenosine 3 β ,5 α -Monophosphate-Dependent and Independent Regulation. Cloning and sequencing of rat aromatase cDNA and 5 α genomic DNA". *Mol Endocrinol*. (1990). **4**(1): 3-12.
167. Solano, ME; Sander, V; Wald, MR y Motta, AB. "Dehydroepiandrosterone and metformin regulate proliferation of murine T lymphocytes". *Clin Exp Immunol*. (2008). **153**(2): 289-296.
168. Parborell, F; Irusta, G; Rodríguez Celín, A y Tesone, M. "Regulation of ovarian angiogenesis and apoptosis by GnRH-I analogs". *Mol Reprod Dev*. (2008). **75**(4): 623-631.
169. Misra, HP y Fridovich, I. "The Role of Superoxide Anion in the Autoxidation of Epinephrine and a Simple Assay for Superoxide Dismutase". *J Biol Chem*. (1972). **247**(10): 3170-3175.
170. Maehly, A y Chance, B. "The assay of catalases and peroxidases". *Methods Biochem Anal*. (1954). **1**: 357-424.
171. Tietze, F. "Enzymatic method for quantitative determination of nanogram amounts of total and oxidized glutathione: applications to mammalian blood and other tissues". *Anal Bioch*. (1969). **27**: 502-522.
172. Buege, J y Aust, S. "Microsomal lipid peroxidation". *Methods Enzymol*. (1978). **52**: 302-310.
173. Hara, S; Takahashi, T; Amita, M; Igarashi, H; Tsutsumi, S y Kurachi, H. "Bezafibrate Restores the Inhibition of FSH-Induced Follicular Development and Steroidogenesis by Tumor Necrosis Factor-Alpha Through Peroxisome Proliferator-Activated Receptor-Gamma Pathway in an In Vitro Mouse Preantral Follicle Culture". *Biology of Reproduction*. **85**(5): 895-906.
174. Ronen-Fuhrmann, T; Timberg, R; King, SR; Hales, KH; Hales, DB; Stocco, DM y Orly, J. "Spatio-Temporal Expression Patterns of Steroidogenic Acute Regulatory Protein (StAR) During Follicular Development in the Rat Ovary". *Endocrinology*. (1998). **139**(1): 303-315.
175. Stocco, DM. "Recent advances in the role of StAR". *Rev Reprod*. (1998). **3**(2): 82-85.
176. Dupont, E; Labrie, F; Luu-The, V y Pelletier, G. "Immunocytochemical localization of 3 beta-hydroxysteroid dehydrogenase/delta 5-delta 4-isomerase in human ovary". *Journal of Clinical Endocrinology & Metabolism*. (1992). **74**(5): 994-998.
177. Bao, B; Kumar, N; Karp, RM; Allen Garverick, H y Sundaram, K. "Estrogen Receptor- β Expression in Relation to the Expression of Luteinizing Hormone Receptor and Cytochrome P450 Enzymes in Rat Ovarian Follicles". *Biology of Reproduction*. (2000). **63**(6): 1747-1755.
178. ASRM. "Definition of "infertility"". *Fertil Steril*. (2004). **82**: 206.
179. Antequera, R; Moreno-Rosset, C; Jenaro, C y Avila, A. "Principales trastornos psicológicos asociados a la infertilidad". *Papeles del Psicólogo*. (2008). **29**: 167-175.
180. Franks, S. "Polycystic Ovary Syndrome". *N Engl J Med*. (1995). **333**(13): 853-861.
181. Azziz, R. "PCOS: A diagnostic challenge". *Reprod Biomed Online* (2004). **8**(6): 644-648.
182. Eisner, JR; Barnett, MA; Dumesic, DA y Abbott, DH. "Ovarian hyperandrogenism in adult female rhesus monkeys exposed to prenatal androgen excess". *Fertility and sterility*. (2002). **77**(1): 167-172.
183. Barbieri, R; Saltzman, D; Torday, J; Randall, R; Frigoletto, F y Ryan, K. "Elevated concentrations of the beta-subunit of human chorionic gonadotropin and testosterone in the amniotic fluid of gestations of diabetic mothers." *Am J Obstet Gynecol*. (1986). **154**(5): 1039-1043.
184. Beck-Peccoz, P; Padmanabhan, V; Baggiani, AM; Cortelazzi, D; Buscaglia, M; Medri, G; Marconi, AM; Pardi, G y Beitins, IZ. "Maturation of Hypothalamic-Pituitary-Gonadal Function in Normal Human Fetuses: Circulating Levels of Gonadotropins, Their Common α -Subunit and Free Testosterone, and Discrepancy between Immunological and Biological Activities of Circulating Follicle-Stimulating Hormone". *J. Clin. Endocrinol. Metab*. (1991). **73**(3): 525-532.
185. Barnes, R; Rosenfield, R; Ehrmann, D; Cara, J; Cuttler, L; Levitsky, LL y Rosenthal, IM. "Ovarian hyperandrogenism as a result of congenital adrenal virilizing disorders: evidence for perinatal masculinization of neuroendocrine function in women". *J. Clin. Endocrinol. Metab*. (1994). **79**(5): 1328-1333.
186. Goldzieher, J. "Polycystic ovarian disease". *Fertil Steril*. (1981). **35**(4): 371-394.
187. Hughesdon, P. "Morphology and morphogenesis of the Stein-Leventhal ovary and of so-called "hyperthecosis"". *Obstet Gynecol Surv*. (1982). **37**(2): 59-77.
188. Erickson, G y Yen, S. "New data on follicle cells in polycystic ovaries: a proposed mechanism for the genesis of cystic follicles". *Sem Reprod Endocrinol*. (1984). **42**: 39-43.

189. Faut, M; Elia, EM; Parborell, F; Cugnata, NM; Tesone, M y Motta, AB. "*Peroxisome proliferator-activated receptor gamma and early folliculogenesis during an acute hyperandrogenism condition*". *Fertility and sterility*. (2011). **95**(1): 333-337.
190. Mapletoft, RJ; Johnson, WH y Adams, WM. "*Effects of a progestagen ear implant on superovulatory response in the cow*". *Theriogenology*. (1980). **13**(1): 102.
191. Gougeon, A. "*Regulation of Ovarian Follicular Development in Primates: Facts and Hypotheses*". *Endocrine Reviews*. (1996). **17**(2): 121-155.
192. Hirshfield, A. "*Development of follicles in the mammalian ovary*". *Int Rev Cytol* (1991). **124**: 43-101.
193. Richards, J; Fitzpatrick, S; Clemens, J; Morris, J; Alliston, T; Sirois, JRPH y Res. "*Ovarian cell differentiation: a cascade of multiple hormones, cellular signals, and regulated genes*". *Recent Prog Horm Res*. (1995). **50**: 223-254.
194. Franks, S; Mason, H y Willis, D. "*Follicular dynamics in the polycystic ovary syndrome*". *Molecular and Cellular Endocrinology*. (2000). **163**(1-2): 49-52.
195. Debril, M; Renaud, J; Fajas, L y Auwerx, J. "*The pleiotropic functions of peroxisome proliferator-activated receptor gamma*". *J Mol Med (Berl)*. (2001). **79**(1): 30-47.
196. Poretsky, L; Cataldo, NA; Rosenwaks, Z y Giudice, LC. "*The Insulin-Related Ovarian Regulatory System in Health and Disease*". *Endocrine Reviews*. (1999). **20**(4): 535-582.
197. Bruning, J; Gautam, D y Burks, D. "*Role of brain insulin receptor in control of body weight and reproduction*". *Science* (2000). **289**: 2122-2125.
198. Burks, DJ; de Mora, JF; Schubert, M; Withers, DJ; Myers, MG; Towery, HH; Altamuro, SL; Flint, CL y White, MF. "*IRS-2 pathways integrate female reproduction and energy homeostasis*". *Nature*. (2000). **407**(6802): 377-382.
199. Lehmann, JrM; Moore, LB; Smith-Oliver, TA; Wilkison, WO; Willson, TM y Kliewer, SA. "*An Antidiabetic Thiazolidinedione Is a High Affinity Ligand for Peroxisome Proliferator-activated Receptor γ (PPAR γ)*". *Journal of Biological Chemistry*. (1995). **270**(22): 12953-12956.
200. Farkash, Y; Timberg, R y Orly, J. "*Preparation of Antiserum to Rat Cytochrome P-450 Cholesterol Side Chain Cleavage, and Its Use for Ultrastructural Localization of the Immunoreactive Enzyme by Protein A-Gold Technique*". *Endocrinology*. (1986). **118**(4): 1353-1365.
201. Zlotkin, T; Farkash, Y y Orly, J. "*Cell-Specific Expression of Immunoreactive Cholesterol Side-Chain Cleavage Cytochrome P-450 during Follicular Development in the Rat Ovary*". *Endocrinology*. (1986). **119**(6): 2809-2820.
202. Hanukoglu, I y Hanukoglu, Z. "*Stoichiometry of mitochondrial cytochromes P-450, adrenodoxin and adrenodoxin reductase in adrenal cortex and corpus luteum*". *European Journal of Biochemistry*. (1986). **157**(1): 27-31.
203. Miller, W y Tyrrell, J. *The adrenal cortex*. in "*Endocrinology and Metabolism*". (1995). McGraw Hill. New York. 555-711.
204. Simpson, E y Waterman, M. "*Regulation of the Synthesis of Steroidogenic Enzymes in Adrenal Cortical Cells by ACTH*". *Annual Review of Physiology*. (1988). **50**: 427-440.
205. Mastrocola, R; Aragno, M; Betteto, S; Brignardello, E; Catalano, MG; Danni, O y Boccuzzi, G. "*Pro-oxidant effect of dehydroepiandrosterone in rats is mediated by PPAR activation*". *Life Sciences*. (2003). **73**(3): 289-299.
206. Rauchová, H; Vokurková, M y Koudelová, J. "*Hypoxia-induced lipid peroxidation in the brain during postnatal ontogenesis*". *Physiol Res*. (2012). **61**(1): 89-101.
207. Clementi, M; Deis, R y Telleria, C. "*Luteal 3beta-hydroxysteroid dehydrogenase and 20alpha-hydroxysteroid dehydrogenase activities in the rat corpus luteum of pseudopregnancy: Effect of the deciduoma reaction*". *Reproductive Biology and Endocrinology*. (2004). **2**(1): 22.