



UNIVERSIDAD DE BUENOS AIRES

Facultad de Ciencias Exactas y Naturales

Departamento de Química Biológica

**Participación de los sistemas Notch y Wnt/ -catenina
en la función y angiogénesis ovárica**

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

Lic. Paula Lucía Accialini

Directora de tesis: Dra. Marta Tesone

Directora adjunta: Dra. Dalhia Nurit Abramovich

Consejero de estudios: Dr. Juan Carlos Calvo

Lugar de trabajo: Laboratorio de Fisiología y Biología Tumoral del Ovario.
Instituto de Biología y Medicina Experimental (IByME-CONICET)

Buenos Aires, Marzo 2018

Participación de los sistemas Notch y Wnt/ -catenina en la función y angiogénesis ovárica

Resumen

El cuerpo lúteo (CL) es una glándula endócrina transitoria esencial para la supervivencia e implantación del embrión. Es por esto que su formación, función y regresión están estrictamente reguladas a través de diversas vías de señalización. En esta tesis se estudió el rol de los sistemas Notch y Wnt/ -catenina sobre el desarrollo y función del CL de ratas. También se analizó la interacción de ambas vías con la acción de la progesterona.

El primer capítulo de esta tesis se diseñó con el objetivo de estudiar la acción *in vitro* del sistema Notch y su interacción con progesterona en cultivo de cuerpo lúteo de rata.

Se utilizaron ratas prepúberes inyectadas de forma subcutánea con eCG y 48 horas después con hCG. Cuatro días después, los animales sufrieron eutanasia. Se aislaron los CLs y se cultivaron en presencia de Aminoglutetimida (AG, inhibidor de la síntesis de progesterona), DAPT (inhibidor del sistema Notch), progesterona, de DAPT en presencia de progesterona, o vehículo de las drogas (DMSO). Luego de una o 4 horas de cultivo, se recolectaron los CLs y los medios condicionados. Se estudió la funcionalidad luteal midiendo la concentración de progesterona en el medio. Se evaluó la participación del sistema Notch y de progesterona en cuanto al contenido de proteínas pro- y anti-apoptóticas, regulación de las enzimas esteroideogénicas, contenido de PCNA (marcador de proliferación) y nivel de fosforilación de AKT y ERK.

DAPT produjo una disminución de la producción de progesterona. A su vez se observó una disminución en el contenido luteal de la enzima P450_{scc}. La presencia de progesterona en el medio de cultivo aumentó los niveles de StAR, efecto que fue impedido al inhibir la vía de Notch. El cultivo con DAPT produjo un aumento de la relación entre proteínas pro:anti-apoptóticas y un aumento del fragmento activo de caspasa 3. Este aumento en la apoptosis fue revertido con la presencia de progesterona en el medio de cultivo. Para determinar la proliferación de células del CL, se cuantificó el contenido de PCNA. Progesterona incrementó significativamente los niveles de

PCNA, y este aumento fue impedido por DAPT. Además, DAPT disminuyó la fosforilación de AKT, la cual se restituyó con la incubación junto a progesterona.

Los resultados de este capítulo muestran por primera vez la existencia de una interacción entre Notch y progesterona que promueve la función y supervivencia del CL.

El segundo capítulo de esta tesis se diseñó con el objetivo de estudiar la implicancia de la vía Wnt/ β -catenina en la función del ovario de ratas superovuladas.

Se utilizaron ratas prepúberes inyectadas de forma subcutánea con eCG y 48 horas después con hCG, día en que los animales fueron operados. A un grupo se le administró bajo la bursa de ambos ovarios un inhibidor específico de la vía Wnt/ β -catenina (XAV939), mientras que el grupo control recibió la dosis equivalente del vehículo del inhibidor (DMSO). Los animales sufrieron eutanasia 24 o 48 horas luego de la cirugía. Se estudió el desarrollo folicular y la formación de CL en ovarios de cada grupo experimental y se evaluó también la concentración de progesterona sérica. En extracto proteico de CLs se midió el contenido de proteínas pro- y anti-apoptóticas, de enzimas esteroideogénicas y de PCNA. Además, se determinó el grado de fosforilación de las proteínas AKT y ERK. Por último, se cuantificaron los niveles de VEGF luteal y se estudió el desarrollo vascular del CL mediante marcación con lectina BS-1.

La inhibición *in vivo* de la vía Wnt/ β -catenina produjo una disminución en el porcentaje de CLs, efecto que estuvo acompañado por la aparición de estructuras quísticas. La concentración de progesterona sérica disminuyó en los animales tratados con XAV939, como así también el contenido luteal de la proteína StAR. La administración de XAV939 aumentó el balance entre proteínas pro:anti-apoptóticas, incrementando la apoptosis en células del CL. A su vez, XAV939 disminuyó los niveles de ERK fosforilado y el contenido de PCNA en CL. Además, la inhibición de la vía Wnt/ β -catenina disminuyó el porcentaje de área endotelial en CL y redujo el contenido luteal de VEGF. La doble marcación para PCNA y lectina reveló que la mayoría de las células proliferativas son las endoteliales. Estos resultados demuestran por primera vez que la vía Wnt/ β -catenina está involucrada en el proceso de ovulación y funcionalidad luteal de ratas prepúberes tratadas con gonadotrofinas.

El tercer capítulo de esta tesis se diseñó con el objetivo de estudiar la acción *in vitro* del sistema Wnt/ β -catenina sobre la expresión de miembros del sistema Notch.

Se utilizaron ratas prepúberes inyectadas de forma subcutánea con eCG y 48 horas después con hCG. Dos días luego de la administración de hCG, los animales sufrieron eutanasia. Se aislaron los CLs y se cultivaron en presencia de ICG-001 o solución vehículo (DMSO). El ICG-001 es un inhibidor de la vía de Wnt/ -catenina con un mecanismo de acción distinto al de XAV939. Luego de 12 horas de cultivo, se recolectaron los CLs y los medios condicionados. Se estudió la funcionalidad luteal midiendo la concentración de progesterona en el medio. En extractos de ARN de CLs se estudió la expresión de miembros del sistema Notch, y en extractos proteicos se midió el contenido de la proteína StAR.

ICG-001 disminuyó la producción de progesterona y el contenido de la proteína StAR, reproduciendo el resultado observado con XAV939 en el capítulo II. Además, la inhibición de la vía Wnt/ -catenina produjo un aumento de la expresión génica del receptor *notch1*, del ligando *jagged1*, del efector *hes1* y del regulador *rbpj*. Los resultados de este capítulo muestran que, ante la inhibición de Wnt/ -catenina, las células del CL promueven la activación de la vía de Notch, posiblemente como mecanismo compensatorio para recuperar la homeostasis celular.

Los resultados de esta tesis demuestran que los sistemas Notch y Wnt/ -catenina están implicados en la regulación del desarrollo y función del CL de rata. A su vez, revelan la existencia de una interacción entre estas vías y la progesterona que promueve la funcionalidad luteal.

Palabras claves: Cuerpo lúteo; Notch; Progesterona; Wnt/ -catenina; Esteroidogénesis; Angiogénesis

Involvement of Notch and Wnt/ β -catenin pathways in ovarian function and angiogenesis

Abstract

The corpus luteum (CL) is a temporary endocrine organ essential for the survival and implantation of the embryo. For this reason, the development, function and regression of the CL are accurately regulated by various signalling pathways. In this thesis, we studied the involvement of Notch and Wnt/ β -catenin pathways in the development and function of the rat CL. We also analysed their interaction with the progesterone action.

The first chapter of this thesis was designed to study the action of Notch pathway on rat CL function, and its interaction with progesterone.

Immature Sprague-Dawley female rats (21-23 day-old) were subcutaneously (sc) injected with eCG followed by hCG 48 hours later. The animals were euthanized 4 days after hCG administration. CLs were isolated and cultured in the presence of Aminoglutethimide (AG, which is a progesterone synthesis inhibitor), DAPT (which is a Notch pathway inhibitor), progesterone, DAPT in the presence of progesterone, or vehicle solution (DMSO). CLs were collected and the conditioned media were frozen. One or 4 hours after incubation, CL function was studied by measuring progesterone concentration in the conditioned medium. Besides, steroidogenic regulators, apoptotic parameters, PCNA content and AKT and ERK phosphorylation levels were measured in CLs protein extracts.

DAPT produced a decrease in progesterone production along with a decrease in P450_{scc} protein levels. The presence of progesterone in the culture medium caused an increase in StAR protein levels, and this effect was blocked by the inhibition of Notch pathway. DAPT produced an increase in pro:anti-apoptotic protein ratio and an increase in the levels of cleaved caspase 3. Both effects were blocked by the presence of progesterone in the culture medium. To study the proliferation of the CL cells, PCNA was measured by Western blot. Progesterone increased PCNA levels and this effect was impaired by DAPT. Moreover, DAPT decreased AKT phosphorylation levels, and this effect was reversed by the coincubation with progesterone.

These results provide the first evidence of a crosstalk between Notch pathway and progesterone, which promotes the functionality and survival of the CL.

The second chapter of this thesis was designed to determine the involvement of Wnt/ -catenin pathway in ovarian function of superovulated rats.

Immature female rats were sc injected with eCG followed by hCG 48 hours later. The day of hCG administration, Wnt/ -catenin inhibitor (XAV939 group) or vehicle (DMSO, control group) was administered into the bursa of both ovaries. Animals were euthanized 24 or 48 hours after XAV939 or vehicle administration. Follicle and CL development were analyzed in ovarian sections from each group and serum progesterone concentration was measured. The content of pro- and anti-apoptotic proteins and steroidogenic regulators were determined in CL protein extracts. In addition, the proliferation marker PCNA, and AKT and ERK phosphorylation was analyzed. Finally, luteal VEGF abundance and vascular development through lectin-BS1 staining were determined.

In vivo Wnt/ -catenin inhibition produced a decrease in the percentage of CLs. This result correlated with the appearance of cystic structures. Besides, circulating progesterone concentration decreased, related to a reduction in StAR protein content in CL. XAV939 administration increased pro:anti-apoptotic protein ratio, which enhanced apoptosis of the CL cells. Wnt/ -catenin inhibition decreased luteal PCNA protein levels and ERK phosphorylation. In addition, the percentage of endothelial cell area in the CLs and the abundance of luteal VEGF were diminished after administration of XAV939. The double staining for PCNA and lectin revealed that the proliferative cells are mainly endothelial cells. These results describe for the first time that Wnt/ -catenin system regulates ovulation and CL function in gonadotropin-treated rats.

The third chapter of this thesis was designed to study the *in vitro* action of Wnt/ -catenin pathway on Notch members expression.

Immature female rats were sc injected with eCG followed by hCG 48 hours later. The animals were euthanized 2 days after hCG administration. CLs were isolated and cultured in the presence of ICG-001, a Wnt/ -catenin inhibitor with a different mechanism of action than XAV939, or vehicle solution (DMSO). 12 hours after incubation, CLs were collected and the conditioned media were frozen. The expression of Notch family members was studied and StAR protein levels were measured in CL

protein extracts. Besides, CL function was studied measuring progesterone concentration in the conditioned medium.

ICG-001 produced a decrease in luteal progesterone production and StAR protein levels, repeating the effect observed in chapter II with XAV939. Besides, Wnt/ β -catenin inhibition increased the expression of *notch1*, *jagged1*, *hes1* and *rbpj*. These results show that CL cells upregulate Notch pathway after Wnt/ β -catenin inhibition, presumably as a compensatory mechanism to recover cellular homeostasis.

The results of this thesis demonstrate that Notch and Wnt/ β -catenin pathways regulate the development and function of the rat CL. Besides, they show an interaction between these pathways and progesterone that promotes CL functionality.

Key words: Corpus Luteum; Notch; Progesterone; Wnt/ β -catenin; teroidogenesis; Angiogenesis

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

1. *A link between Notch and progesterone maintains the functionality of the rat corpus luteum.* **Accialini P**, Hernández SF, Bas D, Pazos Maidana C, Irusta G, Abramovich D, Tesone M. *Reproduction*. 149 1–10. 2015.
DOI: 10.1530/REP-14-0449.

2. *Tankyrase inhibition regulates Corpus luteum development and luteal function in gonadotropin-treated rats.* **Accialini P**, Irusta G, Bechis A, Bas D, Parborell F, Abramovich D, Tesone M. *Mol Reprod Dev*. 2017;84:719–730.
DOI: 10.1002/mrd.22853.

Agradecimientos

Agradezco a Sully el conocimiento que me brindó, el soporte humano cuando los tiempos fueron difíciles y la responsabilidad para que esta tesis se alcance con éxito. Su compromiso para que culmine mi doctorado con la experiencia apropiada, lo que me permitió obtener una beca postdoctoral para seguir adelante con mi carrera.

A Dalhi, porque me enseñó a trabajar en la mesada y a ser prolija y ordenada. Por su crítica fundamentada y vuelta de tuerca, siempre constructivas para mejorar mi trabajo.

Al IByME, porque no es simplemente un instituto con un alto nivel científico. Es una institución con una calidad humana sobresaliente, y eso lo convierte en un lugar muy especial. Estoy agradecida por haberme formado en este instituto.

A los integrantes del 218/208, por acompañarme y ser partícipes activos de mi formación. Porque entre charlas y mates, hicieron que el cotidiano no sea rutina.

A CONICET, porque sin la beca, el doctorado no hubiera sido posible.

A PLISSER, porque me permitió ampliar mi formación en el exterior y establecer conexiones laborales muy valiosas. Porque conocí personas quienes actualmente son mis amigos, y no hay nada más lindo que tener amigos sembrados por el mundo.

A mis amigos del IByME, porque juntos transitamos este precioso enredo. Nos aconsejamos, ayudamos y además compartimos salidas extra laborales. Porque me enseñaron que, al final, AKT siempre se fosforila.

A “Becarios Unite!!”, porque la amistad y la buena onda trascienden el laboratorio.

A Naty y Marianita, por ser mis amigas y ubicarme en la rama correcta de la palmera. Porque transitar un doctorado con amigos hace de esta experiencia una llena de anécdotas y hermosos recuerdos. Y cuando los tiempos se ponen difíciles, son un salvavidas que te ayuda a salir adelante.

A Andrés, por cuestionarme todo (toodooo) y ser un personaje fundamental para que el capítulo III de esta tesis exista. Por ser un buen amigo y enseñarme a mirar la vida a través de Chocochips.

A mis amigos de siempre, por recorrer el camino conmigo y ser partícipes de mis locuras.

A Pi, porque hace diez años me enseñó soluciones madre y hoy en día me apuntala siendo un gran ejemplo de fortaleza y perseverancia. Porque es mi asesora científica, y sobre todo, amiga de la vida.

A Luz, por bancar(me) y entender(me) todo y ser la hermana más compañera que puedo tener.

A mi familia, porque juntos somos un equipo imbatible.

ESTOY HECHA DE RETAZOS

Estoy hecha de retazos, pedacitos coloridos de cada vida que pasa por la mía y que voy cosiendo con el alma. No siempre son bonitos, ni siempre felices, pero me agregan y me hacen ser quien soy.

En cada encuentro, en cada contacto, voy quedando mayor. En cada retazo hay una lección, un cariño, una nostalgia, que me hacen más persona, más humana, más completa.

Pienso que es así cómo se hace la vida: de pedazos de otras personas, que se van convirtiendo en parte de la gente.

Y la mejor parte es que nunca estaremos finalizados. Siempre habrá un retazo para añadir.

Por lo tanto, gracias a cada uno de ustedes, que forman parte de mi vida y me permiten engrandecer mi historia con los retazos dejados en mí. Que yo también pueda dejar pedacitos de mí por el camino y que puedan ser parte de sus historias.

Y que así, de retazo en retazo, podamos convertirnos un día en un inmenso bordado de “nosotros”.

Cora Coralina

A Elsa y Claudio,
por lograr que esta plantita crezca derecha.

A Guille,
por ser un cómplice fiel.

Índice

Abreviaturas.....	14
Introducción.....	16
1.1 El ovario	17
1.2 Foliculogénesis	19
1.3 Selección del folículo dominante	22
1.4 Atresia folicular	23
1.5 Ovulación	24
1.6 Ciclo ovárico de la rata.....	25
1.7 El cuerpo lúteo.....	26
1.8 Luteinización	26
1.8.a Efectos genómicos e intracelulares del pico de LH	26
1.8.b Salida de las células de la granulosa del ciclo proliferativo	28
1.8.c Rol del ovocito en la luteinización.....	28
1.8.d Cambios estructurales	28
1.8.e Desarrollo de los vasos sanguíneos.....	29
1.9 Esteroidogénesis luteal	31
1.9.a Captación y movilización del colesterol	31
1.9.b Biosíntesis de progesterona	32
1.9.c Control molecular de la secreción de progesterona	33
1.9.d Regulación de la secreción de progesterona	33
1.10 Biosíntesis de andrógenos y estradiol por las células del CL.....	34
1.11 Regulación hormonal del CL.....	35
1.11.a LH	35
1.11.b Prolactina (PRL)	35
1.11.c Estradiol	35
1.11.d Progesterona	36
1.12 Receptores de progesterona (PR)	36
1.13 Luteólisis	37
1.13.a Luteólisis funcional.....	37
1.13.b Luteólisis estructural.....	38
1.14 Apoptosis.....	38
1.14.a Vía intrínseca de la apoptosis	40
1.14.b Vía extrínseca de la apoptosis.....	42
1.15 Sistema Notch.....	43
1.15.a Ligandos del sistema Notch	44
1.15.b Receptores del sistema Notch	45
1.15.c Clivajes proteolíticos y activación del sistema Notch	46
1.15.d El sistema Notch en ovario	48
1.15.e El sistema Notch en angiogénesis	49
1.16 El sistema Wnt.....	50
1.16.a El sistema Wnt en ovario	51
1.16.b El sistema Wnt en angiogénesis	52

1.17 Interacción entre los sistemas Notch y Wnt	53
Hipótesis y objetivos	54
Materiales y métodos	56
1. Animales	57
1.1 Tratamiento de los animales Capítulo I.....	57
1.1.a Cultivo de CLs	57
1.2 Tratamiento de los animales Capítulo II.....	58
1.2.a Administración intrabursa de XAV939	58
1.2.b Administración intrabursa de ICG-001	58
1.3 Tratamiento de los animales Capítulo III	59
1.3.a Cultivo de CLs	59
2. Protocolos de las técnicas realizadas	59
2.1 Morfología ovárica	59
2.2 Radioinmunoensayo (RIA).....	60
2.3 Técnica de inmunohistoquímica (IHQ) e histoquímica.....	61
2.4 Técnica de doble marcación IHQ/inmunofluorescencia (IF)	61
2.5 Extracción de ARN.....	62
2.6 Transcripción reversa y PCR en tiempo real	62
2.7 Extracción y medición de proteínas.....	63
2.8 Western blot.....	64
2.9 Análisis estadístico	64
Anticuerpos utilizados para IHQ y Western blot.....	66
Secuencia de los primers utilizados para PCR en tiempo real	66
Resultados	67
CAPÍTULO I: Participación del sistema Notch en la funcionalidad del CL. Interacción con progesterona.....	68
1. Efecto de la inhibición <i>in vitro</i> del sistema Notch sobre la funcionalidad del CL de ratas superovuladas.....	68
2. Efecto de la inhibición <i>in vitro</i> del sistema Notch sobre parámetros apoptóticos.....	71
3. Efecto de la inhibición <i>in vitro</i> del sistema Notch sobre la proliferación de las células del CL	72
4. Participación de las vías de AKT y ERK en la supervivencia y proliferación de las células del CL	73
5. Efecto de la inhibición <i>in vitro</i> del sistema Notch sobre el contenido de β -catenina..	74
CAPÍTULO II: Participación del sistema Wnt/ β -catenina en el desarrollo y la funcionalidad del CL	76
1. Efecto de la administración <i>in vivo</i> de XAV939 sobre el contenido luteal de β -catenina	76
2. Efecto de la inhibición <i>in vivo</i> de Wnt/ β -catenina sobre el desarrollo folicular y formación de CL.....	77
3. Efecto de la administración <i>in vivo</i> de ICG-001 sobre la formación de CL.....	79
4. Efecto de la inhibición <i>in vivo</i> de Wnt/ β -catenina sobre la esteroidogénesis luteal....	80
5. Efecto de la inhibición <i>in vivo</i> de Wnt/ β -catenina sobre parámetros apoptóticos.....	82

6. Efecto de la inhibición <i>in vivo</i> de Wnt/ β -catenina sobre la proliferación celular	82
7. Participación de las vías de ERK y AKT en la supervivencia y proliferación del CL	83
8. Efecto de la inhibición <i>in vivo</i> de Wnt/ β -catenina sobre la angiogénesis	85
8.1 Desarrollo vascular del CL	85
8.1.a Análisis del área endotelial	85
8.1.b Estudio del contenido de VEGF	87
8.1.c Inmunomarcación de células proliferativas	87
8.1.d Estudio del área periendothelial	89
8.2 Desarrollo vascular de folículos y estroma	91
CAPÍTULO III: Efecto de la inhibición de Wnt/ β -catenina sobre el sistema Notch en cuerpo lúteo	93
1. Efecto <i>in vitro</i> de ICG-001 sobre el contenido luteal de Ciclina D1	93
2. Efecto <i>in vitro</i> de ICG-001 sobre la función luteal luego de 12 horas de cultivo	93
3. Efecto <i>in vitro</i> de ICG-001 sobre la vía Notch	94
3.1 Efecto <i>in vitro</i> de ICG-001 sobre la expresión de <i>hes1</i>	94
3.2 Efecto <i>in vitro</i> de ICG-001 sobre la expresión de receptores de Notch	96
3.3 Efecto <i>in vitro</i> de ICG-001 sobre la expresión de ligandos de Notch	97
4. Efecto <i>in vitro</i> de ICG-001 sobre la expresión de genes regulados por β -catenina	97
5. Efecto <i>in vitro</i> de ICG-001 sobre la función luteal luego de 18 horas de cultivo	100
Discusión	101
Modelo propuesto	112
Bibliografía	113

Abreviaturas

20 -DHP: 20 -dihidroxi progesterona

20 -HSD: 20 -hidroxiesteroide deshidrogenasa

3 -HSD: 3 -hidroxiesteroide deshidrogenasa

AC: Adenilil ciclasa

ADNc: Ácido desoxirribonucleico copia

AG: Aminoglutetimida

AMPc: Adenosín monofosfato cíclico

ANG: Angiopoyetina

ANOVA: Análisis de varianza

ARN: Ácido ribonucleico

ATP: Adenosín trifosfato

BSA: Albúmina de suero bovino

CL: cuerpo lúteo

DAG: Diacil glicerol

DAPT: N-[N-(3,5-Difluorofenacetil)-L-alanil]-S-fenilglicina t-butil éster

DMSO: Dimetil sulfóxido

eCG: Gonadotrofina coriónica equina

FSH: Hormona folículo estimulante

Fzd: Frizzled

GnRH: Hormona liberadora de gonadotrofinas

hCG: Gonadotrofina coriónica humana

IF: inmuno fluorescencia

kDa: kilo Dalton

LH: Hormona luteinizante

MEC: matriz extracelular

ml: mililitro

MMP: metaloproteinasas de matriz

ng: nanogramo

NICD: dominio intracelular de Notch

PGF2 : Prostaglandina F2

PGRMC1: Componente de membrana del receptor de progesterona 1

PKA: Proteína quinasa A

PKC: Proteína quinasa C

PLC: fosfolipasa C

PR: receptor de progesterona

PRL: Prolactina

RIA: Radioinmunoensayo

Sc: subcutáneo

SDS: Dodecilsulfato sódico

TGF: Factor de crecimiento tumoral

UI: unidades internacionales

VEGF: Factor de crecimiento del endotelio vascular

μg: microgramo

μl: microlitro

μM: micromolar

Introducción

1.1 El ovario

El ovario de mamíferos es un órgano que tiene como principal función generar, almacenar, desarrollar y liberar los ovocitos formados durante la vida fetal, como gametas completamente competentes para ser fertilizadas y para permitir el desarrollo embrionario (*función gametogénica*). Es además el principal portador de las células secretoras de hormonas femeninas que desarrollan y mantienen los caracteres sexuales secundarios de la hembra y preparan a los órganos reproductivos accesorios para la preñez y el nacimiento de la cría (*función endócrina*) [1]. Así, la función final del ovario es permitir la propagación de la especie [2]. Durante la adultez, la superficie del ovario es nodular y se encuentra cubierta por una capa monoestratificada de células cúbicas o poliédricas, llamada epitelio germinal [3]. Esta cubierta epitelial está frecuentemente invaginada hacia el tejido conectivo subyacente, llamado túnica albugínea. Por debajo se encuentran dos zonas cuyo límite no se encuentra bien definido: la llamada zona cortical y la zona medular. La primera comprende al estroma ovárico (formado por tejido conectivo laxo, fibroblastos y precursores de células tecales), y folículos en distintos estadios de maduración, atrésicos y cuerpos lúteos. La zona medular se encuentra muy vascularizada e inervada, contiene células de tipo muscular y tejido conectivo laxo [4] (Figura 1A).

El ovario de mamíferos es, por lo tanto, un órgano heterogéneo en cuanto a la población celular presente en un momento dado, como también 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 útero, preparándolos para la expulsión del ovocito y la potencial implantación del blastocisto.

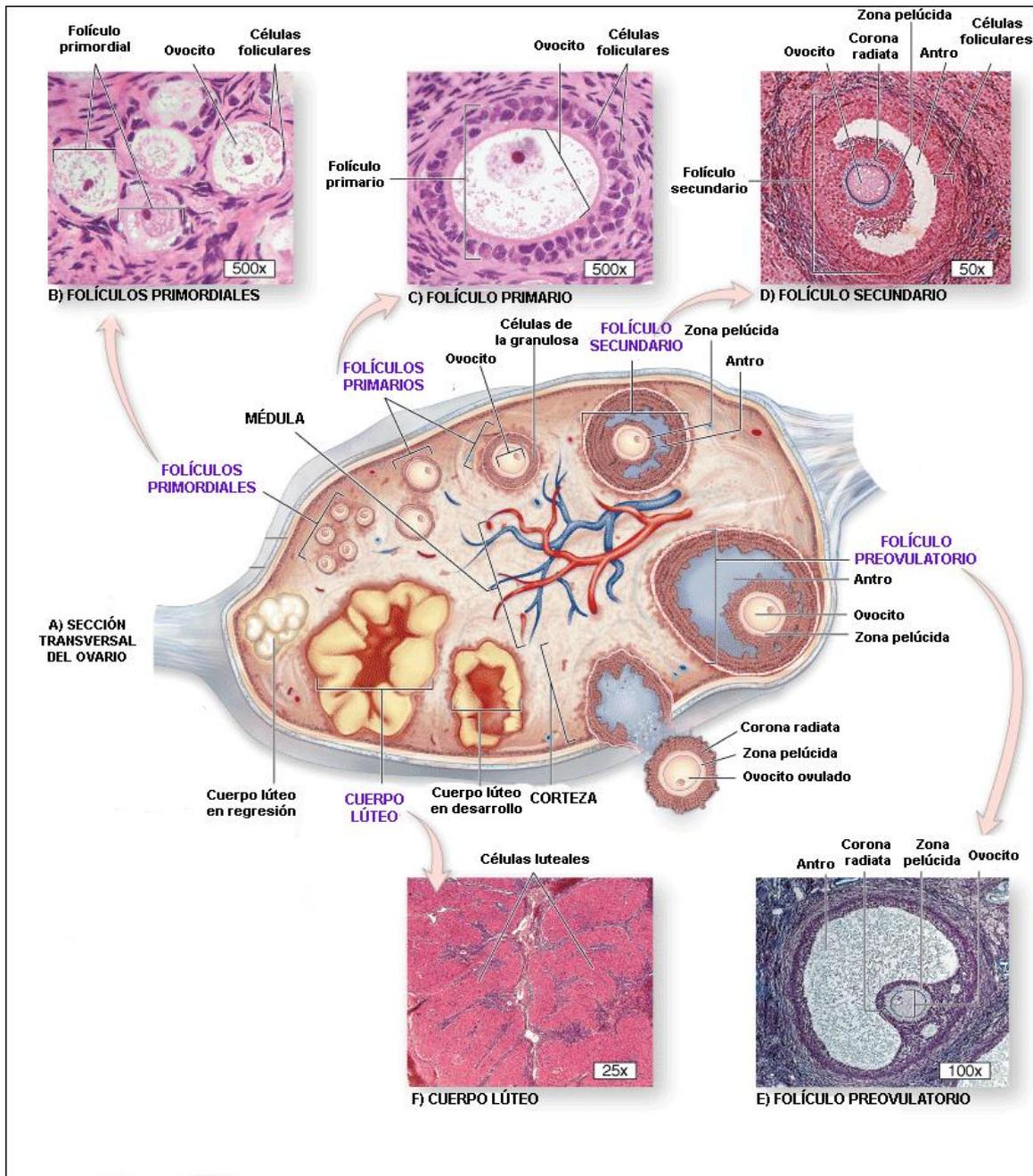


Figura 1: Estructura del ovario, desarrollo folicular, ovulación y formación del cuerpo lúteo. (A) Diagrama de una sección de ovario que muestra los diferentes estadios de la maduración folicular, ovulación y formación del cuerpo lúteo. Todas las etapas y estructuras que se muestran en este esquema suceden en diferentes tiempos durante el ciclo ovárico y no ocurren en simultáneo. Las secciones histológicas muestran (B) folículos primordiales, (C) un folículo primario, (D) un folículo secundario, y (E) un folículo preovulatorio. (F) Luego de la ovulación, el folículo remanente forma el cuerpo lúteo. Adaptado de McGraw Hill Companies [5].

1.2 Foliculogénesis

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

Debido al continuo crecimiento y a la regresión de los folículos, la relación volumen/contenido del ovario se encuentra en constante cambio [1]. Los folículos son las unidades funcionales del ovario de mamífero. Cada especie cuenta con un número determinado de folículos, los cuales se formaron durante la ovogénesis. Al nacimiento, el ovario contiene alrededor de 20.000, 160.000, y 1.000.000 folículos en ratas, ovejas y humanos respectivamente [1]. En la mayoría de los mamíferos, antes o luego del nacimiento, las ovogonias son transformadas en ovocitos primarios. Esta transición está determinada por el cese del proceso de mitosis que sufren las células primordiales germinales y la entrada en la fase meiótica diplotene de profase I, en la cual los ovocitos quedan arrestados. Luego de este proceso, los ovocitos se rodean de una capa única de células foliculares aplanadas, llamadas pregranulosa. En esta fase, las superficies del ovocito y de las células foliculares envolventes están en estrecho contacto. Este tipo de estructuras se denominan folículos primordiales (Figura 1B), que se encuentran principalmente en la periferia de la corteza y constituyen la reserva de folículos en reposo. Las células de la pregranulosa se encuentran envueltas en la llamada lámina basal, que separa a este tipo celular de los elementos que la rodea, como los vasos sanguíneos, capilares y nervios [6]. Estos folículos abandonan continuamente el reservorio para convertirse en folículos primarios (Figura 1C), para lo cual es necesaria una compleja interacción entre factores estimulatorios e inhibitorios. Esta transición implica ciertas modificaciones citológicas en el ovocito, en las células foliculares y en el tejido conjuntivo adyacente.

A medida que el ovocito aumenta de tamaño, la capa única de células aplanadas se convierte inicialmente en una capa de células cúbicas y cilíndricas. Estas células, mediante el proceso de mitosis, originan las células de la granulosa, que formarán posteriormente un epitelio estratificado. Entre el ovocito y las células de granulosa circundantes se originan espacios donde se deposita una sustancia que representa el inicio de la zona pelúcida. La zona pelúcida está formada por tres glicoproteínas y su

adquisición es una característica del folículo preantral. Se sabe que ratones deficientes en proteínas que componen la zona pelúcida son infértiles o subfértiles [7]. A medida que los folículos aumentan de tamaño, van desplazándose gradualmente hacia el interior de la corteza. A través de sucesivas divisiones mitóticas de las células de la granulosa, el folículo primario unilaminar pasa a un estadio multilaminado llamado preantral, con hasta tres capas de células de la granulosa rodeando al ovocito (Figura 1D). En este estadio, las células de la granulosa conforman una población homogénea y adquieren receptores de alta afinidad para la hormona folículo estimulante (FSH) y hormonas esteroideas [8]. Recientemente se ha reportado la importancia de un factor derivado del ovocito llamado GDF-9 (Factor Diferenciador del Crecimiento-9), el cual junto con la hormona FSH, regularían el desarrollo folicular y la atresia durante la transición del estadio preantral a antral temprano [9]. Por lo tanto, la presencia del receptor de FSH en este estadio folicular sería necesaria para su posterior desarrollo. Simultáneamente con la proliferación de las células de la granulosa, se desarrolla alrededor del folículo otra capa de células originadas del estroma, llamadas células de la teca. Las células tecales son altamente diferenciadas, con estructura de células secretoras de esteroides incluyendo abundante mitocondrias, retículo endoplasmático y vesículas lipídicas. La aparición del estrato tecal se asocia con la adquisición de la vascularización del folículo. La capa tecal se diferencia en una interna y otra externa. Numerosos vasos pequeños del estroma penetran en la teca externa para proporcionar un plexo capilar a la teca interna. Dado que los capilares no penetran la membrana basal, la capa de células de la granulosa permanece avascular durante todo el crecimiento del folículo. Como consecuencia de este aumento de la vasculatura, los folículos preantrales entran en contacto directo con factores que se encuentran en la circulación [10]. A medida que se forman los capilares, las células teca-intersticiales comienzan su diferenciación con la adquisición de los receptores de la hormona luteinizante (LH) y la capacidad de biosíntesis de esteroides. Estas células sintetizan andrógenos, que se transformarán a estrógenos por acción de la enzima aromatasa presente en las células de la granulosa. Por todo lo anteriormente mencionado, la aparición del estrato tecal se considera un importante evento fisiológico para el desarrollo del folículo temprano.

Es importante destacar que el establecimiento de la red de capilares coincide con un periodo de crecimiento y diferenciación del folículo [11]. Junto al aumento del tamaño folicular se termina de formar la zona pelúcida. Las células de la granulosa, a través de

proyecciones citoplasmáticas que atraviesan la zona pelúcida, mantienen contacto con la membrana del ovocito. En este momento, el ovocito detiene su crecimiento y se vuelve competente para reanudar la meiosis.

Cuando el folículo alcanza un diámetro aproximado de 0,2 mm y posee de seis a doce capas de células (en humanos), aparecen unos espacios irregulares entre las células de la granulosa, llenos de un líquido claro. Este líquido aumenta en cantidad a medida que crece el folículo y los espacios irregulares que se forman entre las células de la granulosa confluyen para constituir una sola cavidad denominada antro. En este momento el folículo se convierte en folículo antral. El pasaje de folículo preantral a antral es el más susceptible a la atresia [12]. El antro está rodeado por células de la granulosa murales y contiene en su interior el fluido folicular. El folículo antral está tapizado por un epitelio estratificado de células de la granulosa, que a su vez se encuentra rodeado por una lámina basal que lo separa de la teca. Algunas de las células de la granulosa se diferencian en células del cúmulus, las que se encuentran unidas entre sí y al ovocito mediante uniones estrechas. La relación con estas células se vuelve gradualmente más laxa debido al aumento del fluido folicular que llena los espacios intercelulares.

Durante la transición del folículo antral a folículo preovulatorio, la FSH estimula la aparición de los receptores de LH en las células de la granulosa [13]. Este paso es fundamental para que el folículo progrese hacia la ovulación. Los folículos preovulatorios (Figura 1E) son aquellos que han alcanzado los estadios finales de crecimiento y maduración, de manera que han adquirido la habilidad para ovular ante adecuados niveles de LH o la administración de hCG. Los receptores de LH no se encuentran expresados de forma homogénea en estos folículos, sino que los mismos presentan un gradiente de expresión que disminuye hacia las capas internas de la granulosa [13, 14]. El caso más extremo es el de las células del cúmulus de ratón, donde los receptores de LH son indetectables [15]. Por esta razón, el reinicio de la meiosis del ovocito inducida por LH y la expansión de las células del cúmulus requeridas para la ovulación, serían eventos mediados por las células de la granulosa murales [16, 17].

Los folículos preovulatorios se caracterizan por una baja tasa mitótica de las células foliculares y una alta relación estrógenos/andrógenos y estrógenos/progesterona en el fluido folicular. Desde el momento en que el folículo ha sido seleccionado para la ovulación, el mismo comienza a crecer notablemente en tamaño. Las células de la

granulosa sufren transformaciones morfológicas, como por ejemplo el aumento de su volumen [18]. A este folículo destinado a ovular se lo denomina folículo dominante [19].

1.3 Selección del folículo dominante

Luego de que los folículos son reclutados para empezar su crecimiento, comienza el proceso de selección del folículo dominante, durante el cual la cohorte de folículos en crecimiento es reducida al número equivalente a la cuota ovulatoria característica de la especie. La selección concluye cuando el número de folículos sanos en la cohorte (con potencial ovulatorio) es igual al de la cuota ovulatoria [20]. De este modo, se seleccionará un determinado número de folículos (dominancia folicular), los que continuarán su desarrollo hasta alcanzar la fase ovulatoria. Los demás folículos (folículos subordinados) detendrán su crecimiento y estarán destinados a sufrir atresia. A pesar de que no se conoce exactamente por qué un folículo emerge como dominante, se postula que éste posee una mayor sensibilidad a FSH dada por una mayor expresión de sus receptores. Asociado a este proceso, el estradiol y los factores de crecimiento locales ejercen un efecto positivo, amplificando la acción de la FSH en los folículos que están madurando. El folículo seleccionado como dominante inhibe el desarrollo de los folículos subordinados al secretar cantidades importantes de estradiol e inhibina a la circulación sistémica, que ejercen una retroalimentación negativa a nivel hipotálamo-hipófisis, produciendo una caída de los niveles séricos de FSH e impidiendo el desarrollo de los otros folículos [2, 21]. Además, la disminución de FSH provoca un descenso de la actividad de la aromatasas dependiente de FSH (enzima que transforma andrógenos a estrógenos), limitando como consecuencia la disponibilidad de estrógenos en los folículos menos maduros. Esto llevaría a la disminución de la proliferación de las células de granulosa y al aumento de andrógenos, provocando una atresia irreversible. Por lo tanto, los folículos dominantes tienen la ventaja de poseer un mayor número de receptores para FSH y LH, una mayor capacidad de aromatización de andrógenos a estrógenos y además poseen una gran vasculatura tecal que permite un fácil acceso para la FSH. Así, el folículo dominante puede seguir creciendo en condiciones que para el resto de los folículos son adversas. Por otro lado, se ha postulado que el folículo dominante produce factores atretogénicos que inhiben el desarrollo de los folículos vecinos o subordinados [2, 22].

En la mujer, durante los primeros días del ciclo menstrual aumentan los niveles circulantes de FSH y como consecuencia, una cohorte de folículos antrales escapa de la muerte celular programada que los llevaría a la atresia folicular. Dentro de este grupo, alrededor de diez folículos antrales crecen más rápido y producen altos niveles de estrógenos e inhibina, seleccionándose entre éstos el folículo dominante.

En la rata, bajo el estímulo de FSH y en presencia de estrógenos, las células expresan receptores para LH y prolactina, los cuales van aumentando hasta llegar a valores máximos antes de la ovulación [23, 24]. El aumento de estrógenos provoca, por un mecanismo de retroalimentación positiva del eje hipotálamo-hipofisario, la estimulación del pico preovulatorio de LH. Estos procesos, actuando en forma sincronizada, permitirían la selección de los folículos dominantes hasta llegar a la ovulación [2].

1.4 Atresia folicular

Se denomina atresia al proceso por el cual los folículos son eliminados. Este fenómeno ocurre por apoptosis de las células de la granulosa y del ovocito, y constituye uno de los mecanismos característicos en vertebrados mamíferos y no mamíferos. La atresia folicular podría significar una ventaja evolutiva, siendo seleccionados aquellos sólo folículos que contengan ovocitos saludables para que puedan llegar exitosamente a ser ovulados.

Las células de la granulosa son las que evidencian más claramente el proceso de apoptosis. Sin embargo, en algunos animales como cerdo, pollo y rata, se ha observado la ocurrencia de este proceso en las células de la teca, aunque de forma más tardía [25, 26].

En el ovario existen factores tanto atretogénicos como los que favorecen la supervivencia celular. Dentro de los primeros se puede mencionar a la Hormona Liberadora de Gonadotrofinas (GnRH), Interleucina 6 (IL-6), andrógenos, Factor de Necrosis Tumoral tipo alfa (TNF- α) y FasL [27-29]. Como factores citoprotectores ováricos se encuentran el Factor de Crecimiento Epidérmico (EGF), el Factor de Crecimiento similar a Insulina tipo 1 (IGF-1) y el Factor Transformante tipo β (TGF- β). Las hormonas esteroideas también son factores supresores o estimulantes de la apoptosis dependiendo del tejido en el que actúan. Por ejemplo, los estrógenos inhiben la apoptosis en el ovario [30], mientras que la relación andrógenos/estrógenos es elevada en fluido folicular de los folículos atrésicos [31].

Las gonadotrofinas son consideradas los principales factores de supervivencia folicular. Se ha demostrado que los folículos atrésicos tempranos son rescatados por la administración exógena de gonadotrofinas [32] y que la administración de FSH en ratas hipofisectomizadas inmaduras disminuye la apoptosis folicular en células de la granulosa [33].

Estos son solo algunos ejemplos de los múltiples factores que regulan el proceso de atresia folicular. El destino final de los folículos (crecimiento/ovulación o atresia) depende del delicado balance entre la expresión y acción de factores que promueven la proliferación, el desarrollo y la diferenciación de las células del folículo ovárico, y de aquellos que promueven la apoptosis de las mismas.

1.5 Ovulación

El folículo preovulatorio dominante produce una elevada concentración de estrógenos, que por un mecanismo de retroalimentación positiva, estimulan un pico de gonadotrofinas, principalmente de LH y en menor medida de FSH. El pico de LH es el gatillo para que el folículo dominante ovule y origine un cuerpo lúteo (CL) en cada ciclo menstrual en humanos (o varios cuerpos lúteos en roedores y otros mamíferos). Se formará un CL por cada folículo que ovuló. Al desprenderse el ovocito, una o más capas de las células del cúmulus permanecen unidas a él, formando la corona radiata, envoltura celular laxa que persiste alrededor del ovocito aún después de la ovulación.

Luego del pico preovulatorio de LH ocurren una serie de eventos que permiten la expulsión del ovocito y la formación de CL. La síntesis de estradiol declina considerablemente, mientras que aumenta la producción de progesterona estimulada por la misma LH [34]. Las células de la granulosa cercanas a la lámina basal comienzan a separarse debido a la desaparición de las uniones estrechas que las mantenían unidas. El único sitio donde estas uniones no se ven alteradas es en aquellas células que están formando parte de la corona radiata. El rápido aumento del tamaño folicular y de la cavidad antral funcionan como un componente mecánico por el cual el folículo preovulatorio emerge desde la corteza ovárica. La digestión proteolítica de la pared folicular es otro requisito para la ovulación. El pico de LH estimula la activación de colagenasas y otras proteasas que disolverán la membrana basal y el tejido tecal asociado. Las prostaglandinas de la serie E y F (PGE y PGF₂) son otros de los componentes involucrados en la degradación de la pared folicular [35]. Además, el

ovocito que estaba detenido en profase I reanuda la meiosis y es ovulado en el estadio de metafase II.

Durante el desarrollo folicular puede ocurrir que uno o más folículos detengan su crecimiento y no se produzca la ovulación, formando estructuras conocidas con el nombre de quistes. De acuerdo a su morfología, los quistes se pueden clasificar en quistes foliculares o luteales. Los primeros se caracterizan por poseer una gran cavidad central, una capa de células de granulosa disminuida y una capa techal engrosada y anormal [36]. Además, los quistes foliculares presentan células de granulosa apoptóticas y desprendimiento de las mismas, sumado a un plegamiento de la membrana basal donde se apoyan ambas capas de células foliculares. Por otro lado, los quistes luteales presentan paredes gruesas, células de granulosa luteinizadas y pueden llegar a ser hemorrágicos [37].

Luego de la ovulación, el folículo ovárico se transforma en CL, proceso que involucra una gran cantidad de genes. Se denomina luteinización al proceso de reestructuración morfológica y bioquímica que ocurre en las células de las paredes del folículo ovulado para dar lugar al CL [38, 39]. Las células que van a sufrir este proceso escapan del ciclo celular y dejan de dividirse sufriendo una reprogramación génica irreversible.

1.6 Ciclo ovárico de la rata

El término *estro* fue utilizado por primera vez por Heape en el año 1900 para describir el período durante el cual la hembra está dispuesta a recibir al macho en coito fecundante. El período anterior al estro se denomina proestro y se caracteriza por el momento en el cual el animal entra en celo. El período siguiente al estro, diestro, varía en duración de acuerdo a las especies y es el tiempo durante el cual la secreción ovárica prepara a los tejidos reproductivos para la recepción del óvulo fertilizado luego del coito en el estro. En la rata dura uno o dos días, determinando que el ciclo estral tenga una duración de cuatro o cinco días. Si la fertilización no ocurre, el animal vuelve al período de proestro y un nuevo ciclo se inicia.

A nivel vaginal, se pueden determinar los distintos estadios del ciclo por observación con microscopio de los tipos celulares presentes en el extendido. En el proestro predominan células escamosas mientras que en el diestro los mayoritarios son los leucocitos.

La rata de laboratorio es un mamífero no estacional, de ovulación espontánea y poliéstrico. Es decir, el ciclo ovárico ocurre durante todo el año y la ovulación no depende del estímulo de la cópula. Por dichas características, sumadas a su fácil reproducción y mantenimiento en el bioterio, se puede afirmar que la rata de laboratorio representa un buen modelo para el estudio de la fisiología ovárica.

1.7 El Cuerpo Lúteo

El cuerpo lúteo (CL) es una glándula endócrina transitoria formada por las células foliculares remanentes del folículo que ha sido ovulado. Su principal función es producir y secretar progesterona. Esta hormona prepara al útero para el período de preñez o embarazo y regula las contracciones del oviducto para el transporte del ovocito al útero. Por lo tanto, la formación del CL en mamíferos se considera un evento esencial para la supervivencia e implantación del embrión. Si el ovocito ovulado no es fertilizado, el CL regresa permitiendo que un nuevo ciclo comience. Sin embargo, si la fertilización ocurre, se activan diferentes mecanismos que mantienen la función luteal durante la gestación.

1.8 Luteinización

1.8.a Efectos genómicos e intracelulares del pico de LH

En la mitad del ciclo menstrual, el incremento en los niveles de estradiol causa el aumento en la secreción de LH y en menor medida de FSH, también conocido como pico preovulatorio de gonadotrofinas. En el folículo preovulatorio dominante, la activación del receptor de LH por el pico de LH induce la ovulación e inicia el proceso de diferenciación de las células de la granulosa y de la teca en células luteales. La hormona LH es la responsable de inhibir el crecimiento de las células foliculares y de producir el escape del ciclo celular. Un gran número de genes son rápidamente inducidos por el pico de LH de forma transitoria, por lo que se cree estarían involucrados en los procesos de ovulación y luteinización. Entre ellos se encuentra el receptor de progesterona, la ciclooxigenasa-2 (COX-2), el factor de transcripción C/EBP (CATT/enhancer binding protein), Egr-1 (Early growth response protein-1) y el factor de transcripción Nur77 [40-42]. También la LH induce la expresión de distintos miembros de la superfamilia de las metaloproteasas (MMPs) y de factores involucrados en la angiogénesis como el Factor de Crecimiento del Endotelio vascular (VEGF) y las angiopoyetinas [43, 44].

El receptor de LH señala mediante proteínas G (proteínas de unión a GTP), las cuales están compuestas por subunidades α , β , y γ . El receptor de LH se acopla particularmente a la proteína G estimuladora (G_s), aunque se ha demostrado que también puede unirse a la proteína G_i , G_{13} y $G_{q/11}$ [45]. El receptor de LH es capaz de generar dos tipos principales de señalización: la primera es mediante la adenilciclasa (AC) para producir AMPc y la segunda es por activación de la fosfolipasa C (PLC), que moviliza fosfoinosítidos e incrementa el calcio (Ca^{2+}) intracelular. La señalización por G_s activa a la proteína quinasa dependiente de AMPc (PKA). Una vez que PKA se activa, se dirige al núcleo para fosforilar distintos factores de transcripción, entre los cuales está la proteína de unión al elemento respondedor de AMPc (CREB, por sus siglas en inglés). PKA fosforila a CREB en la Serina 133 por PKA permitiendo el reclutamiento de coactivadores, como a la proteína de unión a CREB (CBP/p300). CREB a su vez, se une a secuencias de ADN llamadas "elementos de respuesta a AMPc", mediante los cuales incrementa o reduce la transcripción de genes río abajo [46, 47].

Tanto en células de la granulosa como en células luteales, el AMPc es rápidamente degradado por fosfodiesterasas [48].

Los mecanismos moleculares por los cuales la LH estimula la vía de PLC/fosfoinosítidos no están claramente determinados. En células de la granulosa de rata, se demostró que solo las células con una alta densidad de receptores responden a la LH activando la cascada de fosfoinosítidos, además de la de AMPc [49]. Esto sugiere que solo las células de la granulosa de folículos preovulatorios responden a la LH con un aumento en la producción de los fosfoinosítidos. Se ha propuesto que la liberación de las subunidades α y β de la proteína G, luego de la activación de la G_s , lleva a la liberación de PLC- β . La PLC- β hidroliza al fosfatidilinositol-4,5-bifosfato (PIP_2) resultando en la formación de inositol trifosfato (IP3) y diacilglicerol (DAG). El IP3 induce la liberación de los depósitos intracelulares de Ca^{2+} y el DAG conjuntamente con el Ca^{2+} activan la vía de proteína quinasa C (PKC). La LH también estimula las vías de ERK1/2 en células de la granulosa. El efecto de la LH sobre la fosforilación de ERK puede ser rápido y transitorio, o retrasado y sostenido. El incremento temprano en la fosforilación de ERK1/2 es dependiente de la activación de PKA. Esta activación rápida y transitoria ocurre en células de la granulosa inmadura con bajos niveles de receptores de LH. En células de la granulosa de folículos preovulatorios, que expresan altos niveles de LH, la activación de ERK es sostenida y dependiente tanto de PKA como de PKC.

1.8.b Salida de las células de la granulosa del ciclo proliferativo

La hormona FSH estimula la proliferación de las células de la granulosa, dando como resultado el incremento en el tamaño folicular. Luego del pico de LH, las células de la granulosa dejan de dividirse y salen del ciclo proliferativo. Las células de la granulosa se encuentran arrestadas predominantemente en el estadio de G₀/G₁. El cese de la proliferación celular durante la luteinización está asociado a la pérdida progresiva de reguladores positivos del ciclo celular, incluyendo a las ciclinas, a la quinasa dependiente de ciclina 2 (Cdk2) y al incremento en la expresión de inhibidores de Cdk como p21^{cip1} y p27^{kip130} [50, 51].

1.8.c Rol del ovocito en la luteinización

Distintas moléculas derivadas del ovocito actúan en el folículo para inhibir la prematura luteinización y limitar la biosíntesis de progesterona [52]. Estudios *in vitro* demostraron que miembros de la familia de TGF, incluyendo TGF- β , activinas, inhibinas, BMPs, factores de diferenciación y crecimiento (GDFs), y la hormona antimulleriana median las acciones anti luteinizantes del ovocito. La señalización de TGFs a través de la cascada serina treonina kinasa resulta en la translocación desde el citoplasma al núcleo de proteínas efectoras intracelulares llamadas SMAD [53]. Ratones knockout condicionales para SMAD4 y activina A en células de la granulosa luteinizan prematuramente [54]. Los ovarios de estos animales tienen mayor número de CL, de marcadores luteales y producen altas cantidades de progesterona. Estos resultados sugieren que SMAD4 y activina A previenen la luteinización prematura de células de la granulosa durante el desarrollo folicular.

1.8.d Cambios estructurales

Las células luteales derivan de los dos tipos de células foliculares secretoras de esteroides: células de la granulosa y teca. Por lo tanto, el CL de primates está formado por dos tipos de células luteales: las células granulosa-luteínicas y las células teca-luteínicas (en roedores llamadas grandes o pequeñas, respectivamente). Las primeras derivan de la granulosa y contienen todos los elementos de las células secretoras de esteroides, como numerosas mitocondrias y abundante retículo endoplasmático liso. Por el contrario, las células teca-luteínicas provienen de la teca y tiene moderada cantidad de mitocondrias pero abundante retículo endoplasmático liso. Ambos tipo celulares representan el 50% del total de las células. El resto está

compuesto por células endoteliales, periendotheliales y células del sistema inmune. En humanos y roedores las células luteales difieren en la cantidad de progesterona que producen, siendo las luteales grandes las que más producen. En ratas, ambos tipos celulares responden a la LH incrementando la producción de progesterona.

Además de la diferenciación a células luteales, también se requieren cambios a nivel tisular para establecer la red vascular del CL. Entre estos cambios se encuentran la degradación de la membrana basal folicular, el establecimiento de la matriz extracelular y el desarrollo de nuevos capilares, siendo este último esencial para poder transferir grandes cantidades de progesterona a la circulación general. De esta forma, cada célula luteal se encuentra en contacto directo con los capilares, brindando al CL una de las tasas más altas de flujo sanguíneo del organismo.

Luego de la ovulación, la membrana basal que separa las células tecales de la granulosa es desintegrada y los capilares presentes en la teca se expanden dentro de la granulosa avascular. La matriz extracelular (MEC) del folículo está compuesta principalmente por Laminina, colagenasa tipo IV, fibronectina y proteoglicanos. Estos componentes son clivados por MMPs. En el ovario de rata, MMP-2 está presente en células de la granulosa, teca y luteales, mientras que la MMP-9 se localiza solamente en la membrana plasmática de las células luteales [55]. A diferencia de la MEC folicular, la del CL está formada por componentes proteicos (colágeno, fibronectina y laminina) y no proteicos (proteoglicanos y glicoproteínas).

Las células interactúan con la MEC a través de receptores de superficie llamados integrinas, las cuales incrementan su expresión durante la luteinización debido a la acción estimuladora de LH.

Los componentes de la MEC juegan un rol importante en modular la supervivencia, crecimiento y esteroidogénesis de las células luteales en diversas especies. Por ejemplo, la diferenciación de las células de la granulosa en luteales *in vitro* es promovida por fibronectina o laminina y se bloquea por un anticuerpo contra integrina [56]. Por este motivo, la MEC actúa no solo como una plataforma sino que también modula la función luteal a través de las integrinas ubicadas en la membrana de las células.

1.8.e Desarrollo de vasos sanguíneos

El desarrollo de nuevos vasos sanguíneos involucra la proliferación de células endoteliales, expansión de los capilares y la maduración capilar. La densa red de

capilares que se forma durante la luteinización suministra a las células luteales nutrientes, hormonas y lipoproteínas de unión al colesterol y aporta un mecanismo para la rápida y eficiente salida de progesterona a la circulación sistémica.

En la rata, los nuevos capilares pueden ser encontrados dentro de las primeras 16 horas luego de la ovulación. La regulación molecular de la angiogénesis en el CL es compleja, e incluye reguladores entre los que se encuentran el factor de crecimiento del endotelio vascular (VEGF), el factor de crecimiento fibroblástico básico (bFGF), y las angiopoyetinas.

El VEGF promueve la proliferación, supervivencia y migración de las células endoteliales. En primates y roedores, VEGF se expresa abundantemente en células de la granulosa sólo en el estadio preovulatorio. Luego de la ovulación, las células luteales continúan expresando VEGF. El VEGF de origen luteal es estimulado por LH, estradiol e IGF-1. La importancia del VEGF en la vascularización del CL ha sido demostrada mediante el uso de anticuerpos anti VEGF, anti receptor de VEGF, o anti receptor soluble de VEGF. La administración de este tipo de compuestos a roedores antes de la ovulación inhibe la angiogénesis y, en consecuencia, el desarrollo luteal [57-61]. La administración de un anticuerpo anti receptor de VEGF a ratones en la etapa de preñez temprana, induce la regresión de los vasos sanguíneos del CL. Esto sugiere que VEGF no sólo es necesario para la luteinización, sino que también es fundamental para la funcionalidad y mantenimiento de los vasos sanguíneos luteales durante el embarazo [62].

Las angiopoyetinas (Ang) también son críticas para la angiogénesis y la integridad de los vasos sanguíneos. Ang-1 y Ang-2 se unen a un receptor común llamado Tie-2. Sin embargo, mientras la Ang-1 estimula la ramificación y maduración de los vasos sanguíneos, Ang-2 inhibe este efecto actuando como un inhibidor competitivo al unirse al receptor Tie-2, sin activar los mecanismos de señalización [63]. Ratones knockout para Tie-2 y Ang-1 mueren en el desarrollo embrionario, mientras que los ratones knockout para Ang-2 se desarrollan normalmente y son fértiles. El receptor de Tie-2 se localiza exclusivamente en células endoteliales y está altamente expresado durante la fase luteal temprana y durante el rescate luteal. Ang-1 se expresa en células luteales y endoteliales de manera uniforme a lo largo de la etapa luteal en humanos. En contraste, Ang-2 está fuertemente expresado en una minoría de células luteales y endoteliales [44].

La activación del receptor de LH incrementa la expresión de Ang-1 en células luteales humanas y en células de la granulosa en macacos.

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

El patrón de expresión de Ang-2 sugiere que este factor juega un rol clave en los sitios de invasión vascular. Inicialmente, los transcritos de Ang-2 están agrupados en estrecha asociación a los vasos sanguíneos en la teca interna del folículo preovulatorio tardío. Luego del pico de LH, Ang-2 se vuelve abundante en los vasos que invaden el CL en desarrollo, sugiriendo que Ang-2 colabora con VEGF en la invasión y brote de los vasos sanguíneos, bloqueando los efectos de Ang-1 sobre la maduración y estabilización vascular. Luego de la formación tubular, Ang-1 recluta a las células periendotheliales para promover la maduración vascular y mantener la integridad vascular [64].

1.9 Esteroidogénesis luteal

Las células luteales producen grandes cantidades de progesterona. Como todos los esteroides, la progesterona se sintetiza a partir del colesterol. Por lo tanto, la regulación de la captación y el almacenamiento de colesterol forman parte integral en la síntesis de esta hormona. Durante la luteinización, las células adquieren la capacidad de captar y guardar colesterol y sintetizan varias proteínas asociadas a la movilización de colesterol intracelular.

1.9.a Captación y movilización del colesterol

El colesterol necesario para las células esteroideogénicas proviene de tres posibles fuentes: síntesis *de novo*, hidrólisis de ésteres de colesterol almacenados y lipoproteínas exógenas. En las células luteales, las lipoproteínas son la mayor fuente de colesterol. El colesterol luteal es provisto por la vía de endocitosis de lipoproteínas de bajo peso molecular ricas en colesterol (LDL) a través de su receptor (LDL-R), o por la captación selectiva de ésteres de colesterol de las lipoproteínas de alta densidad (HDL) a través del receptor SR-BI. HDL y LDL estimulan la producción de progesterona en cultivo de células luteales humanas y de ratas [65].

Debido a su naturaleza hidrofóbica, el colesterol no puede difundir libremente en el citosol y llegar a la mitocondria, que es donde ocurre el primer paso enzimático de la síntesis de progesterona. Varias proteínas participan en el movimiento intracelular de colesterol en las células esteroideogénicas, como por ejemplo la proteína transportadora de colesterol 2 (SCP-2). Se considera que SCP-2 desempeña un papel importante en la movilización del colesterol en el citoplasma [66]. El estradiol y la LH aumentan la expresión de SCP-2 en las células luteales [67, 68], y su expresión en CL está estrechamente relacionada a la producción de progesterona [67].

Una vez que el colesterol alcanza la membrana mitocondrial externa, se transporta a la membrana interna a través del espacio de intermembrana acuoso por la acción de al menos dos proteínas: la proteína reguladora de la esteroideogénesis aguda StAR y el receptor periférico de benzodiazepinas (PBR) [69].

1.9.b Biosíntesis de progesterona

La transformación de colesterol en progesterona comienza cuando el colesterol se encuentra en la membrana mitocondrial interna, en donde es convertido a pregnenolona por la enzima de clivaje de la cadena lateral del colesterol (P450_{scc}). La conversión de pregnenolona en progesterona ocurre en el retículo endoplasmático y es catalizado por la enzima 3 -hidroxiesteroide deshidrogenasa (3 HSD) (Figura 2). La expresión de ambas enzimas se incrementa durante la luteinización, permitiendo la secreción de grandes cantidades de progesterona.

En roedores, el nivel de progesterona secretada por el CL depende no solo de la cantidad producida, sino también de la expresión de la enzima 20 -hidroxiesteroide deshidrogenasa (20 -HSD). Esta enzima cataliza la conversión de progesterona en su forma inactiva, la 20 -dihidroxiprogestero (20 -DHP) (Figura 2). Una vez que 20 -HSD se expresa, la secreción de progesterona desciende y la 20 -DHP pasa a ser el principal esteroide secretado por las células luteales. Así, la 20 -HSD juega un papel crucial en la finalización de la preñez e inducción del parto [70], y su expresión es un marcador de regresión luteal.

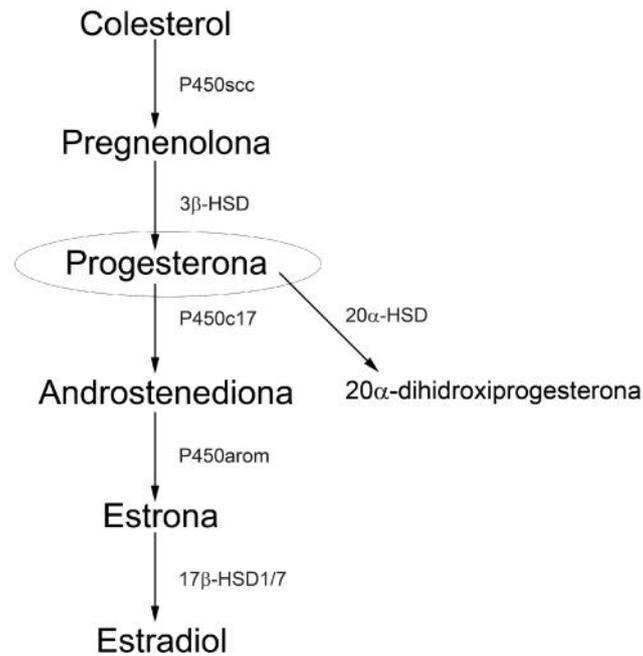


Figura 2: Esteroidogénesis luteal.

1.9.c Control molecular de la secreción de progesterona

El control de la síntesis de progesterona es complejo debido a la presencia de dos tipos de células esteroidogénicas, que son distintas tanto morfológicamente como bioquímicamente [38]. Si bien en la rata ambos tipos celulares responden a la estimulación con LH incrementando la producción de progesterona, la secreción basal en las células luteales grandes es significativamente mayor que en las luteales pequeñas. Esto se debe a que las células luteales grandes contienen más lípidos, secretan más andrógenos y estradiol, y unen LH y PRL de forma más efectiva que las luteales pequeñas.

1.9.d Regulación de la secreción de progesterona

Se sabe desde hace mucho tiempo que la LH es esencial para la función normal del CL en los animales domésticos. La estimulación por LH es indispensable para que las células luteales adquieran capacidad esteroidogénica a largo plazo, incluyendo el mantenimiento de cantidades normales de ARNm de StAR, P450_{scc} y 3 β -HSD [69]. LH regula la secreción aguda de progesterona al afectar el transporte de colesterol a la membrana mitocondrial interna y, a largo plazo, mediante la regulación de la expresión de receptores, transporte de proteínas y enzimas esteroidogénicas. El paso limitante en la biosíntesis de progesterona es el transporte del colesterol a la membrana mitocondrial

interna, llevado a cabo por las proteínas StAR y PBR [69]. StAR se expresa en los tejidos esteroidogénicos en respuesta a inductores de la biosíntesis de esteroides, y su contenido proteico es sensible a los agentes que inducen o inhiben la esteroidogénesis [71]. StAR se sintetiza como un precursor que es transportado del citoplasma a la mitocondria, en donde se cliva en dos formas de 30 kDa, una ácida y una básica. Además contiene sitios de fosforilación para PKC y PKA. La fosforilación por PKA está relacionada con aumentos en la secreción de esteroides, mientras que los sitios de fosforilación de PKC están involucrados en la disminución del transporte de colesterol y de la esteroidogénesis [72].

El PBR también desempeña un papel importante en el transporte de colesterol. Se localiza entre las membranas mitocondriales interna y externa, y presumiblemente podría funcionar a modo de poro, permitiendo el paso del colesterol. El PBR también posee sitios de fosforilación para PKA, aumentando de esta manera el transporte de colesterol. El ligando natural para PBR, endozepina, también parece ser crucial para regular el transporte de colesterol. La supresión selectiva de esta molécula reduce la esteroidogénesis basal en una línea de células tumorales de Leydig con secreción constitutiva de esteroides (R2C) [69].

Niswender y col. [69] propusieron a StAR como una proteína que actúa en el transporte de colesterol citosólico, con dirección hacia la membrana mitocondrial, en donde proporcionaría el colesterol a los PBR, que funcionarían como transportadores de colesterol a la membrana mitocondrial interna [69].

La técnica de Transferencia de Energía entre Fluorocromos (FRET) se utilizó para demostrar que StAR y PBR interactúan en la membrana mitocondrial [73]. En el año 2007 se utilizó la técnica de Transferencia de Energía de Resonancia por Bioluminiscencia (BRET) para demostrar la asociación entre la StAR, receptores PBR y endozepina, pero contrariamente a lo esperado, no se encontraron evidencias de asociación entre ellos [72].

1.10 Biosíntesis de andrógenos y estradiol por las células del CL

En roedores y primates, el CL produce cantidades significativas de andrógenos y estrógenos. La conversión de progestinas en andrógenos está mediada por la enzima CYP17. Si bien esta enzima se expresa en el CL de primates y roedores, su distribución difiere entre especies: mientras que las células luteales grandes y pequeñas de la rata la

expresan, en humanos sólo las células derivadas de la teca producen andrógenos. Los andrógenos son convertidos en estrógenos por la acción de la CYP19a1, expresada en el CL de roedores y primates [74, 75].

1.11 Regulación hormonal del CL

Una de las modificaciones más importantes que ocurre durante la luteinización es el cambio en la sensibilidad a las señales externas que permiten a las células luteales responder a un nuevo conjunto de hormonas. La funcionalidad del CL está controlada por la interacción entre hormonas secretadas por la pituitaria, por el propio CL y por la decidua y la placenta en el caso de preñez.

1.11.a LH

En humanos y primates no humanos, esta hormona es esencial y suficiente para la estimulación y el mantenimiento de la función luteal. El tratamiento de monas con antagonistas de GnRH (que bloquean la secreción de LH por la hipófisis) disminuye la producción de progesterona por el CL y por lo tanto decrece su concentración sérica [76]. En roedores, la LH aumenta la captación de colesterol y estimula la síntesis de progesterona [77].

1.11.b Prolactina (PRL)

La PRL también contribuye a la síntesis de progesterona, pero no es suficiente para mantener la esteroidogénesis por sí misma y depende de la exposición previa del CL a la LH. En el CL de rata, la PRL incrementa la expresión del receptor de LH, facilita los efectos luteotróficos del estradiol, estimulando la expresión del receptor de estrógenos [78]. PRL también ejerce sus efectos aumentando la captación de colesterol por parte de las células luteales, y por lo tanto, incrementando la producción de progesterona.

1.11.c Estradiol

En roedores, el estradiol actúa como agente luteotrófico estimulando la síntesis de progesterona y la vascularización del CL. Se ha demostrado que el estradiol media la acción de la LH en el CL de rata y que puede mantener al CL en ausencia de LH [79] [80]. Dos factores luteotróficos en la rata son la prolactina y el estradiol, que actúan de forma sinérgica en la estimulación de la secreción de progsterona.

En contraste, en primates se ha visto que el estradiol está relacionado al proceso de involución del CL. La administración intra ovárica de estradiol induce luteólisis

funcional prematura en monos [81]. No está claro si actúa directamente sobre las células luteales o indirectamente reduciendo la liberación de LH por la hipófisis y por lo tanto privando al CL de un adecuado soporte gonadotrófico.

1.11.d Progesterona

La progesterona actúa en tejidos como el endometrio, la glándula mamaria y el cerebro, y también localmente regulando la función ovárica: la mitosis y supervivencia de las células de la granulosa y la ovulación. Más aún, la progesterona cumple un rol autócrino sobre el CL, estimulando su propia producción y además protegiéndolo de la muerte celular [82, 83].

En primates, la progesterona contribuye al desarrollo del CL y al mantenimiento de la función luteal, mientras que su depleción causa degeneración funcional y estructural prematura del CL [76].

1.12 Receptores de progesterona (PR)

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

En ratones deficientes en PR, a pesar de la ausencia de ovulación, la luteinización es normal [84], sugiriendo que el receptor clásico de progesterona no afecta la formación ni la función del CL. Esto implica, además, un papel importante para los receptores de progesterona no clásicos en el mantenimiento de la función del CL en roedores.

La unión de progesterona al PR altera la transcripción de genes específicos. Los eventos mediados por el PR son relativamente lentos pero producen respuestas fisiológicas de larga duración. Alternativamente ciertos efectos producidos por la progesterona son muy rápidos y resultan de la unión a receptores de membrana [85]. Las células luteales de rata expresan altos niveles del Componente de membrana del receptor de progesterona tipo 1 (PGRMC1) [86]. PGRMC1 regula la esteroidogénesis [87] y media los efectos anti-apoptóticos de la progesterona observados en las células luteales de rata [88]. A su vez, PGRMC1 también regula la supervivencia de distintas poblaciones de células ováricas *in vitro* [89, 90], como en células de la granulosa de rata [88], células granulosa/luteínicas humanas [91] y en células de la granulosa espontáneamente

inmortalizadas. Además, la progesterona activa el mecanismo dependiente de PGRMC1 que promueve la supervivencia de las células granulosa/luteínicas humanas [92].

1.13 Luteólisis

El CL debe ser eliminado regularmente para que la función reproductiva progrese de manera adecuada. Si la preñez no ocurrió al final de cada ciclo estral, o cuando la progesterona ya no es necesaria para mantener la preñez, el CL deja de producir progesterona y regresa mediante un proceso llamado luteólisis [93]. La progesterona suprime la secreción de FSH y LH, previniendo el desarrollo de un nuevo folículo preovulatorio. Por lo tanto, la luteólisis termina con cada ciclo reproductivo femenino a través de la disminución de la secreción de progesterona, lo que permite el desarrollo de un nuevo folículo. Es por este motivo que la luteólisis se asocia a un mecanismo que incrementa la eficiencia reproductiva: si la hembra no concibe seguido a la ovulación, la remoción del CL permite que un nuevo ciclo ovárico comience y con ello una nueva oportunidad de concebir. En roedores, así como en otras especies donde la única fuente de progesterona durante la preñez es el CL, la luteólisis juega un rol importante porque la disminución de la progesterona es un hecho clave para que el parto ocurra.

En roedores, la luteólisis ocurre en dos etapas: la primera, llamada regresión funcional, está asociada a una disminución en los niveles de progesterona [94]. La segunda etapa, llamada regresión estructural, ocurre luego de la disminución de progesterona y se caracteriza por la pérdida de la integridad vascular y la muerte por apoptosis de las células luteales [82].

Al igual que en la luteinización, durante la luteólisis el CL sufre cambios en su capacidad esteroidogénica, vascularización y remodelamiento tisular, lo que resulta en una glándula formada principalmente por tejido conectivo llamada cuerpo albicans.

1.13.a Luteólisis funcional

La regresión funcional ocurre antes de que los cambios en la integridad del tejido sean perceptibles. La disminución en los niveles de progesterona está dada por su conversión al metabolito inactivo 20 -dihidroprogesterona (20 -DHP) [94]. Hay varios factores que están involucrados en apagar la síntesis de progesterona, siendo la prostaglandina F₂ (PGF₂) esencial en este evento [95]. En la rata, hacia el final de la preñez la PGF₂ induce la actividad de la enzima 20 -HSD, de modo que aumenta la

concentración de la 20 -DHP. Este descenso en los niveles de progesterona hacia el final de la gestación induce el parto [82].

Además, la PGF₂ previene la biosíntesis de progesterona mediada por LH y por PRL. La función anti-LH involucra dos acciones interrelacionadas: el bloqueo de la acumulación de AMPc inducida por LH y la inhibición de la respuesta de las células luteales al AMPc [96, 97].

1.13.b Luteólisis estructural

La regresión estructural se caracteriza por una disminución en el tamaño y peso del CL, que se convierte en cuerpo albicans, que se reabsorbe y reemplaza por tejido ovárico. Uno de los principales eventos que caracteriza la regresión estructural del CL es la muerte por apoptosis de las células luteales y vasculares [98]. La activación de este proceso puede ocurrir por dos vías: por la vía extrínseca o por la intrínseca de la apoptosis. Ambos eventos convergen en una maquinaria de destrucción celular que involucra a una serie de proteasas llamadas caspasas. Estas proteínas juegan un rol clave en la apoptosis, siendo su activación un evento crítico en este proceso [99-101]. Particularmente en la rata, las caspasas juegan un rol importante durante los primeros eventos de la luteólisis en el CL del ciclo estral [98]. En nuestro laboratorio se demostró que el aumento en la actividad de las caspasas-2, -8, -9 y -3 está asociado a los eventos tempranos de la luteólisis funcional hacia el final de la gestación, y que la PGF₂ regula la actividad de estas caspasas en el CL de la rata [102].

1.14 Apoptosis

La apoptosis es una forma de muerte celular regulada genéticamente, cuyo objetivo es eliminar aquellas células de tejidos que han sufrido cambios como consecuencia de su desarrollo o debido a respuestas frente a estímulos fisiológicos alterados [103]. Este programa genético es vital para el desarrollo normal, para el mantenimiento de la homeostasis y para un sistema inmune efectivo. La alteración en este proceso implica numerosas patologías que abarcan desde desórdenes degenerativos hasta autoinmunidad y cáncer [104, 105]. Diversos estudios han demostrado que muchas hormonas y factores de crecimiento son importantes para la proliferación celular y cumplen una función en la supresión de la apoptosis [106]. La inducción de la apoptosis es específica del tipo celular, ya que dichos factores poseen acciones apoptóticas o antiapoptóticas dependiendo del tipo celular sobre el que actúen. Es el balance entre estos factores el

que determinará el destino celular: muerte o supervivencia. Se ha demostrado en el ovario, tanto en modelos *in vitro* como *in vivo*, la presencia de varios factores atretogénicos, como GnRH, IL-6, andrógenos, TNF- α , Ligando Fas, etc. [27-29]. En cambio, entre los factores involucrados en la supervivencia se encuentran el Factor de Crecimiento Epidermal (EGF), Factor de Crecimiento similar a Insulina tipo I (IGF-I), Factor Transformante tipo I (TGF- β) entre otros [33]. La apoptosis ocurre en células que presentan niveles anormales de ATP y requiere la síntesis de ARNm y proteínas. Afecta a células individuales e involucra pérdida de tamaño celular, condensación de la cromatina y formación de cuerpos apoptóticos, que consisten en fragmentos nucleares o de organelas rodeados de membrana plasmática. Los cuerpos apoptóticos son eliminados por fagocitosis y de esta forma se impide la liberación de los componentes citoplasmáticos al medio extracelular, evitándose un proceso inflamatorio. Otros cambios que ocurren durante la apoptosis involucran al núcleo de la célula. Una de las características es la fragmentación que sufre el ADN como consecuencia de la activación de endonucleasas, enzimas que producen clivajes en el ADN de forma regular entre las unidades nucleosomales. Como resultado se generan fragmentos en un tamaño múltiplo de 180 pares de bases, que se visualiza como un patrón característico de bandas en geles de agarosa [107].

Existen dos vías por las que puede ocurrir el proceso de apoptosis: 1) la mitocondrial o intrínseca [105] y 2) la de receptores de muerte o extrínseca [108]. Ambas vías comparten una familia de proteínas que actúan a lo largo de este proceso y que están presentes en la mayoría de los tipos celulares llamadas caspasas. Las caspasas son cisteín- proteasas que clivan en residuos de aspartato, y son las responsables de la mayoría de los clivajes proteolíticos que ocurren durante la apoptosis [101]. Se dividen en “caspasas iniciadoras” (caspasa-8,-9, entre otras), que son las que inician la cascada proteolítica y en “caspasas efectoras” (caspasa-3,-6,-7), que son las responsables de los clivajes que desintegran la célula [101, 109-111]. Para que se activen las caspasas efectoras, sus zimógenos (procaspasas) deben ser clivados proteolíticamente por las iniciadoras. Al contrario, la activación de la caspasas iniciadoras se dispara por la dimerización de los zimógenos a través de una proteína adaptadora [112] (Figura 3 y 4).

La caspasa-3 es la principal caspasa efectora [113]. Se sintetiza como una pro-enzima de 33 kDa que, luego de su activación, es clivada generando un fragmento activo de 11 kDa y un intermediario de 20 kDa. Este último a su vez, es nuevamente clivado

generando un segundo fragmento activo de 17 kDa [114]. Existe un número limitado de sustratos que son clivados por la caspasa-3 durante el proceso de apoptosis. Entre ellos, se destaca la proteína PARP (poli-ADP ribosa polimerasa) [115] y actina [116], los cuales son inhibidores de la enzima DNAasa I, endonucleasa responsable de la fragmentación del ADN durante el proceso de apoptosis [117].

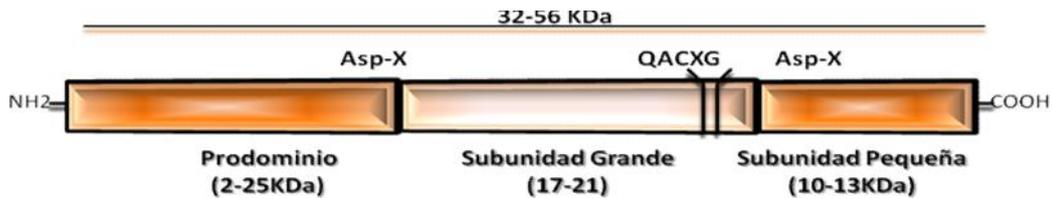


Figura 3: Estructura básica de las caspasas. Están formadas por tres regiones: prodominio, subunidad grande, subunidad pequeña y una región conectora.

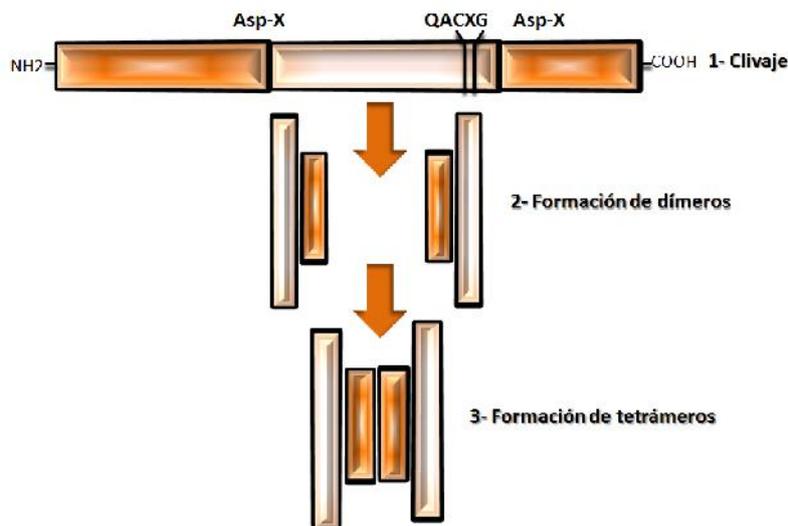


Figura 4: Esquema general de la activación de las caspasas. La activación requiere de un procesamiento proteolítico en residuos aspartato ubicados entre los dominios, resultando en la eliminación del prodominio y de la región conectora. Luego, la subunidad grande y la pequeña forman un heterodímero. La unión entre dos heterodímeros forma un tetrámero, resultando en la activación de la caspasa.

1.14.a Vía intrínseca de la apoptosis

Un punto de control crítico para la activación de la vía intrínseca o mitocondrial es la proteína p53, factor de transcripción que responde al estrés celular arrojando el ciclo celular a la espera de la reparación del daño en ADN. Si el daño celular es grande y no

puede ser reparado, p53 promueve la apoptosis a través de la inducción de genes pro-apoptóticos como *puma*, *noxa*, *bax*, *apaf1* y *fas*, o inhibiendo la expresión de genes antiapoptóticos como *Bcl-2* o *Bcl-X_L* [118, 119].

La vía mitocondrial está controlada por los miembros de la familia de Bcl-2. Los miembros pro-apoptóticos causan la permeabilización de la membrana externa mitocondrial y de esta forma, permiten la liberación al citoplasma de moléculas solubles como citocromo c y Smac/DIABLO. El citocromo c estimula la formación del apoptosoma, un complejo formado por APAF1 (Factor activador de proteasas apoptóticas), dATP, citocromo c y caspasa-9 (Figura 5). La caspasa -9 es activada al incorporarse al apoptosoma y una vez activa, cliva a las caspasas efectoras -3, -6 y -7. Smac/DIABLO se une a las proteínas inhibitorias de la apoptosis (IAPs) y revierten su interacción con las caspasas, lo que permite a estas últimas activarse [120] (Figura 6).

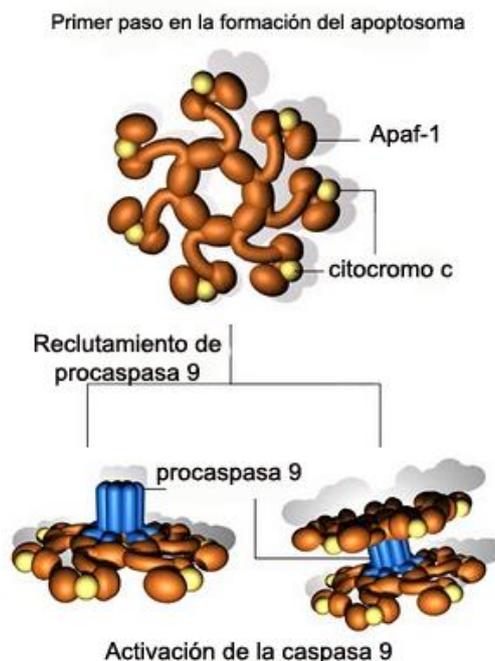


Figura 5. Esquema de la formación del apoptosoma.

Los miembros de la familia de Bcl-2 pueden dividirse en tres grupos. Todos comparten por lo menos uno de los cuatro dominios de homología a Bcl-2 (dominios BH). El primer grupo está integrado por los miembros que poseen todos los dominios BH y se comportan como anti-apoptóticos, como ser Bcl-2, BclX_L y Bcl_w. En el caso particular de BclX, cabe destacar que existen dos isoformas de esta proteína, formadas por splicing alternativo del ARNm: BclX_L y BclX_S. BclX_L actúa como anti-apoptótica

mientras que BclX_S se comporta como una proteína pro-apoptótica. El segundo grupo comprende los miembros multidominio (contienen los dominios BH1, BH2 y BH3), pero que se comportan como pro-apoptóticos. Entre los mismos se puede mencionar BAX, BAK y BOK. Las proteínas anti-apoptóticas se unen con las proteínas pro-apoptóticas formando heterodímeros e impiden que estas últimas puedan ejercer su acción permeabilizante en la membrana externa mitocondrial. Por último se encuentran proteínas, como BAD, BIM, BID, PUMA y NOXA, que contienen sólo el dominio BH3 (*BH3 only*), el cual es necesario y suficiente para otorgarles su acción pro-apoptótica [112]. Algunos estímulos específicos activan a ciertas proteínas *BH3 only* por inducción de la transcripción o por modificaciones post-transcripcionales y rompen el equilibrio entre proteínas pro y anti-apoptóticas, lo que desencadena la apoptosis [121].

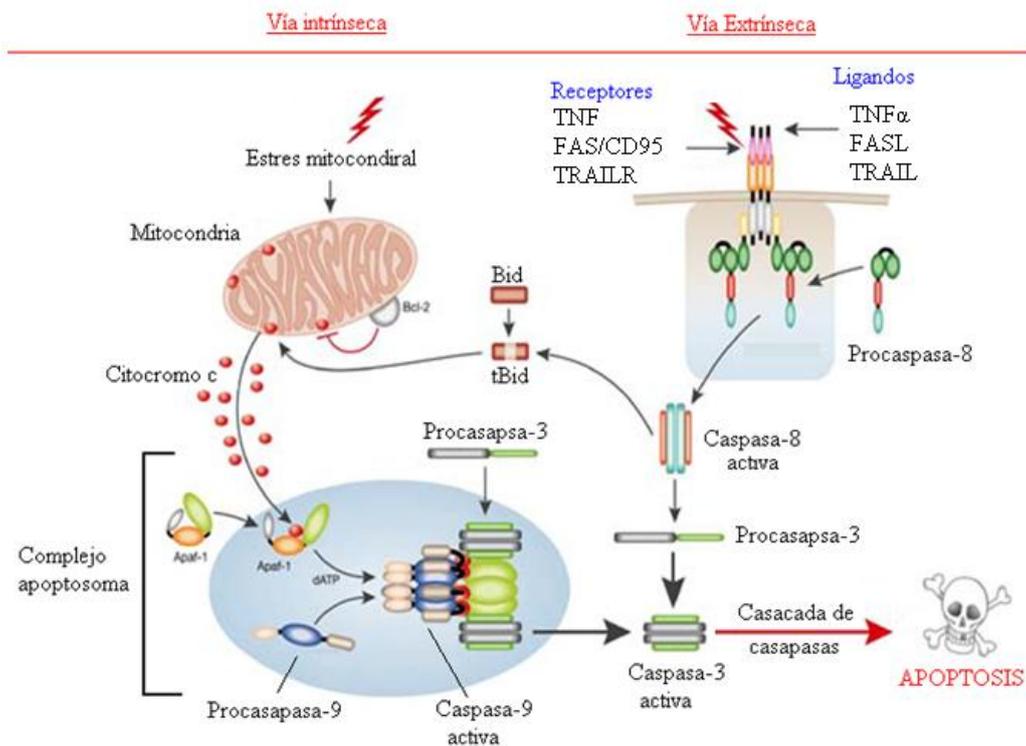


Figura 6. Vía intrínseca y extrínseca de la apoptosis. (Modificado de Williams y McFarlane, 2004 [122]).

1.14.b Vía extrínseca de la apoptosis

La vía extrínseca de la apoptosis se inicia por la activación de receptores de muerte situados en la membrana celular (Figura 6). Estos receptores pertenecen a la superfamilia del factor de necrosis tumoral (TNF), como TNFR1, FAS y TRAILR [109] [123]. La activación de los receptores ocurre por unión de ligandos como TNF, FASL

(también llamado CD95L) y Apo 2L/TRAIL (Apo 2 ligando/ ligando inductor de apoptosis relacionado a TNF) [108]. Al unirse a sus ligandos, los receptores se trimerizan y se generan dos tipos de respuesta celular: una es a través de la expresión de altos niveles de caspasa-8, y la otra es mediante el clivaje de la proteína BID, que está dado por esta misma caspasa, liberándose un fragmento activo que interactúa con la proteína pro-apoptótica BAX y que favorece la salida del Citocromo c de la mitocondria. Una vez liberado, se adhiere a la proteína APAF-1 causando un cambio conformacional y permitiendo que APAF-1 interactúe con procaspasa-9, la cual se activa y a su vez activará a las caspasas efectoras -3 y -7 (Figura 6).

FAS es uno de los principales receptores de muerte. FAS y su ligando FASL se expresan en una gran variedad de células, como células del ovario, hepatocitos, células pulmonares y cardíacas, y en una amplia variedad de células relacionadas al sistema inmune. Una vez activados por la unión de sus ligandos y luego de la trimerización, estos receptores reclutan, mediante su dominio de muerte (DD) a otras proteínas que poseen dicho dominio, como la proteína adaptadora FADD (dominio de muerte asociado a Fas) que a su vez, al estar unida a los receptores activados, recluta a las procaspasas iniciadoras -8 y -10. La unión de todas estas proteínas conforma un complejo de señales inductores de muerte (DISC).

Diversos estudios acerca del rol fisiológico de Apo2L/TRAIL, sugieren que este ligando tiene un papel en la vigilancia del sistema inmune y en la regulación de la respuesta inmune adaptativa [124]. Más aún, este mecanismo media la citotoxicidad de las células dendríticas, monocitos, células natural killer (NK) y células T frente a virus y tumores [125]. Hay además cierta evidencia de que algunos efectos antivirales y antitumorales del interferón están mediados por estos receptores [126].

1.15 Sistema Notch

La vía de Notch es un camino de señalización que está involucrado en el control de diversos eventos que ocurren en las células eucariotas, como la especificación del destino celular [127-132], la migración celular [133], supervivencia/apoptosis [134-136], división celular [135, 137, 138], adhesión celular [136], transición epitelio-mesenquimal [139] y angiogénesis [140-142].

El sistema Notch es utilizado por las células para especificar su destino celular a partir de potenciales funciones pre-existentes. Mediante este sistema, el contacto célula-célula

genera cambios en la expresión génica en una célula vecina, llevándola a adoptar un destino particular. Este proceso es clave para la formación de órganos y tejidos.

Es interesante destacar que el sistema Notch utiliza un mecanismo único de señalización, que involucra una serie de clivajes proteolíticos en vez de una amplificación por segundos mensajeros.

1.15.a Ligandos del sistema Notch

En mamíferos, el sistema Notch está formado por cinco ligandos: Jagged 1-2 y Delta-like 1, 3 y 4 [143] (Figura 7). Estas proteínas se caracterizan por tener un solo paso transmembrana y son las encargadas de transmitir el estímulo a las células receptoras, las cuales responden hacia un destino celular. Estos ligandos están formados por un dominio común a los miembros de esta familia, llamado dominio Delta-Serrate-Lag-2 (DSL), y un dominio homólogo al factor de crecimiento epidérmico (EGF), excepto por la ausencia de los seis residuos de cisteína que caracterizan a EGF. Ambos dominios conforman el dominio de enlace con el motivo EGF de Notch (EBD), cuya función es interactuar con el receptor Notch e iniciar el proceso de señalización celular [144]. Las proteínas moduladoras de la unión receptor-ligando a nivel extracelular son las proteínas “Lunatic Fringe, Radical Fringe, y Maniac Fringe” [145].

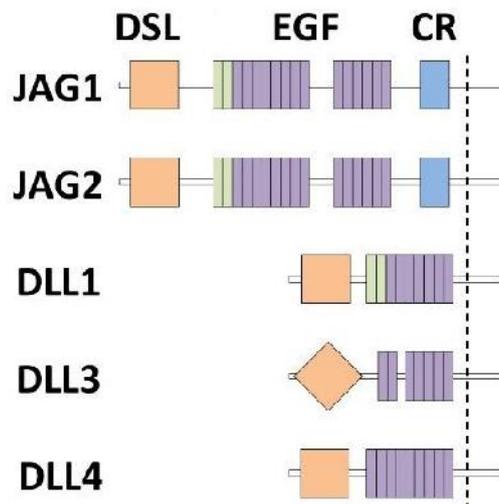


Figura 7. Ligandos de Notch en mamíferos. Los ligandos son proteínas transmembrana, en las cuales el dominio extracelular contiene un número característico de repeticiones de tipo EGF y un dominio DSL indispensable para la unión al receptor. Además Jagged1 y Jagged2 poseen un dominio N-terminal adicional rico en cisteína (CR) (Modificado de Vanorny & Mayo 2017 [146]).

1.15.b Receptores del sistema Notch

En mamíferos, el sistema Notch está formado por cuatro receptores, llamados Notch 1-4. Todos los receptores atraviesan una sola vez la membrana plasmática, y si bien sus estructuras son muy similares, tienen diferencias esenciales en las porciones extracelular y citoplásmica (Figura 8). La región extracelular contiene de 10 a 36 elementos repetidos de tipo EGF (“EGF-like”). Los receptores Notch1 y 2 contienen 36 repeticiones, mientras que Notch3 contiene 34 y Notch4 solamente 29. Los elementos repetidos “EGF-like” en posiciones 11 y 12 constituyen el núcleo primario de interacción con el ligando. Los otros elementos repetidos “EGF-like” se encargan de estabilizar la estructura del receptor y de modificar su actividad, potenciando o inhibiendo la interacción con los ligandos [147, 148]. Adyacentes a estos elementos hay tres zonas conocidas como secuencias repetidas LNG (por estar conservadas en las proteínas LIN-12, Notch y GLP-1), esenciales para la estabilidad y la correcta conformación del dominio extracelular. Entre las secuencias repetidas LNG y el dominio transmembrana, existen dos residuos cisteína que son importantes para el ensamble de los receptores. Cerca del dominio transmembrana hay un residuo valina, que es donde ocurre el procesamiento proteolítico por el cual se libera el dominio intracelular activo de Notch (NICD). En el dominio intracelular se encuentra la región de interacción con factores transcripcionales (RAM), mediante la cual NICD interactúa con el ADN. Adyacentes, se encuentran los seis elementos repetidos de anquirina (ANK), que junto a RAM regulan a proteínas que presentan una estructura común de hélice-lazo-hélice (proteínas bHLH), las cuales actúan como factores transcripcionales para la expresión de genes cuyos productos dirigirán a la célula a un destino celular diferente al de la célula que emitió el estímulo [147, 148]. Flanqueando a los elementos repetidos de anquirina, se encuentra la señal de localización nuclear (NLS), que le permite a NICD entrar al núcleo de la célula [144, 149]. Notch 1-3 contienen dos NLS, mientras que Notch4 tiene solo una. El dominio activador de la transcripción (TAD) tiene como función reclutar acetilasas de histonas para generar una conformación abierta de la cromatina en la doble cadena del ADN. Los cuatro receptores Notch contienen en el C-terminal una región rica en prolina (P), glutamato (E), serina (S) y treonina (T) (PEST), que es la secuencia esencial para la degradación de NICD.

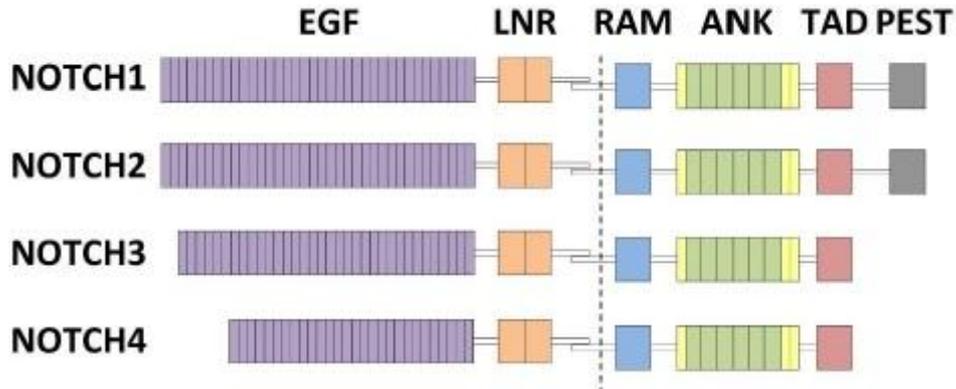


Figura 8. Estructura de los receptores Notch en mamíferos. Los receptores Notch están compuestos por un gran dominio extracelular unido de manera no covalente al dominio intracelular. El dominio extracelular contiene repeticiones de tipo EGF y repeticiones LNR. El dominio intracelular contiene la región RAM y repeticiones anquirina (ANK), necesarias para la interacción con factores transcripcionales. (Modificado de Vanorny & Mayo 2017 [146]).

1.15.c Clivajes proteolíticos y activación del sistema Notch

La actividad biológica del receptor Notch depende de un procesamiento proteolítico secuencial que está catalizado por tres proteasas diferentes. Sobre el sitio S1 actúa una convertasa, cuya acción genera dos fragmentos que se corresponden con los dominios intra y extracelular del receptor, los cuales permanecen unidos de forma no covalente. Ambos fragmentos atraviesan la membrana plasmática y convierten en funcional al receptor [147]. Cuando el receptor interactúa con el ligando se produce la exposición del sitio S2, en donde actúan miembros de la familia de metaloproteasas ADAM. Estas enzimas liberan al dominio extracelular de la membrana plasmática, generando un fragmento de vida corta llamado NEXT (truncamiento extracelular de Notch). Finalmente en el sitio S3 ocurre el clivaje de activación, que está catalizado por el complejo γ -secretasa [150, 151] y es esencial para la función de Notch [152]. Este clivaje libera al fragmento intracelular de Notch (NICD), que se transloca al núcleo y activa la transcripción de genes blanco de la vía [153, 154] (Figura 9). En ausencia de NICD, RBPJ, también llamado CSL [CBF1/Su (H) / Lag2], se encuentra unido al ADN y a las proteínas co-represoras, las cuales reclutan complejos histona deacetilasa (HDAC) para suprimir la transcripción. (Figura 9). Al contrario, cuando NICD se transloca al núcleo, desplaza a los co-represores y forma un complejo ternario con RBPJ y proteínas “Mastermind like” (MAML), convirtiendo a RBPJ de represor en

activador transcripcional. Como consecuencia, se induce la expresión de genes blanco de Notch, como *hes1* y *hes5* (“Hairy Enhancer of Split”) y *hey1* (“proteínas Hes-relacionadas al motivo YRPF”) [155-157]. La duración de la actividad transcripcional de Notch es limitada y está regulada por MAML, que promueve la fosforilación del dominio PEST y la posterior degradación del NICD [155].

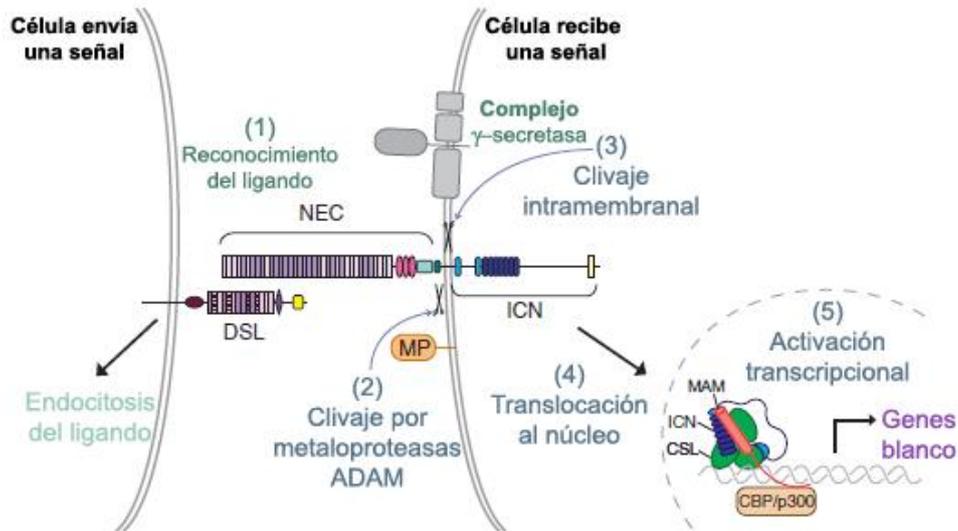


Figura 9. Vía de señalización de Notch. (Modificado de Gordon y col. 2006 [158]).

El sistema Notch comprende una señalización de tipo yuxtácrina, en donde dos células vecinas interactúan para luego una o ambas cambiar su destino celular. Las células que envían la señal expresan los ligandos, mientras que las células que la reciben expresan los receptores, ambos en la membrana celular. Cuando un ligando interactúa con el receptor de la célula vecina, se libera el NICD y se activa la vía, generándose un cambio en la expresión génica en la célula que recibió la señal. Se cree que la forma en la cual Notch ejerce sus efectos pleiotrópicos es mediante la iniciación de una cascada de transcripción que incluye una regulación transcripcional epigenética (Figura 10) [159].

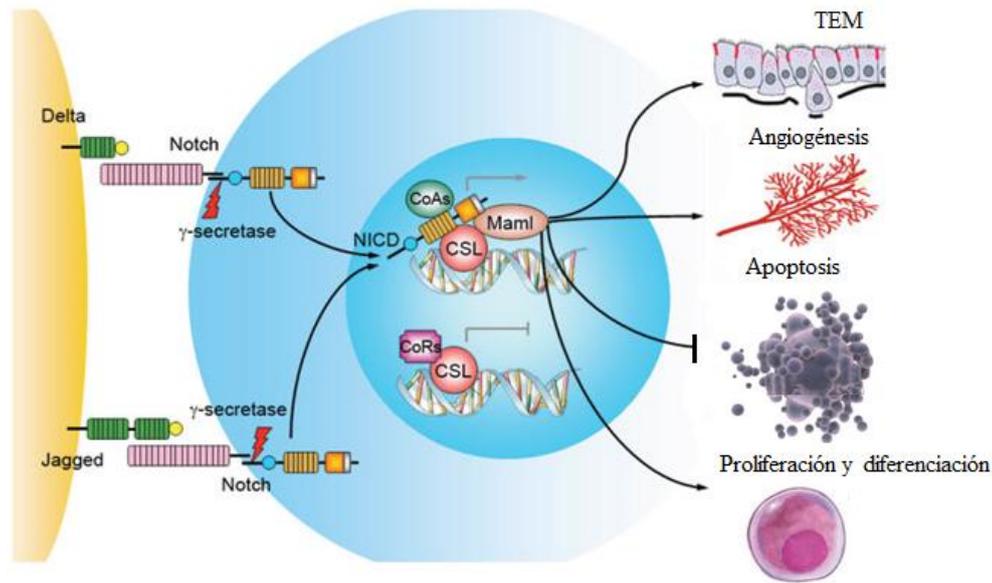


Figura 10. Efectos pleiotrópicos del sistema Notch (Modificado de Yi-Yang Hu y col., 2012[160]).

1.15.d El sistema Notch en ovario

Diversos componentes del sistema Notch, como receptores, ligandos, moduladores y genes blanco, se expresan en el ovario de mamíferos y están dinámicamente regulados durante el desarrollo folicular (Tabla 1).

Tabla1. Expresión de distintos componentes de la vía de Notch en ovario de mamífero.

Gen	Ovocito	Prim	1°	2°	Antral	CL	Vasc
<i>Notch1</i>	1,2	1				3-5	3, 6-9
<i>Notch2</i>	4, 10-12	4,10,12,13	4, 10-13	4,6,8,11-13	4,6,8,11-13	4	
<i>Notch3</i>			4	4,6	4,6	4,6,14	
<i>Notch4</i>		7	7	7	7	3,7	3,6,7
<i>Jag1</i>	4,6,10-13,15	4	4	4,12		4,14	7
<i>Jag2</i>	1			6	6		
<i>Dll1</i>				4		4	
<i>Dll3</i>							
<i>Dll4</i>	4	4	4	4	4	3,4	3,9
<i>Hes1</i>	4,10	4,10	4	4		4	

Referencias: (1) Guo et al. 2012, (2) Feng et al. 2014, (3) Hernandez et al. 2011, (4) Murta et al. 2014, (5) Accialini et al. 2015, (6) Johnson et al. 2001, (7) Vorontchikhina et al. 2005, (8) Jovanovic et al. 2013, (9) Garcia-Pascual et al. 2013, (10) Trombly et al. 2009a,b, (11) Zhang et al. 2011, (12) Wang et al. 2014, (13) Vanorny et al. 2014, (14) Wang et al. 2015, (15) Dorfman et al. 2011. Prim: folículo primordial, 1°: folículo primario, 2°: folículos secundario, CL: cuerpo lúteo, Vasc: vasculatura. (Modificado de Vanorny & Mayo 2017 [146]).

Se observó la presencia de ligandos y receptores de Notch en células de la granulosa, luteales y vasculares del ovario de ratas [161-163]. En particular, los ligandos Jagged1, Dll1 y Dll4 y los receptores Notch 1-4 están expresados en células luteales grandes y pequeñas [161, 162, 164-167], sugiriendo que Notch cumple una función en ellas. En nuestro laboratorio se demostró que los receptores Notch 1 y 4 y que el ligando Dll4 están expresados en ambos tipos de células luteales en CL de preñez y se observó que Notch tiene un rol luteotrófico, ya que promueve la viabilidad y la esteroidogénesis luteal. Se vio también que la hormona luteolítica Prostaglandina F₂ actuaría, en parte, reduciendo la expresión de algunos componentes del sistema Notch [164]. Además, CLs de monos tratados con anticuerpo neutralizante contra Dll4 durante el período periovulatorio mostraron un aumento de la densidad vascular, y un menor tamaño, con aumento de apoptosis y supresión de la concentración sérica de progesterona [168]. Está reportado que la inhibición de la señalización de Notch en ovario de ratón neonatal, disminuye la formación de folículos primordiales [169] y detiene el desarrollo folicular de folículos primarios en cultivo [170].

La inhibición *in vivo* de Notch en ratón afecta la foliculogénesis y la angiogénesis estimulada por gonadotrofinas [163]. La inhibición de la vía de Notch en cultivos *ex vivo* de ovario utilizando dos inhibidores de -secretasa (DAPT y L-685,458) produjo una disminución en el número de folículos primordiales y un retraso en el reclutamiento folicular, culminando en un menor número total de folículos [171]. Esta reducción está asociada con una disminución de la proliferación de las células de la granulosa, un aumento de la apoptosis del ovocito y una disminución de la expresión de factores de transcripción específicos del ovocito. Estos trabajos describen la función de Notch en la foliculogénesis. Sin embargo, su acción en la luteinización y función del CL aún no ha sido descrita.

1.15.e El sistema Notch en angiogénesis

Los receptores de Notch están ampliamente expresados en la vasculatura, lo que demuestra la importancia de este sistema en la angiogénesis. Durante la angiogénesis normal, el Factor de Crecimiento del Endotelio Vascular (VEGF) conduce a la formación de nuevos vasos aumentando la expresión de Dll4 en las células ubicadas en el brote del vaso. Estas células son no proliferativas, pero están seguidas de células móviles y proliferativas llamadas células tubo, las cuales expresan receptores Notch y forman el lumen del nuevo vaso. El Dll4 presente en las células del extremo actúa a

través de Notch en las células del tubo, generando una disminución de la ramificación inducida por VEGF, mediante la desregulación del receptor 2 de VEGF (VEGFR2). De esta forma, Dll4 inhibe la angiogénesis excesiva mediante un ciclo de retroalimentación negativa de VEGF.

Varios estudios abordan la interacción entre componentes del sistema Notch y la angiogénesis. En particular, el ligando Dll4, los receptores Notch1, Notch4 y el VEGF están involucrados en este proceso [141, 172-176]. Sin embargo, la información acerca de la expresión y función de este sistema en la fisiología del ovario y su posible relación con el desarrollo vascular en este órgano es muy limitada. Hay solo dos estudios descriptivos realizados por métodos inmunohistoquímicos en ratones. En uno se demuestra la presencia de los receptores Notch2 y Notch3, y el ligando Jagged2 en células de granulosa de folículos en desarrollo [161] y en otro se describe la presencia de Notch1, Notch4, y el ligando Jagged1 en la vasculatura de folículos en desarrollo y del CL [162]. Además, resultados de nuestro laboratorio demuestran la presencia de Notch1, Notch4 y el ligando Dll4 en células luteales de rata [177].

1.16 Sistema Wnt

El sistema Wnt constituye un camino de señalización altamente conservado involucrado en la regulación de la homeostasis, el desarrollo, la proliferación y la muerte celular en muchos tipos celulares. Está compuesto por 19 ligandos Wnt [178], que son glicoproteínas de secreción que actúan de manera parácrina [179] a través de la unión a receptores Frizzled (Fzd). Existen 10 tipos de receptores, que son proteínas de siete pasos transmembrana acoplados a proteínas G [180-182]. Se postula que los ligandos Wnt se unen a los receptores de forma promiscua. La diferencia de afinidad de unión entre un Wnt particular y los diferentes Fzd determinaría qué rama de la vía de Wnt se activa [183]. La interacción ligando/receptor puede activar tres ramas distintas del sistema Wnt: la vía canónica, también llamada Wnt/ β -catenina, y las dos vías no canónicas: de polaridad celular y de calcio. En el caso de la vía canónica de Wnt, la transducción de la señal involucra la asociación entre el receptor Fzd y co-receptores llamados LRP 5 y 6 [184].

Fisiológicamente, el contenido de β -catenina citosólica está estrictamente regulado por un complejo destructor formado por las proteínas glucógeno sintasa kinasa 3 β (GSK-3 β), adenomatous poliposis coli (APC) y axina [185]. Axina es la proteína limitante que

regula la eficiencia del complejo destructor [185]. Cuando la vía canónica de Wnt está apagada, este complejo fosforila a β -catenina en cuatro residuos serina y treonina específicos (Ser33, Ser37, Tr41, Ser45) [186], marcando a β -catenina para su ubiquitinación y destrucción en proteasomas [187] (Figura 11). La interacción de Wnt con Fzd/LPR desestabiliza al complejo destructor, de modo que se acumula β -catenina no fosforilada en el citoplasma. Luego, β -catenina se transloca al núcleo, en donde desplaza a represores transcripcionales [188, 189] y se asocia al complejo transcripcional TCF/Lef, regulando así la expresión de genes blanco [190, 191], como *ciclina d1*, *star* y *vegf* (Figura 11).

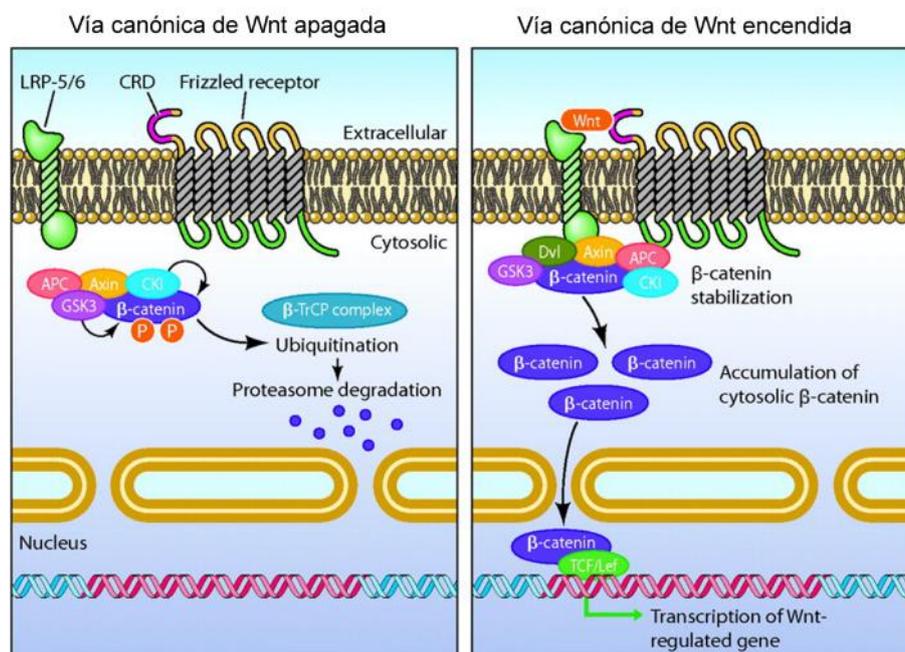


Figura 11. Vía canónica de Wnt. (Modificado de Masckauchan T. y col. 2006 [192]).

1.16.a El sistema Wnt en ovario

Los miembros del sistema Wnt se expresan en células de la granulosa, de la teca y del cúmulus de folículos en desarrollo, así como en el CL de humanos y roedores [185, 193, 194]. En el ovario, de los 19 ligandos de la familia Wnt, se ha demostrado la expresión de Wnt2, 2b, 4, 5a y 11. Respecto a los receptores, se detectó la expresión de Fzd1, Fzd2, Fzd3, Fzd4 y Fzd9 [185]. La primera indicación de la importancia de Wnt en el ovario está dada por el estudio de Vainio y col., quien demostró que ratones transgénicos knockout para el ligando Wnt4 pierden la mayoría de su reserva ovocitaria antes del nacimiento [195]. Luego, Wnt4 ha sido identificado como un factor de

crecimiento involucrado en procesos organogénicos del tracto uro genital, glándula mamaria, hipófisis y sistema reproductivo femenino [196]. Se ha reportado que ratones knockout condicionales ovario-específicos para Wnt4 contienen en el ovario adulto menos folículos antrales, debido posiblemente a un incremento de la atresia folicular [197]. A su vez, ratones knockout para Wnt4 granulosa-específicos mostraron una disminución de la producción de progesterona luteal debida a una disminución de la expresión de StAR, P450scc y aromatasa [185]. Se ha postulado que parte del efecto de la FSH en células de la granulosa está mediado por la acción estimuladora de la vía de PI3K/Akt sobre la vía canónica de Wnt [197]. Posteriormente, se demostró en roedores que diversos componentes de Wnt están expresados diferencialmente durante el desarrollo folicular, y que algunos aumentan su expresión luego de la administración de hCG, sugiriendo un rol potencial en la formación de folículos, ovulación y luteinización [195, 198-201]. Sin embargo, el mecanismo de acción del sistema Wnt sobre la formación y función del CL aún no se ha dilucidado.

1.16.b El sistema Wnt en angiogénesis

Existen varios trabajos que apoyan el papel de las vías canónica y no canónica de Wnt en angiogénesis en distintos tejidos [199, 202-204]. Además, muchas de las acciones que cumple la vía de Wnt están relacionadas a angiogénesis, particularmente a la proliferación de las células endoteliales [205, 206]. Las células endoteliales de la microvasculatura de humanos y ratones expresan *in vitro* los ligandos Wnt-5a, Wnt-7a, Wnt10b, and Wnt-13 [205, 207, 208], mientras que en células endoteliales de cordón umbilical humano (HUVEC) se observó la expresión de Fzd-4, Fzd-5, and Fzd-6 [207]. Además, las células endoteliales expresan otros componentes de la vía de Wnt, como Tcf-1, Tcf-3, Tcf-4 y Lef-1, respondiendo así a la activación de la vía canónica de Wnt [208].

El primer estudio que implicó a Wnt en angiogénesis demostró que ratones knockout homocigotas para Fzd4 (Fzd4^{-/-}) presentaban defectos en la vasculatura de la retina, evidenciado por un retraso en la angiogénesis y acompañado por la formación de vasos defectuosos [202]. Posteriormente, Hsieh y col. notaron que dichos ratones Fzd4^{-/-} presentaban defectos en la vasculatura del CL, donde los vasos tenían un fenotipo morfológico de tipo temprano, dando idea de fallas en el proceso de arborización [199].

Dado que el VEGF es el principal inductor del proceso de angiogénesis, no resulta sorprendente que se hayan encontrado siete regiones de unión al complejo -

catenina/TCF en el promotor del gen de *vegf-a* [209]. De esta manera se pudo describir que la vía canónica de Wnt regula la expresión de este gen [204].

Es importante resaltar que la activación de β -catenina es muy baja en la vasculatura quiescente en adultos. Sin embargo, se observa su activación en las células endoteliales en un contexto de neovascularización patológica, como la que ocurre en tumores [210] o durante la formación de tejidos [211-216]. Debido a que el ovario, y en particular el CL, son tejidos altamente irrigados, en donde la formación de nuevos vasos ocurre de manera permanente, es de esperar que el sistema Wnt/ β -catenina participe regulando el proceso de angiogénesis.

1.17 Interacción entre los sistemas Notch y Wnt

Varios trabajos describen la existencia de una interacción entre las vías de Wnt/ β -catenina y Notch [217-219] y otros postulan que juntas regulan procesos como desarrollo [220], diferenciación [221] y angiogénesis [222] en distintos tejidos. Además, en células tumorales Notch activa la vía de Wnt por estabilización de β -catenina [223]. A su vez, se ha reportado que la vía Wnt/ β -catenina regula el desarrollo vascular mediante la modulación de Notch. Durante el desarrollo embrionario, Wnt/ β -catenina juega un rol crucial en el proceso de angiogénesis debido a que modula el arresto del ciclo celular inducido por Notch, definiendo así el fenotipo de célula punta (no proliferativas) versus célula tallo (proliferativas) [224]. La sobreexpresión de β -catenina en células endoteliales de ratón durante el desarrollo embrionario produjo un aumento de la expresión del ligando Dll4 [225]. Esto generó fenotipos similares a los observados por sobreexpresión de Dll4 [225], como defectos en las ramificaciones, pérdida de identidad vascular y defectos en el remodelado vascular [226].

Los efectos descriptos al sobreexpresar β -catenina no se observan en adultos, indicando que las vías Wnt/ β -catenina y Notch actúan en conjunto regulando el desarrollo vascular durante la etapa embrionaria. Sin embargo, en el ovario adulto no existen estudios que demuestren la interacción entre el sistema Wnt y Notch en la dinámica folicular-luteal y su posible relación con el desarrollo de su vasculatura.

Hipótesis y objetivos

En base a lo expuesto en la introducción, la **hipótesis** postulada es que las vías de señalización Notch y Wnt/ β -catenina regulan la luteinización y la función del cuerpo lúteo de ratas superovuladas. A su vez, la interacción de dichas vías con progesterona resulta clave en la regulación de la función luteal.

Para demostrar esta hipótesis, se plantearon los siguientes **Objetivos Generales**:

Objetivo I

Estudiar la participación del sistema Notch en la funcionalidad del cuerpo lúteo y analizar su interacción con progesterona.

Objetivo II

Estudiar la participación del sistema Wnt/ β -catenina en el desarrollo y funcionalidad del cuerpo lúteo.

Objetivo III

Estudiar el efecto de la inhibición del sistema Wnt/ β -catenina sobre la vía Notch en el cuerpo lúteo.

En base a los objetivos mencionados, se plantearon los siguientes **Objetivos Específicos**:

1. Evaluar el efecto de la inhibición *in vitro* del sistema Notch y su interacción con progesterona en cultivo de cuerpos lúteos sobre:

- La concentración de progesterona en medio condicionado
- El contenido de enzimas esteroidogénicas
- La apoptosis y la proliferación celular
- Los mecanismos de transducción de señales vía PI3K/AKT y ERK1/2

- El contenido de β -catenina

2. Evaluar el efecto de la inhibición local *in vivo* del sistema Wnt/ β -catenina en ratas superovuladas sobre:

- El desarrollo folicular y formación del cuerpo lúteo en cortes histológicos de ovario
- La concentración de progesterona en suero
- El desarrollo y estabilidad vascular en cuerpo lúteo, folículos y estroma

Y en cuerpos lúteos aislados de estos animales estudiar:

- El contenido de enzimas esteroideogénicas
- La apoptosis y la proliferación celular
- Los mecanismos de transducción de señales vía PI3K/AKT y ERK1/2
- El contenido de VEGF, Angiopoyetinas 1 y 2, Tie 2, PDGF-D y PDGFR β

3. Evaluar el efecto de la inhibición *in vitro* del sistema Wnt/ β -catenina en cultivo de cuerpos lúteos sobre:

- La concentración de progesterona en medio condicionado
- La expresión y el contenido proteico de StAR y de Ciclina D1
- La expresión de *hif-1*

Analizar la expresión génica de los siguientes miembros del sistema Notch:

- Receptores *notch1* y *notch4*
- Ligandos *jagged1* y *dll4*
- Efectores *hes1*
- Regulador *rbpj-*

Materiales y Métodos

1. Animales

Se utilizaron ratas prepúberes (*Rattus norvegicus*) de entre 21 y 23 días de la cepa Sprague Dawley, del Bioterio del Instituto de Biología y Medicina Experimental (IByME-CONICET). Todos los protocolos y experimentos fueron aprobados por el comité de ética del IByME y llevados a cabo de acuerdo con la guía para el cuidado y uso de animales de laboratorio del NIH (Instituto Nacional de la Salud, Estados Unidos). Los animales se mantuvieron en el bioterio en condiciones controladas de temperatura (21-23°C) y con un fotoperíodo de 12 horas de luz y 12 horas de oscuridad (las luces se encienden a las 7.00 horas y se apagan a las 19.00 horas). Los animales recibieron agua y alimento balanceado *ad libitum*.

1.1 Tratamiento de los animales Capítulo I

Se utilizaron animales prepúberes para evitar los cambios hormonales debidos al ciclo estral. Para sincronizarlos, se inyectó gonadotropina coriónica equina (eCG, 25 UI) de forma subcutánea (sc). Luego de 48 horas, se inyectó gonadotropina coriónica humana (hCG, 10 UI) (sc) con el objetivo de obtener superovulación y de este modo se forme un mayor número de cuerpos lúteos (CLs). Cuatro días luego de la administración de hCG, los animales sufrieron eutanasia por inhalación de CO₂.

1.1.a Cultivo de CLs

Los ovarios fueron removidos y limpiados con medio de cultivo (DMEM:F12). Para el aislamiento de los CLs se utilizaron los ovarios de cuatro ratas. Los CLs fueron distribuyéndose al azar en una placa p24, hasta completar cinco CLs por pocillo. De esta manera, cada pocillo representa una réplica (n, con n = 4 por tratamiento).

Los CLs fueron cultivados en 350 µl de DMEM:F12 adicionado con 2,4 g/L de bicarbonato de sodio, antibiótico/antimicótico y 0,5% BSA en una estufa a 37°C y 5% de CO₂, durante 1 o 4 horas en presencia de:

- a) DMSO (0,05%), grupo control
- b) Aminoglutetimida (AG), que es un inhibidor del citocromo P450_{scc} y por lo tanto interrumpe la producción de progesterona, (0,15 mM, Sigma-Aldrich)
- c) N-[N-(3,5-Difluorofenacetil)-L-alanil]-S-fenilglicina t-butil éster (DAPT), que es un inhibidor de la enzima γ -secretasa y por lo tanto bloquea al sistema Notch, (20 µM, Sigma-Aldrich).

d) progesterona (500 ng/ml, Sigma-Aldrich)

e) DAPT con progesterona

Luego del cultivo, un CL de cada pocillo fue fijado en Solución de Bouin durante 12 horas para realizar técnicas histológicas, mientras que los CLs restantes se utilizaron para extracto proteico. El medio condicionado fue guardado a -80°C para medir la concentración de progesterona.

Debido a que la β -secretasa actúa sobre más de un sustrato, alternativamente se utilizó un anticuerpo neutralizante del ligando Dll4 a fin de inhibir al sistema Notch. Para ello se cultivaron cinco CLs por pocillo con tres concentraciones diferentes de anticuerpo (0,5; 2 y 5 μ g/ml) e IgG normal de cabra como control (5 μ g/ml) durante 4 horas. Luego se guardó el medio de cultivo a -80°C para medir la concentración de progesterona.

1.2 Tratamiento de los animales Capítulo II

1.2.a Administración intrabursa de XAV939

Los animales fueron inyectados de forma sc con eCG (25 UI) y 48 horas luego con hCG (10 UI). Ese día, los animales se separaron en dos grupos y se los anestesió con ketamina HCl (80 mg/Kg) y xilacina (4 mg/kg). Luego se realizó una incisión en la zona dorsal y se exteriorizaron los ovarios. A un grupo se le administró bajo la bursa de ambos ovarios XAV939 (Sigma-Aldrich), que es un inhibidor de la vía de Wnt/ β -catenina. XAV939 estabiliza a Axina1, que es la proteína limitante que regula la eficiencia del complejo destructor. Así, β -catenina es fosforilada y enviada a degradación. Se ensayaron tres dosis: 1 μ g (0,2 μ g/ μ l), 5 μ g (1 μ g/ μ l) y 10 μ g (2 μ g/ μ l). El grupo control recibió el vehículo del inhibidor (DMSO) en una dosis equivalente a la mayor concentración de XAV939 (5 μ l de una solución de DMSO al 20%). 24 o 48 horas luego de la cirugía, los animales sufrieron eutanasia por decapitación. Los ovarios se limpiaron y fueron utilizados para los sucesivos ensayos. Uno de los ovarios se fijó en solución de Bouin durante 24 horas para realizar técnicas histológicas. El ovario contralateral se utilizó para aislar CLs para Western blot. La sangre fue recolectada para medir la concentración de progesterona sérica.

1.2.b Administración intrabursa de ICG-001

Para validar los resultados observados con XAV939, se utilizó un segundo inhibidor de la vía canónica de Wnt: ICG-001 (Calbiochem-EMD Millipore). Este inhibidor actúa a

través de un mecanismo distinto, ya que compite con β -catenina por la unión a TCF/Lef y por lo tanto inhibe la transcripción mediada por este complejo. El protocolo de estimulación hormonal y cirugía fue idéntico al de XAV939. En este caso, se ensayaron dos dosis: 5 μ g (1 μ g/ μ l) y 10 μ g (2 μ g/ μ l), y el grupo control recibió el vehículo del inhibidor (DMSO) en una dosis equivalente a la mayor concentración de ICG-001 (5 μ l de DMSO al 20%). 48 horas luego de la cirugía, los animales sufrieron eutanasia por inhalación de CO₂. Uno de los ovarios se fijó en solución de Bouin durante 24 horas y se utilizó para técnicas histológicas, mientras que el contralateral se utilizó para aislar CLs para Western blot.

1.3 Tratamiento de los animales Capítulo III

Los animales fueron inyectados de forma sc con eCG (25 UI) y 48 horas después con hCG (10 UI). Luego de dos días, los animales sufrieron eutanasia por inhalación de CO₂.

1.3.a Cultivo de CLs

Los ovarios fueron removidos y limpiados con medio de cultivo (DMEM:F12). Para el aislamiento de los CLs se utilizaron los ovarios de tres ratas. Los CLs fueron distribuyéndose al azar en una placa p24, hasta completar cuatro CLs por pocillo. De esta manera, cada pocillo representa una réplica (n, con n = 4 por tratamiento).

Los CLs fueron cultivados en 350 μ l de DMEM:F12 adicionado con 2,4 g/L de bicarbonato de sodio, antibiótico/antimicótico y 0,5% BSA en una estufa a 37°C y 5% de CO₂, durante 6, 12 o 18 horas en presencia de:

- a) DMSO (0,05%), grupo control
- b) ICG-001 (20 μ M)
- c) ICG-001 (50 μ M)

Luego del cultivo, cuatro CLs de cada tratamiento se utilizaron para extracto proteico, mientras que los otros cuatro CLs se guardaron a -80°C en solución Tripure Isolation Reagent (Roche) para extraer ARN. El medio condicionado fue guardado a -80°C para medir la concentración de progesterona.

2. Protocolos de las técnicas realizadas

2.1 Morfología ovárica

Para el recuento de las estructuras ováricas, se realizaron cortes histológicos y se tiñeron con hematoxilina-eosina (H&E). Secciones de 5 μm de espesor fueron montadas en portaobjetos a intervalos de 50 μm para evitar contar la misma estructura dos veces, de acuerdo al método descrito por Woodruff y col. [227]. Las estructuras se clasificaron en folículos primarios (formados por una capa de células de la granulosa cúbicas), folículos pre antrales o folículos antrales de acuerdo a la ausencia o presencia de antro, respectivamente, y cuerpo lúteo. Las características morfológicas de un folículo atrésico incluyen la degeneración y el desprendimiento de las células de la granulosa de la membrana basal, presencia de núcleos picnóticos en estas células y degeneración del ovocito [228, 229]. Se define como quiste a aquellas estructuras de gran tamaño, con el antro conteniendo al ovocito, rodeado por una delgada capa de células de la granulosa y células luteales. Se evaluó el porcentaje de cada estadio folicular por sección de ovario. El porcentaje de las diferentes estructuras ováricas se determinó en cuatro secciones de cada ovario (n=4 ovarios/grupo) y el número total de estructuras ováricas analizadas fue definido como el 100%.

2.2 Radioinmunoensayo (RIA)

La concentración de progesterona en suero y en medios condicionados se determinó mediante la técnica de radioinmunoensayo (RIA). Se utilizaron anticuerpos policlonales en una dilución adecuada para ligar el 36% del correspondiente ^3H -esteroide utilizado como trazador. En el procedimiento se incubó una alícuota de la muestra a determinar (suero o medio condicionado), una cantidad de trazador correspondiente a 10.000 cpm y un volumen determinado de anticuerpo durante 16 horas a 4°C. Finalizada la incubación, se separó la hormona libre de la unida al anticuerpo con 0,2 ml de una solución de carbón activado 0,5%, en el buffer de ensayo (Buffer RIA: Na_2HPO_4 40 mM; NaH_2PO_4 39,5 mM; NaCl 155 mM; azida sódica 0,1%; gelatina 1%; pH= 7,0) y posterior centrifugación durante 15 minutos a 3000 rpm. Los sobrenadantes fueron transferidos a viales de conteo en los cuales se agregó 2 ml de solución centellante. La radiactividad se determinó en un contador de centelleo líquido Beckman LS 1801, con una eficiencia del 62%.

El rango de utilidad del ensayo para la progesterona fue de 12,5 a 1600 pg en un volumen final de 0,5 ml. Los valores se expresaron por ml de suero o por ml de medio condicionado.

2.3 Técnica de inmunohistoquímica (IHQ) e histoquímica

La localización IHQ se realizó utilizando la técnica de estraptavidina – biotina – peroxidasa. Los cortes histológicos se desparafinaron en xileno e hidrataron en concentraciones decrecientes de etanol (100%, 96% y 70%). Se bloqueó la peroxidasa endógena en 3% de H₂O₂ por 30 minutos. Los cortes se lavaron en buffer PBS (NaCl 0,58 M, Na₂HPO₄ anhidro 41,56 mM, KH₂PO₄ 15,8 mM pH 7,5). Se realizó una exposición antigénica sometiendo las muestras a microondas en buffer citrato 0,01 M (pH 6) dos veces durante cinco minutos a 600 Watt de potencia. En todos los casos se bloquearon las proteínas con 2% de BSA por 20 minutos e incubó con el anticuerpo primario correspondiente (Tabla 2) o con lectina biotinilada proveniente de *Bandeiraea simplicifolia-1* (# catálogo: L3759; Sigma-Aldrich) durante toda la noche a 4°C en cámara húmeda. Al día siguiente se lavó con PBS e incubó con el correspondiente anticuerpo secundario anti conejo o ratón 1/400 en PBS durante una hora en cámara húmeda a temperatura ambiente, excepto en el caso de la lectina. Se lavó con PBS, se agregó el complejo ABC: avidina-peroxidasa biotinilada (Vectastain ABC system, Vector Laboratories, Burlingame, CA) y se incubó durante 30 minutos en cámara húmeda a temperatura ambiente. Se lavó con PBS y reveló con DAB (3',3-diamino bencidina) 0,5 mg/ml. Se detuvo la reacción con agua y se realizó un contraste con hematoxilina. Por último, se deshidrataron los cortes sumergiéndolos en una serie de concentraciones ascendentes de etanol (70%, 96% y 100%), se aclaró con xileno, y se montaron los cortes con medio de montaje permanente.

2.4 Técnica de doble marcación IHQ/inmunofluorescencia (IF)

Durante el primer día, los cortes histológicos se desparafinaron en xileno, hidrataron en concentraciones decrecientes de etanol (100%, 96% y 70%) y se lavaron con agua destilada. Se realizó una exposición antigénica sometiendo las muestras a un baño térmico a 95°C en buffer citrato 0,01 M (pH 6) durante 50 minutos. Los cortes se lavaron en buffer PBS y se bloqueó la peroxidasa endógena con H₂O₂ 10% por 30 minutos. Luego de lavar los cortes en buffer PBS, se bloquearon las proteínas con buffer de bloqueo para IF (5% suero fetal bovino, 0,3% Tritón X-100 en PBS) durante 60 minutos. Se incubó con el anticuerpo primario PCNA (Tabla 2) en una dilución 1/200 en PBS durante toda la noche a 4°C en cámara húmeda. En el segundo día, se lavaron los cortes con buffer PBS y se incubaron a 4°C, en cámara húmeda y oscura, durante toda la noche con lectina fluoresceinada en una dilución 1/200 (Fluorescein

Lycopersicon esculentum, Vector FL-1171) diluída en buffer de incubación (1% BSA, 0,3% Tritón X-100 en PBS). Durante el tercer día, se lavaron los cortes con buffer PBS e incubaron con anticuerpo secundario anti conejo (Tabla 2) 1/400 en PBS durante una hora en cámara húmeda y oscura a temperatura ambiente. Se lavó con PBS, se agregó el complejo ABC: avidina-peroxidasa biotinilada (Vectastain ABC system, Vector Laboratories, Burlingame, CA) y se incubó durante 30 minutos en cámara húmeda y oscura a temperatura ambiente. Se lavó con PBS y reveló con DAB (3',3-diaminobencidina) 0,5 mg/ml. Se detuvo la reacción con agua y los cortes se dejaron secar en oscuridad. Por último, se montaron los cortes con medio de montaje para fluorescencia (Vectashield, Vector Laboratories) y se guardaron en oscuridad a 4°C.

2.5 Extracción de ARN

Para la extracción de ARN total, los CLs aislados se ubicaron en tubos eppendorf y se disgregaron mecánicamente en 800 µl de Tripure Isolation Reagent. El homogenato se centrifugó a 12000 xg durante 10 minutos a 4°C. Se descartó la fase lipídica (fase superior) y se trasvasó el sobrenadante restante a un tubo eppendorf nuevo. Se agregaron 160 µl de cloroformo, se homogeneizó durante 15 segundos y se incubó durante 15 minutos a temperatura ambiente. Luego se centrifugó a 12000 xg durante 15 minutos a 4°C y se transfirió la fase acuosa (fase superior) a un nuevo tubo eppendorf. Se agregaron 400 µl de isopropanol, se mezcló por inversión e incubó durante 10 minutos a temperatura ambiente. Se centrifugó a 12000 xg durante 10 minutos a 4°C y se descartó el sobrenadante. El pellet obtenido se corresponde con el ARN, que se lavó con 0,8 ml de etanol 75% frío. Se homogeneizó y centrifugó a 7500 xg durante 5 minutos a 4°C. Se descartó el sobrenadante y el pellet de ARN se secó durante 15 minutos a temperatura ambiente. El pellet seco se disolvió en 10 µl de agua libre de ARNasas (agua DEPC) y se incubó durante 10 minutos a 60°C. Por último, se midió la concentración de ARN de cada muestra utilizando un Nanodrop y se corroboró su integridad mediante una electroforesis en gel de agarosa. Las muestras se guardaron en un freezer a -80°C.

2.6 Transcripción reversa y PCR en tiempo real

Para sintetizar ADNc a partir del ARN total se utilizó el kit “Transcriptor First Strand cDNA Synthesis Kit” (Roche). A 1 µg de ARN total de cada muestra se le agregaron hexámeros random como primers y se incubó a 65°C durante 10 minutos. A continuación se agregó a cada muestra la mezcla de reacción (buffer, inhibidor de

ARNasas, dNTPs y retrotranscriptasa) y se incubó a 55°C durante 30 minutos. Pasado ese tiempo, se incubó a 85°C durante 5 minutos. El ADNc obtenido se guardó en el freezer a -20°C.

Para la PCR en tiempo real se utilizó el kit “FastStart Universal SYBR Green” (Roche). Los primers para los genes estudiados fueron comprados a Thermofisher (Tabla 3). Las amplificaciones se realizaron en un volumen final de 10 µl conteniendo: una dilución 1/20 de ADNc de cada muestra, la mezcla de primers (concentración final 300 nM) y la mezcla de reacción (conteniendo Taq ADN Polimerasa, buffer de reacción, dNTPs, SYBR Green). La PCR se realizó en un termociclador 7500 Fast Real Time PCR System, en una placa p96 sellada. El programa utilizado para todos los primers fue: 10 minutos a 95°C (un ciclo), seguido por 40 ciclos de: 15 segundos a 95°C, 30 segundos a 55°C y 1 minuto a 60°C. Al finalizar cada programa se realizó una curva de melting para confirmar la especificidad de la señal observada. Para setear la eficiencia de amplificación de los primers, se corrió una curva standard para cada primers con diluciones seriadas de ADNc. La expresión de los genes estudiados se relativizó al promedio de la expresión de dos genes endógenos (“housekeeping”): *cicofilina* y *gapdh*.

2.7 Extracción y medición de proteínas

Para la extracción de proteínas totales, los CLs aislados se homogenizaron en 300 µl de buffer de lisis (Nonidet P (NP-40) 1%, Tris 20 mM pH 8, NaCl 137 mM y glicerol 10%) suplementado con inhibidores de proteasas (fenilmetilsulfonil fluoruro [PMSF] 0,5 mM; N-CBZ-L-fenilalanina clorometil cetona 0,025 mM; N-p-tosil-lisina clorometil cetona 0,025 mM, y L-1-tosilamida-2-fenil-etilclorometil cetona 0,025 mM) e inhibidores de fosfatasa (fluoruro de sodio 25 mM, ortovanadato de sodio 0,2 mM, y - glicerofosfato 10 mM) utilizando un Ultra-Turrax homogenizer (IKA-Werke GmbH & Co.). El lisado se centrifugó a 13.540 xg durante 10 minutos a 4° C. La medición de proteínas se realizó en el sobrenadante por el método de Bradford.

Para extraer las proteínas del núcleo, los CLs se homogeneizaron en buffer TEDGS 10% (Tris, pH 7,4, 50 mM; EDTA 7,5 mM; ditiotreitól 0,5 mM; glicerol 10%; sacarosa 0,25 M; PMSF 10 µl/ml e inhibidores de proteasas 10 µl/ml) y se incubaron en hielo durante 30 minutos. Luego se centrifugó el homogenato a 1.024 xg durante 10 minutos a 4°C. Se resuspendió el pellet en buffer de lavado (TEDGS 10% + Nonidet P-40 0,01%) y se repitió la centrifugación. Se resuspendió el pellet en buffer de núcleos

(TEDGS 10% + KCl 0,4M), se homogeneizó por 20 segundos e incubó en hielo durante 30 minutos. Este homogenato se centrifugó a 13.540 xg durante 20 minutos a 4°C. Se rescató el sobrenadante y se diluyó al medio en buffer TEDGS 30% (Tris pH 7,4 50 mM; EDTA 7,5 mM; ditioneitol 0,5 mM; glicerol 30%; sacarosa 0,25 M; PMSF 10 µl/ml e inhibidores de proteasas 10 µl/ml). La medición de proteínas se realizó en esta dilución por el método de Bradford.

2.8 Western blot

Para la determinación de los niveles proteicos, se sembraron 20 µg de proteínas en un gel de poliacrilamida (10% o 12%) con SDS (SDS page). Las muestras proteicas fueron previamente hervidas durante 5 minutos en buffer de carga (SDS 6%, β -mercaptoetanol 15%, glicerol 60%, azul de bromofenol 0,006%, Tris-base 0,18M, pH=6,8). Las proteínas fueron separadas por electroforesis a 25 mA durante 1,5 horas y luego fueron transferidas a membranas de nitrocelulosa durante 2 horas a 80 V en buffer de transferencia (Tris-base 0,025M (pH=8,3), glicina 0,192 M y metanol 20%). Los sitios de unión remanentes sobre las membranas fueron bloqueados con una solución de TBS y detergente Tween (TTNBS 0,05%) y leche descremada en una concentración de 0,05 g/ml durante 1 hora a temperatura ambiente. Luego las membranas fueron incubadas con los correspondientes anticuerpos primarios (Tabla 2) en TTNBS 0,1% durante toda la noche a 4°C. Después de sucesivos lavados con TTNBS 0,1%, las membranas fueron incubadas con sus correspondientes anticuerpos secundarios acoplados a la enzima peroxidasa (IgG anti conejo acoplado a peroxidasa 1:1000 o IgG anti ratón acoplado a peroxidasa 1:1000, diluidos en TTNBS 0,1%) durante 1 hora a temperatura ambiente. Finalmente, se detectó la marca por quimioluminiscencia y autorradiografía utilizando una película radiográfica. El contenido proteico se analizó en las distintas muestras mediante una densitometría de las bandas obtenidas para la proteína de interés utilizando el programa Scion Corporation. La densidad de cada banda fue normalizada respecto a la densidad obtenida para la proteína β -ACTINA o GAPDH en la misma muestra.

2.9 Análisis estadístico

Los resultados fueron expresados como la media \pm error estándar de la media (ESM) de los valores obtenidos en el total de los experimentos realizados. Para el análisis estadístico de todos los datos se utilizó el programa de estadística GraphPad Prism v5.0.

Valores de probabilidad menores que 0,05 fueron considerados significativos. Previo al análisis estadístico, se corroboró que las muestras se ajustaban a una distribución normal.

Para el análisis de los datos del capítulo I, se utilizaron cuatro ratas y se cultivaron cinco CLs por pocillo. Cada pool de CLs de un mismo pocillo fue considerado un dato. Los resultados obtenidos fueron de cinco experimentos independientes. Las comparaciones estadísticas entre los grupos se realizaron utilizando el Análisis de Varianza (ANOVA), seguido por el test de Tukey o Newman-Keuls.

Para el análisis de los datos del capítulo II, cada animal fue considerado como un dato. Los resultados obtenidos fueron de tres experimentos independientes, y en cada uno se utilizaron cuatro ratas por grupo. Las comparaciones estadísticas entre los grupos se realizaron utilizando el test t de Student para muestras independientes no paramétricas.

Para el análisis de los datos del capítulo III, se utilizaron tres ratas y se cultivaron cuatro CLs por pocillo. Cada pool de CLs de un mismo pocillo fue considerado un dato. Las comparaciones estadísticas entre los grupos se realizaron utilizando el test t de Student para muestras independientes no paramétricas.

Tabla 2. Anticuerpos utilizados para IHQ y Western blot.

Proteína	Empresa, # catálogo	Especie	Dilución
-CATENINA	Santa Cruz Biotechnology, Inc.(Santa Cruz, CA, USA). # sc-59737 (12F7)	Ratón	1:1000
BAX	Santa Cruz Biotechnology, Inc.(Santa Cruz, CA, USA). # sc-493	Conejo	1:750
BCLX	Santa Cruz Biotechnology, Inc.(Santa Cruz, CA, USA). # sc-634	Conejo	1:200
PCNA	Santa Cruz Biotechnology, Inc.(Santa Cruz, CA, USA). # sc-7907 (FL-261)	Conejo	1:200
3 -HSD	Santa Cruz Biotechnology, Inc.(Santa Cruz, CA, USA). # sc-30820 (P-18)	Cabra	1:200
StAR	Santa Cruz Biotechnology, Inc.(Santa Cruz, CA, USA). # sc-25806	Conejo	1:200
AKT fosforilado	Santa Cruz Biotechnology, Inc.(Santa Cruz, CA, USA). # sc-7985-R	Conejo	1:1000
ERK	Santa Cruz Biotechnology, Inc.(Santa Cruz, CA, USA). # sc-154	Conejo	1:2000
ERK fosforilado	Santa Cruz Biotechnology, Inc.(Santa Cruz, CA, USA). # sc-7383	Ratón	1:1000
-ACTINA	Cell Signaling (Danvers, MA, USA). #4967	Conejo	1:10000
GAPDH	Cell Signaling (Danvers, MA, USA). # 2118	Conejo	1:10000
AKT	Cell Signaling (Danvers, MA, USA). # 9272	Conejo	1:8000
Hes1	Cell Signaling (Danvers, MA, USA). # D6P2U	Conejo	1:50
P450scc	Dr. Anita Payne. Stanford University Medical Center, Satanford, CA, USA	Conejo	1:200
VEGF *	Abcam (Cambridge, USA). # Ab46154	Conejo	1:1000
-ACTINA	Abcam (Cambridge, USA). # Ab18147	Ratón	1:100
Ciclina D1	Abcam (Cambridge, USA). # Ab134175	Conejo	1:50
Caspasa 3 clivada	Biocare Medical (Concord. California, USA). #CP229C	Conejo	1:100
IgG anti-conejo HRP	Sigma-Aldrich (St. Louis, MO,USA). # A-4914	Cabra	1:1000
IgG anti-ratón HRP	R&D Systems (Minneapolis, USA). # HAF007	Cabra	1:1000
IgG anti-cabra HRP	Bio Rad (California, USA). #772-1034	Conejo	1:1000
IgG anti-conejo biotinilado	Vectastain ABC system; Vector Laboratories, Burlingame, CA, USA	Cabra	1:400

* Reconoce las isoformas 164 y 120 de VEGF

Tabla 3. Secuencia de los primers utilizados para PCR en tiempo real.

Gen	Secuencia sentido	Secuencia antisentido
<i>hif-1</i>	5'-TTGAAGATGTCCCGTTGTA	5'AGTTTCAGAGGCAGGTAATG
<i>vegf-a</i>	5'GAAGAAGAGGCCTGGTAAG	5'AAGGTCCTCCTGAGCTATAC
<i>ciclinad1</i>	5'- TGGGTCGAGAAGAGAAAG	5'-ACGGTCCCTACTTCCAAA
<i>star</i>	5'-ACTGGAAGCAACTCTAC	5'-CTTTCCTTCTCCAGCCTTC
<i>dll4</i>	5'-ATTACCAGGCAACCTTCTC	5'CGCTATTCTTGTCCTGATG
<i>jagged1</i>	5'-AGAACCACAGCAACTATCA	5'GCAACTGCTGACATCAAATC
<i>notch1</i>	5'-TGTGGATGAGGAAGACAAG	5'- TTCTGGCAGGGATTAGGT
<i>notch4</i>	5'- AATGAGTGTGCCTCTAACC	5'CATCTGGCACCAGTGAATC
<i>hes1</i>	5'-AGGCCACTGCTAATCATAA	5'GTCTCTCCTAAAGTCCAAGTC
<i>rbpj</i>	5'-GTTTGTCTTTCTGGCTATCT	5'-TGTTTCGGAGTGGCATTTAC
<i>gapdh</i>	5'-CATCAACGACCCTTCATT	5'ACTCCACGACATACTCAGCAC
<i>ciclofilina</i>	5'-GCGTCTCCTTCGAGCTCTT	5'-AAGTACCACCCTGGCAC

Resultados

CAPÍTULO I: Participación del sistema Notch en la funcionalidad del CL.

Interacción con progesterona

En un trabajo previo de nuestro laboratorio se observó que al cultivar cuerpos lúteos (CLs) de preñez durante 4 horas en presencia de aminoglutetimida (AG, inhibidor del citocromo P450_{scc}) hay una disminución significativa del contenido del fragmento activo de Notch1. Además el cultivo en presencia de DAPT (inhibidor de la -secretasa) disminuyó la concentración de progesterona en el medio condicionado. Estos resultados fueron la primera evidencia que sugirió una interacción entre las vías de Notch y progesterona en CL [166].

Debido a la poca cantidad de CLs que se obtienen durante la preñez, y su implicancia sobre el número de animales a utilizar, los experimentos que comprenden esta tesis se realizaron utilizando CLs de ratas superovuladas. De esta forma se obtuvo una mayor cantidad de tejido utilizando un menor número de animales.

1. Efecto de la inhibición *in vitro* del sistema Notch sobre la funcionalidad del CL de ratas superovuladas

En base a los antecedentes mencionados, se aislaron CLs de ovario de ratas superovuladas con gonadotrofinas y se cultivaron durante una o 4 horas en presencia de DAPT (20 μ M), AG (0,15 mM), progesterona (500 ng/ml) y de DAPT con progesterona. La función luteal se estudió midiendo progesterona en el medio condicionado por RIA. Utilizando este modelo, la concentración de progesterona disminuyó significativamente al cultivar con AG durante una hora, mientras que en el cultivo con DAPT no produjo cambios (Figura 12A). Luego de 4 horas, la concentración de progesterona disminuyó significativamente al cultivar con ambos inhibidores (Figura 12B).

Debido a que la enzima -secretasa actúa sobre varios sustratos, alternativamente se inhibió al sistema Notch utilizando como estrategia un anticuerpo neutralizante de Dll4, que es el ligando con acción luteotrófica descrita [164, 168, 230]. En estas condiciones también se observó una disminución significativa de la producción de progesterona (Figura 12C).

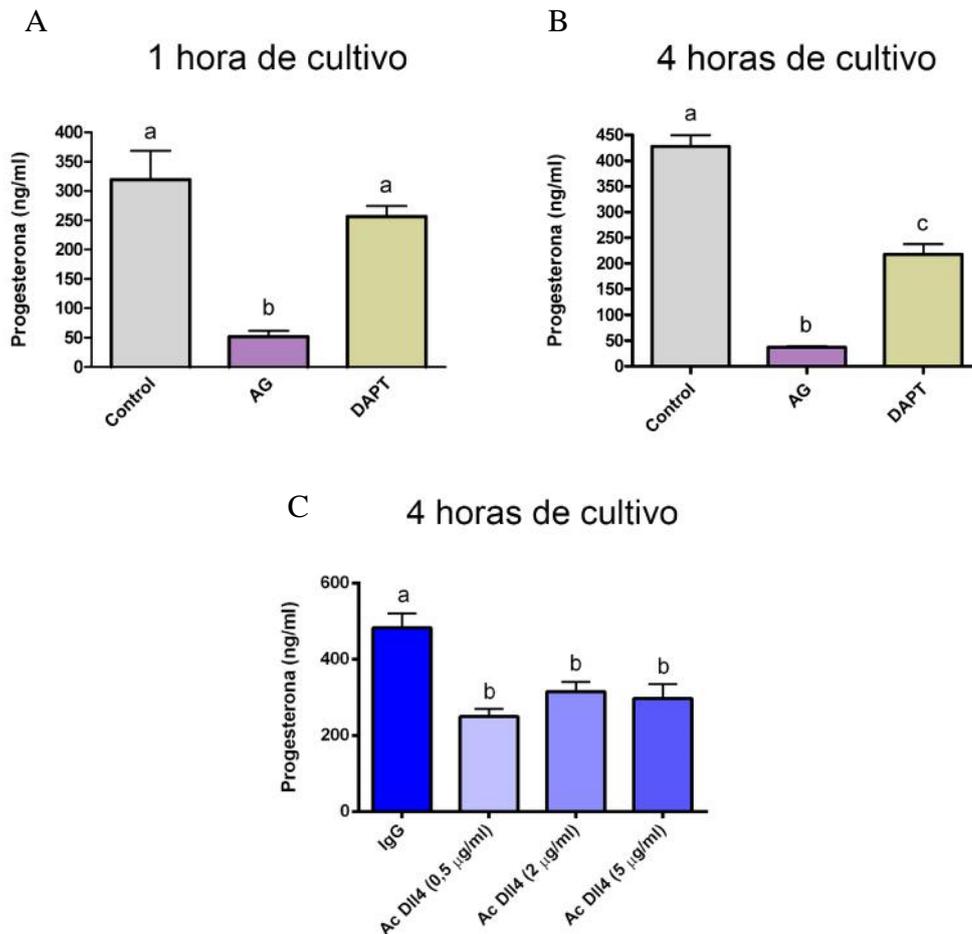


Figura 12. Concentración de progesterona en medio condicionado. (A) Progesterona en medio de cultivo de CLs cultivados durante una hora con AG o DAPT (a vs b, $p < 0,01$). (B) Progesterona en medio de cultivo de CLs cultivados durante 4 horas con AG o DAPT (a vs b y c, $p < 0,001$). (C) Progesterona en medio de cultivo de CLs cultivados durante 4 horas con distintas concentraciones de anticuerpo contra Dll4 (a vs b, $p < 0,01$). Los valores se expresan como la media \pm ESM de progesterona en el medio de cultivo ($n = 4$).

Para analizar si las proteínas de la vía de síntesis de progesterona son reguladas por el sistema Notch, se evaluó el contenido de StAR, P450scc y 3 β -HSD luego del cultivo con DAPT y/o progesterona durante 4 horas. Si bien el cultivo con DAPT no modificó el contenido de StAR (Figura 13A), se observó un aumento significativo de esta proteína en presencia de progesterona, efecto que fue revertido al cultivar en presencia de DAPT + P (Figura 13A). El cultivo con DAPT produjo una disminución significativa del contenido de P450scc. La incubación en conjunto con progesterona revirtió el contenido de esta enzima a niveles más altos que el control (Figura 13B). Por otro lado, no se observaron diferencias significativas para la enzima 3 β -HSD (Figura 13C). Estas

mediciones también se realizaron luego de una hora de cultivo, y consistentemente con el resultado observado para DAPT sobre la producción de progesterona, no se observaron cambios significativos para ninguna de las tres enzimas.

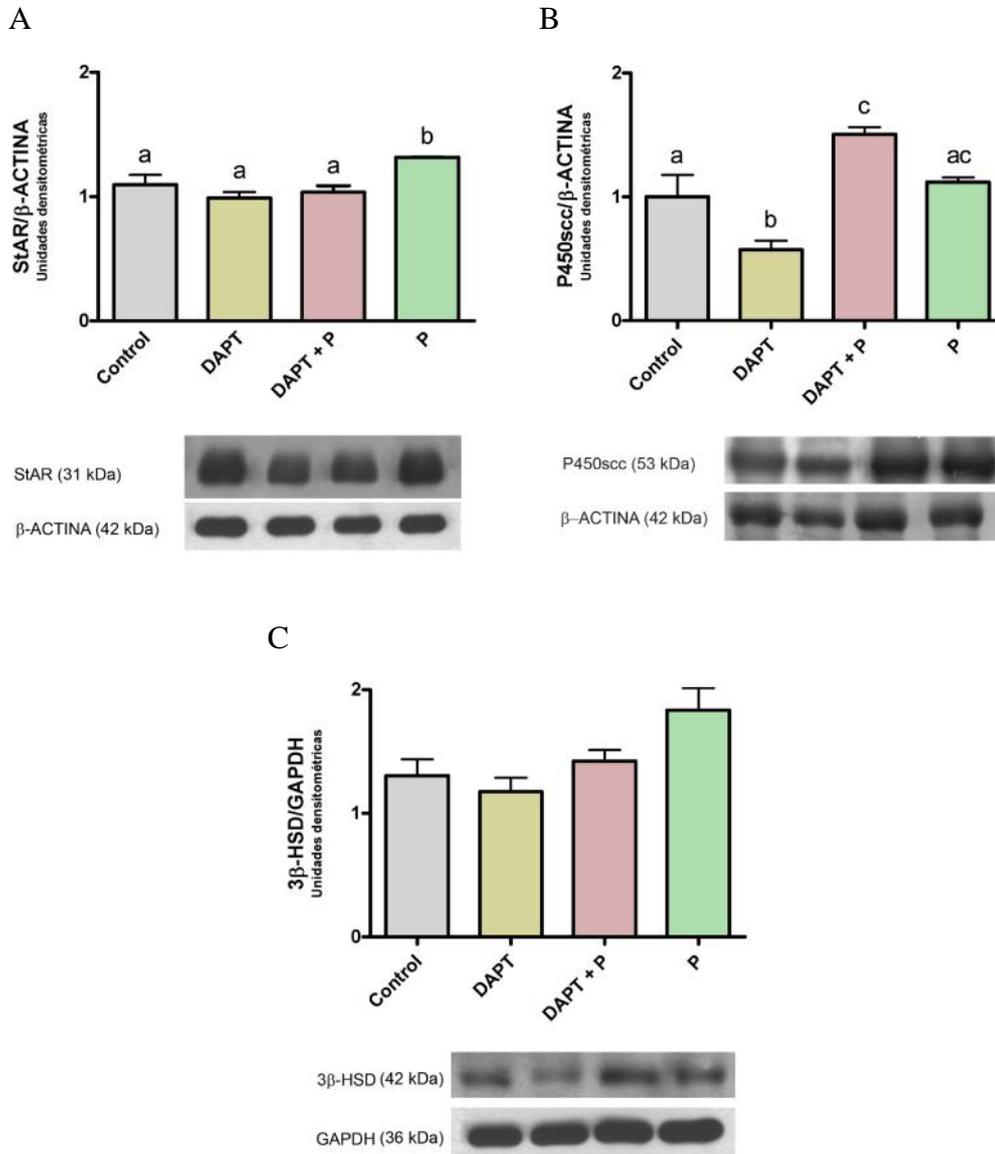


Figura 13. Niveles luteales de enzimas esteroidogénicas. (A) Contenido de StAR en CLs cultivados 4 horas (a vs b, $p < 0,01$). (B) Contenido de P450scc en CLs cultivados 4 horas (a vs b y c, $p < 0,05$; b vs c, $p < 0,001$). (C) Contenido de 3 -HSD en CLs cultivados 4 horas. Los valores se expresan como unidades arbitrarias \pm ESM normalizado a β -ACTINA o GAPDH ($n = 4$). Los grupos con distintas letras sobre las barras de error (a, b, c) representan diferencias significativas.

2. Efecto de la inhibición *in vitro* del sistema Notch sobre parámetros apoptóticos

A continuación se analizó la participación de Notch y de progesterona en la regulación de la supervivencia del CL. En primer lugar se estudió la marcación para Caspasa-3 (CASP3) clivada en cortes de CL mediante IHQ. En la figura 14A se muestra la cuantificación de la marca observada por IHQ. El cultivo con DAPT produjo un aumento significativo de la marca para CASP3 activa respecto al control. La presencia de progesterona en el medio de cultivo no solo revirtió el aumento en la marca observada con DAPT, sino que también disminuyó de manera significativa la marca de CASP3 activa respecto al control. Este resultado es coherente con la acción antiapoptótica que fue descrita para la progesterona sobre las células del CL de roedores [82]. En la figura 14B se muestran fotos representativas de la IHQ.

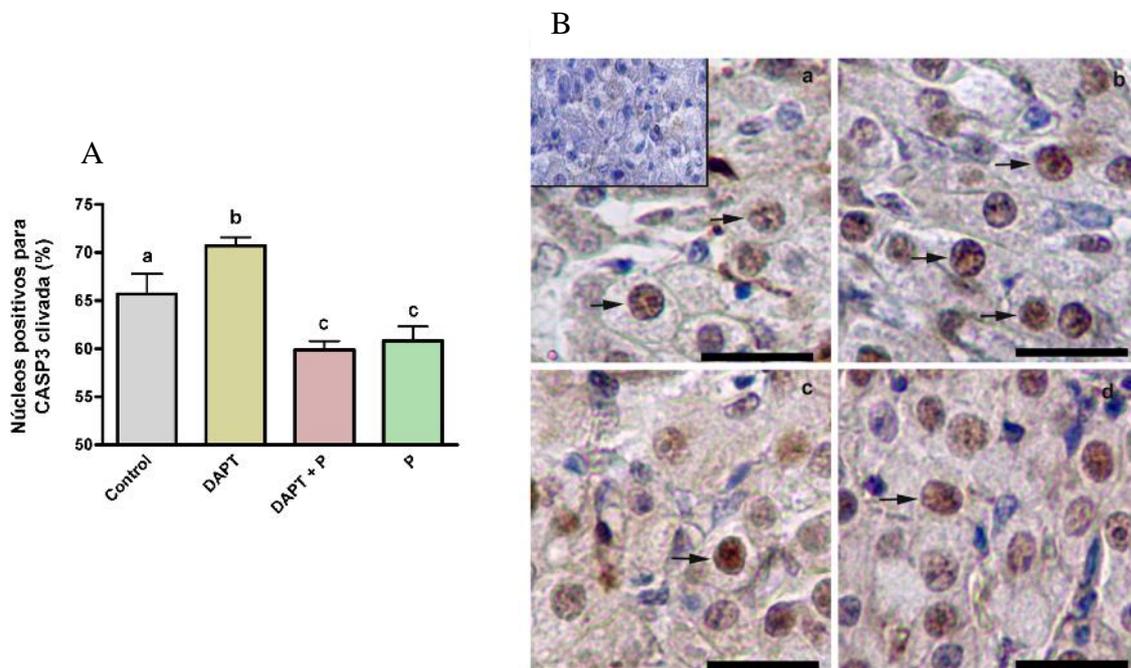


Figura 14. Inmunohistoquímica para CASP3 activa. (A) Cuantificación del porcentaje de núcleos marcados para CASP3 activa. Los grupos con distintas letras sobre las barras de error (a, b, c) representan diferencias significativas ($p < 0,05$; $n=4$). (B) Los paneles muestran fotos representativas de la marca para CASP3 activa en el grupo control (a), DAPT (b), DAPT+P (c) y progesterona (d). El recuadro muestra el control negativo. Las flechas indican marca nuclear para CAPS3 activa. Barra = 20 μm .

En base a estos resultados se estudió el contenido luteal de la proteína proapoptótica BAX y de la antiapoptótica BCLX_L. El cultivo con DAPT y/o con progesterona no modificaron el contenido de BAX (Figura 15A). DAPT disminuyó significativamente el contenido de BCLX_L en comparación con el grupo control. El agregado de progesterona

a los CLs cultivados con DAPT revirtió los valores de BCLX_L a niveles del control, mientras que la progesterona sola no modificó el contenido de esta proteína (Figura 15B). La relación pro-apoptótica BAX/BCLX_L aumentó significativamente en los CLs tratados con DAPT en comparación con el grupo control (Figura 15C). La progesterona sola no modificó la relación BAX/BCLX_L, sin embargo fue capaz de revertir el aumento en la relación de estas proteínas ocasionado por DAPT (Figura 15C).

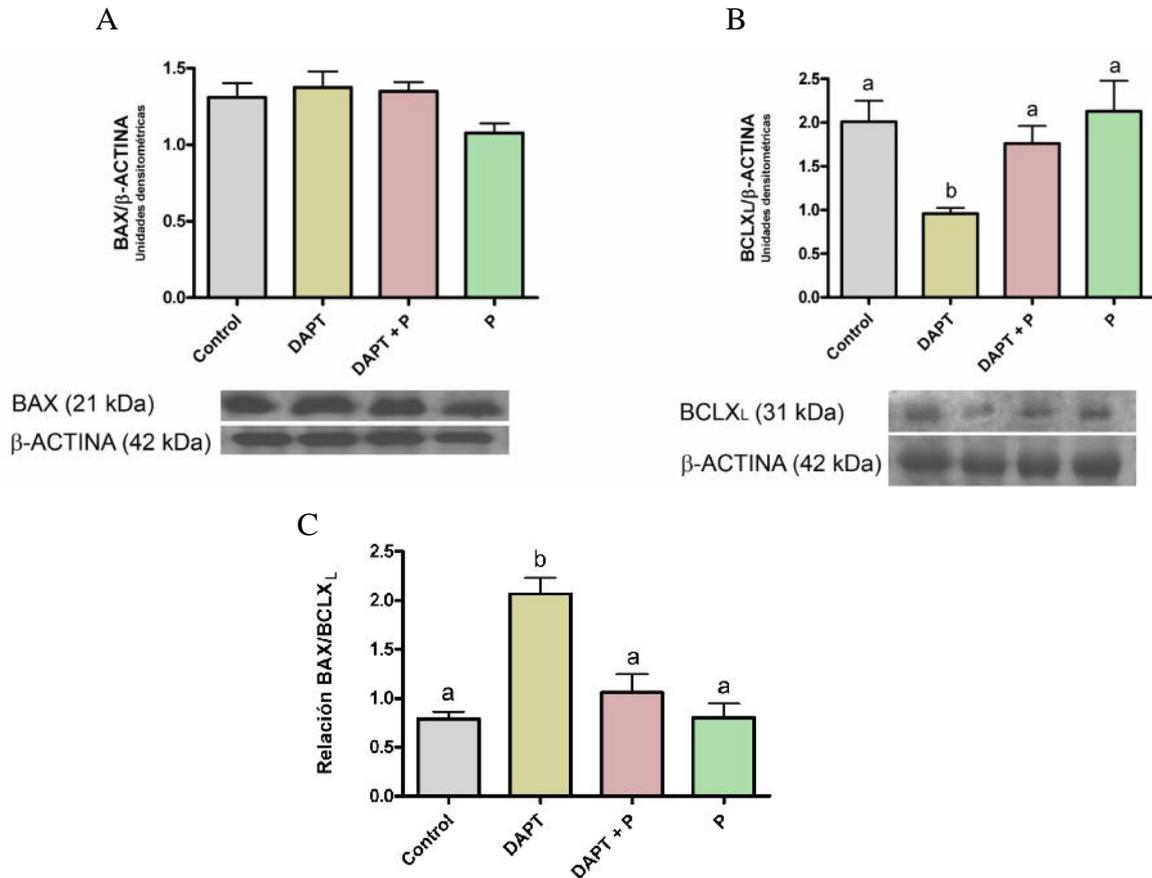


Figura 15. Efecto de la incubación con DAPT, DAPT+P y P sobre el contenido de BAX y BCLX_L. (A) Cuantificación del contenido de BAX. La densidad óptica se expresa como unidades arbitrarias \pm ESM normalizado a β -ACTINA (n=4). (B) Cuantificación del contenido de BCLX_L. La densidad óptica se expresa como unidades arbitrarias \pm ESM normalizado a β -ACTINA (n=4). (C) Relación BAX/BCLX_L para los distintos grupos. Los grupos con distintas letras sobre las barras de error (a, b) representan diferencias significativas ($p < 0,05$).

3. Efecto de la inhibición *in vitro* del sistema Notch sobre la proliferación de las células del CL

Para analizar si el sistema Notch y la progesterona regulan la proliferación de las células del CL, se midió por Western blot los niveles de PCNA, que es un marcador de

proliferación celular. El cultivo con DAPT no modificó el contenido de PCNA respecto del control. Sin embargo, el cultivo con progesterona generó un aumento significativo de PCNA, efecto que fue revertido con la combinación de DAPT + P. Este resultado sugiere que DAPT estaría inhibiendo la proliferación estimulada por progesterona (Figura 16). Estos resultados apoyan el rol autócrino de la progesterona sobre la proliferación de las células del CL.

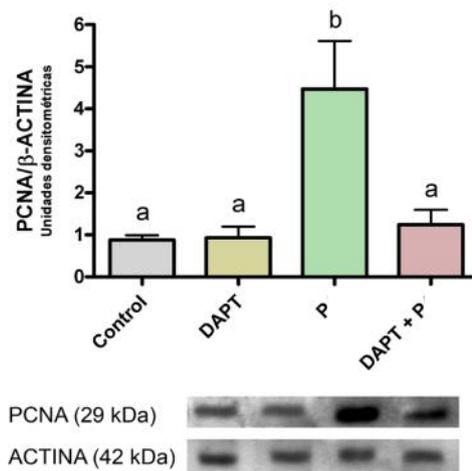


Figura 16. Efecto de la incubación con DAPT, DAPT+P y P sobre el contenido de PCNA. Contenido de PCNA medido por Western blot en extractos de CL luego de cultivarlos durante 4 horas en presencia de DAPT, progesterona o DAPT+P. La densidad óptica se expresa como unidades arbitrarias \pm ESM normalizado a β -ACTINA. Los grupos con distintas letras sobre las barras de error (a, b, c) representan diferencias significativas ($p < 0,05$; $n=4$).

4. Participación de las vías de AKT y ERK en la supervivencia y proliferación de las células del CL

A continuación se estudió la participación de las vías de AKT y ERK y su relación con el rol que cumple Notch en la regulación de la supervivencia del CL. Para determinar si Notch está involucrado en la activación de la vía de AKT, se midió por Western blot la forma fosforilada de esta proteína (p-AKT) en extractos de CLs cultivados durante una hora. En estas condiciones, DAPT disminuyó significativamente la fosforilación de AKT. El cultivo de DAPT + P restituyó los niveles de p-AKT a valores del control, mientras que no se observó ningún efecto al cultivar solo con progesterona (Figura

17A). Por otro lado, no se observaron diferencias significativas en la fosforilación de ERK entre los grupos analizados (Figura 17B).

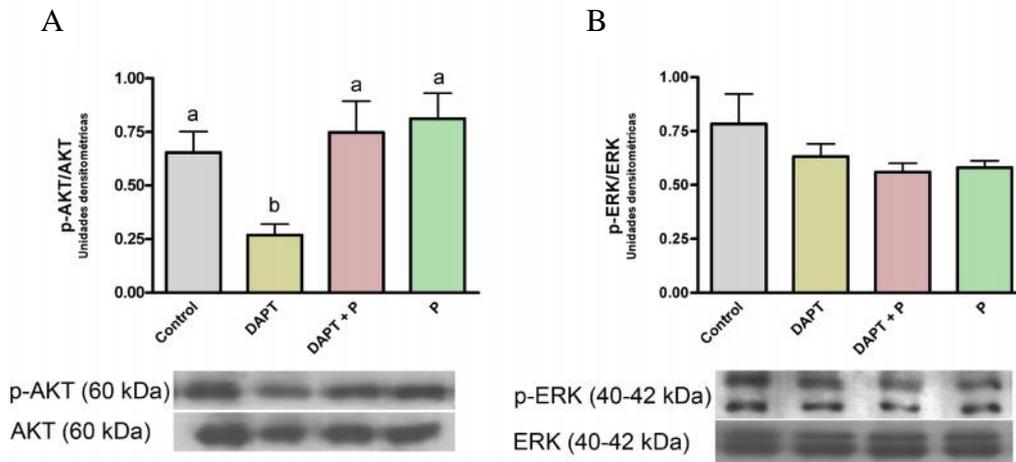


Figura 17. Participación de las vías de AKT y ERK en la supervivencia y proliferación de las células del CL. Efecto de la incubación con DAPT, DAPT+P y progesterona por una hora sobre la fosforilación de (A) AKT y (B) ERK. La densidad óptica se expresa como unidades arbitrarias \pm ESM. Los grupos con distintas letras sobre las barras de error (a, b) representan diferencias significativas ($p < 0,05$; $n = 4$).

5. Efecto de la inhibición *in vitro* del sistema Notch sobre el contenido de β -catenina

β -catenina es el principal mediador de la vía canónica de Wnt. Se estudió si los niveles de esta proteína están regulados por el sistema Notch y por la progesterona. El contenido de β -catenina disminuyó significativamente luego de la incubación con DAPT por 4 horas. Progesterona aumentó significativamente el contenido de β -catenina respecto al control. Al cultivar simultáneamente con DAPT y progesterona, la progesterona fue capaz de revertir el efecto de DAPT sobre el contenido de β -catenina (Figura 18). Este resultado muestra que β -catenina está siendo regulada por el sistema Notch y por progesterona.

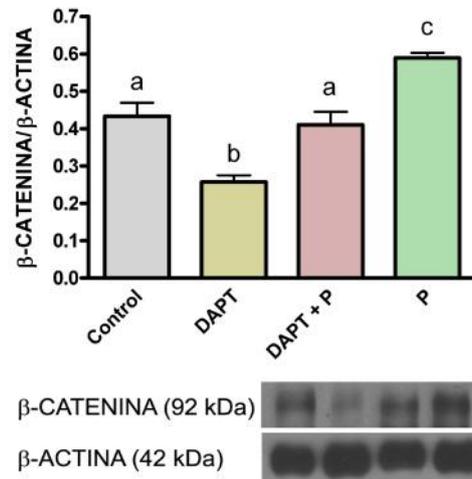


Figura 18. Efecto de la incubación con DAPT, DAPT+P y P sobre el contenido de β -catenina. Contenido luteal de β -catenina luego de 4 horas de cultivo. La densidad óptica se expresa como unidades arbitrarias \pm ESM normalizado a β -ACTINA. Los grupos con distintas letras sobre las barras de error (a, b, c) representan diferencias significativas ($p < 0,05$; $n = 4$).

Los resultados de este capítulo son la primera evidencia de que la función del CL está regulada por las vías de Notch y progesterona. También sugieren que existiría una interacción de dichas vías con el sistema Wnt/ β -catenina en CL de ratas superovuladas.

CAPÍTULO II: Participación del sistema Wnt/ β -catenina en el desarrollo y la funcionalidad del CL

1. Efecto de la administración *in vivo* de XAV939 sobre el contenido luteal de β -catenina

En primer lugar se evaluó la funcionalidad del XAV939 en el sistema experimental. Para ello se midió el contenido de β -catenina en extractos de proteínas de CL mediante la técnica de Western blot. No se observaron cambios significativos 48 horas luego de la administración de 1 μ g de XAV939 (control: $0,28 \pm 0,008$; XAV939: $0,28 \pm 0,08$. $n=4$; $p=0,93$). En cambio, se observó una disminución significativa en el contenido luteal de β -catenina en los animales tratados con 5 μ g (control: $0,87 \pm 0,01$, XAV939: $0,63 \pm 0,06$. $p < 0,05$; $n=4$) y 10 μ g de XAV939 (control: $0,87 \pm 0,01$; XAV939: $0,72 \pm 0,01$. $p < 0,01$; $n=4$) 48 horas luego de su administración (Figura 19). Debido a que las dosis de 5 μ g y 10 μ g produjeron el mismo cambio en los niveles de β -catenina, se eligió la dosis de 5 μ g para los siguientes experimentos.

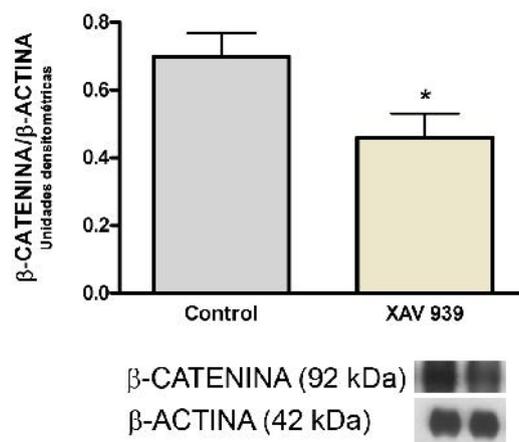


Figura 19. Efecto de XAV939 sobre el contenido de β -catenina. Contenido luteal de β -catenina 48 horas luego de la administración de 5 μ g de XAV939. La densidad óptica se expresa como unidades arbitrarias \pm ESM normalizado a β -ACTINA (*, $p < 0,05$; $n=4$).

Para evaluar el contenido de β -catenina nuclear, que es la responsable de la regulación transcripcional, se midieron sus niveles en la fracción de proteínas nucleares. El contenido de β -catenina nuclear también disminuyó 48 horas luego de la administración de 5 μ g de XAV939 (control: $1,7 \pm 0,04$; XAV939: $1,4 \pm 0,05$; $p < 0,01$; $n=4$) (Figura 20).

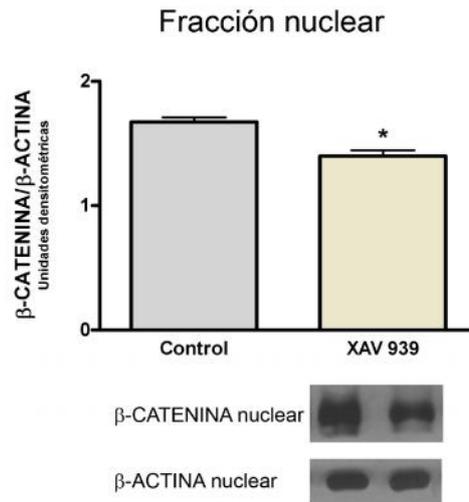


Figura 20. Efecto de XAV939 sobre el contenido de β -catenina nuclear. Contenido de β -catenina nuclear 48 horas luego de la administración de 5 μ g de XAV939. La densidad óptica se expresa como unidades arbitrarias \pm ESM normalizado a β -ACTINA (*, $p < 0,01$; $n=4$).

2. Efecto de la inhibición *in vivo* de Wnt/ β -catenina sobre el desarrollo folicular y formación de CL

Para evaluar el efecto de XAV939 sobre el desarrollo folicular, se tiñeron cortes de ovario con H&E y se cuantificó el porcentaje de cada estructura ovárica en ambos grupos experimentales. No se observaron cambios en el porcentaje de folículos primarios, preantrales, antrales o atrésicos 48 horas luego de la administración del inhibidor respecto al grupo control (Tabla 4). Sin embargo, se observó una disminución significativa en el porcentaje de CL, que fue acompañada con un aumento significativo del porcentaje de estructuras quísticas en el grupo tratado con el inhibidor (Tabla 4).

Tabla 4. Efecto de XAV939 sobre el desarrollo folicular y luteal. La tabla muestra la cuantificación del porcentaje de cada estructura ovárica en los ovarios control y en los tratados con XAV939.

Estructura	Promedio \pm ESM (%)		p
	Control (n=4)	XAV939 (n=4)	
Folículos Primarios	4,9 \pm 1,2	6,3 \pm 1,2	ns
Folículos Preantrales	6,3 \pm 0,9	10,5 \pm 2,4	ns
Folículos Antrales	34,5 \pm 3,8	32,3 \pm 5,6	ns
Folículos Atrésicos	9,6 \pm 2,9	10,1 \pm 2,8	ns
CLs	45,8 \pm 5,0	30,9 \pm 4,0	$p < 0,05$
Quistes	1,0 \pm 0,8	8,7 \pm 1,0	$p < 0,001$

(ns: no significativo).

Estos quistes son grandes estructuras formadas por un antro rodeado de una fina capa de células de la granulosa y luteales, adentro del cual se encuentra el ovocito. No se observa ruptura de la pared folicular. En la figura 21 se muestran fotos representativas de un ovario control y de uno tratado con XAV939.

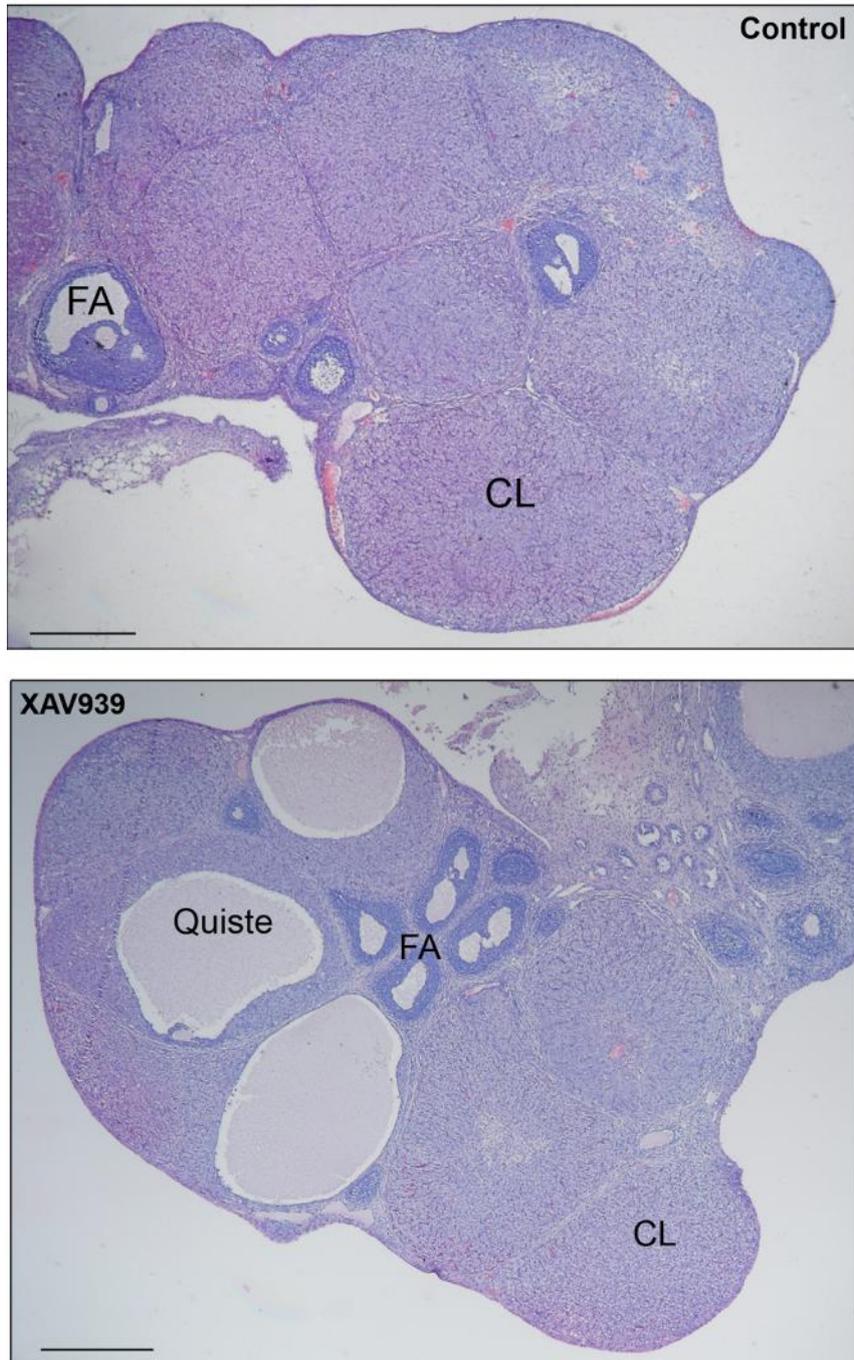


Figura 21. Fotos representativas de un ovario control y de uno tratado con XAV939. Las barras representan 200 μ m. FA: folículo antral, CL: cuerpo lúteo.

3. Efecto de la administración *in vivo* de ICG-001 sobre la formación de CL

Para corroborar el resultado observado con XAV939, se inhibió la vía de Wnt/ β -catenina utilizando ICG-001, cuyo mecanismo de acción es distinto del de XAV939. Esta molécula compite con β -catenina por la unión a TCF/Lef, y por lo tanto inhibe la transcripción mediada por este complejo. Así, se espera observar una disminución de la expresión de genes target, como *ciclina d1*.

En primer lugar se evaluó la funcionalidad de ICG-001 48 horas luego de administrar 5 μ g bajo la bursa de ambos ovarios. Para ello se midió el contenido de Ciclina D1 en extractos de proteínas de CL, donde se observó una disminución significativa en el grupo tratado con el inhibidor (control: $0,79 \pm 0,05$; ICG-001: $0,65 \pm 0,01$. $p < 0,05$; $n=4$) (Figura 22). A continuación se evaluó el efecto de ICG-001 sobre la formación de CL. En concordancia con el fenotipo observado con XAV939, la administración de ICG-001 produjo una disminución del porcentaje de CL (control: $43,5 \pm 4,5\%$; ICG-001: $25,9 \pm 1,5\%$. $p < 0,05$; $n=4$), efecto que fue acompañado por la aparición de quistes (control: 0% ; ICG-001: $1,22 \pm 0,33\%$). En la figura 23 se muestran fotos representativas de un ovario control y de uno tratado con ICG-001.

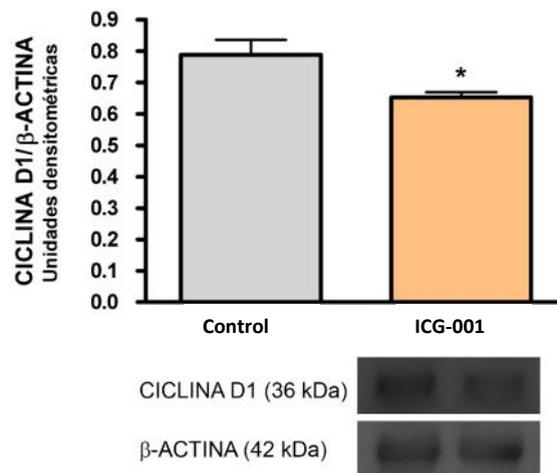


Figura 22. Efecto de ICG-001 sobre el contenido de Ciclina D1. Contenido luteal de Ciclina D1 48 horas luego de la administración de 5 μ g de ICG-001. La densidad óptica se expresa como unidades arbitrarias \pm ESM normalizado a β -ACTINA (* $p < 0,05$; $n=4$).

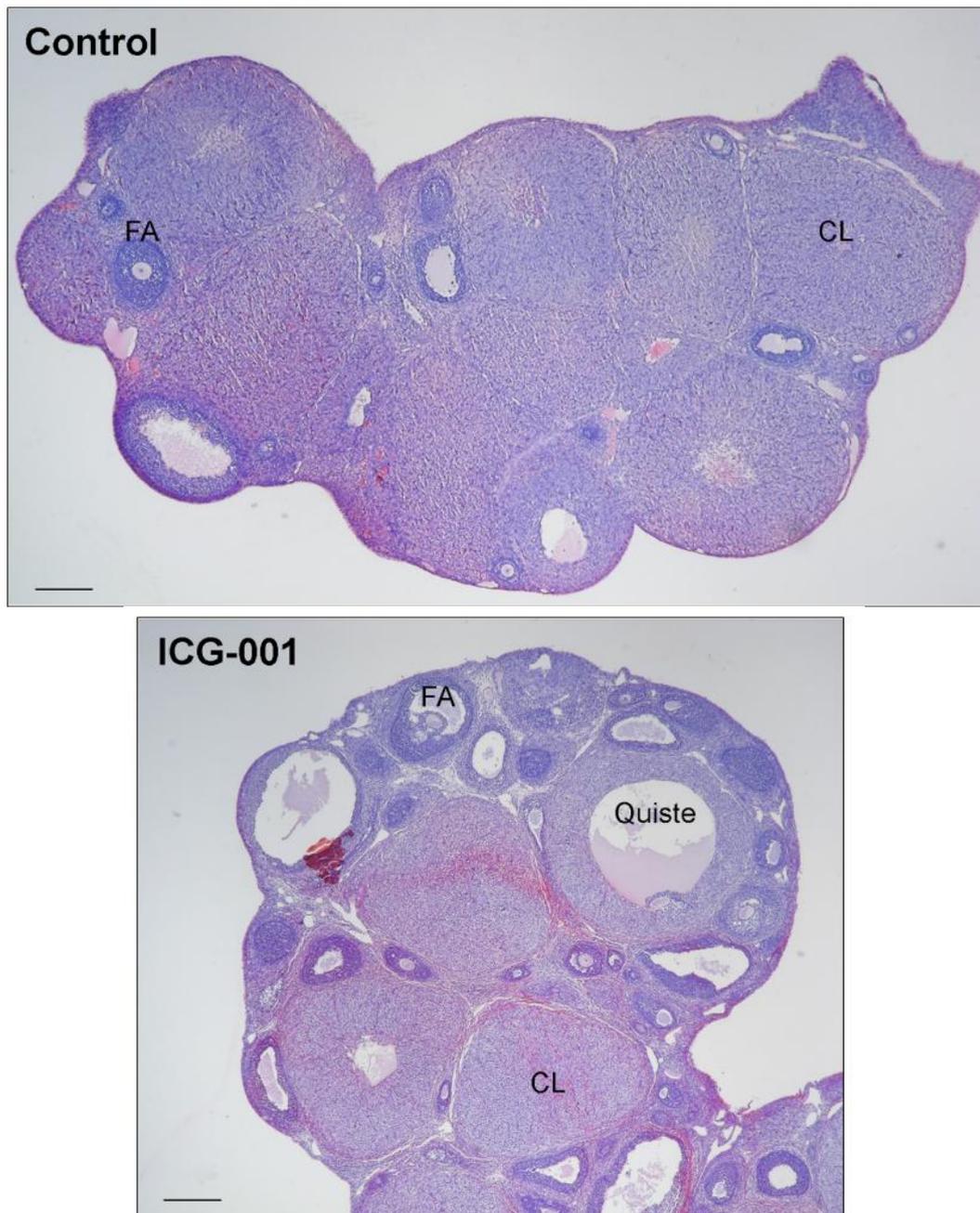


Figura 23. Fotos representativas de un ovario control y de uno tratado con ICG-001. Las barras representan 200 μm . FA: folículo antral, CL: cuerpo lúteo.

4. Efecto de la inhibición *in vivo* de Wnt/S-catenina sobre la esteroidogénesis luteal

Como la función principal del CL es producir y secretar progesterona, se midió la concentración de progesterona sérica 48 horas luego de la administración de XAV939. Se observó una disminución significativa en el grupo tratado con el inhibidor respecto del control (Figura 24A).

Para determinar si alguna de las proteínas involucradas en la síntesis de progesterona está regulada por la vía Wnt/ β -catenina, se midió el contenido luteal de StAR, P450_{scc} y 3 β -hidroxiesteroide deshidrogenasa (3 β -HSD). Se observó una disminución significativa en el contenido de StAR en el grupo tratado con XAV939 respecto al control (Figura 24B). No se observaron cambios en el contenido de P450_{scc} (Figura 24C) ni 3 β -HSD (Figura 24D).

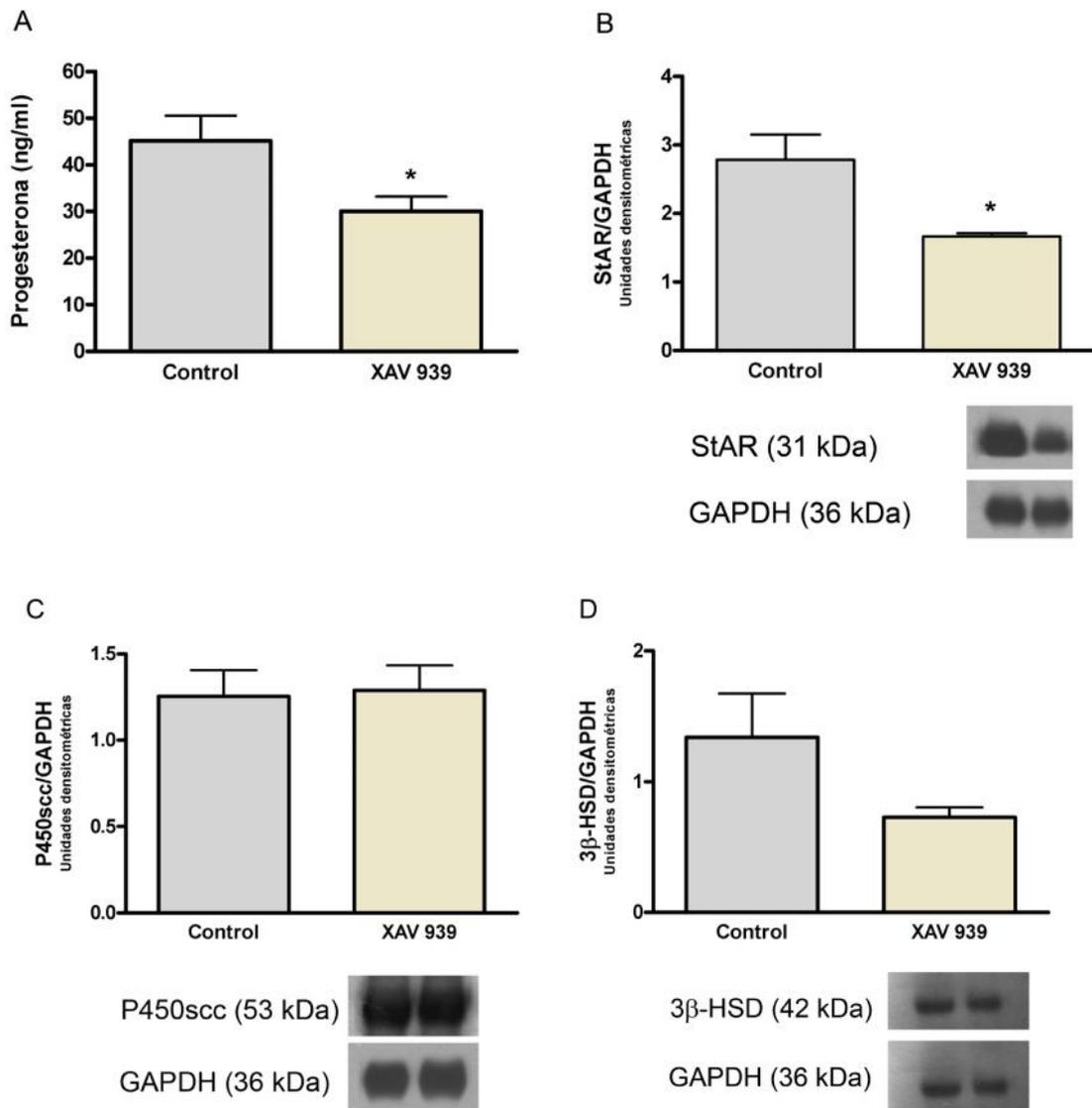


Figura 24. Efecto de XAV939 sobre la producción de progesterona y sobre el contenido luteal de proteínas esteroidogénicas. (A) Niveles de progesterona sérica 48 horas luego de la administración de XAV939 medidos por RIA (*, $p < 0,05$; $n = 4$). Contenido luteal de la proteína (B) StAR, (C) P450_{scc} y (D) 3 β -HSD 48 horas luego de la administración de XAV939. La densidad óptica se expresa como unidades arbitrarias \pm ESM normalizado a GAPDH (*, $p < 0,05$; $n = 4$).

5. Efecto de la inhibición *in vivo* de Wnt/ β -catenina sobre parámetros apoptóticos

Se evaluaron los niveles proteicos de proteínas pro y anti apoptóticas y se observó que la administración de XAV939 aumentó significativamente el contenido de la proteína pro-apoptótica BCLX_S (Figura 25A) y disminuyó significativamente el de la proteína anti-apoptótica BCLX_L (Figura 25C). En consecuencia, la relación pro-apoptótica BCLX_S/BCLX_L aumentó significativamente en el grupo tratado con el inhibidor respecto al control (Figura 25D). Si bien XAV939 no afectó el contenido de BAX (Figura 25B), la relación pro-apoptótica BAX/BCLX_L también mostró un aumento significativo en el grupo tratado con XAV939 (Figura 25E).

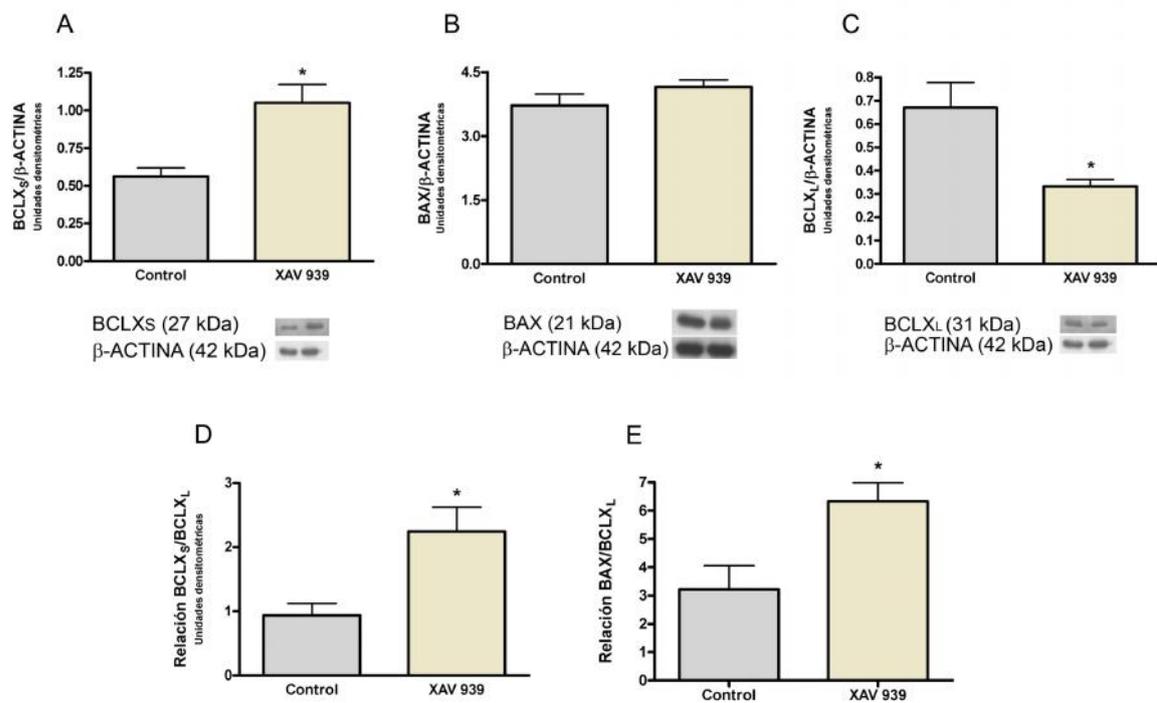


Figura 25. Efecto de XAV939 sobre parámetros apoptóticos. Cuantificación del contenido de (A) BCLX_S, (B) BAX, (C) BCLX_L. La densidad óptica se expresa como unidades arbitrarias \pm ESM normalizado a β -ACTINA. (D) Relación BCLX_S/BCLX_L y (E) BAX/ BCLX_L para ambos grupos experimentales (*, $p < 0,05$; $n = 4$).

6. Efecto de la inhibición *in vivo* de Wnt/ β -catenina sobre la proliferación celular

Para estudiar si la vía Wnt/ β -catenina está involucrada en la proliferación de las células del CL, se midió por Western blot los niveles proteicos de PCNA. Se observó una disminución significativa en el contenido de PCNA luteal 48 horas luego de la administración del inhibidor (Figura 26).

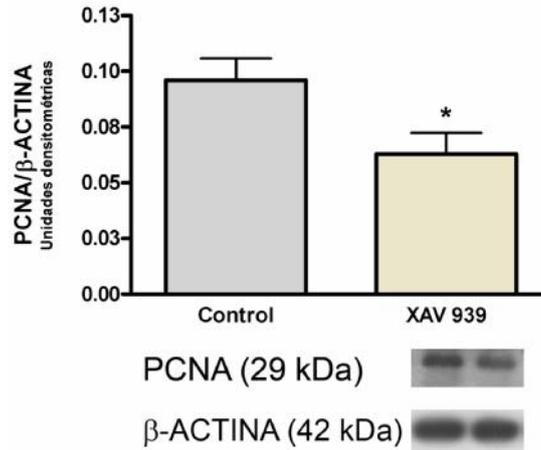


Figura 26. Efecto de XAV939 sobre la proliferación de las células del CL. Contenido luteal de la proteína PCNA 48 horas luego de la administración de XAV939. La densidad óptica se expresa como unidades arbitrarias \pm ESM normalizado a β -ACTINA (*, $p < 0,05$; $n = 4$).

7. Participación de las vías de ERK y AKT en la supervivencia y proliferación del CL

Las vías de ERK y AKT están involucradas en la regulación de la proliferación y supervivencia celular [231], [232]. Habiendo observado que la inhibición de la vía Wnt/ β -catenina produjo un aumento de parámetros apoptóticos y una disminución de la proliferación celular, se analizó una posible interacción entre dichas vías y Wnt/ β -catenina. Para ello, se evaluó el nivel de fosforilación de las proteínas ERK y AKT en extractos proteicos de CL, que da cuenta de la activación de las vías. No se observaron cambios significativos en el nivel de fosforilación de ERK y AKT 48 horas luego de la administración de XAV939. Debido a que las fosforilaciones son eventos rápidos, se analizó el efecto de la inhibición de la vía de Wnt/ β -catenina a un tiempo menor. Para ello, se administraron 5 μ g de XAV939 y luego de 24 horas se corroboró la disminución del contenido de β -catenina en extracto de CLs (Figura 27).

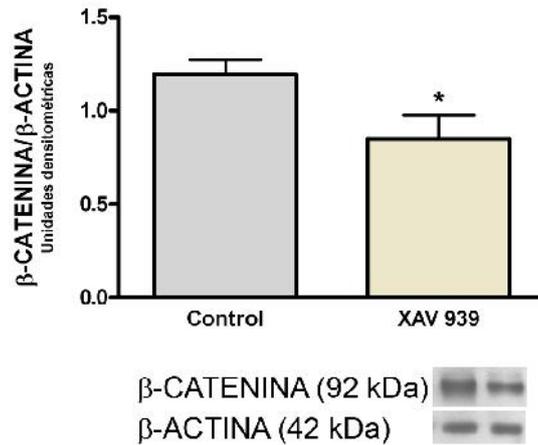


Figura 27. Efecto de XAV939 sobre el contenido de β -catenina. Contenido luteal de β -catenina 24 horas luego de la administración de 5 μ g de XAV939. La densidad óptica se expresa como unidades arbitrarias \pm ESM normalizado a β -ACTINA (*, $p < 0,05$; $n=4$).

Luego de corroborar que el contenido de β -catenina disminuyó a las 24 horas de administrado el XAV939, se analizó el nivel de fosforilación de ERK, observándose una disminución significativa (Figura 28A). Por otro lado, no se observaron cambios en la fosforilación de AKT (Figura 28B).

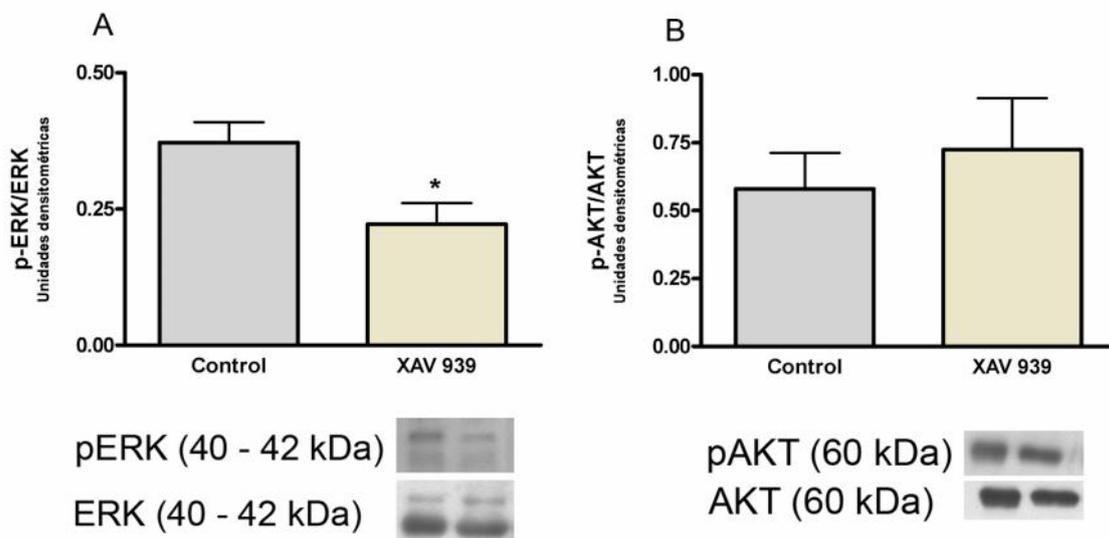


Figura 28. Efecto de XAV939 sobre las vías de ERK y AKT en CL. Niveles de fosforilación de (A) ERK y (B) AKT medidos por Western blot. La densidad óptica se expresa como unidades arbitrarias \pm ESM (*, $p < 0,05$; $n=4$).

8. Efecto de la inhibición *in vivo* de Wnt/ -catenina sobre la angiogénesis

Un correcto desarrollo vascular resulta imprescindible para el ovario. De esta manera, los nutrientes y hormonas necesarios para promover el desarrollo folicular y la formación del CL pueden suministrarse apropiadamente.

8.1 Desarrollo vascular del CL

8.1.a Análisis de área endotelial

Para estudiar si la vía Wnt/ -catenina está involucrada en el desarrollo vascular del CL, en primer lugar se marcaron cortes de ovario con lectina BS-1, que es un marcador específico de células endoteliales. Se cuantificó el porcentaje de área endotelial únicamente en los CLs, 48 horas luego de la administración de XAV939. La cuantificación mostró que los CLs provenientes de ovarios tratados con XAV939 presentan un área endotelial significativamente menor que los CLs control (Figura 29A).

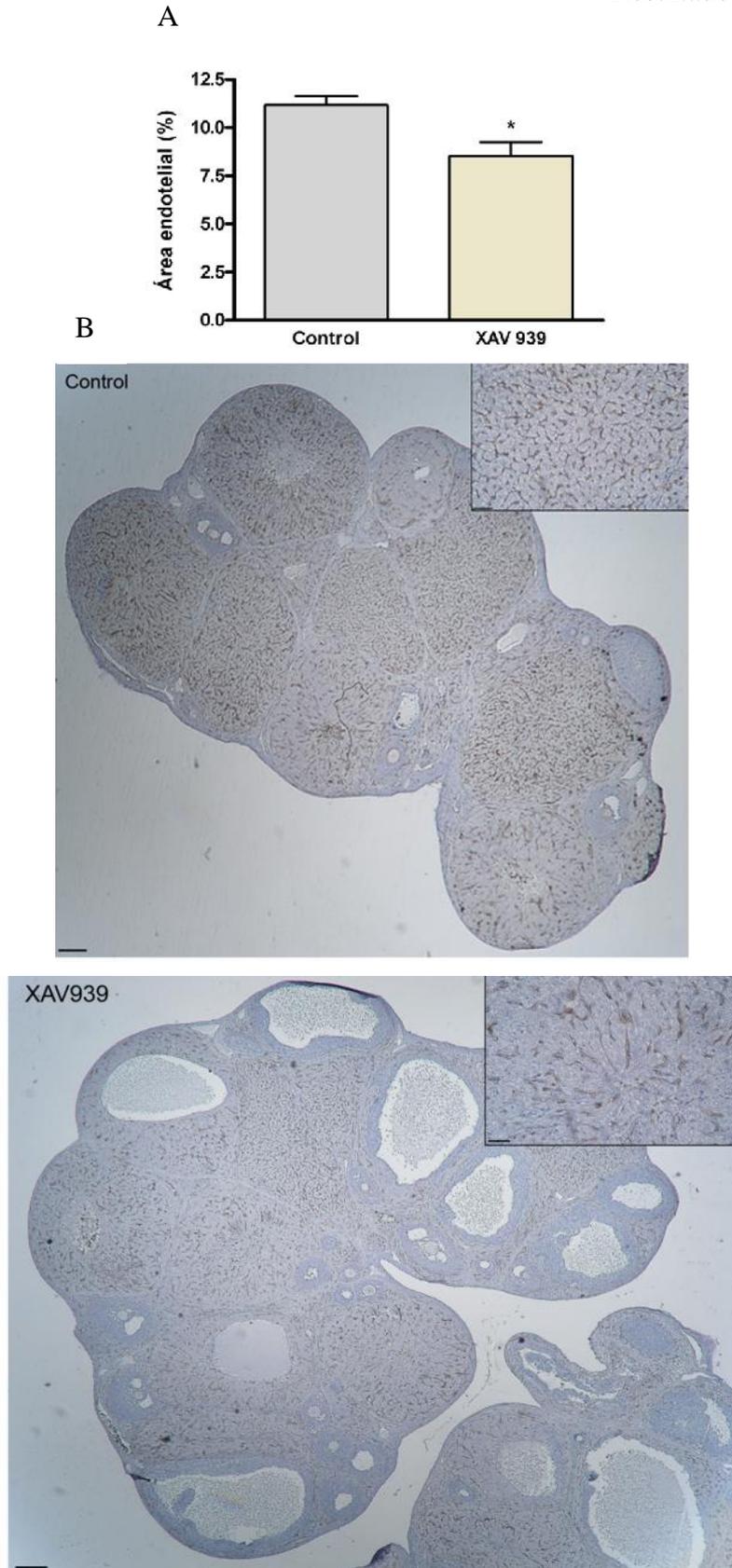


Figura 29. Efecto de XAV939 sobre el desarrollo vascular del CL. (A) Cuantificación del porcentaje de área endotelial en CL. (B) Fotos representativas de un ovario control y uno tratado con XAV939 marcados con lectina. Los recuadros muestran un CL en mayor aumento. Las barras representan 200 μm (paneles) y 50 μm (recuadros) (*, $p < 0,05$; $n=4$).

8.1.b Estudio del contenido de VEGF

El factor de crecimiento del endotelio vascular (VEGF) es el principal inductor del proceso de angiogénesis y su función es estimular la proliferación y migración de las células endoteliales para la formación de un nuevo vaso. Se midió el contenido proteico de las isoformas 164 y 120 de VEGF en extractos de CLs 48 horas luego de la administración de XAV939 y no se observaron diferencias significativas entre ambos grupos. Sin embargo, al evaluar 24 horas después de administrar el inhibidor, se observó una disminución significativa de VEGF120 en el grupo tratado en comparación con el control, mientras que la isoforma 164 no mostró cambios (Figura 30).

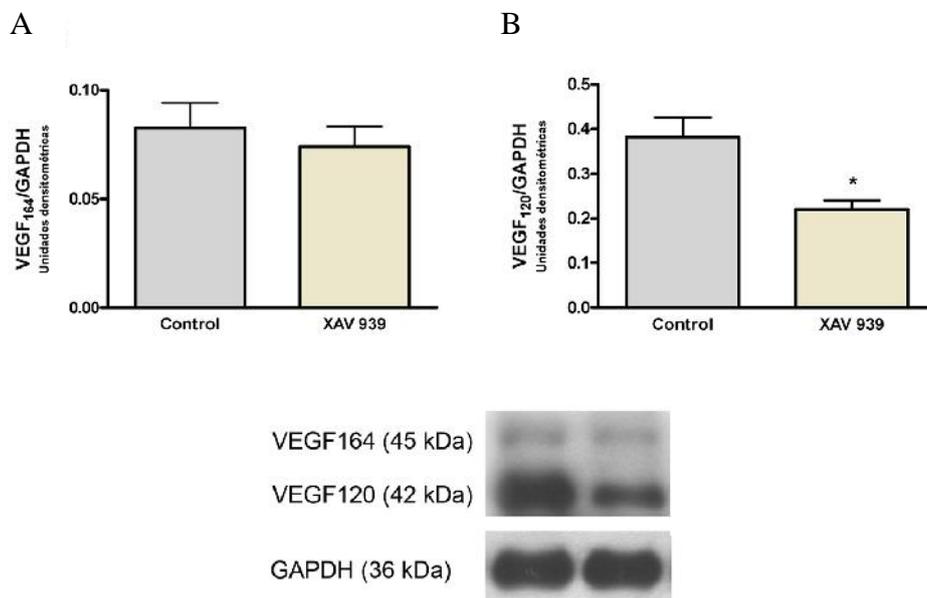


Figura 30. Efecto de XAV939 sobre el contenido de VEGF. Contenido luteal de las isoformas 164 y 120 de VEGF medidos por Western blot 24 horas luego de administrar XAV939. La densidad óptica se expresa como unidades arbitrarias \pm ESM normalizado a GAPDH (*, $p < 0,05$; $n = 4$).

8.1.c Inmuno marcación de células proliferativas

Para determinar qué células del CL son las que proliferan, se realizó una IHQ para PCNA. Se observó marca de PCNA en células pequeñas, que se corresponden con células luteales pequeñas y otros componentes del CL, como las células endoteliales (Figura 31).

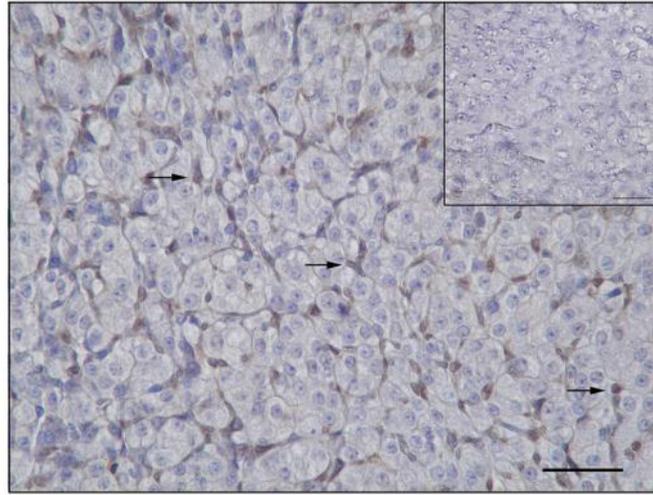


Figura 31. Inmuno marcación de células proliferativas del CL. El panel muestra una foto representativa de la marca de PCNA en el grupo control. Las flechas indican células pequeñas marcadas para PCNA. El recuadro muestra el control negativo. Barra = 50 μ m.

Habiendo observado que las células pequeñas del CL son positivas para PCNA, sumado a la evidencia de que al inhibir Wnt/ β -catenina hay una disminución del área endotelial y del contenido proteico de VEGF y PCNA en CL, se buscó determinar si las células endoteliales son las proliferativas. Para ello se realizó una doble marcación en cortes de ovario, en donde se marcó simultáneamente PCNA por IHQ y células endoteliales con lectina fluoresceinada. Luego, se cuantificó el porcentaje de células doble positivo en CL. De esta forma, del total de células proliferativas, es decir las positivas para PCNA, el $94,0 \pm 1,0$ % se corresponde con células endoteliales en CLs control y el $93,6 \pm 0,9$ % en CLs tratados (Figura 32). Esto significa que son las células endoteliales principalmente las que proliferan y que la disminución de la proliferación celular observada con XAV939 está dada mayoritariamente por las células endoteliales en CL.

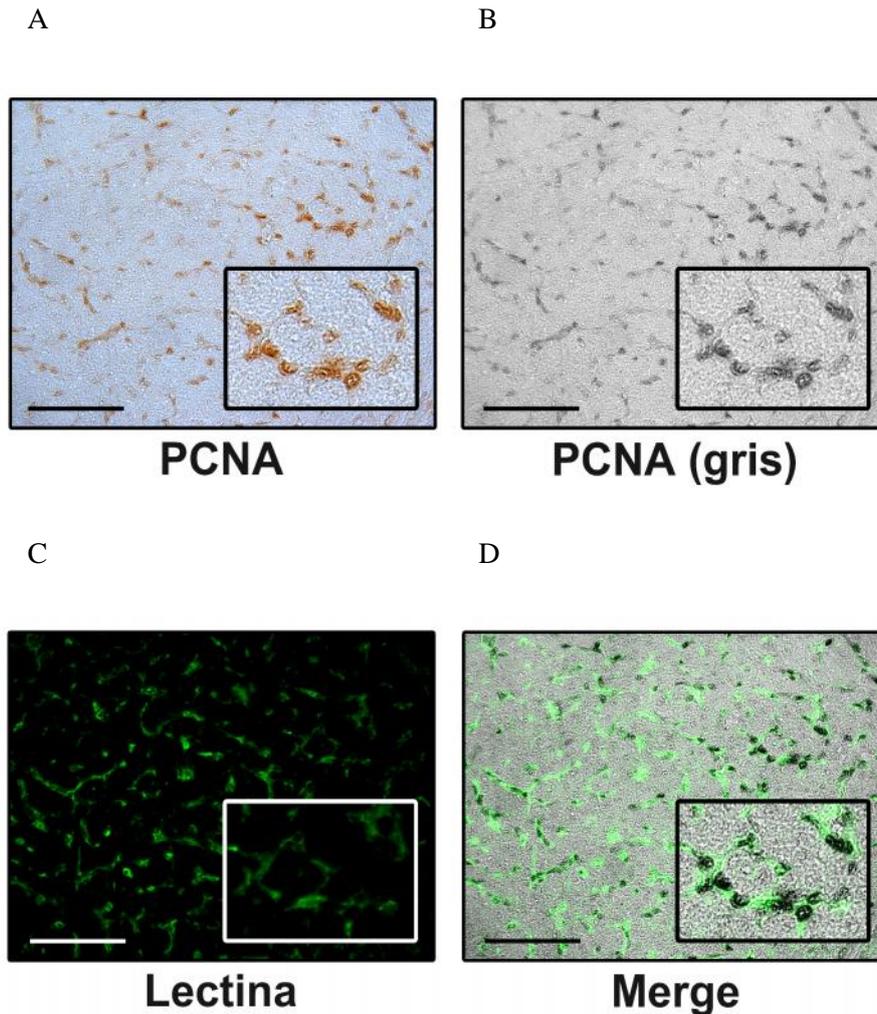


Figura 32. Doble marcación de células proliferativas y endoteliales del CL. Los paneles muestran una foto representativa de la marca de (A y B) PCNA y (C) lectina en el grupo control. El panel D muestra la superposición de ambas marcas. El recuadro muestra una sección representativa a mayor aumento. Barra = 100 μm .

8.1.d Estudio del área periendotelial

El establecimiento de una red vascular madura requiere de la acción coordinada de varios factores adicionales, como las Angiopoyetinas 1 y 2, que actúan a través del receptor Tie2, y el Factor de crecimiento derivado de Plaquetas (PDGF), que actúa a través del PDGFR. En conjunto, estos factores reclutan células periendoteliales, que tapizan al vaso, proporcionándole estabilidad y convirtiéndolo en funcional. Para estudiar si la vía Wnt/ β -catenina está involucrada en el proceso de estabilidad vascular, se marcaron cortes de ovario con α -Actina de músculo liso, que es un marcador específico de células periendoteliales. Se cuantificó el porcentaje de área periendotelial

sólo en los CLs 48 horas luego de la administración de XAV939. No se observaron diferencias significativas entre ambos grupos experimentales (Figura 33A).

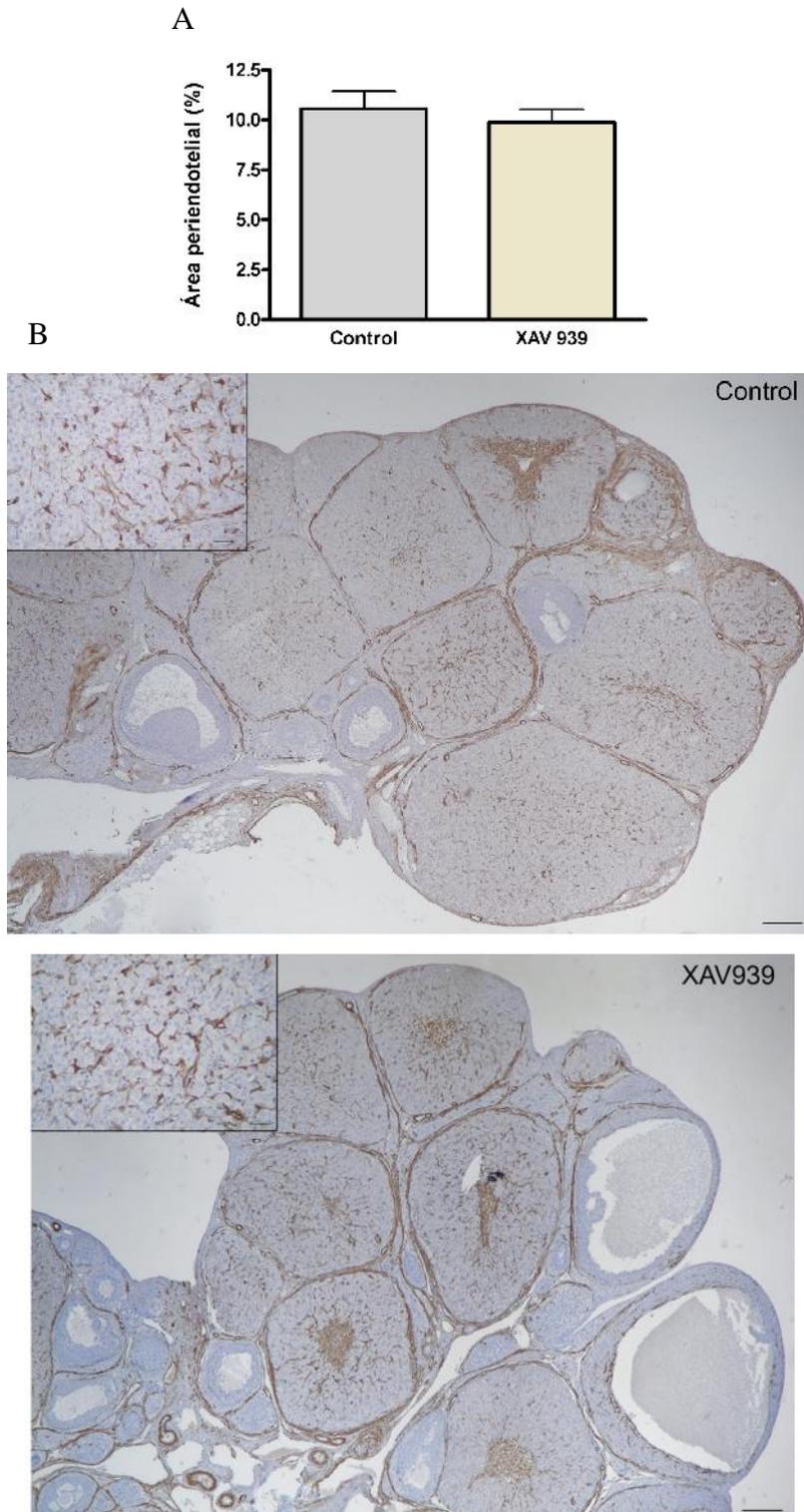


Figura 33. Efecto de XAV939 sobre la estabilidad vascular del CL. El gráfico muestra la cuantificación del porcentaje de área perivascular en CL. Las fotos muestran imágenes representativas de un ovario control y uno tratado con XAV939 marcados con α -Actina de músculo liso. Los recuadros muestran un CL en mayor aumento. Las barras representan 200 μ m (paneles) y 50 μ m (recuadros).

Luego se analizó el contenido de las proteínas PDGFD, de su receptor PDGFR , de Angiopoyetinas 1 y 2, y del receptor Tie2 en CL. No se observaron cambios entre los grupos experimentales 48 horas luego de la administración de XAV939 (Tabla 5). Estos resultados sugieren que la vía Wnt/ -catenina no estaría involucrada en el proceso de estabilidad vascular al tiempo analizado.

Tabla 5. Efecto de XAV939 sobre el contenido de proteínas relacionadas a estabilidad vascular.

Proteína	Control (n=4)	XAV939 (n=4)
PDGF D	0,60±0,06	0,66±0,08
Receptor PDGF	1,42±0,13	1,50±0,10
Angiopoyetina 1	0,20±0,026	0,22±0,04
Angiopoyetina 2	0,52±0,08	0,39±0,03
Receptor Tie 2	0,07±0,02	0,10±0,02
- Actina	0,8±0,07	0,73±0,06

8.2 Desarrollo vascular de folículos y estroma

Mientras que los folículos primordiales y primarios reciben nutrientes y oxígeno por difusión pasiva de los vasos estromales, el crecimiento folicular se asocia al desarrollo de una red capilar individual y a una angiogénesis continua destinada a nutrir el folículo en rápido crecimiento. Sabiendo que la administración de XAV939 provocó la formación de quistes, se evaluó la participación de Wnt/ -catenina en la regulación de la angiogénesis en folículos y estroma. La administración de XAV939 provocó una disminución significativa del área endotelial de folículos y estroma (Figura 34A) mientras que no produjo cambios en el área periendoelital (Figura 34B).

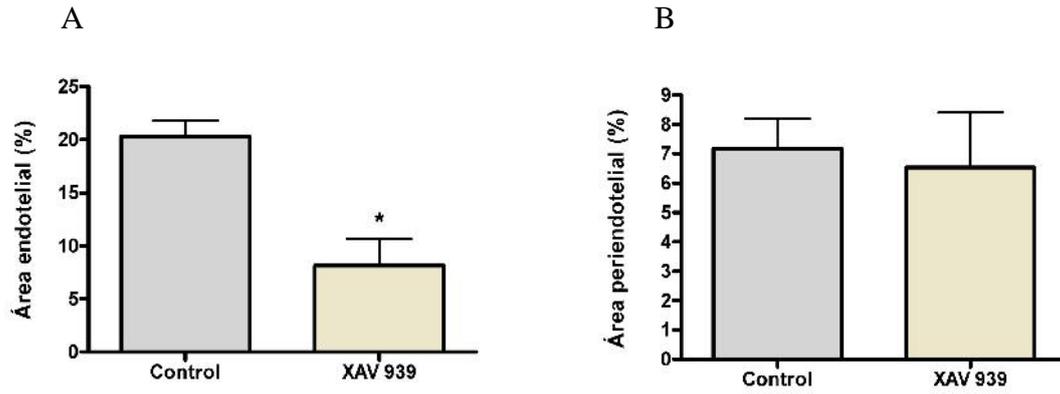


Figura 34. Efecto de XAV939 sobre el desarrollo vascular en los folículos y el estroma. El gráfico muestra la cuantificación del porcentaje de (A) área endotelial y (B) área periendotelial (*, $p < 0,05$; $n = 4$).

Los resultados de este capítulo describen la participación del sistema Wnt/ -catenina en la funcionalidad del CL. Además, sugieren la implicancia de esta vía en el proceso de ovulación y formación del CL.

CAPÍTULO III: Efecto de la inhibición de Wnt/ β -catenina sobre el sistema Notch en el cuerpo lúteo

1. Efecto *in vitro* de ICG-001 sobre el contenido luteal de Ciclina D1

En primer lugar se evaluó la funcionalidad del ICG-001 en el sistema experimental. Para ello se cultivaron CLs aislados durante 12 horas y se midió el contenido de Ciclina D1 en extracto proteico mediante la técnica de Western blot. Se observó una disminución significativa en el contenido de Ciclina D1 con ambas concentraciones de ICG-001 ensayadas (control: $0,46 \pm 0,01$; $20 \mu\text{M}$: $0,25 \pm 0,05$; $50 \mu\text{M}$: $0,23 \pm 0,05$) (Figura 35).

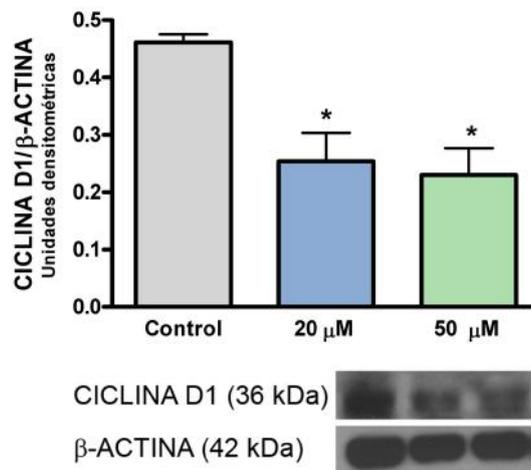


Figura 35. Efecto de ICG-001 sobre el contenido de Ciclina D1. Contenido luteal de Ciclina D1 12 horas luego de la administración de $20 \mu\text{M}$ o $50 \mu\text{M}$ de ICG-001. La densidad óptica se expresa como unidades arbitrarias \pm ESM normalizado a β -ACTINA (*, $p < 0,05$; $n=4$).

2. Efecto *in vitro* de ICG-001 sobre la función luteal luego de 12 horas de cultivo

Para estudiar la funcionalidad de los CLs, se midió en primer lugar la concentración de progesterona en el medio condicionado, observándose una disminución significativa luego de 12 horas de cultivo con ambas concentraciones de ICG-001 (Figura 36).

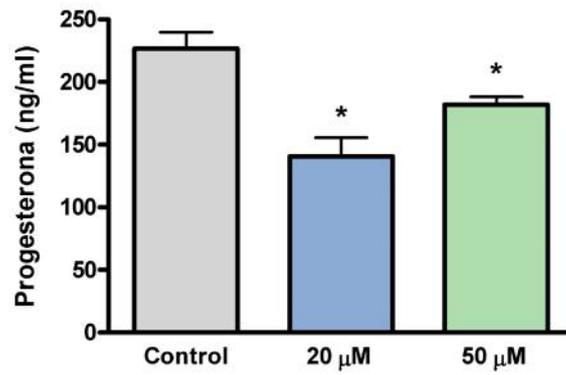


Figura 36. Concentración de progesterona en medio condicionado. Progesterona en medio de cultivo de CLs cultivados durante 12 horas con 20 μ M o 50 μ M de ICG-001. Los valores se expresan como la media \pm ESM de progesterona en el medio de cultivo (*, $p < 0,05$; $n = 4$).

A continuación se evaluó si el inhibidor ICG-001 afectó el contenido luteal de StAR. Coherente con el resultado observado al inhibir *in vivo* el sistema Wnt/ β -catenina, se observó una disminución significativa del contenido de StAR luego de 12 horas de cultivo con 50 μ M de ICG-001 (Figura 37).

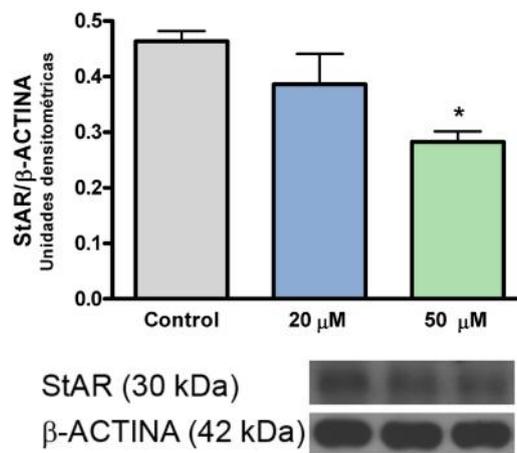


Figura 37. Efecto de ICG-001 sobre el contenido de StAR. Contenido luteal de StAR 12 horas luego del cultivo con 20 μ M o 50 μ M de ICG-001. La densidad óptica se expresa como unidades arbitrarias \pm ESM normalizado a β -ACTINA (*, $p < 0,05$; $n = 4$).

3. Efecto *in vitro* de ICG-001 sobre la vía Notch

3.1 Efecto *in vitro* de ICG-001 sobre la expresión de *hes1*

Para estudiar el efecto de la inhibición *in vitro* de la vía Wnt/ β -catenina sobre el estado de activación del sistema Notch, se estudió por PCR cuantitativa (RT-PCR) la

expresión de *hes1*, que es el efector de Notch descrito en CL [233]. Luego de 12 horas de cultivo, se observó un aumento significativo de la expresión de *hes1* con 50 μM de ICG-001 (Figura 38).

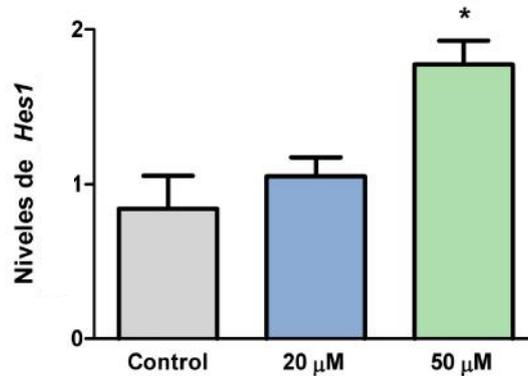


Figura 38. Efecto de ICG-001 sobre la expresión de *hes1*. Niveles relativos de ARNm de *hes1* 12 horas luego del cultivo con 20 μM o 50 μM de ICG-001. Los niveles de ARNm se expresan como la relación entre *hes1* y el control interno (*, $p < 0,05$; $n=4$).

Se midió también el contenido proteico de Hes1, observándose un aumento significativo luego del cultivo con 50 μM de ICG-001 (Figura 39).

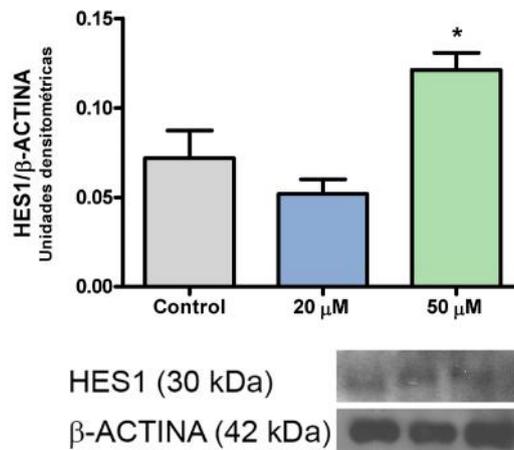


Figura 39. Efecto de ICG-001 sobre el contenido de Hes1. Contenido luteal de Hes1 12 horas luego del cultivo con 20 μM o 50 μM de ICG-001. La densidad óptica se expresa como unidades arbitrarias \pm ESM normalizado a β -ACTINA (*, $p < 0,05$; $n=4$).

El aumento observado tanto en la expresión como en el contenido de Hes1 es reflejo de la activación de la vía de Notch. En relación a este efecto, se estudió la expresión de *rbpj-*, que actúa como represor transcripcional cuando la vía de Notch está inactiva o como activador transcripcional cuando se une al NICD en el núcleo, activando así la

expresión de genes target de Notch [234]. Luego de 12 horas de cultivo, se observó un aumento significativo de la expresión de *rbpj-* con ambas concentraciones de ICG-001 ensayadas (Figura 40).

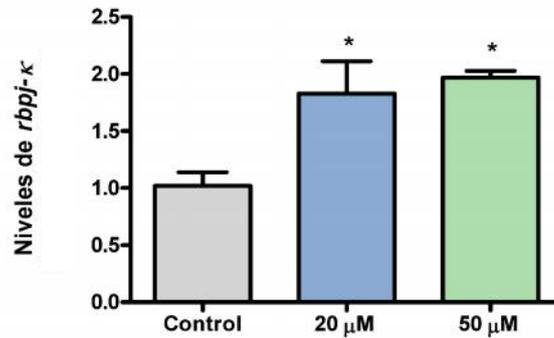


Figura 40. Efecto de ICG-001 sobre la expresión de *rbpj-*. Niveles relativos de ARNm de *rbpj-* 12 horas luego del cultivo con 20 μ M o 50 μ M de ICG-001. Los niveles de ARNm se expresan como la relación entre *rbpj-* y el control interno (*, $p < 0,05$; $n=4$).

3.2 Efecto *in vitro* de ICG-001 sobre la expresión de receptores de Notch

Habiendo observado que la inhibición *in vitro* de la vía Wnt/ β -catenina produjo la activación de la vía de Notch, a continuación se estudió el nivel de expresión de los receptores Notch 1 y Notch 4. ICG-001 (50 μ M) aumentó significativamente la expresión del receptor *notch1* luego de 12 horas de cultivo, mientras que no produjo cambios en el receptor *notch4* (Figura 41).

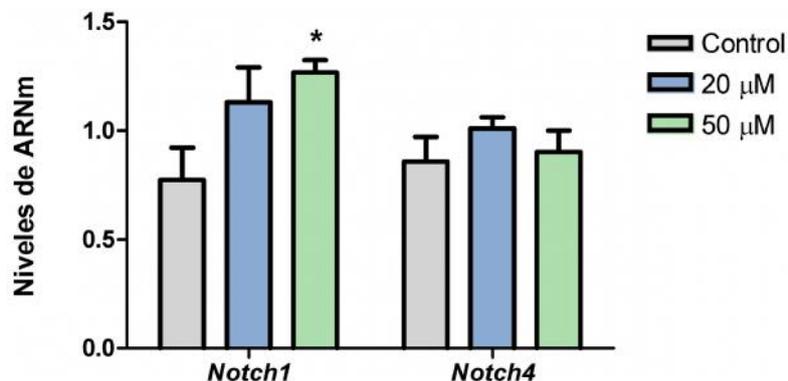


Figura 41. Efecto de ICG-001 sobre la expresión de receptores de Notch. Niveles relativos de ARNm de *notch1* y *notch4* luego de 12 horas de cultivo con 20 μ M o 50 μ M de ICG-001. Los niveles de ARNm se expresan como la relación entre cada gen y el control interno (*, $p < 0,05$; $n=4$).

3.3 Efecto *in vitro* de ICG-001 sobre la expresión de ligandos de Notch

Para estudiar si la inhibición *in vitro* de la vía Wnt/ β -catenina produce cambios en la expresión de ligandos Notch, se midieron los niveles de ARNm de *jagged1* y *dll4*. Luego de 12 horas de cultivo, la expresión de *jagged1* aumentó significativamente con ambas concentraciones de ICG-001, mientras que la expresión de *dll4* no se afectó (Figura 42).

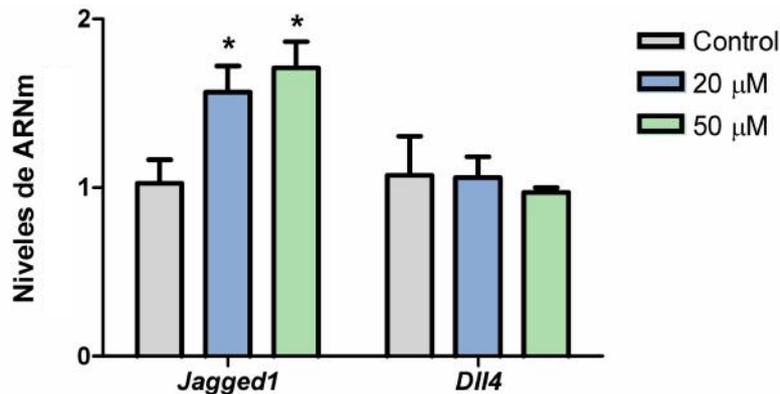


Figura 42. Efecto de ICG-001 sobre la expresión de ligandos de Notch. Niveles relativos de ARNm de *jagged1* y *dll4* luego de 12 horas de cultivo con 20 μ M o 50 μ M de ICG-001. Los niveles de ARNm se expresan como la relación de cada gen y el control interno (*, $p < 0,05$; $n = 4$).

4. Efecto *in vitro* de ICG-001 sobre la expresión de genes regulados por β -catenina

Para estudiar el efecto de la inhibición *in vitro* de la vía Wnt/ β -catenina sobre la expresión de genes regulados por β -catenina, se midieron los niveles de ARNm de *ciclina d1*, *star* y *vegf-a*. Luego de 12 horas de cultivo, la expresión de *ciclina d1* mostró una tendencia a aumentar con 50 μ M de ICG-001 (Figura 43A), mientras que con esta concentración de inhibidor, la expresión de *star* (Figura 43B) y *vegf-a* (Figura 43C) aumentaron significativamente.

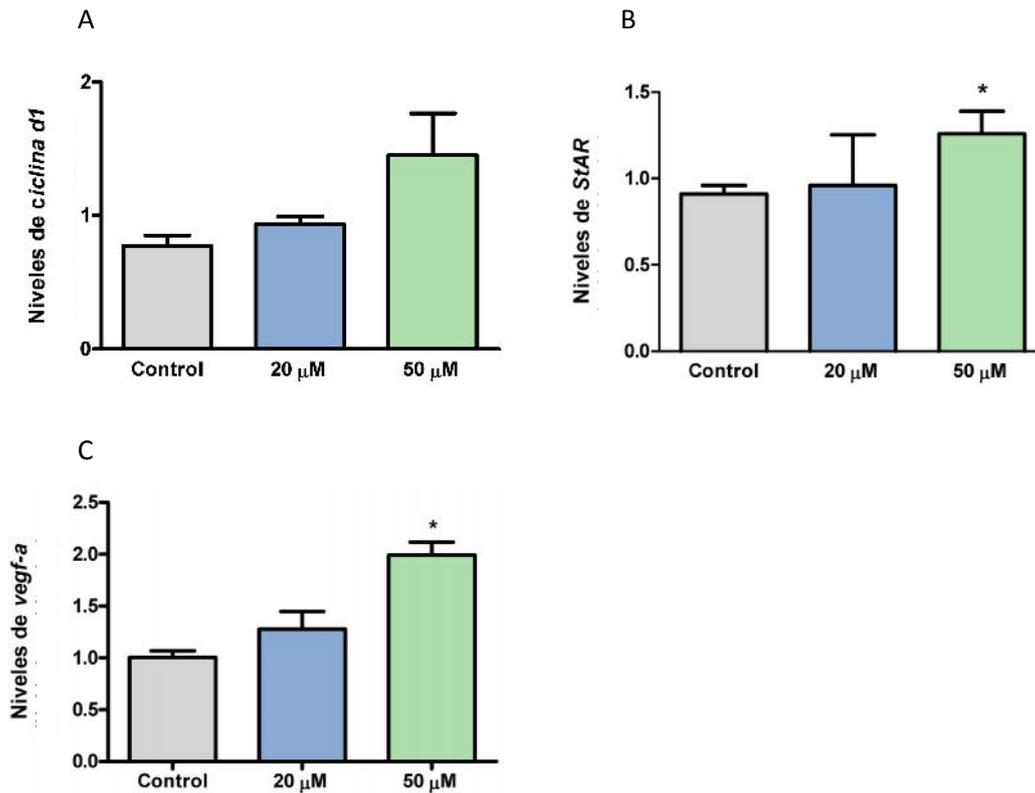


Figura 43. Efecto de ICG-001 sobre la expresión de genes regulados por β -catenina. Niveles relativos de ARNm de (A) *ciclina d1*, (B) *star* y (C) *vegf-a* luego de 12 horas de cultivo con 20 μ M o 50 μ M de ICG-001. Los niveles de ARNm se expresan como la relación entre cada gen y el control interno (*, $p < 0,05$ para *star* y $p < 0,01$ para *vegf-a*; $n=4$).

Si bien *ciclina d1* es un gen blanco de la vía de Wnt/ β -catenina, está reportado que también lo es de la vía de Notch en cáncer de mama, en particular producto de la interacción entre Notch1 y Jagged1 [235]. Esto podría explicar la tendencia de *ciclina d1* a aumentar su expresión luego de 12 horas de cultivo con ICG-001. Para dilucidar si la tendencia al aumento de la expresión de *ciclina d1* se debe al tiempo de cultivo con ICG-001 (12 horas), se midió su expresión a un tiempo menor (6 horas). A este tiempo, se observó una disminución significativa de la expresión de este gen con ambas dosis de inhibidor (Figura 44). Por lo cual, sugerimos que la tendencia al aumento en la expresión de *ciclina d1* luego de 12 horas de cultivo podría deberse a la activación de la vía de Notch.

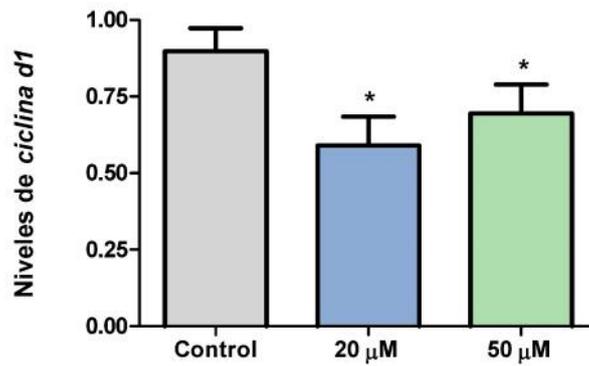


Figura 44. Efecto de ICG-001 sobre la expresión de *ciclina d1*. Niveles relativos de ARNm de *ciclina d1* luego de 6 horas de cultivo con 20 μ M o 50 μ M de ICG-001. Los niveles de ARNm se expresan como la relación entre *ciclina d1* y el control interno (*, $p < 0,05$; $n=4$).

Por otro lado, debido a que *star* y *vegf-a* son genes regulados por varias vías de señalización, es de esperar que no sólo Wnt/ -catenina esté modulando su expresión. Existen trabajos que describen a HIF-1 como regulador de la expresión de ambos genes [167, 236], y que además HIF-1, entre otros factores, está regulado por la vía de Notch a través Hes1 [237]. Para analizar si el aumento de la expresión de *star* y *vegf-a* podría deberse a la acción de HIF-1, se midieron los niveles de ARNm de *hif-1*. Se encontró su expresión significativamente aumentada luego de 12 horas de cultivo con 50 μ M de ICG-001 (Figura 45).

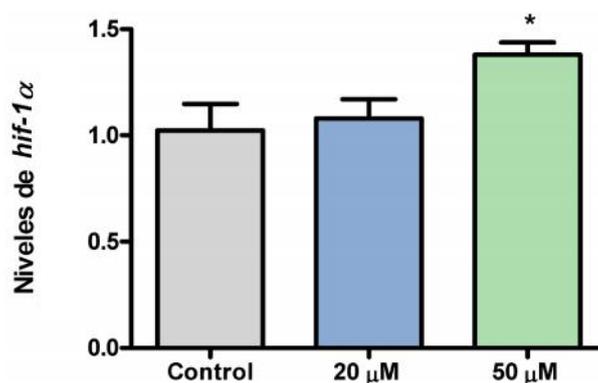


Figura 45. Efecto de ICG-001 sobre la expresión de *hif-1*. Niveles relativos de ARNm de *hif-1* luego de 12 horas de cultivo con 20 μ M o 50 μ M de ICG-001. Los niveles de ARNm se expresan como la relación entre *hif-1* y el control interno (*, $p < 0,05$; $n=4$).

5. Efecto *in vitro* de ICG-001 sobre la función luteal luego de 18 horas de cultivo

Con el objetivo de estudiar si a un mayor tiempo se restablece la funcionalidad del CL, se estudiaron parámetros de función luteal luego de 18 horas de cultivo con ICG-001. Tanto la concentración de progesterona en medio condicionado (Figura 46A) como el contenido proteico de StAR (Figura 46B) alcanzaron los valores del control luego del cultivo por 18 horas.

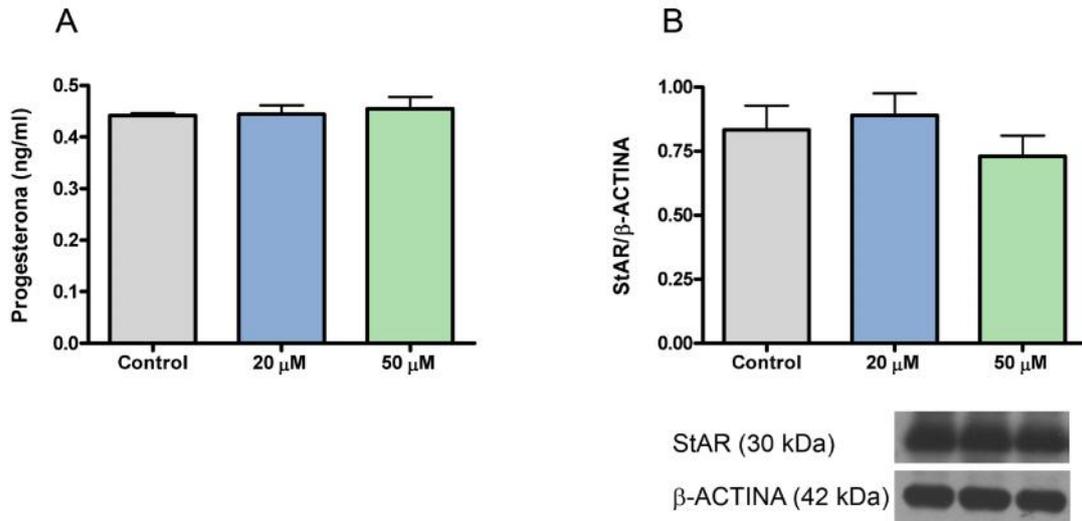


Figura 46. Efecto de ICG-001 sobre la función luteal luego de 18 horas de cultivo. (A) Progesterona en medio de cultivo de CLs cultivados durante 18 horas con 20 μ M o 50 μ M de ICG-001. Los valores se expresan como la media \pm ESM de progesterona en el medio de cultivo, (n = 4). (B) Contenido luteal de StAR luego de 18 horas de cultivo con 20 μ M o 50 μ M de ICG-001. La densidad óptica se expresa como unidades arbitrarias \pm ESM normalizado a β -ACTINA (n=4).

Discusión

El cuerpo lúteo (CL) es una estructura endócrina transitoria esencial para el establecimiento y mantenimiento de la preñez en la mayoría de los mamíferos. El ciclo de vida del CL comprende tres etapas: formación, mantenimiento y regresión. Además, existe una potencial cuarta fase que comprende el rescate y funcionamiento sostenido durante la preñez. Cada fase posee un mecanismo de regulación propio, lo que permite diferenciar unas de las otras. El rol que cumple el CL en la fertilidad es de suma importancia, convirtiéndolo en una estructura finamente regulada por un mecanismo que comprende varias vías de señalización.

Si bien la hormona LH es esencial para estimular y mantener la producción de progesterona por el CL, existen otros factores autócrinos, parácrinos y yuxtácrinos que regulan la función de las células del CL [82]. Los sistemas Notch y Wnt/ -catenina son importantes reguladores de la diferenciación, proliferación y muerte celular [149, 178, 238], tres procesos que están involucrados en el desarrollo y función del CL. Por este motivo nos preguntamos si los sistemas Notch y Wnt/ -catenina podrían formar parte de la compleja red regulatoria que caracteriza al CL.

El sistema Notch regula procesos fundamentales de la función ovárica a través de una señalización yuxtácrina entre las distintas poblaciones celulares. Notch estimula el crecimiento y la maduración folicular mediante la interacción entre células foliculares yuxtapuestas. A su vez, la comunicación entre las células germinales y somáticas es crítica para la formación de los folículos y para el establecimiento del nicho en donde madurará el ovocito. Además, en el ovario existen otras poblaciones celulares que interactúan entre sí, activando la vía de Notch para regular procesos críticos como la luteinización y el desarrollo vascular. Ambos procesos son fundamentales para la producción y secreción de hormonas y factores indispensables para el mantenimiento del embarazo/preñez y la reproducción femenina.

Postulamos que la vía de Notch regula procesos involucrados en la función del CL. Para su demostración, en este trabajo de tesis se evaluó su participación en la regulación de la función luteal y su posible interacción con la acción que ejerce la progesterona sobre el CL.

La producción de progesterona por parte del CL es esencial para la preparación del endometrio uterino para la implantación y mantenimiento del embarazo. En humanos, el CL produce progesterona durante un limitado período de tiempo, hasta que la placenta toma el control de su producción. Por otro lado, la placenta de rata produce una

reducida cantidad de progesterona, y es por ello que el CL de preñez es el responsable de su producción durante todo el tiempo de gestación.

Rothchild fue el primero en postular que la progesterona producida por el CL actúa localmente, regulando la función de las células luteales en mamíferos [239]. Durante los años posteriores, muchos estudios apoyaron esta hipótesis y demostraron que la progesterona cumple un rol autócrino sobre el CL, estimulando su propia producción y además protegiéndolo de la muerte celular [82].

En este trabajo de tesis se observó una disminución de la producción de progesterona al cultivar CLs de ratas superovuladas en presencia de DAPT, un inhibidor de la vía de Notch. A su vez se observó una disminución en el contenido luteal de la enzima P450scc, lo que podría explicar la disminución de la concentración de progesterona. Además, la presencia de progesterona en el medio de cultivo revirtió la disminución de P450scc generada por DAPT, restituyendo el contenido de esta enzima a valores basales. Por otro lado, la presencia de progesterona en el medio de cultivo produjo un aumento en los niveles de StAR, efecto que fue anulado en presencia de DAPT. Estos resultados están en concordancia con el trabajo de Wang y col., en donde al cultivar células luteales de ratón con DAPT o con otro inhibidor de Notch llamado L-658,458 se observó una reducción de la producción de progesterona basal y de la inducida por hCG, junto a una reducción en la expresión de StAR y P450scc [167]. En dicho trabajo también se observó que la sobreexpresión del fragmento activo (NICD) de Notch3 generó un aumento de la producción de progesterona basal y de la inducida por hCG mediante la regulación de StAR y P450scc. Este trabajo concluye que la activación de Notch y la estimulación con hCG tienen efectos sinérgicos sobre la producción de progesterona en CL. Si bien en nuestro sistema experimental no se observó una disminución de StAR en presencia de DAPT, sí se observó que este inhibidor impide el aumento producido por la progesterona, sugiriendo la influencia de Notch sobre la acción autócrina de esta hormona. Esta observación, junto a la disminución del contenido de P450scc, sugiere la existencia una interacción entre el sistema Notch y progesterona en la regulación de la esteroidogénesis luteal.

Previamente en nuestro laboratorio se observó que el cultivo de CLs de preñez en presencia de Aminoglutetimida (AG), un inhibidor de la síntesis de progesterona, produce una disminución en el contenido del NICD de Notch1 [166]. Este resultado está en concordancia con lo observado en endometrio de primates, en donde la progesterona

aumenta el NICD de Notch1 [240]. En dicho trabajo, los autores sugirieron que la progesterona sinergiza con la hCG para activar Notch1, que a su vez inhibe la apoptosis de células estromales. Por otro lado, el cultivo de ovarios de neonatos con el antagonista de progesterona RU486 disminuyó la expresión de *jagged2*, *notch1* y *hey2* [241], concluyendo que es necesario un correcto entorno hormonal para la apropiada regulación de los miembros de la familia de Notch.

Teniendo en cuenta que DAPT es un inhibidor de la γ -secretasa, y que esta enzima posee también otros sustratos, en nuestro modelo experimental también se bloqueó la acción del sistema Notch mediante el uso de un anticuerpo neutralizante de Dll4, que es el ligando descrito con acción luteotrópica [164, 168, 230]. Luego de este bloqueo, disminuyó la producción de progesterona luteal, confirmando que los efectos observados utilizando DAPT son debidos a la inhibición del sistema Notch. Así, García-Pascual y col. también observaron que la administración de un anticuerpo neutralizante de Dll4 en ratones hembras prepúberes estimuladas con gonadotrofinas, resulta en una disminución de la producción de progesterona, asociada a un desarrollo vascular exacerbado y no funcional [230].

Si bien las células de la granulosa y las luteales de rata no expresan el receptor clásico de progesterona, sí expresan altos niveles del componente de membrana del receptor de progesterona tipo 1 (o PGRMC1 por sus siglas en inglés) [86]. PGRMC1 regula la esteroidogénesis [87] y la supervivencia de distintas poblaciones de células ováricas *in vitro* [89, 90]. Se describió que es el PGRMC1 quien media los efectos anti-apoptóticos de la progesterona observados en células de la granulosa de rata [88], células luteales de rata [88] y células granulosa/luteínicas humanas [91]. Además, la progesterona activa el mecanismo dependiente de PGRMC1 que promueve la supervivencia de las células granulosa/luteínicas humanas [92].

Respecto a la supervivencia celular, en esta tesis se observó un aumento de la inmunomarcación para CASP3 clivada y de la relación pro-apoptótica BAX/BCLX_L luego del cultivo con DAPT, mientras que la progesterona disminuyó la marcación para CASP3 clivada, coherente con la acción anti-apoptótica descrita para esta hormona sobre el CL. La inhibición de Notch fue capaz de bloquear la acción anti-apoptótica de la progesterona. Estos resultados sugieren que existe una interacción directa entre el sistema Notch y progesterona que regula la supervivencia de las células del CL. Por otro lado, existen varios reportes que describen la existencia de una interacción entre las vías

de Notch y de PI3K/AKT. En células epiteliales de cáncer de mama, el sistema Notch induce un loop autócrino que activa AKT, necesario para la supervivencia celular [242]. A su vez, Wang y col. [243] reportaron que la inhibición de Notch1 en células de cáncer de próstata produce una disminución del crecimiento celular que está ligada con la inhibición de la fosforilación de AKT, sugiriendo que AKT es blanco de Notch1. Más aún, en nuestro laboratorio se demostró que la fosforilación de AKT se reprime al cultivar células KGN (línea celular tumoral de granulosa) en presencia de DAPT [244]. Más recientemente, se observó que la inhibición de Notch en folículos primordiales interrumpe la activación de la vía PI3K/AKT en la célula germinal femenina, lo que llevaría a una inhibición del desarrollo folicular [167]. En este trabajo de tesis, el cultivo de CL con DAPT disminuyó la fosforilación de AKT, efecto que fue revertido al incubar junto a progesterona. En relación a este resultado, se describió que la progesterona activa las vías de ERK1/2 y PI3K/AKT en cáncer de mama [245] y células estromales de endometrio [246]. Los resultados de esta tesis sugieren la existencia de un mecanismo similar en células del CL, apoyando la hipótesis de que existe una asociación entre el efecto antiapoptótico de progesterona y la vía Notch/PI3K/AKT.

Diversos trabajos implicaron a Notch como regulador de la proliferación celular en ovario. Tanto en un modelo de ratones knockout para Jagged1 y Notch2 [146], como al cultivar en presencia de DAPT o de L-685,458 ovarios de ratones adultos [171], ovarios de ratones neonatos [247] y folículos pre antrales [170], se observó una disminución de la proliferación de las células de la granulosa. En un modelo diferente, en donde se cultivaron ovarios con un disruptor farmacológico de uniones estrechas, se observó una disminución de la expresión de Notch2 en células de la pregranulosa, que resultó en una disminución de la proliferación de dichas células [248].

Para determinar si la proliferación de las células del CL se afecta al inhibir el sistema Notch, se midió el contenido proteico de PCNA, que es un marcador de proliferación celular. Si bien el cultivo con DAPT no modificó los niveles de PCNA, el cultivo con progesterona generó un aumento significativo de esta proteína, efecto que luego fue revertido con la combinación de DAPT + P. A partir de este resultado, concluimos que DAPT interfiere con la proliferación estimulada por progesterona.

Los resultados observados en relación a apoptosis y proliferación celular sustentan el rol autócrino de la progesterona sobre ambos procesos en las células del CL. Además, estas

observaciones son consistentes con el efecto de Notch descrito sobre la regulación de diversos procesos, como proliferación, supervivencia y muerte celular.

En conjunto, estos resultados demuestran por primera vez la existencia de una interacción entre Notch y progesterona que promueve la supervivencia de las células del CL. Notch induce la producción de progesterona *in vitro* regulando el contenido de P450scc y participa en la regulación de la apoptosis y proliferación de las células del CL. La señalización por Notch/PI3K/AKT interacciona con la progesterona, intensificando el rol de supervivencia que esta hormona cumple sobre el CL.

Como se mencionó anteriormente, la vía canónica de Wnt regula procesos que están activamente involucrados en la función del CL. Por este motivo, en primer lugar se estudió si la vía Wnt/ β -catenina se encuentra implicada en la luteinización. Para ello se utilizó el inhibidor XAV939, que disminuye el contenido de β -catenina total y nuclear. Al ser administrado de manera intrabursa, se logra interrumpir *in vivo* la vía canónica de Wnt en el ovario. Sorpresivamente, los resultados obtenidos mostraron que la vía Wnt/ β -catenina sería un regulador del proceso de ovulación. Al cuantificar el porcentaje de las estructuras ováricas en cortes de ovario inyectados con XAV939, se observó la aparición de estructuras quísticas. Estos quistes son grandes estructuras formadas por el antro conteniendo al ovocito, rodeado de una delgada capa de células de la granulosa y células luteales, y en donde no se observa ruptura de la pared folicular. La aparición de los quistes fue acompañada por una disminución en el porcentaje de CLs, efecto que se correlaciona con la falla en la ovulación. Es importante resaltar que estos quistes difieren de aquellos formados por un exceso de andrógenos descritos en el modelo de Síndrome de ovario poliquístico desarrollado en rata [249]. Se concluye que la vía de Wnt/ β -catenina participa en la cascada de eventos que llevan a la ovulación.

Diversos estudios funcionales han demostrado la relevancia del sistema Wnt/ β -catenina en la regulación de la función ovárica y la fertilidad. La participación de esta vía en los eventos mediados por gonadotrofinas remarca la importancia de su función sobre el crecimiento de los folículos, la ovulación y la formación y función del CL.

Durante el desarrollo folicular, los folículos están expuestos a varios miembros de la familia Wnt, lo que culmina con la activación y translocación de β -catenina al núcleo para regular la expresión de genes modulados por la vía Wnt/ β -catenina. Por ejemplo, la maduración de los folículos antrales y la esteroidogénesis [197] están reguladas por β -catenina a través de la vía canónica de Wnt. Sin embargo, estudios recientes

identificaron que β -catenina también está regulada por PKA independientemente de la vía de Wnt. Law y col. describieron que β -catenina media la acción de FSH en los folículos. En células de la granulosa, PKA fosforila a β -catenina en Serinas 552 y 675 en respuesta a FSH [250]. Estas fosforilaciones llevan a la acumulación de β -catenina [251, 252] y al aumento de la actividad transcripcional mediada por el complejo β -catenina/TCF [252, 253], lo cual promueve la expresión de diversos genes, como por ejemplo el del receptor de LH [250].

En un estudio realizado en cultivo de células luteales bovinas se observó que, en respuesta a LH, PKA fosforila a β -catenina en Serina 675, activándola y promoviendo su translocación al núcleo. De esta manera, β -catenina-S675 podría regular la expresión de genes modulados por LH en células luteales [254].

A la luz de estos estudios, resulta evidente que la señalización por Wnt y la activación de β -catenina abarcan múltiples capas de complejidad y dependen del contexto celular.

En células de la granulosa y del cúmulus, el pico pre ovulatorio de LH estimula la expresión de genes asociados con ovulación, expansión del complejo ovocito-cúmulus, maduración del ovocito y luteinización [255]. Entre las proteínas que se inducen en respuesta a LH están el receptor de progesterona, Hif-1 y β -catenina. A su vez, la LH aumenta la expresión de genes reguladores de la función luteal, como P450scc y StAR. Por su parte, el receptor de progesterona aumenta la expresión de factores involucrados en la desestabilización de la matriz extracelular, mientras que Hif-1 regula genes asociados a vascularización. La activación del receptor de progesterona es esencial para que el proceso de ovulación se complete con éxito. Así fue descrito en ratones knockout para el receptor de progesterona, en donde si bien está impedida la ovulación, la luteinización ocurre [256-259], observándose quistes con un fenotipo como el descrito en esta tesis.

En el desarrollo de esta tesis, para evaluar la funcionalidad de la población de CLs formados en nuestro sistema experimental, se midió la concentración sérica de progesterona como reflejo de la función luteal. El bloqueo *in vivo* de la vía Wnt/ β -catenina afectó la funcionalidad del CL ya que se detectó una disminución de la concentración sérica de progesterona. En base a esto se postuló que alguna de las enzimas o proteínas que regulan la esteroidogénesis está siendo modulada por la vía Wnt/ β -catenina. En efecto, se observó una disminución en el contenido luteal de StAR. Esta proteína regula el ingreso de colesterol a la mitocondria y está considerada como

un paso limitante de la síntesis de progesterona [260]. Estos resultados están en concordancia con un estudio realizado en células luteales bovinas, en donde se describió la existencia de una relación entre la reducción de β -catenina debida a la sobreexpresión de GSK-3 con la esteroidogénesis estimulada por LH y la expresión de StAR [261].

La inhibición de la vía canónica de Wnt en el ovario modificó reguladores río abajo de esta vía, dependientes de la acción de β -catenina. Por ejemplo, el eje PI3K/AKT y ERK 1/2 regula la proliferación y supervivencia celular [232, 262]. Si bien se describió a la vía de Wnt como regulador de la actividad de AKT [185], en nuestro modelo experimental no se ha observado modificación en la fosforilación de esta proteína al tiempo evaluado. Sin embargo, la inhibición de Wnt disminuyó la fosforilación de ERK, reflejando una disminución de su actividad. Este resultado demuestra por primera vez que en algún punto existe una interacción entre las vías Wnt/ β -catenina y ERK en CL de rata. La inhibición de la vía Wnt/ β -catenina también produjo un aumento de la apoptosis de las células del CL, sugiriendo que la interacción Wnt/ β -catenina/ERK podría regular la supervivencia de las células del CL. Sin embargo, se requieren más experimentos para poder confirmar esta hipótesis.

Existen varios trabajos que apoyan el papel de las vías canónica y no canónica de Wnt en angiogénesis en distintos tejidos [199, 202-204]. La primera evidencia de la implicancia de Wnt en angiogénesis fue hallada en ratones knockout homocigotas para Fzd4 ($Fzd4^{-/-}$), en donde se observaron defectos en la vasculatura de la retina, evidenciado por un retraso en la angiogénesis y acompañado por la formación de vasos defectuosos [202]. Posteriormente, Hsieh y col. notaron que dichos ratones $Fzd4^{-/-}$ presentaban defectos en la vasculatura del CL, donde los vasos tenían una morfología de tipo temprano, dando idea de fallas en el proceso de arborización [199]. En el conocimiento de que la formación de una correcta red vascular es indispensable para el desarrollo y la función del CL, sumado a las alteraciones observadas en el funcionamiento luteal, nos preguntamos si el desarrollo vascular en nuestro sistema experimental fue el apropiado. Para ello se marcaron las células endoteliales con lectina BS-1 y se cuantificó el área endotelial en CL. La marcación con lectina evidenció una disminución en el porcentaje de área endotelial en los CLs provenientes de ovarios tratados con XAV939.

Diversos estudios demostraron que las células endoteliales son sensibles al sistema Wnt. Los ligandos Wnt son factores que podrían estar producidos por distintos tipos celulares

y actuar en forma parácrina sobre las células endoteliales [204], regulando por ejemplo los niveles de VEGF-A y, en consecuencia, la proliferación celular. Está descrito que el complejo transcripcional β -catenina/TCF regula la expresión de *vegfa* [204]. En esta tesis, al evaluar el contenido proteico de VEGF-A luteal, se observó una disminución en los niveles de la isoforma 120 en aquellos CLs provenientes de ovarios inyectados con XAV939. Las diferentes isoformas de VEGF promueven distintas funciones dependiendo del lecho vascular [263] y se expresan diferencialmente durante la progresión del CL [264]. Estudios realizados en cultivo primario de células endoteliales (HUVECs) implicaron a la vía Wnt/ β -catenina como promotor de la proliferación y supervivencia de las células endoteliales [205]. En esta tesis se observó que la inhibición de la vía Wnt/ β -catenina produjo una disminución en los niveles de PCNA luteal. Además, la inmunomarcación para PCNA evidenció marca en células pequeñas del CL, como las células luteales pequeñas y células endoteliales. En roedores, el crecimiento del CL depende del aumento de tamaño de las células luteales grandes y de la división de las células luteales pequeñas y de las células endoteliales [94]. A su vez, la proliferación celular no cesa durante la luteinización: si bien la división de las células de la granulosa se detiene, las células de la teca, las endoteliales y los fibroblastos continúan dividiéndose [265]. Habiendo observado que XAV939 disminuyó el contenido proteico de VEGF y PCNA y redujo el área endotelial, se sugiere que VEGF estaría regulando la proliferación de las células endoteliales, posiblemente mediado por la vía Wnt/ β -catenina. Para poner a prueba esta hipótesis se realizó una doble marcación, en donde cortes de ovarios fueron marcados simultáneamente con PCNA y con lectina BS-1 fluoresceinada como marcador de células endoteliales. Así, se cuantificaron las células doble positivas en CL y se observó que del total de células proliferando, el 94% corresponde a células endoteliales, tanto en el grupo control como en el tratado con XAV939. Este resultado muestra que la disminución observada en el contenido de PCNA se debe a una disminución de la proliferación de las células endoteliales.

La función del ovario depende del correcto establecimiento y del continuo remodelado de la vasculatura, lo que le permite a los folículos en crecimiento recibir el suministro de nutrientes, oxígeno y hormonas requeridos para su desarrollo. La interrupción del proceso de angiogénesis reduce el crecimiento de los folículos, impide la ovulación y afecta el desarrollo del CL. Así, es indispensable un apropiado desarrollo vascular del

estroma y de la células de la teca para mantener el desarrollo y la función de los folículos y evitar la atresia folicular [57, 266, 267]. La disminución en el porcentaje de folículos que logran ovular al inhibir la vía Wnt/ -catenina nos condujo a pensar si la vasculatura estromal y folicular estaba alterada. La cuantificación de la marca de lectina evidenció una disminución del área endotelial tanto en estroma como en folículos, sugiriendo que esta alteración podría ser una posible causa que explique la falla en el proceso de ovulación.

Existen varios trabajos que describen la existencia de una interacción entre las vías de Wnt/ -catenina y Notch [217-219] y otros donde se postula que juntas regulan procesos como desarrollo [220], diferenciación [221] y angiogénesis [222] en distintos tejidos. Sin embargo, los resultados de esta tesis son la primera evidencia de que dicha interacción ocurre en el CL de rata. El estudio de la interacción entre Wnt/ -catenina y Notch mostró que, ante la inhibición de Wnt/ -catenina, las células del CL promueven la activación de la vía de Notch, posiblemente como mecanismo compensatorio para recuperar la homeostasis celular. En efecto, tres genes regulados por -catenina, como *ciclina d1*, *star* y *vegf-a*, aumentaron o mostraron una tendencia al aumento en su expresión, luego del cultivo con ICG-001 por 12 horas. El estudio a un tiempo menor evidenció que la expresión de *ciclina d1* disminuye luego de cultivar los CLs durante 12 horas con ICG-001, lo que explicaría la disminución en su contenido proteico a las 12 horas. La tendencia al aumento en la expresión de *ciclina d1* a las 12 horas de cultivo podría ser consecuencia de la activación de la vía de Notch. Está reportado que *ciclina d1* es un gen blanco de la vía de Notch en cáncer de mama, en particular producto de la interacción entre Notch1 y Jagged1 [235], lo cual da relevancia a nuestros resultados que muestran que la expresión de este receptor y ligando aumenta luego del cultivo con ICG-001. Por otro lado, en células luteales de ratón se reportó que el sistema Notch estimula la expresión de *star* [167]. Esta podría ser la razón por la que aumenta su expresión luego de 12 horas de cultivo, buscando revertir la disminución de su contenido proteico y de la concentración de progesterona causados por la inhibición de Wnt/ -catenina. De hecho, luego de 18 horas de cultivo se observó que tanto la concentración de progesterona como los niveles de StAR se restablecieron a valores del control. Este resultado fortalece nuestra hipótesis de que la estimulación del sistema Notch ocurre como mecanismo compensatorio a la inhibición del sistema Wnt/ -catenina. Respecto a *vegf-a*, está extensamente descrito que HIF-1 es el principal

estímulo para la expresión de este gen [236]. Más aún, la expresión de *hif-1* aumenta en respuesta a hCG [268, 269], coherente con la necesidad de estimular la expresión de *vegf-a* para la vascularización del CL. Si bien son varios los factores que influyen a HIF-1, está descrito que Notch regula, a través de Hes1, la activación de STAT3, que en consecuencia aumenta la expresión de *hif-1* [237]. Por su parte, *hif-1* además de regular a *vegf*, estimula la expresión de *star* en células de la granulosa murinas [270]. Habiendo observado, luego del cultivo con ICG-001, un aumento de la expresión de *hes1* y *hif-1*, sugerimos que son en parte responsables del aumento de la expresión de *star* y *vegf*. Sin embargo, se requiere de más experimentos para comprobar esta hipótesis.

El ovario es un órgano en el que suceden cambios permanentes y por lo tanto está dinámicamente regulado por una amplia red de señalización que involucra mecanismos endócrinos, parácrinos y yuxtácrinos. Entender estas vías de señalización en el microambiente del ovario resulta fundamental para comprender los mecanismos mediante los cuales los folículos maduran hasta alcanzar la ovulación y la consecuente luteinización. Como se ha estudiado a lo largo de esta tesis, la señalización yuxtácrina a través del sistema Notch y la endócrina a través de Wnt/ -catenina, son importantes reguladores de la formación y función del CL. El estudio de los mecanismos que regulan la formación, función y regresión del CL contribuyen a la comprensión de diversas patologías, como la infertilidad asociada a la disfunción luteal. En humanos, el síndrome de fase luteínica inadecuada está caracterizado por una la fase lútea corta y por bajos niveles de progesterona. La falta de una etiología clara genera que haya pocas terapias que reviertan la infertilidad exitosamente en las pacientes que sufren este síndrome. Por este motivo, estudiar la interacción entre múltiples tipos de señalización celular en el ovario resulta crucial para el abordaje de estrategias relacionadas a la salud reproductiva femenina y a la preservación de la fertilidad.

Modelo propuesto

A lo largo de esta tesis se estudiaron mecanismos moleculares mediante los cuales el CL se mantiene como una estructura funcional. Los resultados obtenidos permiten proponer un modelo en donde se resume la acción de las vías Notch y Wnt/ β -catenina, quienes junto a progesterona, regulan la función del CL (Figura 47).

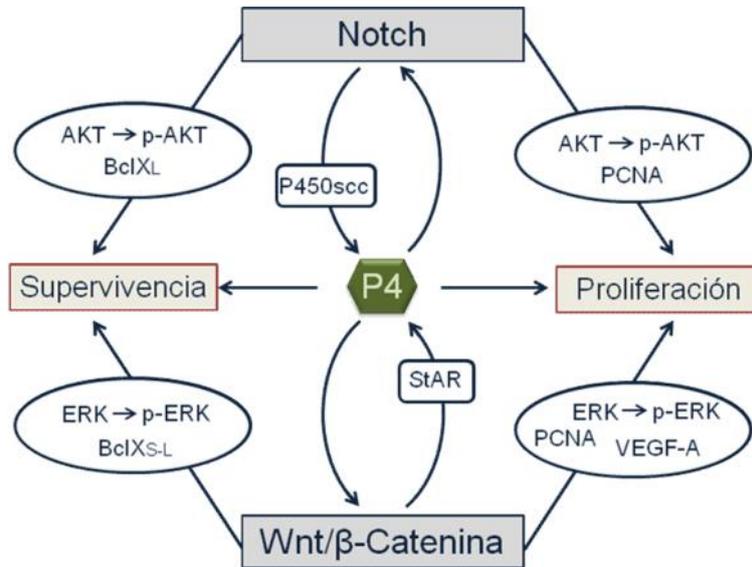


Figura 47. Modelo propuesto de regulación de la funcionalidad del CL. Acción de la progesterona y de las vías Notch y Wnt/ β -catenina sobre los distintos procesos involucrados en la función del CL.

El sistema Notch regula la producción de progesterona a través de la enzima P450scc, y a su vez, progesterona regula a Notch. Esta vía también regula la proliferación y la supervivencia de las células del CL, presumiblemente a través de la vía de AKT. En consecuencia, se modula la proliferación de las células del CL y el balance entre proteínas pro:anti-apoptóticas. Por otro lado, el sistema Wnt/ β -catenina regula la producción de progesterona a través StAR, y a su vez, progesterona regula el contenido de β -catenina. Esta vía también regula la proliferación y la supervivencia de las células del CL, posiblemente a través de la vía de ERK. En consecuencia, se modula la proliferación de las células del CL y el balance entre proteínas pro:anti-apoptóticas. Es de señalar la relevancia de los datos que demuestran que la vía de Wnt/ β -catenina regula el desarrollo vascular del CL, modulando el contenido de VEGF-A y así la proliferación de las células endoteliales.

Bibliografía

1. Thibault, C., M.-C. Levasseur, and R.H.F. Hunter, *Reproduction in Mammals and Man*. English revised edition ed. 1993.
2. McGee, E.A. and A.J. Hsueh, *Initial and cyclic recruitment of ovarian follicles*. *Endocr.Rev.*, 2000. **21**(2): p. 200-214.
3. Maekawa, A., *Pathology of tumours in laboratory animals. Tumours of the rat. Tumours of the ovary*. IARC Sci.Publ., 1990(99): p. 473-497.
4. W., B. and F. W.D., *Tratado de Histología*. 11^{aba} ed. 1997, Madrid: Mc. Graw Hill - Interamericana.
5. Hill, M., *The Female Reproductive System*. 2009.
6. Irving-Rodgers, H.F. and R.J. Rodgers, *Ultrastructure of the basal lamina of bovine ovarian follicles and its relationship to the membrana granulosa*. *J.Reprod.Fertil.*, 2000. **118**(2): p. 221-228.
7. Elvin, J.A. and M.M. Matzuk, *Mouse models of ovarian failure*. *Rev.Reprod.*, 1998. **3**(3): p. 183-195.
8. Adashi, E.Y., et al., *Insulin-like growth factor (IGF) binding protein-1 is an antigonadotropin: evidence that optimal follicle-stimulating hormone action in ovarian granulosa cells is contingent upon amplification by endogenously-derived IGFs*. *Adv.Exp.Med.Biol.*, 1993. **343**: p. 377-385.
9. Orisaka, M., et al., *Growth differentiation factor 9 is antiapoptotic during follicular development from preantral to early antral stage*. *Mol.Endocrinol.*, 2006. **20**(10): p. 2456-2468.
10. Hirshfield, A.N., *Development of follicles in the mammalian ovary*. *Int.Rev.Cytol.*, 1991. **124**: p. 43-101.
11. *The Ovary*. 2nd ed. 2004: Elsevier, Academic Press.
12. McGee, E.A., *The regulation of apoptosis in preantral ovarian follicles*. *Biol Signals Recept.*, 2000. **9**(2): p. 81-86.
13. Oxberry, A, and G. GS, *An autoradiographic study of the binding of 125 I-labeled follicle-stimulating hormone, human chorionic gonadotropin and prolactin to the hamster ovary throughout the estrous cycle*. *Biol Repr*, 1982. **27**(2): p. 505-516.
14. Amsterdam, A., et al., *Distribution of binding sites for human chorionic gonadotropin in the preovulatory follicle of the rat*. *J.Cell Biol.*, 1975. **67**(3): p. 894-900.
15. Eppig, J.J., *FSH stimulates hyaluronic acid synthesis by oocyte-cumulus cell complexes from mouse preovulatory follicles*. *Nature*, 1979. **281**(5731): p. 483-484.
16. Dekel, N., D. Galiani, and I. Sherizly, *Dissociation between the inhibitory and the stimulatory action of cAMP on maturation of rat oocytes*. *Mol.Cell Endocrinol.*, 1988. **56**(1-2): p. 115-121.
17. Phillips, D.M. and N. Dekel, *Effect of gonadotropins and prostaglandin on cumulus mucification in cultures of intact follicles*. *J.Exp.Zool.*, 1982. **221**(3): p. 275-282.
18. Kumar, T.R., et al., *Follicle stimulating hormone is required for ovarian follicle maturation but not male fertility*. *Nat.Genet.*, 1997. **15**(2): p. 201-204.
19. Gougeon, A. and J. Testart, *Germinal vesicle breakdown in oocytes of human atretic follicles during the menstrual cycle*. *J.Reprod.Fertil.*, 1986. **78**(2): p. 389-401.
20. Yen, S.S.C., R.B. Jaffe, and R.L. Barbieri, *Endocrinología de la Reproducción*. 4^{ta} ed. 2001.

21. Zeleznik, A.J., H.M. Schuler, and L.E. Reichert, Jr., *Gonadotropin-binding sites in the rhesus monkey ovary: role of the vasculature in the selective distribution of human chorionic gonadotropin to the preovulatory follicle*. *Endocrinology*, 1981. **109**(2): p. 356-362.
22. Vitale, A.M., et al., *Inhibin a increases apoptosis in early ovarian antral follicles of diethylstilbestrol-treated rats*. *Biol.Reprod.*, 2002. **67**(6): p. 1989-1995.
23. Zeleznik, A.J., A.R. Midgley, Jr., and L.E. Reichert, Jr., *Granulosa cell maturation in the rat: increased binding of human chorionic gonadotropin following treatment with follicle-stimulating hormone in vivo*. *Endocrinology*, 1974. **95**(3): p. 818-825.
24. Wang, X.N. and G.S. Greenwald, *Synergistic effects of steroids with FSH on folliculogenesis, steroidogenesis and FSH- and hCG-receptors in hypophysectomized mice*. *J Reprod.Fertil.*, 1993. **99**(2): p. 403-413.
25. Foghi, A., et al., *Induction of apoptosis in thecal/interstitial cells: action of transforming growth factor (TGF) alpha plus TGF beta on bcl-2 and interleukin-1 beta-converting enzyme*. *J.Endocrinol.*, 1998. **157**(3): p. 489-494.
26. Tilly, J.L., et al., *Involvement of apoptosis in ovarian follicular atresia and postovulatory regression*. *Endocrinology*, 1991. **129**(5): p. 2799-2801.
27. Parborell, F., et al., *Effects of a gonadotropin-releasing hormone agonist on rat ovarian follicle apoptosis: Regulation by EGF and the expression of Bcl-2-related genes*. *Biol.Reprod.*, 2002. **67**: p. 481-486.
28. Parborell, F., et al., *GnRH antagonist Antide inhibits apoptosis of preovulatory follicle cells in rat ovary*. *Biol Repr*, 2005. **72**: p. 659-666.
29. Chun, S.Y. and A.J. Hsueh, *Paracrine mechanisms of ovarian follicle apoptosis*. *J Reprod.Immunol.*, 1998. **39**(1-2): p. 63-75.
30. Billig, H., I. Furuta, and A.J. Hsueh, *Estrogens inhibit and androgens enhance ovarian granulosa cell apoptosis*. *Endocrinology*, 1993. **133**(5): p. 2204-2212.
31. Carson, R.S., et al., *Estradiol, testosterone, and androstenedione in ovine follicular fluid during growth and atresia of ovarian follicles*. *Biol.Reprod.*, 1981. **24**(1): p. 105-113.
32. Braw, R.H. and A. Tsafirri, *Effect of PMSG on follicular atresia in the immature rat ovary*. *J.Reprod.Fertil.*, 1980. **59**(2): p. 267-272.
33. Chun, S.Y., et al., *Gonadotropin suppression of apoptosis in cultured preovulatory follicles: mediatory role of endogenous insulin-like growth factor I*. *Endocrinology*, 1994. **135**(5): p. 1845-1853.
34. Knobil, E. and J.D. Neill, *Physiology of Reproduction*. 3 Rev Ed edition ed. 2005.
35. Caron, M.G., et al., *Protein kinase stimulation of a reconstituted cholesterol side chain cleavage enzyme system in the bovine corpus luteum*. *J Biol Chem*, 1975. **250**(13): p. 5137-5143.
36. Brawer, J.R., M. Munoz, and R. Farookhi, *Development of the polycystic ovarian condition (PCO) in the estradiol valerate-treated rat*. *Biol Reprod.*, 1986. **35**(3): p. 647-655.
37. Rizk, B., et al., *The role of vascular endothelial growth factor and interleukins in the pathogenesis of severe ovarian hyperstimulation syndrome*. *Hum.Reprod.Update.*, 1997. **3**(3): p. 255-266.
38. GD, N. and N. TM, *Corpus luteum and its control in infraprimate species*, in *The Physiology of Reproduction*, K. E and N. J.D., Editors. 1994, Raven Press: New York. p. 781-816.

39. Strauss, J.F., III and R.L. Stambaugh, *Induction of 20 alpha-hydroxysteroid dehydrogenase in rat corpora lutea of pregnancy by prostaglandin F-2 alpha*. Prostaglandins, 1974. **5**(1): p. 73-85.
40. Sterneck, E., L. Tessarollo, and P.F. Johnson, *An essential role for C/EBPbeta in female reproduction*. Genes Dev., 1997. **11**(17): p. 2153-2162.
41. Espey, L.L., et al., *Induction of early growth response protein-1 gene expression in the rat ovary in response to an ovulatory dose of human chorionic gonadotropin*. Endocrinology, 2000. **141**(7): p. 2385-2391.
42. Natraj, U. and J.S. Richards, *Hormonal regulation, localization, and functional activity of the progesterone receptor in granulosa cells of rat preovulatory follicles*. Endocrinology, 1993. **133**(2): p. 761-769.
43. Lee, A., et al., *Vascular endothelial growth factor production by human luteinized granulosa cells in vitro*. Hum.Reprod., 1997. **12**(12): p. 2756-2761.
44. Wulff, C., et al., *Angiogenesis in the human corpus luteum: localization and changes in angiopoietins, tie-2, and vascular endothelial growth factor messenger ribonucleic acid*. J.Clin.Endocrinol.Metab, 2000. **85**(11): p. 4302-4309.
45. Ascoli, M., F. Fanelli, and D.L. Segaloff, *The lutropin/choriogonadotropin receptor, a 2002 perspective*. Endocr.Rev., 2002. **23**(2): p. 141-174.
46. Mukherjee, A., O.K. Park-Sarge, and K.E. Mayo, *Gonadotropins induce rapid phosphorylation of the 3',5'-cyclic adenosine monophosphate response element binding protein in ovarian granulosa cells*. Endocrinology, 1996. **137**(8): p. 3234-3245.
47. Arias, J., et al., *Activation of cAMP and mitogen responsive genes relies on a common nuclear factor*. Nature, 1994. **370**(6486): p. 226-229.
48. Park, J.Y., et al., *Phosphodiesterase regulation is critical for the differentiation and pattern of gene expression in granulosa cells of the ovarian follicle*. Mol.Endocrinol., 2003. **17**(6): p. 1117-1130.
49. Donadeu, F.X. and M. Ascoli, *The differential effects of the gonadotropin receptors on aromatase expression in primary cultures of immature rat granulosa cells are highly dependent on the density of receptors expressed and the activation of the inositol phosphate cascade*. Endocrinology, 2005. **146**(9): p. 3907-3916.
50. Robker, R.L. and J.S. Richards, *Hormone-induced proliferation and differentiation of granulosa cells: a coordinated balance of the cell cycle regulators cyclin D2 and p27Kip1*. Mol Endocrinol, 1998. **12**(7): p. 924-940.
51. Murphy, B.D., *Models of luteinization*. Biol Reprod., 2000. **63**(1): p. 2-11.
52. el Fouly, M.A., et al., *Role of the ovum in follicular luteinization*. Endocrinology, 1970. **87**(2): p. 286-293.
53. Pangas, S.A. and M.M. Matzuk, *Genetic models for transforming growth factor beta superfamily signaling in ovarian follicle development*. Mol.Cell Endocrinol., 2004. **225**(1-2): p. 83-91.
54. Pangas, S.A., et al., *Premature luteinization and cumulus cell defects in ovarian-specific Smad4 knockout mice*. Mol.Endocrinol., 2006. **20**(6): p. 1406-1422.
55. Bagavandoss, P., *Differential distribution of gelatinases and tissue inhibitor of metalloproteinase-1 in the rat ovary*. J.Endocrinol., 1998. **158**(2): p. 221-228.
56. Aten, R.F., T.R. Kolodecik, and H.R. Behrman, *A cell adhesion receptor antiserum abolishes, whereas laminin and fibronectin glycoprotein components of extracellular matrix promote, luteinization of cultured rat granulosa cells*. Endocrinology, 1995. **136**(4): p. 1753-1758.

57. Abramovich, D., F. Parborell, and M. Tesone, *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): p. 434-441.
58. Kashida, S., et al., *Regulation and role of vascular endothelial growth factor in the corpus luteum during mid-pregnancy in rats*. Biol.Reprod., 2001. **64**(1): p. 317-323.
59. Zimmermann, R.C., et al., *Preovulatory treatment of mice with anti-VEGF receptor 2 antibody inhibits angiogenesis in corpora lutea*. Microvasc.Res., 2001. **62**(1): p. 15-25.
60. Hazzard, T.M., et al., *Injection of antiangiogenic agents into the macaque preovulatory follicle: disruption of corpus luteum development and function*. Endocrine., 2002. **17**(3): p. 199-206.
61. Ferrara, N., et al., *Vascular endothelial growth factor is essential for corpus luteum angiogenesis*. Nat.Med., 1998. **4**(3): p. 336-340.
62. Pauli, S.A., et al., *The vascular endothelial growth factor (VEGF)/VEGF receptor 2 pathway is critical for blood vessel survival in corpora lutea of pregnancy in the rodent*. Endocrinology, 2005. **146**(3): p. 1301-1311.
63. Fiedler, U. and H.G. Augustin, *Angiopoietins: a link between angiogenesis and inflammation*. Trends Immunol., 2006. **27**(12): p. 552-558.
64. Maisonpierre, P.C., et al., *Angiopoietin-2, a natural antagonist for Tie2 that disrupts in vivo angiogenesis*. Science, 1997. **277**(5322): p. 55-60.
65. Ragoobir, J., et al., *Stimulation of progesterone production in human granulosa-lutein cells by lipoproteins: evidence for cholesterol-independent actions of high-density lipoproteins*. J.Endocrinol., 2002. **173**(1): p. 103-111.
66. Seedorf, U., P. Ellinghaus, and N.J. Roch, *Sterol carrier protein-2*. Biochim.Biophys.Acta, 2000. **1486**(1): p. 45-54.
67. McLean, M.P., et al., *Estradiol regulation of sterol carrier protein-2 independent of cytochrome P450 side-chain cleavage expression in the rat corpus luteum*. Endocrinology, 1989. **125**(3): p. 1337-1344.
68. Rennert, H., et al., *Regulated expression of sterol carrier protein 2 in the ovary: a key role for cyclic AMP*. Biochemistry, 1991. **30**(47): p. 11280-11285.
69. Niswender, G.D., *Molecular control of luteal secretion of progesterone*. Reproduction., 2002. **123**(3): p. 333-339.
70. Seong, H.H., *Change in ovarian and placental 20 -HSD activity during the pregnancy in the rat* Asian-Aust. J. Anim. Sci. , 2002. **16**(2): p. 342-347.
71. Stocco, D.M., *StAR protein and the regulation of steroid hormone biosynthesis*. Annu.Rev.Physiol, 2001. **63**: p. 193-213.
72. Bogan, R.L., T.L. Davis, and G.D. Niswender, *Peripheral-type benzodiazepine receptor (PBR) aggregation and absence of steroidogenic acute regulatory protein (StAR)/PBR association in the mitochondrial membrane as determined by bioluminescence resonance energy transfer (BRET)*. J.Steroid Biochem.Mol.Biol., 2007. **104**(1-2): p. 61-67.
73. West, L.A., et al., *Steroidogenic acute regulatory protein and peripheral-type benzodiazepine receptor associate at the mitochondrial membrane*. Endocrinology, 2001. **142**(1): p. 502-505.
74. Sanders, S.L. and R.L. Stouffer, *Localization of steroidogenic enzymes in macaque luteal tissue during the menstrual cycle and simulated early pregnancy: immunohistochemical evidence supporting the two-cell model for*

- estrogen production in the primate corpus luteum*. Biol.Reprod., 1997. **56**(5): p. 1077-1087.
75. Hickey, G.J., et al., *Aromatase cytochrome P450 and cholesterol side-chain cleavage cytochrome P450 in corpora lutea of pregnant rats: diverse regulation by peptide and steroid hormones*. Endocrinology, 1989. **125**(3): p. 1673-1682.
 76. Stouffer, R.L., *Progesterone as a mediator of gonadotrophin action in the corpus luteum: beyond steroidogenesis*. Hum.Reprod.Update., 2003. **9**(2): p. 99-117.
 77. Risk, M., et al., *Cloning and characterization of a 5' regulatory region of the prolactin receptor-associated protein/17{beta} hydroxysteroid dehydrogenase 7 gene*. Endocrinology, 2005. **146**(6): p. 2807-2816.
 78. Richards, J.S. and J.J. Williams, *Luteal cell receptor content for prolactin (PRL) and luteinizing hormone (LH): regulation by LH and PRL*. Endocrinology, 1976. **99**(6): p. 1571-1581.
 79. Gibori, G., P.L. Keyes, and J.S. Richards, *A role for intraluteal estrogen in the mediation of luteinizing hormone action on the rat corpus luteum during pregnancy*. Endocrinology, 1978. **103**(1): p. 162-169.
 80. Gibori, G., R. Rodway, and I. Rothchild, *The luteotrophic effect of estrogen in the rat: prevention by estradiol of the luteolytic effect of an antiserum to luteinizing hormone in the pregnant rat*. Endocrinology, 1977. **101**(6): p. 1683-1689.
 81. Butler, W.R., J. Hotchkiss, and E. Knobil, *Functional luteolysis in the rhesus monkey: ovarian estrogen and progesterone during the luteal phase of the menstrual cycle*. Endocrinology, 1975. **96**(6): p. 1509-1512.
 82. Stocco, C., C. Telleria, and G. Gibori, *The molecular control of corpus luteum formation, function, and regression*. Endocr.Rev., 2007. **28**(1): p. 117-149.
 83. Kuranaga, E., et al., *Progesterone is a cell death suppressor that downregulates Fas expression in rat corpus luteum*. FEBS Lett., 2000. **466**(2-3): p. 279-282.
 84. Robker, R.L., et al., *Progesterone-regulated genes in the ovulation process: ADAMTS-1 and cathepsin L proteases*. Proc.Natl.Acad.Sci.U.S.A, 2000. **97**(9): p. 4689-4694.
 85. Ashley, R.L., et al., *Cloning and characterization of an ovine intracellular seven transmembrane receptor for progesterone that mediates calcium mobilization*. Endocrinology, 2006. **147**(9): p. 4151-4159.
 86. Peluso, J.J., et al., *Progesterone membrane receptor component 1 expression in the immature rat ovary and its role in mediating progesterone's antiapoptotic action*. Endocrinology, 2006. **147**(6): p. 3133-3140.
 87. Hughes, A.L., et al., *Dapl/PGRMC1 binds and regulates cytochrome P450 enzymes*. Cell Metab, 2007. **5**(2): p. 143-9.
 88. Peluso, J.J., et al., *Expression and function of PAIRBP1 within gonadotropin-primed immature rat ovaries: PAIRBP1 regulation of granulosa and luteal cell viability*. Biol.Reprod., 2005. **73**(2): p. 261-270.
 89. Peluso, J.J., J. Romak, and X. Liu, *Progesterone receptor membrane component-1 (PGRMC1) is the mediator of progesterone's antiapoptotic action in spontaneously immortalized granulosa cells as revealed by PGRMC1 small interfering ribonucleic acid treatment and functional analysis of PGRMC1 mutations*. Endocrinology, 2008. **149**(2): p. 534-43.
 90. Peluso, J.J., et al., *Progesterone inhibits apoptosis in part by PGRMC1-regulated gene expression*. Mol Cell Endocrinol, 2010. **320**(1-2): p. 153-61.

91. Engmann, L., et al., *Progesterone regulation of human granulosa/luteal cell viability by an RU486-independent mechanism*. J.Clin.Endocrinol.Metab, 2006. **91**(12): p. 4962-4968.
92. Peluso, J.J., et al., *Progesterone activates a progesterone receptor membrane component 1-dependent mechanism that promotes human granulosa/luteal cell survival but not progesterone secretion*. J.Clin.Endocrinol.Metab, 2009. **94**(7): p. 2644-2649.
93. Patel, T., G.J. Gores, and S.H. Kaufmann, *The role of proteases during apoptosis*. FASEB J, 1996. **10**(5): p. 587-597.
94. Bachelot, A. and N. Binart, *Corpus luteum development: lessons from genetic models in mice*. Curr.Top.Dev.Biol, 2005. **68**: p. 49-84.
95. Pharriss, B.B. and L.J. Wyngarden, *The effect of prostaglandin F 2alpha on the progesterone content of ovaries from pseudopregnant rats*. Proc.Soc.Exp.Biol.Med., 1969. **130**(1): p. 92-94.
96. Stocco, C.O., et al., *Prostaglandin F2alpha-induced expression of 20alpha-hydroxysteroid dehydrogenase involves the transcription factor NUR77*. J.Biol Chem., 2000. **275**(47): p. 37202-37211.
97. Behrman, H.R., D.L. Grinwich, and M. Hichens, *Studies on the mechanism of PGF2alpha and gonadotropin interactions on LH receptor function in corpora lutea during luteolysis*. Adv.Prostaglandin Thromboxane Res., 1976. **2**: p. 655-666.
98. Peluffo, M.C., K.A. Young, and R.L. Stouffer, *Dynamic Expression of Caspase-2, -3, -8, and -9 Proteins and Enzyme Activity, But Not Messenger Ribonucleic Acid, in the Monkey Corpus Luteum during the Menstrual Cycle*. J.Clin.Endocrinol.Metab, 2005. **90**(4): p. 2327-2335.
99. Chinnaiyan, A.M. and V.M. Dixit, *The cell-death machine*. Curr.Biol., 1996. **6**(5): p. 555-562.
100. Cryns, V. and J. Yuan, *Proteases to die for*. Genes Dev., 1998. **12**(11): p. 1551-1570.
101. Thornberry, N.A. and Y. Lazebnik, *Caspases: enemies within*. Science, 1998. **281**(5381): p. 1312-1316.
102. Peluffo, M.C., R.L. Stouffer, and M. Tesone, *Activity and expression of different members of the caspase family in the rat corpus luteum during pregnancy and postpartum*. Am.J Physiol Endocrinol.Metab, 2007. **293**(5): p. E1215-E1223.
103. Kerr, J.F., A.H. Wyllie, and A.R. Currie, *Apoptosis: a basic biological phenomenon with wide-ranging implications in tissue kinetics*. Br.J.Cancer, 1972. **26**(4): p. 239-257.
104. Cory, S. and J.M. Adams, *The Bcl2 family: regulators of the cellular life-or-death switch*. Nat.Rev.Cancer, 2002. **2**(9): p. 647-656.
105. Cory, S., D.C. Huang, and J.M. Adams, *The Bcl-2 family: roles in cell survival and oncogenesis*. Oncogene, 2003. **22**(53): p. 8590-8607.
106. Chun, S.Y., et al., *Growth factors in ovarian follicle atresia*. Semin.Reprod.Endocrinol., 1996. **14**(3): p. 197-202.
107. Billig, H., I. Furuta, and A.J. Hsueh, *Gonadotropin-releasing hormone directly induces apoptotic cell death in the rat ovary: biochemical and in situ detection of deoxyribonucleic acid fragmentation in granulosa cells*. Endocrinology, 1994. **134**(1): p. 245-252.
108. Ashkenazi, A., *Targeting death and decoy receptors of the tumour-necrosis factor superfamily*. Nat.Rev.Cancer, 2002. **2**(6): p. 420-430.

109. Kaufmann, S.H. and W.C. Earnshaw, *Induction of apoptosis by cancer chemotherapy*. Exp.Cell Res., 2000. **256**(1): p. 42-49.
110. Bamford, M., G. Walkinshaw, and R. Brown, *Therapeutic applications of apoptosis research*. Exp.Cell Res., 2000. **256**(1): p. 1-11.
111. Budihardjo, I., et al., *Biochemical pathways of caspase activation during apoptosis*. Annu.Rev.Cell Dev.Biol, 1999. **15**: p. 269-290.
112. Adams, J.M., *Ways of dying: multiple pathways to apoptosis*. Genes Dev., 2003. **17**(20): p. 2481-2495.
113. Lavrik, I.N., A. Golks, and P.H. Krammer, *Caspases: pharmacological manipulation of cell death*. J.Clin.Invest, 2005. **115**(10): p. 2665-2672.
114. Yacobi, K., et al., *Gonadotropins enhance caspase-3 and -7 activity and apoptosis in the theca-interstitial cells of rat preovulatory follicles in culture*. Endocrinology, 2004. **145**(4): p. 1943-1951.
115. Boone, D.L. and B.K. Tsang, *Caspase-3 in the rat ovary: localization and possible role in follicular atresia and luteal regression*. Biol.Reprod., 1998. **58**(6): p. 1533-1539.
116. Kayalar, C., et al., *Cleavage of actin by interleukin 1 beta-converting enzyme to reverse DNase I inhibition*. Proc.Natl.Acad.Sci.U.S.A, 1996. **93**(5): p. 2234-2238.
117. Nelipovich, P.A., L.V. Nikonova, and S.R. Umansky, *Inhibition of poly(ADP-ribose) polymerase as a possible reason for activation of Ca²⁺/Mg²⁺-dependent endonuclease in thymocytes of irradiated rats*. Int.J.Radiat.Biol.Relat Stud.Phys.Chem.Med., 1988. **53**(5): p. 749-765.
118. Vousden, K.H. and X. Lu, *Live or let die: the cell's response to p53*. Nat.Rev.Cancer, 2002. **2**(8): p. 594-604.
119. Wu, Y., et al., *Negative regulation of bcl-2 expression by p53 in hematopoietic cells*. Oncogene, 2001. **20**(2): p. 240-251.
120. Henry-Mowatt, J., et al., *Role of mitochondrial membrane permeabilization in apoptosis and cancer*. Oncogene, 2004. **23**(16): p. 2850-2860.
121. Willis, S.N., et al., *Apoptosis initiated when BH3 ligands engage multiple Bcl-2 homologs, not Bax or Bak*. Science, 2007. **315**(5813): p. 856-859.
122. MacFarlane, M. and A.C. Williams, *Apoptosis and disease: a life or death decision*. EMBO Rep., 2004. **5**(7): p. 674-678.
123. Ashkenazi, A. and V.M. Dixit, *Death receptors: signaling and modulation*. Science, 1998. **281**(5381): p. 1305-1308.
124. Ashkenazi, A., P. Holland, and S.G. Eckhardt, *Ligand-based targeting of apoptosis in cancer: the potential of recombinant human apoptosis ligand 2/Tumor necrosis factor-related apoptosis-inducing ligand (rhApo2L/TRAIL)*. J.Clin.Oncol., 2008. **26**(21): p. 3621-3630.
125. LeBlanc, H.N. and A. Ashkenazi, *Apo2L/TRAIL and its death and decoy receptors*. Cell Death.Differ., 2003. **10**(1): p. 66-75.
126. Sato, K., et al., *Antiviral response by natural killer cells through TRAIL gene induction by IFN-alpha/beta*. Eur.J.Immunol., 2001. **31**(11): p. 3138-3146.
127. Lindsell, C.E., et al., *Expression patterns of Jagged, Delta1, Notch1, Notch2, and Notch3 genes identify ligand-receptor pairs that may function in neural development*. Mol Cell Neurosci, 1996. **8**(1): p. 14-27.
128. Weijzen, S., et al., *Activation of Notch-1 signaling maintains the neoplastic phenotype in human Ras-transformed cells*. Nat.Med., 2002. **8**(9): p. 979-986.
129. Chau, M.D., et al., *Notch signaling plays a key role in cardiac cell differentiation*. Mech Dev, 2006. **123**(8): p. 626-40.

130. Raetzman, L.T., et al., *Persistent expression of Notch2 delays gonadotrope differentiation*. Mol Endocrinol, 2006. **20**(11): p. 2898-908.
131. Hayashi, H. and T. Kume, *Foxc transcription factors directly regulate Dll4 and Hey2 expression by interacting with the VEGF-Notch signaling pathways in endothelial cells*. PLoS One, 2008. **3**(6): p. e2401.
132. Doetzlhofer, A., et al., *Hey2 regulation by FGF provides a Notch-independent mechanism for maintaining pillar cell fate in the organ of Corti*. Dev Cell, 2009. **16**(1): p. 58-69.
133. Jordan, K.C., et al., *The homeobox gene mirror links EGF signalling to embryonic dorso-ventral axis formation through notch activation*. Nat Genet, 2000. **24**(4): p. 429-33.
134. Nickoloff, B.J., et al., *Jagged-1 mediated activation of notch signaling induces complete maturation of human keratinocytes through NF-kappaB and PPARgamma*. Cell Death Differ, 2002. **9**(8): p. 842-55.
135. Sainson, R.C., et al., *Cell-autonomous notch signaling regulates endothelial cell branching and proliferation during vascular tubulogenesis*. FASEB J, 2005. **19**(8): p. 1027-9.
136. Choi, J.H., et al., *Jagged-1 and Notch3 juxtacrine loop regulates ovarian tumor growth and adhesion*. Cancer Res., 2008. **68**(14): p. 5716-5723.
137. Kolev, V., et al., *EGFR signalling as a negative regulator of Notch1 gene transcription and function in proliferating keratinocytes and cancer*. Nat Cell Biol, 2008. **10**(8): p. 902-11.
138. Monahan, P., S. Rybak, and L.T. Raetzman, *The notch target gene HES1 regulates cell cycle inhibitor expression in the developing pituitary*. Endocrinology, 2009. **150**(9): p. 4386-94.
139. Li L, *The human homolog of rat Jagged1 expressed by marrow stroma inhibits differentiation of 32D cells through interaction with Notch1*. Immunity, 1998. **8** p. 43-55.
140. Krebs, L.T., et al., *Notch signaling is essential for vascular morphogenesis in mice*. Genes Dev., 2000. **14**(11): p. 1343-1352.
141. Gridley, T., *Notch signaling in vascular development and physiology*. Development, 2007. **134**(15): p. 2709-2718.
142. Gridley, T., *Notch signaling in the vasculature*. Curr Top Dev Biol, 2010. **92**: p. 277-309.
143. Gray, G.E., et al., *Human ligands of the Notch receptor*. Am.J.Pathol., 1999. **154**(3): p. 785-794.
144. Fleming, R.J., *Structural conservation of Notch receptors and ligands*. Semin.Cell Dev.Biol., 1998. **9**(6): p. 599-607.
145. Moran, J.L., et al., *Genomic structure, mapping, and expression analysis of the mammalian Lunatic, Manic, and Radical fringe genes*. Mamm.Genome, 1999. **10**(6): p. 535-541.
146. Vanorny, D.A. and K.E. Mayo, *The role of Notch signaling in the mammalian ovary*. Reproduction, 2017. **153**(6): p. R187-R204.
147. Baron, M., *An overview of the Notch signalling pathway*. Semin.Cell Dev.Biol., 2003. **14**(2): p. 113-119.
148. Baron, M., et al., *Multiple levels of Notch signal regulation (review)*. Mol.Membr.Biol., 2002. **19**(1): p. 27-38.
149. Artavanis-Tsakonas, S., M.D. Rand, and R.J. Lake, *Notch signaling: cell fate control and signal integration in development*. Science, 1999. **284**(5415): p. 770-776.

150. Schroeter, E.H., et al., *A presenilin dimer at the core of the gamma-secretase enzyme: insights from parallel analysis of Notch 1 and APP proteolysis*. Proc.Natl.Acad.Sci.U.S.A, 2003. **100**(22): p. 13075-13080.
151. Schroeter, E.H., J.A. Kisslinger, and R. Kopan, *Notch-1 signalling requires ligand-induced proteolytic release of intracellular domain*. Nature, 1998. **393**(6683): p. 382-386.
152. Huppert, S.S., et al., *Embryonic lethality in mice homozygous for a processing-deficient allele of Notch1*. Nature, 2000. **405**(6789): p. 966-970.
153. Blaumueller, C.M., et al., *Intracellular cleavage of Notch leads to a heterodimeric receptor on the plasma membrane*. Cell, 1997. **90**(2): p. 281-291.
154. Kopan, R., J.S. Nye, and H. Weintraub, *The intracellular domain of mouse Notch: a constitutively activated repressor of myogenesis directed at the basic helix-loop-helix region of MyoD*. Development, 1994. **120**(9): p. 2385-2396.
155. Zanotti, S. and E. Canalis, *Notch and the skeleton*. Mol.Cell Biol., 2010. **30**(4): p. 886-896.
156. Kopan, R. and M.X. Ilagan, *The canonical Notch signaling pathway: unfolding the activation mechanism*. Cell, 2009. **137**(2): p. 216-233.
157. Nickoloff, B.J., B.A. Osborne, and L. Miele, *Notch signaling as a therapeutic target in cancer: a new approach to the development of cell fate modifying agents*. Oncogene, 2003. **22**(42): p. 6598-6608.
158. Gordon, W.R., K.L. Arnett, and S.C. Blacklow, *The molecular logic of Notch signaling--a structural and biochemical perspective*. J.Cell Sci., 2008. **121**(Pt 19): p. 3109-3119.
159. Ranganathan, P., K.L. Weaver, and A.J. Capobianco, *Notch signalling in solid tumours: a little bit of everything but not all the time*. Nat.Rev.Cancer, 2011. **11**(5): p. 338-351.
160. Yi-Yang Hu, M.-h.Z., Rui Zhang, Ying-Min Liang and Hua Han, *Notch Signaling Pathway and Cancer Metastasis*. 2012.
161. Johnson, J., et al., *Notch pathway genes are expressed in mammalian ovarian follicles*. Mech.Dev., 2001. **109**(2): p. 355-361.
162. Vorontchikhina, M.A., et al., *Unique patterns of Notch1, Notch4 and Jagged1 expression in ovarian vessels during folliculogenesis and corpus luteum formation*. Gene Expr.Patterns., 2005. **5**(5): p. 701-709.
163. Jovanovic, V.P., et al., *Intraovarian regulation of gonadotropin-dependent folliculogenesis depends on notch receptor signaling pathways not involving Delta-like ligand 4 (Dll4)*. Reprod.Biol.Endocrinol., 2013. **11**: p. 43.
164. Hernandez, F., et al., *Role of the DLL4-NOTCH system in PGF2alpha-induced luteolysis in the pregnant rat*. Biol.Reprod., 2011. **84**(5): p. 859-865.
165. Murta, D., et al., *In vivo notch signaling blockade induces abnormal spermatogenesis in the mouse*. PLoS One, 2014. **9**(11): p. e113365.
166. Accialini, P., et al., *A link between Notch and progesterone maintains the functionality of the rat corpus luteum*. Reproduction, 2015. **149**(1): p. 1-10.
167. Wang, J., et al., *Notch Signaling Pathway Regulates Progesterone Secretion in Murine Luteal Cells*. Reprod Sci, 2015. **22**(10): p. 1243-51.
168. Fraser, H.M., et al., *Inhibition of delta-like ligand 4 induces luteal hypervascularization followed by functional and structural luteolysis in the primate ovary*. Endocrinology, 2012. **153**(4): p. 1972-1983.
169. Trombly, D.J., T.K. Woodruff, and K.E. Mayo, *Suppression of Notch signaling in the neonatal mouse ovary decreases primordial follicle formation*. Endocrinology, 2009. **150**(2): p. 1014-1024.

170. Zhang, C.P., et al., *Notch signaling is involved in ovarian follicle development by regulating granulosa cell proliferation*. *Endocrinology*, 2011. **152**(6): p. 2437-2447.
171. Wang, L.Q., et al., *Regulation of primordial follicle recruitment by cross-talk between the Notch and phosphatase and tensin homologue (PTEN)/AKT pathways*. *Reprod Fertil Dev*, 2016. **28**(6): p. 700-12.
172. Paris, D., et al., *Inhibition of angiogenesis and tumor growth by beta and gamma-secretase inhibitors*. *Eur.J.Pharmacol.*, 2005. **514**(1): p. 1-15.
173. Mailhos, C., et al., *Delta4, an endothelial specific notch ligand expressed at sites of physiological and tumor angiogenesis*. *Differentiation*, 2001. **69**(2-3): p. 135-144.
174. Siekmann, A.F. and N.D. Lawson, *Notch signalling limits angiogenic cell behaviour in developing zebrafish arteries*. *Nature*, 2007. **445**(7129): p. 781-784.
175. Rehman, A.O. and C.Y. Wang, *Notch signaling in the regulation of tumor angiogenesis*. *Trends Cell Biol.*, 2006. **16**(6): p. 293-300.
176. Li, J.L. and A.L. Harris, *Notch signaling from tumor cells: a new mechanism of angiogenesis*. *Cancer Cell*, 2005. **8**(1): p. 1-3.
177. Hernandez, F., et al., *Local effects of the sphingosine 1-phosphate on prostaglandin F2alpha-induced luteolysis in the pregnant rat*. *Mol.Reprod.Dev.*, 2009.
178. Logan, C.Y. and R. Nusse, *The Wnt signaling pathway in development and disease*. *Annu.Rev.Cell Dev.Biol.*, 2004. **20**: p. 781-810.
179. Strand, M. and C.A. Micchelli, *Quiescent gastric stem cells maintain the adult Drosophila stomach*. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 2011. **108**(43): p. 17696-701.
180. Slusarski, D.C., V.G. Corces, and R.T. Moon, *Interaction of Wnt and a Frizzled homologue triggers G-protein-linked phosphatidylinositol signalling*. *Nature*, 1997. **390**(6658): p. 410-3.
181. Liu, T., et al., *G protein signaling from activated rat frizzled-1 to the beta-catenin-Lef-Tcf pathway*. *Science*, 2001. **292**(5522): p. 1718-22.
182. Bjarnadottir, T.K., et al., *Comprehensive repertoire and phylogenetic analysis of the G protein-coupled receptors in human and mouse*. *Genomics*, 2006. **88**(3): p. 263-73.
183. He, X., et al., *A member of the Frizzled protein family mediating axis induction by Wnt-5A*. *Science*, 1997. **275**(5306): p. 1652-4.
184. Pinson, K.I., et al., *An LDL-receptor-related protein mediates Wnt signalling in mice*. *Nature*, 2000. **407**(6803): p. 535-8.
185. Boyer, A., A.K. Goff, and D. Boerboom, *WNT signaling in ovarian follicle biology and tumorigenesis*. *Trends Endocrinol.Metab*, 2010. **21**(1): p. 25-32.
186. Liu, C., et al., *Control of beta-catenin phosphorylation/degradation by a dual-kinase mechanism*. *Cell*, 2002. **108**(6): p. 837-47.
187. Aberle, H., et al., *beta-catenin is a target for the ubiquitin-proteasome pathway*. *EMBO J*, 1997. **16**(13): p. 3797-804.
188. Cavallo, R.A., et al., *Drosophila Tcf and Groucho interact to repress Wingless signalling activity*. *Nature*, 1998. **395**(6702): p. 604-8.
189. Cinnamon, E. and Z. Paroush, *Context-dependent regulation of Groucho/TLE-mediated repression*. *Curr Opin Genet Dev*, 2008. **18**(5): p. 435-40.
190. Riese, J., et al., *LEF-1, a nuclear factor coordinating signaling inputs from wingless and decapentaplegic*. *Cell*, 1997. **88**(6): p. 777-87.

191. Behrens, J., et al., *Functional interaction of an axin homolog, conductin, with beta-catenin, APC, and GSK3beta*. Science, 1998. **280**(5363): p. 596-9.
192. Masckauchan, T.N. and J. Kitajewski, *Wnt/Frizzled signaling in the vasculature: new angiogenic factors in sight*. Physiology (Bethesda), 2006. **21**: p. 181-8.
193. Hsieh, M., et al., *Regulated expression of Wnts and Frizzleds at specific stages of follicular development in the rodent ovary*. Endocrinology, 2002. **143**(3): p. 898-908.
194. Hernandez Gifford, J.A., *The role of WNT signaling in adult ovarian folliculogenesis*. Reproduction, 2015. **150**(4): p. R137-R148.
195. Vainio, S., et al., *Female development in mammals is regulated by Wnt-4 signalling*. Nature, 1999. **397**(6718): p. 405-409.
196. Pellegrino, M., R. Maiorino, and S. Schonauer, *WNT4 signaling in female gonadal development*. Endocr.Metab Immune.Disord.Drug Targets., 2010. **10**(2): p. 168-174.
197. Boyer, A., et al., *WNT4 is required for normal ovarian follicle development and female fertility*. FASEB J., 2010. **24**(8): p. 3010-3025.
198. Monkley, S.J., et al., *Targeted disruption of the Wnt2 gene results in placentation defects*. Development, 1996. **122**(11): p. 3343-3353.
199. Hsieh, M., et al., *Mice null for Frizzled4 (Fzd4^{-/-}) are infertile and exhibit impaired corpora lutea formation and function*. Biol.Reprod., 2005. **73**(6): p. 1135-1146.
200. Tomizuka, K., et al., *R-spondin1 plays an essential role in ovarian development through positively regulating Wnt-4 signaling*. Hum.Mol.Genet., 2008. **17**(9): p. 1278-1291.
201. Hernandez Gifford, J.A., M.E. Hunzicker-Dunn, and J.H. Nilson, *Conditional deletion of beta-catenin mediated by Amhr2cre in mice causes female infertility*. Biol.Reprod., 2009. **80**(6): p. 1282-1292.
202. Xu, Q., et al., *Vascular development in the retina and inner ear: control by Norrin and Frizzled-4, a high-affinity ligand-receptor pair*. Cell, 2004. **116**(6): p. 883-95.
203. Reis, M. and S. Liebner, *Wnt signaling in the vasculature*. Exp.Cell Res., 2013. **319**(9): p. 1317-1323.
204. Parmalee, N.L. and J. Kitajewski, *Wnt signaling in angiogenesis*. Curr Drug Targets, 2008. **9**(7): p. 558-64.
205. Wright, M., et al., *Identification of a Wnt-responsive signal transduction pathway in primary endothelial cells*. Biochem Biophys Res Commun, 1999. **263**(2): p. 384-8.
206. Choi, H.J., et al., *The Wnt pathway and the roles for its antagonists, DKKS, in angiogenesis*. IUBMB Life, 2012. **64**(9): p. 724-31.
207. Cheng, C.W., S.K. Smith, and D.S. Charnock-Jones, *Wnt-1 signaling inhibits human umbilical vein endothelial cell proliferation and alters cell morphology*. Exp Cell Res, 2003. **291**(2): p. 415-25.
208. Masckauchan, T.N., et al., *Wnt/beta-catenin signaling induces proliferation, survival and interleukin-8 in human endothelial cells*. Angiogenesis, 2005. **8**(1): p. 43-51.
209. Easwaran, V., et al., *beta-Catenin regulates vascular endothelial growth factor expression in colon cancer*. Cancer Res, 2003. **63**(12): p. 3145-53.
210. Blankesteyjn, W.M., et al., *Beta-catenin, an inducer of uncontrolled cell proliferation and migration in malignancies, is localized in the cytoplasm of*

- vascular endothelium during neovascularization after myocardial infarction.* Am J Pathol, 2000. **157**(3): p. 877-83.
211. Wang, H., et al., *Gene expression profile signatures indicate a role for Wnt signaling in endothelial commitment from embryonic stem cells.* Circ Res, 2006. **98**(10): p. 1331-9.
212. Wang, H., et al., *Wnt2 coordinates the commitment of mesoderm to hematopoietic, endothelial, and cardiac lineages in embryoid bodies.* J Biol Chem, 2007. **282**(1): p. 782-91.
213. Stefater, J.A., 3rd, et al., *Regulation of angiogenesis by a non-canonical Wnt-Flt1 pathway in myeloid cells.* Nature, 2011. **474**(7352): p. 511-5.
214. Stenman, J.M., et al., *Canonical Wnt signaling regulates organ-specific assembly and differentiation of CNS vasculature.* Science, 2008. **322**(5905): p. 1247-50.
215. Liebner, S., et al., *Wnt/beta-catenin signaling controls development of the blood-brain barrier.* J Cell Biol, 2008. **183**(3): p. 409-17.
216. Daneman, R., et al., *Wnt/beta-catenin signaling is required for CNS, but not non-CNS, angiogenesis.* Proc Natl Acad Sci U S A, 2009. **106**(2): p. 641-6.
217. Foltz, D.R., et al., *Glycogen synthase kinase-3beta modulates notch signaling and stability.* Curr Biol, 2002. **12**(12): p. 1006-11.
218. Gopalakrishnan, N., et al., *Colocalization of beta-catenin with Notch intracellular domain in colon cancer: a possible role of Notch1 signaling in activation of CyclinD1-mediated cell proliferation.* Mol Cell Biochem, 2014. **396**(1-2): p. 281-93.
219. Morris, S.L. and S. Huang, *Crosstalk of the Wnt/beta-catenin pathway with other pathways in cancer cells.* Genes Dis, 2016. **3**(1): p. 41-47.
220. Hayward, P., T. Kalmar, and A.M. Arias, *Wnt/Notch signalling and information processing during development.* Development, 2008. **135**(3): p. 411-24.
221. Li, B., et al., *Interaction of Wnt/beta-catenin and notch signaling in the early stage of cardiac differentiation of P19CL6 cells.* J Cell Biochem, 2012. **113**(2): p. 629-39.
222. Phng, L.K., et al., *Nrarp coordinates endothelial Notch and Wnt signaling to control vessel density in angiogenesis.* Dev Cell, 2009. **16**(1): p. 70-82.
223. Rodilla, V., et al., *Jagged1 is the pathological link between Wnt and Notch pathways in colorectal cancer.* Proc.Natl.Acad.Sci.U.S.A, 2009. **106**(15): p. 6315-6320.
224. Phng, L.K. and H. Gerhardt, *Angiogenesis: a team effort coordinated by notch.* Dev.Cell, 2009. **16**(2): p. 196-208.
225. Corada, M., et al., *The Wnt/beta-catenin pathway modulates vascular remodeling and specification by upregulating Dll4/Notch signaling.* Dev Cell, 2010. **18**(6): p. 938-49.
226. Duarte, A., et al., *Dosage-sensitive requirement for mouse Dll4 in artery development.* Genes Dev, 2004. **18**(20): p. 2474-8.
227. Woodruff, T.K., et al., *Dynamic changes in inhibin messenger RNAs in rat ovarian follicles during the reproductive cycle.* Science, 1988. **239**(4845): p. 1296-1299.
228. Andreu, C., et al., *Regulation of follicular luteinization by a gonadotropin-releasing hormone agonist: relationship between steroidogenesis and apoptosis.* Mol.Reprod.Dev., 1998. **51**(3): p. 287-294.

229. Sadrkhanloo, R., C. Hofeditz, and G.F. Erickson, *Evidence for widespread atresia in the hypophysectomized estrogen-treated rat*. *Endocrinology*, 1987. **120**(1): p. 146-155.
230. Garcia-Pascual, C.M., et al., *Delta-like ligand 4 regulates vascular endothelial growth factor receptor 2-driven luteal angiogenesis through induction of a tip/stalk phenotype in proliferating endothelial cells*. *Fertil.Steril.*, 2013. **100**(6): p. 1768-1776.
231. Gerber, H.P., V. Dixit, and N. Ferrara, *Vascular endothelial growth factor induces expression of the antiapoptotic proteins Bcl-2 and A1 in vascular endothelial cells*. *J.Biol Chem.*, 1998. **273**(21): p. 13313-13316.
232. Thakker, G.D., et al., *The role of phosphatidylinositol 3-kinase in vascular endothelial growth factor signaling*. *J.Biol.Chem.*, 1999. **274**(15): p. 10002-10007.
233. Murta, D., et al., *Differential expression of Notch component and effector genes during ovarian follicle and corpus luteum development during the oestrous cycle*. *Reprod Fertil Dev*, 2015. **27**(7): p. 1038-48.
234. Bartels, S.J., et al., *A SILAC-based screen for Methyl-CpG binding proteins identifies RBP-J as a DNA methylation and sequence-specific binding protein*. *PLoS One*, 2011. **6**(10): p. e25884.
235. Cohen, B., et al., *Cyclin D1 is a direct target of JAG1-mediated Notch signaling in breast cancer*. *Breast Cancer Res Treat*, 2010. **123**(1): p. 113-24.
236. Zhang, Z., D. Yin, and Z. Wang, *Contribution of hypoxia-inducible factor-1alpha to transcriptional regulation of vascular endothelial growth factor in bovine developing luteal cells*. *Anim Sci J*, 2011. **82**(2): p. 244-50.
237. Lee, J.H., et al., *Notch signal activates hypoxia pathway through HES1-dependent SRC/signal transducers and activators of transcription 3 pathway*. *Mol Cancer Res*, 2009. **7**(10): p. 1663-71.
238. Bolos, V., J. Grego-Bessa, and J.L. de la Pompa, *Notch signaling in development and cancer*. *Endocr.Rev.*, 2007. **28**(3): p. 339-363.
239. Rothchild, I., *The regulation of the mammalian corpus luteum*. *Recent Prog Horm Res*, 1981. **37**: p. 183-298.
240. Afshar, Y., L. Miele, and A.T. Fazleabas, *Notch1 is regulated by chorionic gonadotropin and progesterone in endometrial stromal cells and modulates decidualization in primates*. *Endocrinology*, 2012. **153**(6): p. 2884-2896.
241. Guo, M., et al., *P4 down-regulates Jagged2 and Notch1 expression during primordial folliculogenesis*. *Front Biosci (Elite Ed)*, 2012. **4**: p. 2631-44.
242. Meurette, O., et al., *Notch activation induces Akt signaling via an autocrine loop to prevent apoptosis in breast epithelial cells*. *Cancer Res.*, 2009. **69**(12): p. 5015-5022.
243. Wang, Z., et al., *Down-regulation of Notch-1 is associated with Akt and FoxM1 in inducing cell growth inhibition and apoptosis in prostate cancer cells*. *J.Cell Biochem.*, 2011. **112**(1): p. 78-88.
244. Irusta, G., et al., *Effects of an Inhibitor of the Gamma-Secretase Complex on Proliferation and Apoptotic Parameters in a FOXL2-Mutated Granulosa Tumor Cell Line (KGN)*. *Biol.Reprod.*, 2013.
245. Ballare, C., et al., *Progesterone signaling in breast and endometrium*. *J.Steroid Biochem.Mol.Biol*, 2006. **102**(1-5): p. 2-10.
246. Lee, I.I. and J.J. Kim, *Influence of AKT on Progesterone Action in Endometrial Diseases*. *Biol Reprod.*, 2014.

247. Terauchi, K.J., et al., *Role of Notch signaling in granulosa cell proliferation and polyovular follicle induction during folliculogenesis in mouse ovary*. Cell Tissue Res, 2016. **365**(1): p. 197-208.
248. Teng, Z., et al., *Gap junctions are essential for murine primordial follicle assembly immediately before birth*. Reproduction, 2016. **151**(2): p. 105-15.
249. Abramovich, D., et al., *Angiopoietins/TIE2 System and VEGF Are Involved in Ovarian Function in a DHEA Rat Model of Polycystic Ovary Syndrome*. Endocrinology, 2012. **153**(7): p. 3446-3456.
250. Law, N.C., et al., *Lhcgr expression in granulosa cells: roles for PKA-phosphorylated beta-catenin, TCF3, and FOXO1*. Mol Endocrinol, 2013. **27**(8): p. 1295-310.
251. Castanon, B.I., et al., *Follicle-stimulating hormone regulation of estradiol production: possible involvement of WNT2 and beta-catenin in bovine granulosa cells*. J Anim Sci, 2012. **90**(11): p. 3789-97.
252. Stapp, A.D., et al., *Canonical WNT signaling inhibits follicle stimulating hormone mediated steroidogenesis in primary cultures of rat granulosa cells*. PLoS One, 2014. **9**(1): p. e86432.
253. Fan, H.Y., et al., *Beta-catenin (CTNNB1) promotes preovulatory follicular development but represses LH-mediated ovulation and luteinization*. Mol Endocrinol, 2010. **24**(8): p. 1529-42.
254. Yang, J.H., X.; Davis, J., *LH Stimulates the Phosphorylation of Key Components of the Wnt Signaling Pathway in Bovine Steroidogenic Luteal Cells*. Biology of Reproduction, 2012. **87**.
255. Richards, J.S.L., Z. , *Ovulation, in Female reproductive system*. 2014.
256. Robker, R.L., et al., *Progesterone-regulated genes in the ovulation process: ADAMTS-1 and cathepsin L proteases*. Proc Natl Acad Sci U S A, 2000. **97**(9): p. 4689-94.
257. Sriraman, V., M. Sinha, and J.S. Richards, *Progesterone receptor-induced gene expression in primary mouse granulosa cell cultures*. Biol Reprod, 2010. **82**(2): p. 402-12.
258. Shimada, M., et al., *Paracrine and autocrine regulation of epidermal growth factor-like factors in cumulus oocyte complexes and granulosa cells: key roles for prostaglandin synthase 2 and progesterone receptor*. Mol Endocrinol, 2006. **20**(6): p. 1352-65.
259. Shimada, M., et al., *Synaptosomal-associated protein 25 gene expression is hormonally regulated during ovulation and is involved in cytokine/chemokine exocytosis from granulosa cells*. Mol Endocrinol, 2007. **21**(10): p. 2487-502.
260. Stocco, D.M. and B.J. Clark, *Role of the steroidogenic acute regulatory protein (StAR) in steroidogenesis*. Biochem.Pharmacol., 1996. **51**(3): p. 197-205.
261. Roy, L., et al., *Convergence of 3',5'-cyclic adenosine 5'-monophosphate/protein kinase A and glycogen synthase kinase-3beta/beta-catenin signaling in corpus luteum progesterone synthesis*. Endocrinology, 2009. **150**(11): p. 5036-5045.
262. Gerber, H.P., et al., *Vascular endothelial growth factor regulates endothelial cell survival through the phosphatidylinositol 3'-kinase/Akt signal transduction pathway. Requirement for Flk-1/KDR activation*. J.Biol Chem., 1998. **273**(46): p. 30336-30343.
263. Maes, C., et al., *Impaired angiogenesis and endochondral bone formation in mice lacking the vascular endothelial growth factor isoforms VEGF164 and VEGF188*. Mech.Dev., 2002. **111**(1-2): p. 61-73.

264. Tesone, M., et al., *Vascular endothelial growth factor (VEGF) production by the monkey corpus luteum during the menstrual cycle: isoform-selective messenger RNA expression in vivo and hypoxia-regulated protein secretion in vitro*. Biol Reprod., 2005. **73**(5): p. 927-934.
265. Peluso, J.J., et al., *Cellular and molecular mechanisms that mediate insulin-dependent rat granulosa cell mitosis*. Biol Reprod., 1995. **52**(1): p. 124-130.
266. Robinson, R.S., et al., *Angiogenesis and vascular function in the ovary*. Reproduction, 2009. **138**(6): p. 869-881.
267. Pascuali, N., et al., *Inhibition of platelet-derived growth factor (PDGF) receptor affects follicular development and ovarian proliferation, apoptosis and angiogenesis in prepubertal eCG-treated rats*. Mol Cell Endocrinol, 2015. **412**: p. 148-158.
268. Kim, J., I.C. Bagchi, and M.K. Bagchi, *Signaling by hypoxia-inducible factors is critical for ovulation in mice*. Endocrinology, 2009. **150**(7): p. 3392-400.
269. Tam, K.K., et al., *Hormonally regulated follicle differentiation and luteinization in the mouse is associated with hypoxia inducible factor activity*. Mol Cell Endocrinol, 2010. **327**(1-2): p. 47-55.
270. Kowalewski, M.P., A. Gram, and A. Boos, *The role of hypoxia and HIF1alpha in the regulation of STAR-mediated steroidogenesis in granulosa cells*. Mol Cell Endocrinol, 2015. **401**: p. 35-44.