

Tesis Doctoral

Caracterización de un modelo de ratones transgénicos hipersecretores de hCG que desarrolla tumores gonadales

Gonzalez, Betina

2010

Este documento forma parte de la colección de tesis doctorales y de maestría de la Biblioteca Central Dr. Luis Federico Leloir, disponible en digital.bl.fcen.uba.ar. Su utilización debe ser acompañada por la cita bibliográfica con reconocimiento de la fuente.

This document is part of the doctoral theses collection of the Central Library Dr. Luis Federico Leloir, available in digital.bl.fcen.uba.ar. It should be used accompanied by the corresponding citation acknowledging the source.

Cita tipo APA:

Gonzalez, Betina. (2010). Caracterización de un modelo de ratones transgénicos hipersecretores de hCG que desarrolla tumores gonadales. Facultad de Ciencias Exactas y Naturales. Universidad de Buenos Aires.

Cita tipo Chicago:

Gonzalez, Betina. "Caracterización de un modelo de ratones transgénicos hipersecretores de hCG que desarrolla tumores gonadales". Facultad de Ciencias Exactas y Naturales. Universidad de Buenos Aires. 2010.

EXACTAS UBA

Facultad de Ciencias Exactas y Naturales



UBA

Universidad de Buenos Aires



UNIVERSIDAD DE BUENOS AIRES
FACULTAD DE CIENCIAS EXACTAS Y NATURALES
DEPARTAMENTO DE QUÍMICA BIOLÓGICA

**CARACTERIZACIÓN DE UN MODELO
DE RATONES TRANSGÉNICOS
HIPERSECRETORES DE hCG QUE
DESARROLLA TUMORES GONADALES**

**TESIS PARA OPTAR AL TÍTULO DE DOCTORA
DE LA UNIVERSIDAD DE BUENOS AIRES**

Lic. Betina Gonzalez

Directora: Dra. Susana B. Rulli

Consejera de Estudios: Dra. Marta Tesone

INSTITUTO DE BIOLOGÍA Y MEDICINA EXPERIMENTAL
BUENOS AIRES 2010

**CARACTERIZACIÓN DE UN MODELO DE RATONES TRANSGÉNICOS
HIPERSECRETORES DE hCG QUE DESARROLLA TUMORES GONADALES**

RESUMEN

En esta Tesis Doctoral se estudiaron distintos aspectos de la regulación del eje hipotálamo-hipófiso-gonadal (HHG) en un modelo de ratones transgénicos que produce niveles elevados de la hormona gonadotrofina coriónica humana (hCG) y desarrolla tumores gonadales (ratones hCG $\alpha\beta$ +). Se partió de la hipótesis que los elevados niveles de esteroides sexuales inducidos por la hipersecreción de hCG desde edades tempranas del desarrollo, actuarían sobre el eje HHG alterando la síntesis y secreción de hormonas y factores claves en la función reproductiva, participando directa o indirectamente en el inicio y progresión de los tumores gonadales que presentan estos ratones. En una primera etapa se caracterizó en profundidad el fenotipo de machos y hembras hCG $\alpha\beta$ +, estudiando parámetros morfológicos, bioquímicos y moleculares de la función gonadal e hipotálamo-hipofisaria. Se observaron marcadas diferencias sexuales en el modelo, donde los machos transgénicos resultaron severamente comprometidos a nivel de la regulación de la unidad hipotálamo-hipofisaria desde edades tempranas del desarrollo, mientras que las hembras mostraron alteraciones gonadales que condujeron al desarrollo de teratomas ováricos al inicio de la edad reproductiva. En una segunda etapa se aplicaron tratamientos antihormonales y gonadectomía, siendo nuestro particular interés estudiar el rol de los esteroides sexuales en el fenotipo de los machos y hembras hCG $\alpha\beta$ +. Los resultados obtenidos ponen de manifiesto que la hipersecreción de hCG, a través de la estimulación de la esteroidogénesis gonadal, altera la funcionalidad del eje reproductivo y participa en el desarrollo de patologías gonadales.

Palabras claves: gonadotrofina coriónica humana, FSH, eje hipotálamo-hipófiso-gonadal, tumores gonadales, esteroides sexuales, ratones transgénicos.

**CHARACTERIZATION OF A TRANSGENIC MOUSE MODEL THAT
HYPERSECRETES hCG AND DEVELOPS GONADAL TUMOURS.**

ABSTRACT

In the present Doctoral Thesis, several aspects of the hypothalamic-pituitary-gonadal (HPG) axis were evaluated in a transgenic mouse model that produces elevated levels of human chorionic gonadotropin (hCG) and develops gonadal tumours (hCG $\alpha\beta$ + mice). We hypothesized that the elevated levels of sex steroids induced by hCG hypersecretion from early development, would act on the HPG axis by altering the synthesis and secretion of key hormones and factors involved in the reproductive function, thus participating either directly or indirectly in the onset and progression of the gonadal tumours. First, we characterized in deep the male and female phenotype of hCG $\alpha\beta$ + mice, through morphological, biochemical and molecular studies of the gonadal and hypothalamic-pituitary function. Sex differences were observed in this model, where transgenic males were severely compromised at the hypothalamic-pituitary unit regulation, whereas transgenic females showed gonadal alterations that derived in the development of ovarian teratomas at the beginning of the reproductive age. Further in this study, we carried out antihormonal treatments and gonadectomy, being our particular interest to study the role of sex steroids in the hCG $\alpha\beta$ + male and female phenotype. Our results demonstrate that hCG hypersecretion, through the stimulation of gonadal steroidogenesis, alters the reproductive axis function and participates in the development of gonadal pathologies.

Key words: human chorionic gonadotropin, FSH, hypothalamic-pituitary-gonadal axis, gonadal tumours, sex steroids, transgenic mice.

Agradecimientos

En primer lugar quiero agradecer a la Dra. Susana Rulli, directora de esta Tesis Doctoral, por la confianza que depositó en mí durante todos estos años, y especialmente por la libertad que me dio para poner en práctica mis ideas y llevar adelante este trabajo. No me alcanzan las palabras para expresar la calidad humana y profesional que tuvo siempre conmigo y lo que he aprendido a su lado durante todos estos años. Gracias por tu infinita paciencia Susi, para mi sos un ejemplo a seguir.

Al Dr. Ricardo Calandra, por darme un lugar en su laboratorio y por los consejos brindados a lo largo de estos años.

A las Dras. Mónica Frungieri y Silvia Gonzalez-Calvar, por sus aportes, consejos y disponibilidad siempre que lo necesité.

A la Dra. Marta Tesone, mi consejera de estudios, por su ayuda y buena predisposición a contestar todas mis dudas relacionadas con el doctorado.

A Cande, mi amiga del alma, cuya amistad y contención fueron tan importantes a lo largo de estos años, y con quien hemos compartido experiencias, viajes, y miles de momentos dentro y fuera del laboratorio. Gracias por estar siempre Can.

A Lau, con quien comenzamos siendo compañeras de laboratorio y hoy en día la considero además mi amiga. Gracias por el compañerismo y la buena onda de siempre, fue muy bueno trabajar con vos este último tiempo.

A Euge y Sole, que siempre que necesité su ayuda estuvieron dispuestas a darme una mano, y con quienes hemos compartido tantas vicisitudes del trabajo en el laboratorio.

A Marta, por su calidez, y por estar siempre dispuesta a prestarnos su ayuda..

A todos los integrantes del laboratorio del Dr. Libertun, que me alojaron en el laboratorio durante los extensos experimentos de pulsatilidad y siempre estuvieron predispuestos a darme una mano, en especial a la Dra. Victoria Lux-Lantos, Dra. Silvia Bianchi, Dr. Paolo Catalano y a la Lic. Noelia Di Giorgio, por sus aportes a parte del trabajo que se presenta en esta Tesis.

A la Dra. Silvia Vanzulli, por sus aportes en la interpretación de los cortes histológicos.

A las ministras de la Real Time, Dra. Gricelda Vallejo y Dra. Florencia Labombarda, por sus consejos y ayuda para poner a punto la técnica.

A los integrantes del staff del Bioterio, Víctor, Paola, Natalia, Corina, por cuidarnos los animales y brindarnos su ayuda siempre que fue necesario.

A la bibliotecaria del IByME Gabriela Diessler, por su ayuda en la búsqueda de material bibliográfico.

A las chicas del 213 Cecilia y Wendy, por su buena onda y ayuda siempre que me hizo falta.

A mis amigos-hermanos: Ana, Lau, Lina, Pablo, Agustin, Sebi, Parri, que me vienen aguantando hace tantos años y siempre están a mi lado. Gracias chicos.

A toda mi familia, mis viejos, abuelas, tíos, primos, que siempre están cuando hace falta. En especial quiero agradecer a mi prima Marcela Poy, quien diseñó la portada y contraportada de esta Tesis.

A Fer, el amor de mi vida.

A la educación pública.

Este trabajo está dedicado a las personas que de distintas maneras fueron mi sostén durante estos años de doctorado:

Mis viejos, que siempre me incentivaron a perseguir mis sueños y nunca dejaron de apoyarme.

Fer, cuyo amor y comprensión me acompañaron en la última etapa, la más difícil.

Susi, que me apuntaló tanto en lo profesional como en lo personal.

GRACIAS

Abreviaturas

17β-HSD	17 β -hidroxiesteroide deshidrogenasa
3β-HSD	3 β -hidroxiesteroide deshidrogenasa
5α-Red	5 α -Reductasa
ADN	ácido desoxirribonucleico
ADNc	ácido desoxirribonucleico copia
AMH	hormona antimülleriana
AMPc	adenosín monofosfato cíclico
ANOVA	análisis de la varianza
AR	receptor de andrógenos
ARN	ácido ribonucleico
ARNm	ácido ribonucleico mensajero
ATP	adenosín trifosfato
AVPV	núcleo anteroventral paraventricular
BSA	albúmina sérica bovina
CG	gonadotrofina coriónica
Ci	Curie
COC	complejo formado por el ovocito y las células del cúmulo
Col.	colaboradores
Ct	ciclo de PCR umbral en el cual se detecta una fluorescencia mayor a la basal
Cx	castración
CYP11A	enzima que escinde la cadena lateral de colesterol dependiente del citocromo P450
CYP17	17 α -hidroxilasa/17-20 liasa dependiente del citocromo P450
CYP19	aromatasa dependiente del citocromo P450
DAB	3,3'-diaminobencidina
DAG	1,2-diacilglicerol
DEPC	dietilpirocarbonato
DG	día gestacional
DHT	dihidrotestosterona
DNAsa	desoxirribonucleasa
dNTPs	desoxirribonucleótidos
DPN	día postnatal
DHEA	dehidroepiandrosterona
E	eficiencia
eCG	gonadotrofina coriónica equina
EDTA	ácido etilen-diamino-tetracético
EGF	factor de crecimiento epidermal
ERK	proteína quinasa regulada por señales extracelulares
ERα	receptor de estrógenos α

ERβ	receptor de estrógenos β
ESM	error estándar medio
F	flutamida
FFv	flutamida-fulvestrant
FGFb	factor de crecimiento fibroblástico básico
FSH	hormona folículo estimulante
FSHR	receptor de FSH
Fv	fulvestrant
g	aceleración de la gravedad
g	gramos
Gαs	subunidad α estimuladora de la proteína G
GABA	ácido γ -aminobutírico
GAP	uniones comunicantes onexo
GnRH	hormona hipotalámica liberadora de gonadotrofinas
GnRHR	receptor de GnRH
hCG	gonadotrófica coriónica humana
hCGα+	ratón transgénico para la subunidad α de hCG
hCGβ+	ratón transgénico para la subunidad β de hCG
hCG$\alpha\beta$+	ratón transgénico para las subunidades α y β de hCG
HEPES	ácido 4-(2-hidroxietil)-1-piperazin-etanosulfónico
HHG	hipotálamo-hipófiso-gonadal
hr	hora
IGF	factor de crecimiento similar a la insulina
IgG	inmunoglobulina G
IP₃	inositol 1,4,5-trifosfato
kg	kilogramos
L	litro
LDL	lipoproteínas de baja densidad
LH	hormona luteinizante
LHCGR	receptor de hormona luteinizante y gonadotrofina coriónica
M	molar
μg	microgramo
mg	miligramo
Mf	mifepristona
min	minuto
MK	marcador de fragmentos de ADN
μl	microlitro
ml	mililitro
μM	micromolar
mM	milimolar

mm	milímetro
MMPs	metaloproteinasas de matriz extracelular
N	tamaño de la muestra
NADPH	nicotiamida-adenina dinucleótido fosfato
ND	no detectable
ng	nanogramo
NIDDK	National Institute of Diabetes, Digestive Diseases and Kidney
NIH	Instituto Nacional de Salud de los Estados Unidos
nm	nanometro
°C	grados centígrados
Ovx	ovariectomía
p	probabilidad
<i>p</i>	pendiente
pb	pares de bases
PBS	buffer fosfato salino
PCO	ovario poliquístico
PCOS	síndrome de ovario poliquístico
PCR	reacción en cadena de la polimerasa
pg	picogramo
PGF_{2α}	prostaglandina F _{2α}
PGE₂	prostaglandina E ₂
pH	potencial hidrógeno (-log[H ⁺])
PKA	proteína quinasa A
PKC	proteína quinasa C
PL	lactógeno placentario
PIGF	factor de crecimiento placentario
PR	receptor de progesterona
RIA	radioinmunoensayo
RNAse	ribonucleasa
rpm	revoluciones por minuto
RT	reacción de retrotranscripción
s.c.	subcutáneo
SDS	dodecilsulfato sódico
seg	segundo
sol.sat	solución saturada
SRY	región determinante del sexo en el cromosoma Y
StAR	proteína de la regulación aguda de la esteroidogénesis
TBE	buffer TRIS bórico EDTA
TBS	buffer TRIS salino
TRIS	hidroximetilaminometano

TSH	hormona estimulante de la tiroides
UA	unidades arbitrarias
UI	unidades internacionales
UV	ultravioleta
VEGF	factor de crecimiento del endotelio vascular
Vol	volumen
vs	versus
WT	<i>wild type</i> , cepa salvaje

Listado de genes

Ar	gen que codifica para el receptor de andrógenos
Cga	gen que codifica para la subunidad α de gonadotrofinas
Cyp11a1	gen que codifica para la enzima que escinde la cadena lateral de colesterol dependiente del citocromo P450 (P450 _{scc} o CYP11A)
Cyp17a1	gen que codifica para la enzima 17α -hidroxilasa/17-20 liasa dependiente del citocromo P450 (CYP17)
Cyp19a1	gen que codifica para la enzima aromatasa dependiente del citocromo P450 (CYP19)
Esr1	gen que codifica para el receptor de estrógenos α
Esr2	gen que codifica para el receptor de estrógenos β
Fshb	gen que codifica para la subunidad β de la hormona folículo estimulante o FSH
Fshr	gen que codifica para el receptor de FSH
Fst	gen que codifica para la folistatina
Gad67	gen que codifica para la enzima glutamato decarboxilasa 67 (GAD67)
Gapdh	gen que codifica para la enzima gliceraldehido 3-fosfato deshidrogenasa (GAPDH)
Gnrh	gen que codifica para la hormona liberadora de gonadotrofinas (GnRH)
Gnrhr	gen que codifica para el receptor de GnRH
Kiss1	gen que codifica para la kisspeptina
Kiss1r	gen que codifica para el receptor de kisspeptina (GPR54)
Lhb	gen que codifica para la subunidad β de la hormona luteinizante (LH)
Lhcgr	gen que codifica para el receptor de LH y hCG
Ptgs2	gen que codifica para la enzima prostaglandina endoperoxidasa sintasa 2 (PTGS2 o COX2)
Srd5a2	gen que codifica para la enzima 5α -Reductasa tipo II

ÍNDICE

INTRODUCCIÓN	1
ASPECTOS GENERALES DE LA REPRODUCCIÓN	1
Anatomía y función del tracto reproductor masculino	1
Anatomía y función del tracto reproductor femenino	3
Anatomía y función de la unidad hipotálamo-hipofisaria	4
La secreción de GnRH	6
Las gonadotrofinas	8
Los esteroides gonadales	9
ASPECTOS PARTICULARES DE LA REGULACIÓN DEL EJE HHG	13
Regulación de la producción de gonadotrofinas	13
Regulación de las neuronas GnRH	16
DESARROLLO ONTOGENÉTICO DEL EJE HHG	17
Diferenciación y maduración del tracto reproductor masculino	17
Ontogenia del funcionamiento de la unidad hipotálamo-hipofisaria	20
Impronta perinatal de los esteroides sexuales sobre el funcionamiento del eje HHG	22
ASPECTOS PARTICULARES DE LA REPRODUCCIÓN FEMENINA	25
La foliculogénesis, ovulación y formación del cuerpo lúteo	25
El ciclo estral	31
NIVELES ELEVADOS DE GONADOTROFINAS Y SU RELACIÓN CON PATOLOGÍAS	33
LA TUMORIGÉNESIS GONADAL	34
La tumorigénesis ovárica: el teratoma	34
La tumorigénesis testicular: el adenoma de células de Leydig	36
RATONES TRANSGÉNICOS COMO HERRAMIENTAS DE ESTUDIO DE LA FUNCIÓN DEL EJE HHG	37
El modelo de sobreexpresión de hCG	37
Sobreexpresión de la subunidad α (modelo hCG α +)	39
Sobreexpresión de la subunidad hCG β (modelo hCG β +)	39
Sobreexpresión de las subunidades α y hCG β (modelo hCG $\alpha\beta$ +)	40

HIPÓTESIS Y OBJETIVOS	41
HIPÓTESIS DE TRABAJO	41
OBJETIVOS GENERALES	41
OBJETIVOS ESPECÍFICOS	41
MATERIALES Y MÉTODOS	43
1. Drogas y reactivos	43
2. Cría y cuidado de los animales	44
3. Identificación de los animales transgénicos	44
3.1. Extracción de ADN genómico	45
3.2. Técnica de PCR	45
3.3. Electroforesis en gel de agarosa	46
4. Animales para la caracterización del fenotipo	46
5. Tratamientos <i>in vivo</i>	46
5.1. Tratamientos <i>in vivo</i> en machos	47
5.1.1. Tratamiento antiandrogénico	47
5.1.1.1. Tratamiento antiandrogénico perinatal	48
5.1.1.2. Tratamiento antiandrogénico desde la edad infantil	49
5.1.2. Castración	49
5.2. Tratamientos <i>in vivo</i> en hembras	50
5.2.1. Tratamiento antiandrogénico	50
5.2.2. Tratamiento antiestrogénico	50
5.2.3. Tratamiento combinado antiandrogénico y antiestrogénico	51
5.2.4. Tratamiento antiprogestagénico	51
5.2.5. Ovariectomía	52
6. Estudios de Fertilidad	52
7. Obtención del suero y procesamiento de los tejidos	53
7.1. Obtención del suero	53
7.2. Almacenamiento de los tejidos	53
7.3. Procesamiento de los sueros y tejidos para determinación hormonal	54

7.3.1. Procesamiento de los sueros para determinación de hormonas esteroideas	54
7.3.2. Procesamiento de los tejidos para determinación de hormonas esteroideas	54
7.3.3. Procesamiento de los tejidos para determinación de hormonas proteicas	54
8. Determinaciones hormonales	55
8.1. Hormonas proteicas	55
8.1.1. FSH y prolactina séricas	55
8.1.2. Niveles hipofisarios de FSH	55
8.1.3. GnRH en medios de incubación	56
8.1.4. Concentración hipotalámica de GnRH	56
8.2. Hormonas esteroideas	56
9. Ensayos de pulsatilidad de GnRH <i>ex vivo</i>	57
10. Determinación de la expresión génica	57
10.1. Extracción de ARN	57
10.2. Reacción de retrotranscripción (RT)	58
10.3. PCR	58
10.3.1. PCR semicuantitativa	58
10.3.2. PCR en Tiempo Real	59
11. Técnicas histológicas	62
11.1. Preparación de los tejidos	62
11.2. Tinción con Hematoxilina y Eosina	62
11.3. Tinción con DAPI	62
11.4. Inmunohistoquímica	62
12. Análisis estadístico de los datos	63
RESULTADOS	65
CAPITULO 1 – FENOTIPO DE LOS MACHOS hCG$\alpha\beta$+	65
1.1. Peso corporal y testicular de los machos hCG $\alpha\beta$ +	65
1.1.1. Peso corporal	65
1.1.2. Peso testicular	65

1.2. Peso de los órganos sexuales accesorios de los machos hCG $\alpha\beta$ + ...	66
1.2.1. Peso del epidídimo	66
1.2.2. Peso de la vesícula seminal	66
1.3. Cambios morfológicos en el testículo de ratones hCG $\alpha\beta$ +	67
1.4. Perfil hormonal de los machos hCG $\alpha\beta$ +: FSH y testosterona sérica ..	69
1.4.1. Niveles séricos de FSH	69
1.4.2. Niveles séricos de testosterona	69
1.5. Perfil hormonal de los machos hCG $\alpha\beta$ +: niveles intratesticulares de hormonas esteroideas	70
1.5.1. Concentración intratesticular de testosterona	70
1.5.2. Concentración intratesticular de estradiol	70
1.6. Niveles de FSH en hipófisis de machos hCG $\alpha\beta$ + prepúberes.....	71
1.6.1. Peso de la hipófisis	71
1.6.2. Niveles hipofisarios de FSH	71
1.6.3. Inmunolocalización de FSH β en la hipófisis	71
1.7. Perfil de expresión génica en la hipófisis de machos hCG $\alpha\beta$ + prepúberes	72
1.8. Expresión de GnRH en hipotálamo de machos hCG $\alpha\beta$ + prepúberes	73
1.9. Perfil de expresión génica en hipotálamo de machos hCG $\alpha\beta$ + neonatos y prepúberes	74
1.9.1. Expresión de enzimas esteroiogénicas	74
1.9.2. Expresión de <i>Kiss1</i> y <i>Gad67</i>	75
1.10. Análisis de la pulsatilidad de GnRH <i>ex vivo</i> en machos hCG $\alpha\beta$ + prepúberes	76
CAPÍTULO 2 – TRATAMIENTOS IN VIVO EN MACHOS hCG$\alpha\beta$+	78
2.1. Tratamiento antiandrogénico desde la edad infantil: peso de los órganos sexuales y fertilidad	78
2.1.1. Peso del testículo, epidídimo y vesícula seminal	78
2.1.2. Efecto del tratamiento antiandrogénico sobre la fertilidad	80

2.2. Tratamiento antiandrogénico desde la edad infantil y castración: niveles séricos de FSH	80
2.3. Efecto de la castración en machos hCG $\alpha\beta$ + prepúberes: parámetros de la función hipotálamo-hipofisaria	81
2.3.1. Perfil de expresión génica en hipófisis e hipotálamo	82
2.3.2. Concentración intrahipotalámica de GnRH	82
2.3.3. Pulsatilidad de GnRH <i>ex vivo</i>	83
2.4. Tratamiento antiandrogénico perinatal.....	85
2.4.1. Peso de los órganos sexuales	86
2.4.2. Niveles séricos de FSH y expresión génica en hipotálamo e hipófisis.....	86
CAPITULO 3 – FENOTIPO DE LAS HEMBRAS hCG$\alpha\beta$+	89
3.1. Peso corporal, del ovario, útero e hipófisis de las hembras hCG $\alpha\beta$ +	89
3.1.1. Peso corporal	89
3.1.2. Peso del ovario	89
3.1.3. Peso del útero	90
3.1.4. Peso de la hipófisis	90
3.1.5. Apertura vaginal	91
3.2. Perfil hormonal de las hembras hCG $\alpha\beta$ +.....	91
3.2.1. Niveles séricos de testosterona.....	91
3.2.2. Niveles séricos de progesterona	91
3.2.3. Niveles séricos de estradiol	91
3.2.4. Niveles séricos de FSH	92
3.2.5. Niveles séricos de prolactina	92
3.3. Análisis de la función hipotálamo-hipofisaria de las hembras hCG $\alpha\beta$ +.....	94
3.3.1. Niveles hipofisarios de FSH a distintas edades	94
3.3.2. Perfil de expresión génica en hipófisis a las 3 semanas de edad ...	94
3.3.3. Perfil de expresión génica en hipotálamo a las 3 semanas de edad	95

3.4. Cambios morfológicos en el ovario de las hembras hCG $\alpha\beta$ +	97
3.4.1. Histología ovárica a las 2 semanas de edad	97
3.4.2. Histología ovárica a las 3 semanas de edad	98
3.4.3. Histología ovárica a las 6 semanas de edad	99
3.4.4. Histología ovárica a las 8 semanas de edad	101
3.5. Expresión génica en ovarios WT y hCG $\alpha\beta$ +	104
3.5.1. Evaluación de la expresión génica a las 2 semanas de edad	105
3.5.2. Evaluación de la expresión génica a las 3 semanas de edad	105
3.5.3. Evaluación de la expresión génica a las 6 semanas de edad	106
3.6. Inmunolocalización de CYP11A en el ovario WT y hCG $\alpha\beta$ +	107
3.6.1. Inmunolocalización de CYP11A a las 2 semanas de edad	107
3.6.2. Inmunolocalización de CYP11A a las 3 semanas de edad	108
3.6.3. Inmunolocalización de CYP11A a las 6 semanas de edad	108
CAPITULO 4 – TRATAMIENTOS <i>IN VIVO</i> EN HEMBRAS hCG$\alpha\beta$+	110
4.1. Efecto de la ovariectomía sobre la unidad hipotálamo-hipofisaria a las 3 semanas	110
4.1.1. Niveles séricos de FSH	110
4.1.2. Perfil de expresión génica en hipófisis	111
4.1.3. Perfil de expresión génica en hipotálamo	112
4.2. Validación de los tratamientos antihormonales	114
4.2.1. Validación del tratamiento antiandrogénico con flutamida	114
4.2.2. Validación del tratamiento antiestrogénico con fulvestrant	115
4.2.3. Validación del tratamiento antiprogestagénico con mifepristona	116
4.3. Tratamientos antihormonales a las 6 semanas de edad: peso ovárico y uterino	117
4.3.1. Peso ovárico	117
4.3.2. Peso uterino	117
4.4. Tratamientos antihormonales a las 6 semanas de edad: histología ovárica	118
4.4.1. Tratamiento con flutamida	118
4.4.2. Tratamiento con fulvestrant	118

4.4.3. Tratamiento combinado con flutamida y fulvestrant	119
4.4.4. Tratamiento con mifepristona	119
4.5. Tratamientos antihormonales a las 6 semanas de edad: niveles séricos de FSH.....	121
4.6. Tratamiento antiandrogénico: expresión génica en ovario a las 6 semanas de edad	121
4.7. Tratamientos antihormonales a las 12 semanas de edad: peso corporal, ovárico y uterino	122
4.7.1. Peso corporal	122
4.7.2. Peso uterino	122
4.7.3. Peso ovárico	123
4.8. Tratamientos antihormonales a las 12 semanas de edad: histología ovárica	125
4.8.1. Tratamiento con flutamida	125
4.8.2. Tratamiento con fulvestrant	126
4.8.3. Tratamiento combinado con flutamida y fulvestrant	126
4.8.4. Tratamiento con mifepristona	126
DISCUSIÓN	131
El fenotipo de los machos hCG $\alpha\beta$ +	131
Tratamientos <i>in vivo</i> en los machos hCG $\alpha\beta$ +	137
El fenotipo de las hembras hCG $\alpha\beta$ +	139
Tratamientos <i>in vivo</i> en las hembras hCG $\alpha\beta$ +	146
CONCLUSIONES	151
REFERENCIAS	153

INTRODUCCIÓN

ASPECTOS GENERALES DE LA REPRODUCCIÓN

En los mamíferos de ambos sexos, la reproducción depende de interacciones endocrinas entre la unidad hipotálamo-hipofisaria y el tracto reproductivo, éste último conformado por las gónadas y los órganos sexuales accesorios. La interacción entre el hipotálamo, la hipófisis y las gónadas se denomina *eje hipotálamo-hipófiso-gonadal* (HHG), el cual se encarga de coordinar dos procesos claves en la reproducción sexual: la síntesis de esteroides y la producción de gametas. Los esteroides sexuales son vitales en la función gonadal, donde participan en la espermatogénesis y la maduración folicular. Además, promueven el crecimiento y desarrollo de los órganos reproductivos y la aparición de los caracteres sexuales secundarios. Asimismo, actúan sobre la unidad hipotálamo-hipofisaria influenciando la secreción de gonadotrofinas mediante sistemas de retroalimentación y cumplen un rol fundamental en el comportamiento sexual (Sisk y Foster 2004).

➤ **Anatomía y función del tracto reproductor masculino**

El *tracto reproductor masculino* de los mamíferos está compuesto por una serie de órganos y conductos, que en conjunto cumplen con la función de producir espermatozoides, contribuir con las distintas secreciones del líquido seminal y transportarlos hacia el tracto genital femenino.

Los *testículos* están ubicados fuera de la cavidad abdominal en un saco de piel denominado escroto, y son lo encargados de la producción de andrógenos y de proporcionar el entorno adecuado para la producción de espermatozoides. Del testículo emerge el *conducto eferente*, el cual desemboca en el *epidídimo*, y se continúa con el *conducto deferente* por donde son transportados los espermatozoides. Cada conducto deferente desemboca en un *conducto eyaculador* corto, que luego de atravesar la próstata se comunica con la *uretra*. Las *glándulas sexuales accesorias*, que incluyen la *vesícula seminal*, la *próstata*, las *glándulas coagulantes*, las *glándulas bulbo uretrales* o de Cowper y las *glándulas uretrales* o de Littré, aportan secreciones que constituyen la fracción principal del líquido seminal (Fig. 1) (Geneser 2000a).

Los testículos de los mamíferos se pueden dividir funcional y estructuralmente en dos compartimientos: el tubular y el intersticial (Fig. 1). La mayor parte del volumen testicular está ocupado por los túbulos seminíferos, los cuales conforman la unidad productora de espermatozoides y están compuestos por un epitelio seminífero que contiene dos tipos principales de células: las *células de Sertoli*, y las células de la serie espermatogénica, que comprenden las *espermatogonias*, *espermatoцитos primarios y secundarios*, *espermátides* y *espermatozoides* (Geneser 2000a). El tejido intersticial que completa los espacios entre los túbulos seminíferos contiene las *células de Leydig*, principal fuente productora de andrógenos, *mastocitos* y *macrófagos*, vasos sanguíneos y linfáticos y terminaciones nerviosas. Las células de Leydig se asocian a los vasos sanguíneos y a las paredes de los túbulos seminíferos, y su número varía según la especie, observándose mayor producción de andrógenos en aquellas especies donde existe un mayor número de células de Leydig (Setchell y col. 1994).

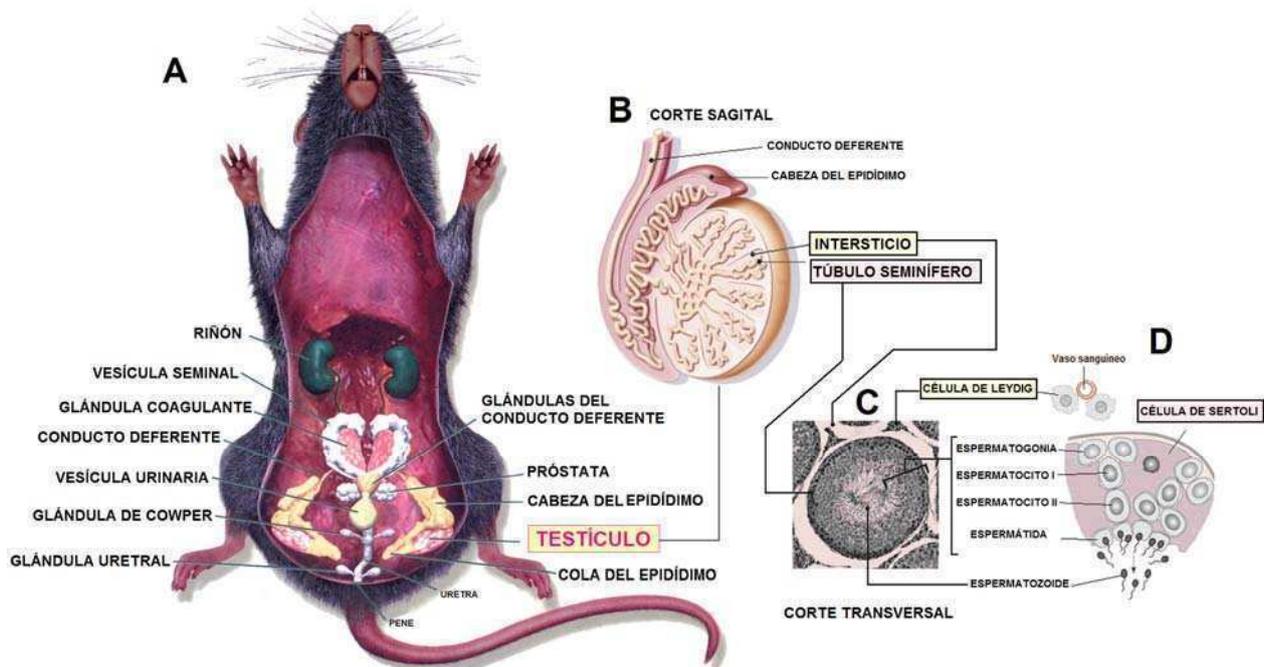


Figura 1. A) Anatomía del tracto reproductor masculino en el ratón, B) esquema de un corte sagital del testículo y epidídimo, C) corte histológico transversal del testículo, donde se pueden observar los compartimientos tubular e intersticial, y D) esquema de los tipos celulares más importantes presentes en ambos compartimientos.

➤ Anatomía y función del tracto reproductor femenino

El *tracto reproductor femenino* está compuesto por los *ovarios*, *oviductos*, el *útero* y la *pared vaginal* (Fig. 2). Los ovarios son los responsables de la generación de ovocitos y de la síntesis de hormonas esteroideas y peptídicas, que mantienen los caracteres secundarios femeninos y el trofismo de los demás órganos del tracto reproductor femenino. Las hormonas esteroideas más importantes sintetizadas por el ovario son los estrógenos y progestágenos, y en menor proporción, los andrógenos (Greenway y Roy 1994).

El ovario está compuesto por una gruesa *corteza* externa, poco delimitada de una *médula* central, formada por tejido conectivo con abundantes vasos sanguíneos, vías linfáticas y fibras nerviosas. La corteza se compone de un estroma de tejido conectivo formado por distintas estructuras, entre las que se ubican los *folículos ováricos*, compuestos por dos tipos celulares separados por una membrana basal: las *células de la teca*, ubicadas en la periferia, y las *células de la granulosa*, ubicadas dentro del folículo y en contacto con el ovocito (Fig. 2). Los folículos ováricos producen principalmente andrógenos y estradiol, y pueden encontrarse en diferentes estadios de desarrollo o degeneración. Otras estructuras presentes en la corteza son los *cuerpos lúteos*, formados por células tecales y granulosas remanentes del folículo ovárico, las cuales luego de la ovulación sufren un proceso denominado *luteinización* y se transforman en *células luteales*, productoras de progesterona. Los cuerpos lúteos constituyen estructuras endocrinas transitorias que van regresionando hasta perder la capacidad de sintetizar hormonas. También pueden encontrarse células del sistema inmune (Geneser 2000a).

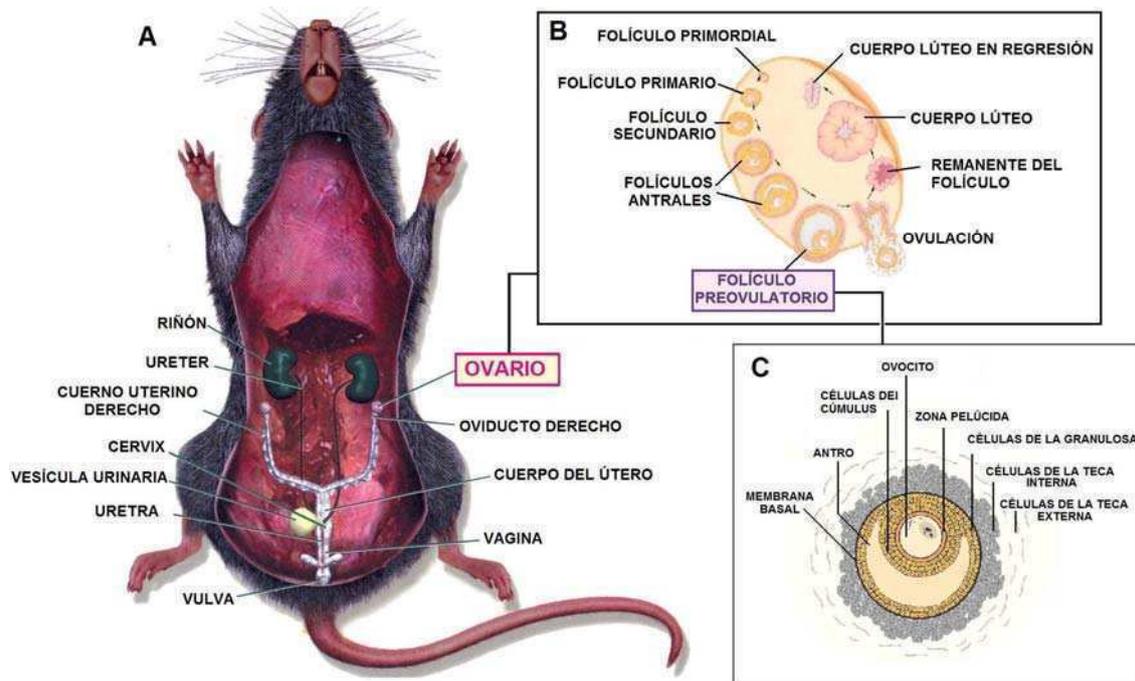


Figura 2. A) Anatomía del tracto reproductor femenino en el ratón, B) detalle del ovario y sus estructuras más importantes: folículos ováricos y cuerpos lúteos, en distintos estadios del desarrollo, y C) detalle de un folículo preovulatorio.

➤ Anatomía y función de la unidad hipotálamo-hipofisaria

El hipotálamo y la hipófisis forman una unidad funcional de vital importancia para la coordinación de una variedad de procesos fisiológicos, entre ellos la reproducción. El hipotálamo está situado en torno a la base del tercer ventrículo, por debajo del tálamo y por encima de la hipófisis, a la cual está unido por el tallo hipofisario, y está dividido en varios núcleos diferentes, los cuales son agregados de cuerpos neuronales. Existen nervios que lo conectan con todas las regiones del cerebro, entre ellos nervios que proceden de las zonas erógenas (los genitales y los pezones), de los órganos internos y del sistema límbico. Es capaz de detectar cambios en la osmolaridad de la sangre, y se ve afectado por las concentraciones de las distintas hormonas presentes en el torrente sanguíneo. De este modo, el hipotálamo es el centro de la regulación neuroendocrina, autónoma y homeostática, y actúa como un centro integrador coordinando mensajes del entorno, ritmos, patrones de desarrollo endógeno y señales corporales, para producir finalmente, de una forma integrada, respuestas autónomas y endocrinas. El hipotálamo tiene conexiones vasculares con el lóbulo anterior de la hipófisis, denominado *adenohipófisis*. Estos capilares sanguíneos se conocen como *sistema portal*

hipotálamo-hipofisario, y conectan los lechos capilares del hipotálamo con los lechos de la adenohipófisis (Fig. 3). Así, permiten que las hormonas y los factores liberadores que secreta el hipotálamo se desplacen hacia la adenohipófisis, donde actúan sobre las células hipofisarias. Es de esta forma como las hormonas hipotalámicas se ponen en contacto con sus células blanco rápidamente y a elevadas concentraciones, antes de diluirse en la circulación general. Esta proximidad resulta crucial para la preservación del ritmo pulsátil neurosecretor de las neuronas hipotalámicas. También hay nervios que conectan el hipotálamo con el lóbulo posterior de la hipófisis, denominado *neurohipófisis*, a través del tallo hipofisario. Las hormonas que secreta el hipotálamo descenden por estas neuronas hasta el lóbulo posterior de la hipófisis, antes de ser liberadas al torrente sanguíneo (Geneser 2000b).

En los mamíferos, la producción de esteroides sexuales y la gametogénesis está finamente regulada por la acción de las *gonadotrofinas adenohipofisarias: hormona luteinizante (LH) y hormona folículo estimulante (FSH)*, cuya producción está bajo el control directo de la secreción hipotalámica de la *hormona liberadora de gonadotrofinas (GnRH)* (Fig. 3). Tanto LH como FSH son secretadas por un mismo tipo celular: los gonadotropos, los cuales constituyen aproximadamente el 7-15% de la población celular de la hipófisis. Dentro de la población de gonadotropos, se encuentran los que producen LH, los que producen FSH, y los que tienen la capacidad de producir ambas gonadotrofinas. Los gonadotropos son el blanco de GnRH, un pequeño péptido de 10 aminoácidos producido por neuronas peptidérgicas localizadas en el hipotálamo, denominadas *neuronas GnRH*. Dichas neuronas proyectan sus axones hacia la eminencia media y secretan GnRH en forma pulsátil al sistema vascular portal hipofisario, por donde llega hasta la adenohipófisis y estimula la secreción de LH y FSH (Silverman y col. 1979; Burger y col. 2004). Las gonadotrofinas viajan por el sistema circulatorio y actúan en las células blanco del ovario y testículo orquestando la producción de ovocitos y espermatozoides, así como la secreción de hormonas esteroideas y peptídicas.

En contraste con otras neuronas hipotalámicas secretoras de péptidos, las neuronas GnRH no forman núcleos bien definidos, sino que se presentan como redes laxas dispersas a través de distintos núcleos hipotalámicos. En los roedores hay dos áreas del hipotálamo que son particularmente ricas en

neuronas GnRH, y ambas están involucradas en la regulación de la secreción de gonadotropinas: los *núcleos arcuato y ventromedial*, ubicados en el *hipotálamo medio basal*, y el *núcleo anteroventral paraventricular (AVPV)*, ubicado en el *área preóptica y supraquiasmática del hipotálamo anterior* (Silverman y col. 1987).

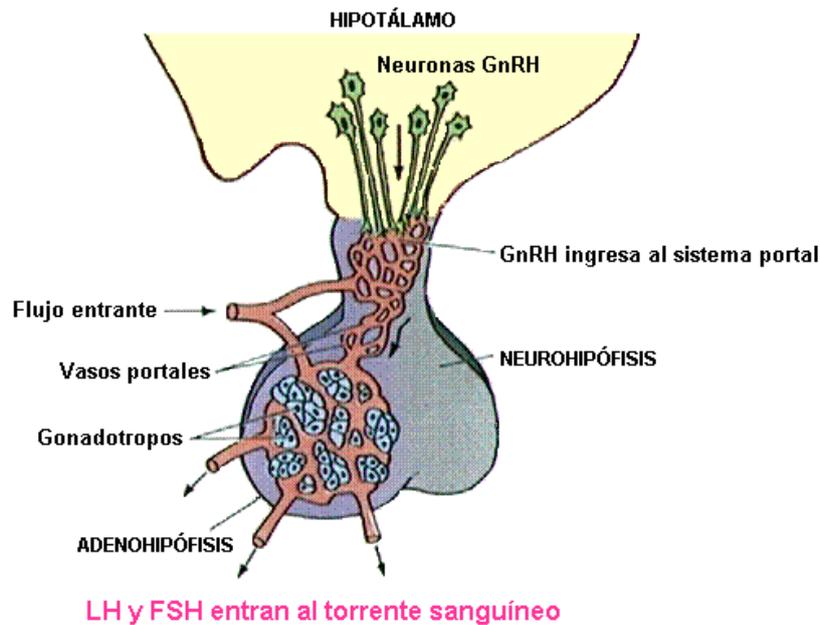


Figura 3. La unidad hipotálamo-hipofisaria, encargada de la secreción de GnRH y gonadotropinas. Las neuronas GnRH, ubicadas en el hipotálamo, descargan GnRH desde sus terminales axónicas hacia el sistema vascular portal, por donde llega a los gonadotropos de la hipófisis y estimula la síntesis y secreción de LH y FSH.

➤ La secreción de GnRH

La secreción pulsátil de GnRH es el resultado de un “*generador de pulsos*” situado en el interior del hipotálamo medio basal (Rasmussen y col. 1989). Dicha liberación episódica de GnRH es regulada a nivel central en amplitud y frecuencia, y es esencial para el mantenimiento de los perfiles séricos de gonadotropinas requeridos para lograr una gametogénesis y esteroidogénesis normal (Counis y col. 2005). El análisis de los mecanismos subyacentes a la secreción pulsátil de GnRH y a su regulación tuvo un desarrollo muy importante a partir de la generación de la línea celular de neuronas GT-1 secretoras de GnRH, inmortalizadas por Mellon y col. (1990). La naturaleza pulsátil de estas células inmortalizadas llevó a postular que la pulsatilidad es una cualidad intrínseca de las neuronas GnRH, cuya amplitud y

frecuencia es regulada por distintos agentes moduladores, y que no se requerirían otros tipos celulares neuronales o no neuronales para producir el patrón de liberación observado. Por lo tanto, se postuló a la *red de neuronas GnRH per se* como el “*generador de pulsos de GnRH*” (Wetsel y col. 1992).

El GnRH interactúa con receptores celulares de alta afinidad en la membrana plasmática de los gonadotropos, estimulando la síntesis y secreción de LH y FSH (Marshall y col. 1993). La frecuencia de pulsos de GnRH regula la liberación de gonadotrofinas de manera diferencial, donde *pulsos de baja frecuencia favorecen la secreción de FSH*, mientras que *pulsos de alta frecuencia favorecen la secreción de LH* (Wildt y col. 1981). Sin embargo, GnRH regula principalmente la secreción de LH, mientras que la de FSH es más dependiente de la regulación negativa de péptidos gonadales como la inhibina, y también de péptidos producidos localmente en la hipófisis como la activina y la folistatina (Gharib y col. 1990; Haisenleder y col. 1994).

El receptor de GnRH (GnRHR) pertenece a la familia de receptores acoplados a proteína G, y su activación conduce al inicio de una variedad de cascadas de señalización intracelular que incluye un aumento en los niveles de Ca^{2+} intracelular y la activación de la proteína quinasa C (PKC) (Stojilkovic y col. 1994; Chen y Moenter 2009). La naturaleza pulsátil de la liberación hipotalámica de GnRH no sólo determina la secreción episódica de las gonadotrofinas hipofisarias, sino también el número de GnRHRs presentes en la superficie celular de los gonadotropos (Marian y col. 1981). La pulsatilidad fisiológica del GnRH posee un atributo de autoestimulación sobre sus receptores en el gonadotropo, denominado regulación por aumento o “*up regulation*”. En contraste, una frecuencia muy elevada o la exposición constante a GnRH conduce a un estado de regulación por descenso de GnRHR o “*down regulation*”, induciendo un estado refractario sobre la regulación de las gonadotrofinas (Yen 2001). GnRH y GnRHR también se detectaron en tejidos extrahipofisarios tales como el ovario, testículo, hipocampo, hipotálamo, próstata, mama y placenta, donde se los vinculó a la inhibición de la proliferación de ciertos tipos celulares, control de la esteroidogénesis, etc (Ramakrishnappa y col. 2005).

➤ Las gonadotrofinas

Además de LH y FSH, la familia de las gonadotrofinas está compuesta por la *gonadotrofina coriónica* (CG). Junto con la *hormona estimulante de la tiroides* (TSH), todas son hormonas glicoproteicas compuestas por dos subunidades, alfa (α) y beta (β), asociadas por interacciones no covalentes. La subunidad α es común a todas las hormonas de esta familia, mientras que la subunidad β determina la especificidad biológica. La expresión de la subunidad β es el paso limitante en la modulación de los niveles de estas hormonas, mientras que la expresión de la subunidad α es más abundante y se la encuentra libre en suero (Pierce y Parsons 1981; Gharib y col. 1990).

La FSH, LH y TSH son producidas por la hipófisis, mientras que la CG es secretada por la placenta humana (hCG) y equina (eCG). La eCG posee actividad FSH y LH cuando es administrada en especies distintas al equino, en donde sólo posee actividad LH, mientras que hCG sólo posee actividad LH (Murphy y Martinuky 1991). Las hormonas LH y hCG son altamente homólogas, están íntimamente relacionadas en estructura y función e interactúan con el mismo receptor. hCG funciona como un superagonista de LH ya que su extremo C-terminal altamente glicosilado le otorga mayor vida media y, en consecuencia mayor biopotencia (Jameson y Hollemberg 1993).

El receptor de FSH (FSHR) y el de LH/hCG (LHCGR) pertenecen a la familia de receptores acoplados a proteína G, y poseen las características típicas de este grupo de receptores: un dominio extracelular de unión a la hormona, un dominio transmembrana que atraviesa 7 veces la membrana plasmática, y un dominio citoplasmático acoplado a una o más proteínas G, que transducen la señal a la célula. La unión de FSH y LH/hCG a sus receptores específicos conduce a la activación de una proteína $G_{\alpha s}$ que activa a la adenilato ciclasa, la cual convierte el ATP en el segundo mensajero AMPc. Este segundo mensajero se une a la subunidad regulatoria de la proteína quinasa A (PKA), la cual se activa y fosforila una variedad de moléculas blanco intracelulares (Segaloff y col. 1990). Si bien el AMPc es considerado el principal mediador de la acción de FSHR y LHCGR, también puede ocurrir la activación de la vía de PKC por inositol 1,4,5-trifosfato (IP_3) y 1,2-diacilglicerol (DAG). La activación de la vía de PKC generalmente requiere dosis más elevadas de

LH/hCG que las necesarias para lograr aumentos en los niveles de AMPc (Davis 1994). Se observó además que el estímulo con LH/hCG y FSH también es capaz de activar la cascada de señalización de la quinasa ERK (*extracellular signal-regulated kinase*) (Amsterdam y col. 2002).

La estimulación repetitiva o prolongada de ambos receptores de gonadotrofinas inicia un proceso denominado *desensibilización*, que reduce la capacidad de respuesta de las células. La desensibilización tiene lugar a través de un mecanismo rápido que se denomina *desacoplamiento* y que ocurre en minutos, así como a través de un proceso más lento que conduce a la *regulación por descenso* o “*down regulation*” del receptor. El mecanismo de desensibilización involucra: a) la fosforilación del receptor por las mismas quinasas que activa la transducción de la señal, provocando el desacoplamiento del receptor de su proteína G, b) un aumento en la tasa de internalización del receptor, c) la regulación por descenso del receptor, que involucra una disminución tanto del ARNm como de la síntesis proteica, y d) la degradación de los receptores preexistentes (Davis 1994; Ferguson 2001; Amsterdam y col. 2002).

El sitio primario de expresión de FSHR y LHCGR es el tejido gonadal, donde son indispensables para la fertilidad (Pakarainen y col. 2005a y b). Sin embargo, LHCGR también se encuentra en otros tejidos como útero, placenta, oviducto, próstata, vesícula seminal, linfocitos, glándula mamaria, riñón, glándula adrenal, médula espinal, cerebro y piel, pero su función en estos tejidos aún no ha sido esclarecida (Themmen y Huhtaniemi 2000; Rao y Lei 2007). La expresión de LHCGR es inducida por FSH y LH/hCG, como también por prolactina (Solano y col. 1980; Calandra y col. 1982; Reshef y col. 1990).

➤ **Los esteroides gonadales**

Los esteroides sexuales son sintetizados en las gónadas como respuesta al estímulo de LH. El precursor común de todas las hormonas esteroideas es el colesterol, el cual es transformado en los distintos metabolitos mediante una serie de pasos enzimáticos altamente regulados. El colesterol utilizado proviene principalmente de depósitos citoplasmáticos, también conocidos como gotas lipídicas, aunque también puede provenir de

lipoproteínas plasmáticas o de la síntesis *de novo* (Payne 1990). La traslocación del colesterol desde la membrana mitocondrial externa a la interna está facilitada por la acción de la *proteína de la regulación aguda de la esteroidogénesis*, más conocida como StAR (*Steroidogenic Acute Regulatory protein*) (Stocco 2000).

El paso inicial en la biosíntesis de esteroides es la conversión de colesterol, de 27 átomos de carbono, en pregnenolona, de 21 átomos de carbono (Fig. 4). Este paso está mediado por un único complejo enzimático denominado *complejo de escisión de la cadena lateral de colesterol dependiente del citocromo P450* ó *P450_{scc}* (*P450 Side Chain Cleavage*) (Shikita y Hall 1973). Los citocromos P450 son una familia de supergenes que han recibido la denominación de CYP, por lo que a P450_{scc} también se lo conoce con el nombre de *CYP11A* (Nelson y col. 1996). La reacción tiene lugar en la membrana mitocondrial interna y comprende dos hidroxilaciones sucesivas en los carbonos 22 y 20 y la escisión de la cadena lateral del colesterol en presencia de oxígeno molecular y NADPH (Payne 1990; Porter y Coon 1991).

La síntesis de esteroides sexuales a partir de pregnenolona comprende la acción de la 17 α -hidroxilasa-17,20-liasa (CYP17), las deshidrogenasas 3 β -HSD y 17 β -HSD, la 5 α -reductasa (5 α -Red) y la aromatasa (CYP19) (Fig. 4). La hidroxilasa y la aromatasa también reciben la designación CYP porque al igual que CYP11A son miembros de la familia de supergenes del citocromo P450 (Nelson y col. 1993). La síntesis de esteroides consiste en dos vías generales: la vía de la pregnenolona, también conocida como vía Δ_5 , y la vía de la progesterona, producida a partir de la pregnenolona por la acción de la 3 β -HSD y también conocida como vía Δ_4 (Fig. 4). La rata y el ratón utilizan preferentemente la vía Δ_4 (Payne y Youngblood 1995; Pertiwi y col. 2002), mientras que el mono y el humano utilizan preponderantemente la vía Δ_5 (Rey y col. 1995; Preslock 1980).

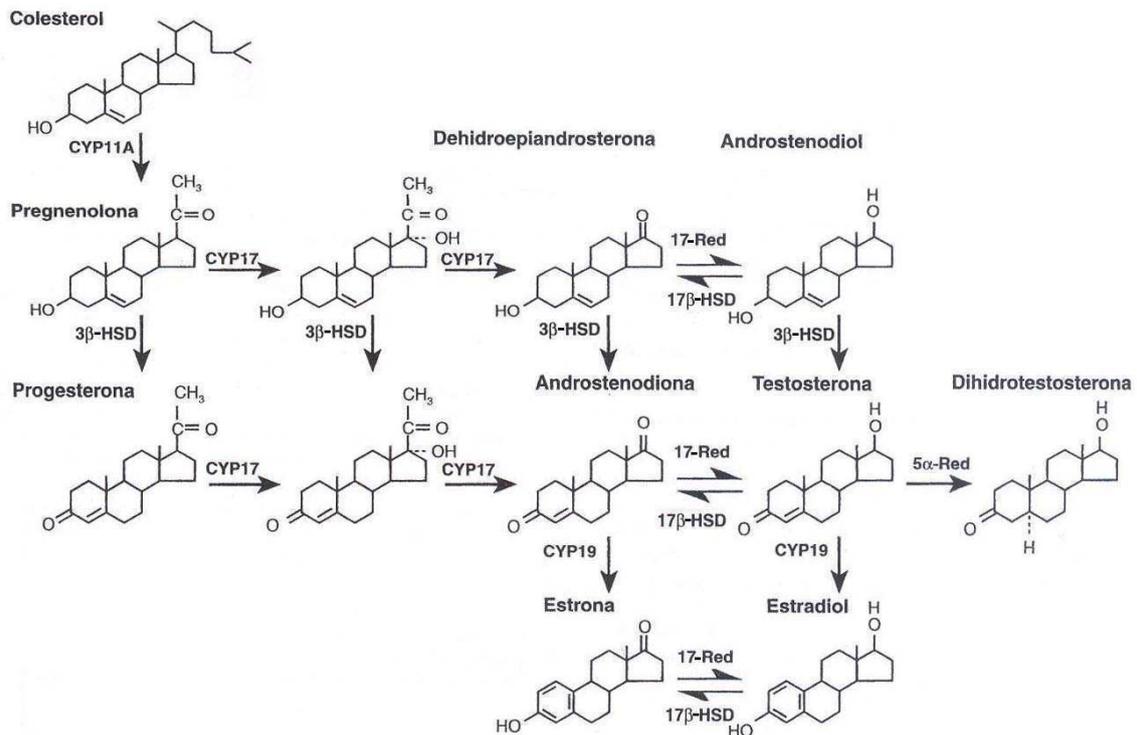


Figura 4. Esquema general de la síntesis de esteroides sexuales. CYP11A: complejo de escisión de la cadena lateral de colesterol o citocromo P450_{sc}; CYP17: 17 α -hidroxilasa-17,20-liasa; 3 β -HSD: 3 β -hidroxiesteroide deshidrogenasa; 17 β -HSD: 17 β -hidroxiesteroide deshidrogenasa; 17-Red: 17-Reductasa; CYP19: Aromatasa; 5 α -Red: 5 α -Reductasa (tomado y modificado de O'Malley y Strott 2001).

Los esteroides sexuales son secretados desde sus órganos endocrinos respectivos al torrente sanguíneo, donde circulan principalmente unidos a proteínas plasmáticas de transporte, las cuales brindan un reservorio a la vez que regulan el aporte de esteroides a las células. Los esteroides libres difunden hacia el interior de la célula y se combinan con los receptores específicos presentes en el compartimiento citoplasmático o nuclear de aquellas células blanco en las que ejercerán sus funciones (O'Malley y Strott 2001).

Los receptores de esteroides se encuentran en el citoplasma o núcleo de la célula en estado inactivo, y al formar un complejo con la hormona sufren un cambio conformacional alostérico que los convierte en factores de transcripción, capaces de activar (o inhibir) la transcripción génica. Los receptores de esteroides son miembros de la superfamilia de *receptores nucleares*, los cuales contienen un dominio de unión al ADN, un dominio de unión a la hormona, y los dominios de activación. Para funcionar de manera eficiente y directa los receptores deben dimerizar, interactuar con secuencias específicas del ADN y luego acoplarse con otros factores de transcripción para

formar un complejo multimérico estable que estimula a la ARN polimerasa para que inicie la transcripción (O'Malley y Strott 2001). Además de los mecanismos que involucran la transcripción génica, denominados *mecanismos genómicos*, se han descrito *mecanismos no genómicos* rápidos capaces de activar distintas cascadas de señalización (Wendler y col. 2010).

La acción de los estrógenos es mediada por dos tipos de receptores nucleares, denominados receptor de estrógenos α (ESR1 o ER α) y β (ESR2 o ER β). ER α y ER β son sintetizados a partir de dos genes diferentes y se detectan en una gran variedad de tejidos. En algunos órganos, ambos subtipos se expresan en niveles similares, mientras que en otros algún subtipo es predominante. Además, dentro de un mismo tejido ambos receptores pueden estar presentes, pero en distintos tipos celulares. ER α se expresa mayoritariamente en el útero, próstata (estroma), ovario (células tecales e intersticiales), testículo (células de Leydig), epidídimo, hueso, mama, varias regiones cerebrales incluyendo el hipotálamo y la hipófisis, hígado y tejido adiposo. ER β se expresa en el colon, próstata (epitelio), testículo, ovario (células de la granulosa), médula ósea, glándulas salivales, células endoteliales vasculares y ciertas regiones del cerebro (Weihua y col. 2003; Dahlman-Wright y col. 2006).

Los andrógenos ejercen su efecto tras unirse al receptor de andrógenos (AR). El mecanismo de acción de los andrógenos es más complejo que el de los estrógenos o progestágenos, ya que la testosterona puede actuar por sí misma uniéndose a AR, convertirse en dihidrotestosterona (DHT) por la acción de 5 α -Red y unirse a AR con más afinidad, o aromatizarse a estradiol por la acción de CYP19 y activar a ER α o ER β . La aromatización o 5 α -reducción de testosterona no sólo ocurre dentro de la célula esteroideogénica sino en los mismos tejidos blanco que pueden expresar 5 α -Red o CYP19. AR se expresa mayoritariamente en el testículo (células de Sertoli) y ovario (células de la granulosa, células tecales, células estromales, ovocito), como también en hipófisis, hipotálamo, hueso, piel, tejido cardiovascular, varias áreas cerebrales, tejido adiposo, folículos pilosos, glándulas sebáceas, etc (Walters y col. 2008; Verhoeven y col. 2010).

En humanos y otros vertebrados, la actividad biológica de la progesterona es mediada por la modulación de la actividad transcripcional de dos receptores de progesterona (PR): PR-A y PR-B. Estos receptores surgen de un mismo gen que posee dos promotores alternativos, y muestran tanto actividades superpuestas como actividad transcripcional diferencial. La producción de estas dos isoformas está conservada en un gran número de vertebrados, incluidos el hombre y el ratón, y la proporción de cada isoforma individual varía en los tejidos reproductivos en función del desarrollo, estado hormonal y durante la carcinogénesis. PR se expresa en el ovario (células de la granulosa de folículos preovulatorios, células luteales), glándula mamaria, sistema nervioso central e hipófisis, pero por lo general tiene una distribución más limitada en los tejidos que los receptores de otras hormonas esteroideas (Mulac-Jericevic y Conneely 2004).

ASPECTOS PARTICULARES DE LA REGULACIÓN DEL EJE

HHG

➤ **Regulación de la producción de gonadotrofinas**

La expresión de las gonadotrofinas está modulada por:

- **Factores hipotalámicos:** principalmente GnRH.
- **Factores intrahipofisarios:** especialmente por péptidos como activina y folistatina.
- **Retroalimentación gonadal:** de los esteroides sexuales y péptidos como inhibina.

Inhibina, activina y folistatina son los factores regulatorios de la síntesis de FSH más recientemente identificados. Inhibina y activina son glicoproteínas estructuralmente relacionadas pero de efectos opuestos sobre la regulación de FSH. Estudios *in vivo* e *in vitro* demostraron que inhibina actúa en el gonadotropo regulando negativamente la síntesis y secreción de FSH, mientras que activina posee el efecto opuesto. Numerosos estudios indican que activina ejerce su acción principalmente como factor paracrino y autocrino hipofisario,

mientras que inhibina actúa principalmente como factor endocrino de origen gonadal. Folistatina es una glicoproteína monomérica estructuralmente distinta a inhibina y activina, producida por una gran variedad de tejidos, incluidos la mayoría de los tipos celulares de la adenohipófisis, siendo particularmente abundante en las células foliculoestrelladas hipofisarias. Su función es unirse a activina y neutralizar su actividad biológica, y se demostró que el control de folistatina sobre activina es un factor clave en la secreción basal de FSH por el gonadotropo (Bilezikjian y col. 2004). Si bien la pulsatilidad de GnRH regula principalmente la expresión de LH β , existen evidencias que la regulación de FSH β por GnRH se lleva a cabo a través de folistatina, donde pulsos de GnRH de alta frecuencia aumentan su expresión tanto *in vivo* como *in vitro* (Kirk y col. 1994). Además, la castración induce un aumento en folistatina que es revertido luego del tratamiento con GnRH (Dalkin y col. 1998).

La regulación de la secreción de gonadotrofinas por esteroides y péptidos gonadales se lleva a cabo mediante sistemas de retroalimentación negativos en machos y hembras, y positivos sólo en hembras (Fig. 5). En el macho, los andrógenos actúan a nivel central frenando la generación de pulsos hipotalámicos por medio de una retroalimentación negativa (Urban y col. 1988). La testosterona también actúa a nivel hipofisario inhibiendo la síntesis de las subunidades α y LH β , pero no de FSH β , la cual es regulada por la retroalimentación negativa de la inhibina producida por las células de Sertoli (Gharib y col. 1990). La retroalimentación negativa de los andrógenos es ejercida en gran parte por la aromatización de testosterona a estradiol, el cual ejerce su acción inhibitoria a través de ER α tanto a nivel hipotalámico como hipofisario. Sin embargo AR también está involucrado en la retroalimentación negativa, como lo sugieren estudios con fármacos androgénicos no esteroideos y antiandrógenos específicos (Veldhuis 2001).

En contraste con el macho, cuya producción constante de espermatozoides se regula con un mecanismo simple de retroalimentación por esteroides gonadales, el patrón discontinuo de liberación de gametas por la hembra necesita sistemas de control complejos. En la hembra, el estradiol producido en la fase folicular y la progesterona producida en la fase luteínica inhiben la secreción de GnRH y la producción de gonadotrofinas. Sin embargo,

en el momento previo a la ovulación los estrógenos producidos por los folículos ovulatorios llegan a una concentración máxima y son capaces de realizar una retroalimentación positiva a nivel del hipotálamo, provocando una descarga masiva de GnRH, que impactará en la hipófisis disparando asimismo una descarga masiva LH. Este aumento de LH se denomina “*pico preovulatorio de LH*”, y es el gatillo para que ocurra la ovulación (Liu y Yen 1983) (Fig. 5). En roedores, ovejas y primates se propuso que el núcleo arcuato contiene el sustrato neuronal encargado de la regulación del eje reproductivo por retroalimentación negativa de los andrógenos y estrógenos en ambos sexos, mientras que en el AVPV se encuentran los circuitos capaces de responder a la retroalimentación positiva de los estrógenos e inducir el pico preovulatorio de LH sólo en las hembras (Simerly 1998; Kauffman 2009).

Durante el ciclo reproductivo femenino existen diferencias en la sensibilidad de la adenohipófisis a GnRH, debido a que esta hormona es capaz de aumentar la respuesta adenohipofisaria a su propio estímulo, haciendo que la respuesta de LH a un segundo estímulo de GnRH sea siempre mayor. Este efecto se denomina autopotenciación o “*self priming*”, y es indispensable para que ocurra el pico preovulatorio de LH, ya que estimula la capacidad de la adenohipófisis de responder a GnRH, y coordina este incremento exponencial en la capacidad de respuesta con el momento de liberación máxima de GnRH (de Koning 1995). El efecto de autopotenciación involucra a) cambios en las cascadas de señalización post-receptor, b) potenciación por estrógenos, los cuales estimulan la expresión de PR y aumentan aún más la sensibilidad adenohipofisaria (Sánchez-Criado y col. 2006), c) regulación positiva de GnRHR, que aumenta su propia expresión, haciendo que la cantidad de receptores sea máxima en el momento preovulatorio (Kaiser y col. 1997). Así como los altos niveles de progesterona producidos en la etapa luteínica inhiben la frecuencia y amplitud de los pulsos de GnRH y la síntesis de LH y FSH, en la fase folicular los niveles moderados de progesterona en presencia de estradiol tienen efectos facilitatorios sobre el pico de LH, ya que el estradiol induce la expresión de PR en hipotálamo y adenohipófisis (Gordon y col. 2009). Este aumento preovulatorio de progesterona es necesario para que el pico de LH ocurra en su máxima amplitud (Mahesh y Muldoon 1987; Caraty y Skinner 1999).

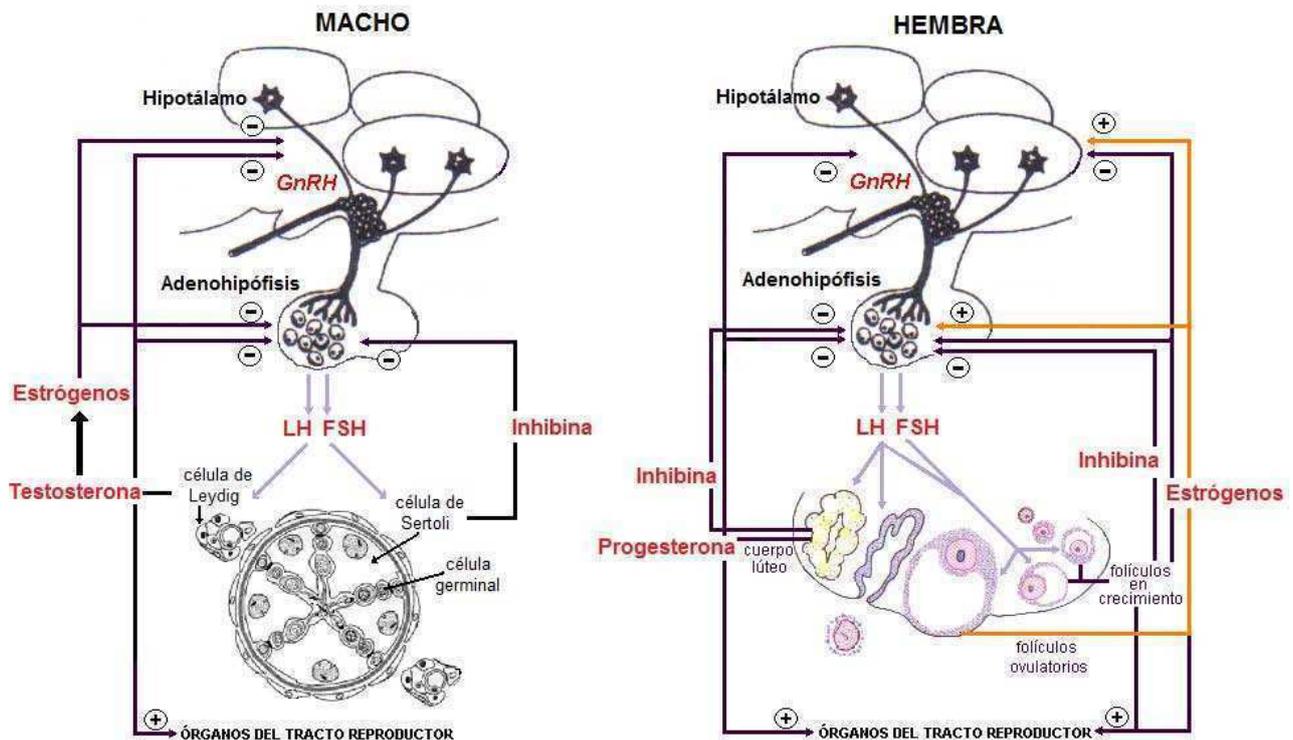


Figura 5. Regulación de los niveles de gonadotropinas por sistemas de retroalimentación gonadal en machos y hembras. Flechas negras: mecanismos de retroalimentación negativos. Flecha naranja: mecanismo de retroalimentación positivo de los estrógenos en la etapa preovulatoria.

➤ Regulación de las neuronas GnRH

La visión clásica de la regulación de la neurona GnRH por retroalimentación gonadal se basa en que estas neuronas no expresan los receptores de esteroides gonadales (Shivers y col. 1983; Huang y Harlan 1993). Por lo tanto, todos los efectos de retroalimentación serían mediados por otras neuronas (excitatorias o inhibitorias) que se proyectan hacia las neuronas GnRH y que sí expresan estos receptores, tales como neuronas productoras de noradrenalina, ácido γ -aminobutírico (GABA), opioides, etc. Sin embargo, esta postura está poniéndose en duda ya que surgieron numerosas evidencias, tanto en estudios *in vivo* como *in vitro*, que las neuronas GnRH, al menos en las hembras y en líneas celulares inmortalizadas, sí expresarían $ER\alpha$, $ER\beta$ y PR (Poletti y col. 1994; Navarro y col. 2003; Hu y col. 2008; Ng y col. 2009). Además de la retroalimentación gonadal, denominada retroalimentación larga, se describieron sistemas de retroalimentación corta y ultracorta, llevadas a cabo por las gonadotropinas sobre la liberación de GnRH, y por GnRH sobre su propia liberación, respectivamente (Padmanabhan y col. 1995). Las neuronas

GnRH expresan GnRHR, cuya activación se asocia con un efecto bifásico sobre la pulsatilidad, donde dosis bajas disminuyen la frecuencia de GnRH y dosis elevadas la aumentan, indicando que hay una regulación autócrina de la liberación de GnRH por GnRH, como había sido observado en estudios *in vivo* (Cesnjaj y col. 1993; Xu y col. 2004).

Los extensos estudios *in vivo* e *in vitro* utilizando animales de experimentación y líneas celulares como las neuronas GT-1 han aportado gran parte de la información sobre los moduladores que actúan sobre las neuronas GnRH, ya sea de manera directa o indirecta. Dentro de los *moduladores positivos* se encuentran neurotransmisores como las *catecolaminas*, especialmente en las hembras la noradrenalina y la dopamina (Negro-Vilar y col. 1982; Findell y col. 1993), *hormonas* como estradiol y progesterona en la etapa preovulatoria de las hembras, insulina, leptina, etc (Chappell y Levine 2000; Pralong 2010), *factores de crecimiento* como IGF-I y II, EGF y FGFb (Olson y col. 1995; Tsai y col. 1995), *aminoácidos* como glutamato (Brann y Mahesh 1997), y *péptidos* como kisspeptina, neuropéptido Y (NPY), galanina, etc (Woller y Terasawa 1992; Brann y col. 1993; Tena-Sempere 2010). Dentro de los *moduladores negativos* son especialmente importantes los *opioides* y el GABA (Pimpinelli y col. 2006; Zhang y col. 2009a).

DESARROLLO ONTOGENÉTICO DEL EJE HHG

➤ **Diferenciación y maduración del tracto reproductor masculino**

El desarrollo del sexo en los mamíferos es un evento que ocurre de manera secuencial. Primero se establece el *sexo cromosómico*, que ocurre en la fertilización, dotando al individuo masculino de un cromosoma X y un cromosoma Y, y al femenino de dos cromosomas X. La dotación cromosómica definirá el *sexo fenotípico*, el cual surge como resultado de la acción coordinada entre señales genéticas, hormonales y celulares, que darán lugar a la aparición de los ovarios o testículos. Finalmente, la determinación del sexo

gonadal dará lugar al desarrollo de los genitales internos y externos femeninos o masculinos. Por lo tanto, la diferenciación sexual se define como la conversión de una gónada indiferenciada en un testículo u ovario, y dicho proceso de desarrollo está programado genéticamente. En los mamíferos, en realidad, la diferenciación sexual depende de la gónada sólo en los machos, ya que el programa del desarrollo femenino está preestablecido y tiene lugar aunque no se desarrolle el ovario. Es necesaria la presencia del cromosoma Y para que la gónada bipotencial se diferencie a testículo, y éste cambie el patrón de diferenciación femenino a masculino (McLaren 1991).

La diferenciación masculina sólo puede ocurrir cuando el testículo fetal comienza a secretar hormonas clave en períodos críticos de la gestación temprana. En 1947 Alfred Jost realizó los primeros experimentos que confirmaron esta "Teoría Endócrina" de la diferenciación sexual (Jost 1947): utilizando microcirugía para remover las gónadas de fetos de conejo en una etapa ambisexual de la diferenciación, Jost encontró que todos desarrollaban características somáticas femeninas, a pesar de que la naturaleza histológica de la gónada fetal removida fuera masculina. Esto reveló el rol clave de la secreción testicular en escapar del programa preestablecido hacia la diferenciación genital femenina. Posteriormente, Jost demostró que las encargadas de promover las características masculinas e inhibir las femeninas son dos hormonas testiculares distintas: la *testosterona*, que promueve el desarrollo del conducto de Wolff, precursor de los órganos sexuales accesorios masculinos, y la *hormona antimülleriana* (AMH), la cual promueve la regresión del conducto de Müller, precursor de los órganos sexuales accesorios femeninos (Hughes 2001).

La gonadogénesis se inicia con la formación de las crestas genitales asociadas al mesonefros. Luego de la diferenciación de la gónada primitiva, ocurre la diferenciación de las células germinales primordiales, las cuales surgen a partir de células pluripotentes del epiblasto y migran hacia la gónada primitiva. Poco después se diferencia un nuevo tipo celular, la *célula de Sertoli primitiva*, la cual interactúa con las células mioides peritubulares en diferenciación y forman cordones testiculares que rodean a las células germinales. En esta instancia, las células de Sertoli primitivas comienzan a expresar AMH y también SRY (*Sex-determining Region Y*), un factor clave,

producto de un gen localizado en el cromosoma Y, cuya función es inducir un patrón de migración celular específico para que la gónada bipotencial se desarrolle a testículo. La expresión de SRY es lo que definirá el sexo gonadal del organismo, ya que en su ausencia, sin importar cuánto del resto del cromosoma Y esté presente, la gónada bipotencial se diferenciará a ovario. Poco después de la diferenciación de los cordones seminíferos, los espacios intersticiales se llenan de vasos sanguíneos y células mesenquimales (Hughes 2001).

Hacia el día gestacional 13 (DG13) en ratones, las *células de Leydig fetales* se diferencian en el compartimiento intertubular y comienzan a secretar testosterona, la cual dispara la masculinización del sistema urogenital que da lugar a la aparición de los genitales externos, los órganos sexuales accesorios y el descenso testicular (Hughes 2001). Alrededor del DG16 LHCGR aparece en las células de Leydig fetales, lo que les permite responder a LH aumentando la producción de testosterona (O'Shaughnessy y col. 1998). La característica más importante de las células de Leydig fetales es que escapan a la desensibilización de LHCGR, y así logran mantener una alta producción de testosterona para completar la diferenciación del tracto genital masculino (Rabinovici y Jaffe 1990). Hacia el final del período fetal, las células de Leydig fetales inician una regresión funcional, y permanecen silenciosas en el testículo hasta la adultez (Ariyaratne y Chamindrani Mendis-Handagama 2000).

En roedores, las *células de Leydig adultas* no derivan de las fetales sino de células precursoras indiferenciadas. Estas células precursoras proliferan en la etapa neonatal y forman una población de células ahusadas de tipo mesenquimal (Hardy y col. 1989). Con la llegada de la pubertad, estas células indiferenciadas responden a los niveles elevados de LH, se diferencian a células de Leydig progenitoras, expresan marcadores de esteroidogénesis como CYP11A, 3 β -HSD, CYP17 y LHCGR y producen andrógenos (Hardy y col. 1990; Siril Ariyaratne y col. 2000). Hacia el día postnatal 28 (DPN28) en la rata, las células de Leydig progenitoras incrementan su capacidad esteroidogénica y se diferencian a *células de Leydig inmaduras* (Shan y col. 1993). Entre los DPN28 y 56, las células de Leydig inmaduras se dividen una vez y finalmente se diferencian a células de Leydig adultas, con capacidad de sintetizar los niveles de testosterona necesarios para dar comienzo a la

producción espermática. La aparición de células de Leydig adultas totalmente diferenciadas es un evento asociado al aumento de LH que ocurre con la pubertad, ya que en ratones que carecen de LHCGR o con mutaciones inactivantes de LH β estas células están ausentes (Zhang y col. 2001; Ma y col. 2004).

Se pueden distinguir dos tipos de respuesta de las células de Leydig adultas a la acción de LH/hCG en función del tiempo: un *efecto agudo*, que tiene lugar en segundos o minutos, y un *efecto crónico*, que se observa en horas posteriores al estímulo hormonal. El efecto agudo consiste en la movilización del colesterol desde los depósitos hacia la mitocondria donde será metabolizado (Privalle y col. 1983; Stocco 2001); en cambio, el efecto crónico involucra un aumento en la transcripción de los genes que codifican para las enzimas esteroidogénicas, responsables de mantener una producción óptima de esteroides a largo plazo (Anderson y Mendelson 1985; Payne y Sha 1991; Manna y col. 2004). Además de estimular la esteroidogénesis, LH/hCG es capaz de modular la expresión de sus propios receptores en las células de Leydig adulta. Así, después de la exposición a altos niveles de LH/hCG *in vivo* e *in vitro*, LHCGR muestra un aumento transitorio (*up regulation*), que es seguido de un marcado descenso y una prolongada disminución en su número (Dufau y col. 1984). La expresión de LHCGR también es inducida por andrógenos y prolactina (Calandra y col. 1982; Shan y col. 1995).

➤ **Ontogenia del funcionamiento de la unidad hipotálamo-hipofisaria**

Estudios embriológicos en ratones revelaron el origen extrahipotalámico de las neuronas GnRH. En una fase temprana del desarrollo las neuronas inmunorreactivas para GnRH se encuentran en los epitelios de la fosita olfatoria. Estos cordones de células GnRH migran a través del tabique nasal y atraviesan el nervio terminal en el encéfalo anterior, formando un arco en el esbozo del tabique y el hipotálamo, que se extiende hacia el área preóptica (Schwanzel-Fukuda y Pfaff 1989). Hacia el DG16, las neuronas GnRH proyectan sus axones a la eminencia media y comienzan a descargar GnRH al sistema portal, coincidiendo con el momento en que la hipófisis adquiere la

capacidad de responder al estímulo de GnRH, observándose gonadotropos inmunoreactivos para LH que expresan GnRHR. Hacia el DG17, los gonadotropos responden a GnRH secretando LH, que actuará sobre las células de Leydig fetales aumentando la síntesis de testosterona (Aubert y col. 1985; Schwanzel-Fukuda y Pfaff 1989). Estudios recientes indican que la secreción de LH inducida por GnRH sería el estímulo necesario para la maduración de gonadotropos capaces de sintetizar FSH, ya que la presencia de gonadotropos inmunorreactivos para FSH se observa posteriormente a la descarga de LH, y el desarrollo de éstos no ocurre en ausencia de la señalización ejercida por GnRH fetal (Wen y col. 2010).

La ontogenia de la secreción pulsátil de GnRH y gonadotrofinas en humanos, se puede representar como una curva con forma de U, como se ejemplifica en la Figura 6: las concentraciones elevadas de gonadotrofinas observadas durante el primer año de vida son seguidas por una declinación progresiva que alcanza un estado hipogonadotrófico quiescente a la edad de 6 a 8 años, con una disminución paralela en la capacidad de respuesta hipofisaria al GnRH exógeno. Esta caída en los niveles de gonadotrofinas durante la edad infantil se desarrolla en ausencia de función ovárica (Leblanc y col. 1976), por lo que se le atribuyeron causas centrales a nivel de la secreción de GnRH. Luego de este período de quiescencia, la pubertad se inicia cuando la secreción pulsátil de GnRH nuevamente comienza a aumentar, estimulando la secreción de gonadotrofinas y la producción de esteroides gonadales, iniciando la maduración gonadal y la capacidad de expresar un comportamiento reproductivo (Sisk y Foster 2004). El inicio de la pubertad es disparado por un mecanismo concertado que actúa sobre las neuronas GnRH aumentando las conexiones excitatorias, como kisspeptina y glutamato, y disminuyendo las inhibitorias, como GABA y los opioides (Terasawa y Fernandez 2001). Además, señales hormonales y metabólicas de origen periférico como la leptina también jugarían un rol importante (Cheung y col. 1997).

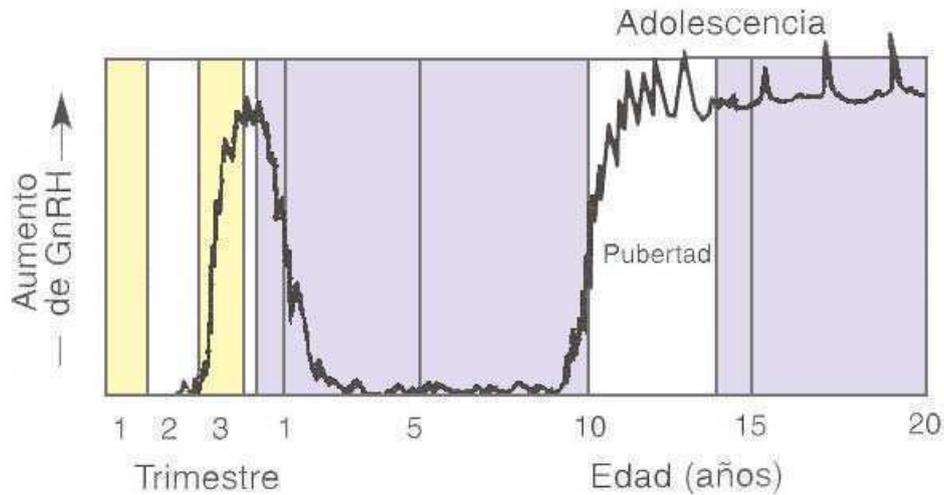


Figura 6. Representación esquemática de la ontogenia de la secreción de GnRH en humanos, desde la vida fetal hasta la adolescencia (tomado y modificado de Yen 2001).

➤ **Impronta perinatal de los esteroides sexuales sobre el funcionamiento del eje HHG**

Unos de los eventos claves en el desarrollo y diferenciación del eje HHG es la inducción de diferencias estructurales y funcionales permanentes en el hipotálamo y otras áreas especializadas del cerebro. Este mecanismo de *impronta* (“*imprinting*”) opera durante un período crítico de la vida prenatal/postnatal temprana, que en roedores abarca desde el nacimiento hasta la primera semana de vida, induciendo la organización de circuitos neuronales específicos según el sexo, que controlan una gran variedad de funciones neuroendócrinas, comportamentales y cognitivas (Arnold y Gorski 1984). En el macho, la activación transitoria del eje HHG durante la vida perinatal resulta en un aumento de testosterona, que actúa como un “factor organizador” de estructuras neuronales típicamente masculinas. En los roedores macho, los niveles de testosterona aumentan progresivamente y exhiben 2 picos: uno en la gestación tardía (DG17-19) (Weisz y Ward 1980), y otro en la vida neonatal temprana (pocas horas luego del nacimiento) (Corbier y col. 1978). El aumento neonatal de testosterona es responsable de la masculinización y defeminización del cerebro, y una gran cantidad de evidencias experimentales demostraron que los estrógenos y la DHT derivadas de la testosterona por aromatización y 5α -reducción, respectivamente, son críticos en estos procesos (Negri-Cesi y col. 2008; Sakuma 2009).

La conversión de testosterona a DHT ocurre a través de dos 5α -Red diferentes, producto de genes distintos: *5 α -Red tipo I*, con baja afinidad por testosterona y considerada una enzima constitutiva, y *5 α -Red tipo II*, con alta afinidad por testosterona y que actúa en la androgenización de las estructuras periféricas dependientes de andrógenos (Russell y Wilson 1994). La testosterona se aromatiza a estradiol a través de la acción de CYP19, y se considera al estradiol convertido localmente el efector principal de los procesos de masculinización. De acuerdo con el rol inductor de mecanismos de impronta postulado para estradiol, la expresión de CYP19 muestra un perfil ontogénico muy específico, con aumentos de actividad en el hipotálamo medio basal y área preóptica que coinciden con los aumentos de testosterona (Colciago y col. 2005). El rol de DHT en la masculinización no está aún completamente esclarecido, pero se demostró que la expresión de 5α -Red tipo II aumenta en el cerebro en paralelo con el perfil de síntesis de testosterona por el testículo en desarrollo. Por otra parte, estudios *in vitro* mostraron que la testosterona induce fuertemente su expresión en células hipotalámicas (Poletti y col. 1998). Además, AR se encuentra ampliamente distribuido en el cerebro fetal/neonatal, mostrando mayor concentración en las áreas que controlan la reproducción, y su expresión aumenta considerablemente en el nacimiento, siendo mayor en los neonatos masculinos, lo que sugiere fuertemente un efecto directo de los andrógenos en los fenómenos de impronta perinatal (Negri-Cesi y col. 2008).

Al igual que con la diferenciación sexual embrionaria, se propuso que el fenotipo neuroendócrino preestablecido es femenino, y que la secreción perinatal aguda de testosterona masculiniza las acciones de retroalimentación de los esteroides sexuales sobre la secreción de GnRH, eliminando los complejos mecanismos regulatorios que operan en las hembras y conservando un único mecanismo de retroalimentación negativa (Foster y col. 2006). El modelado ejercido por testosterona y/o sus metabolitos aromatizados y 5α -reducidos alteran los circuitos del cerebro en desarrollo, previniendo en el macho la capacidad del estradiol de ejercer la retroalimentación positiva que induce la descarga de GnRH y el pico de LH que dispara la ovulación. En contraste, roedores macho castrados durante la ventana crítica del desarrollo perinatal son capaces de mostrar picos de LH en la adultez, como los que

presentan las hembras en la etapa preovulatoria (Kauffman 2009, Tena-Sempere 2010).

El mecanismo por el cual las neuronas GnRH se activan al inicio de la pubertad ha sido intensamente investigado, y en la actualidad sigue despertando profundo interés. Varios factores se han propuesto como reguladores centrales de las neuronas GnRH (Ojeda y Skinner 2006; Ojeda y col. 2003), entre ellos kisspeptina, la cual, actuando a través de su receptor GPR54, es uno de los activadores más potentes de la descarga de GnRH (Han y col. 2005) y esencial en el inicio de la pubertad en varias especies (Herbison 2008, Tena-Sempere 2010). En roedores, kisspeptina se expresa de manera dimórfica en los núcleos arcuato y AVPV (Herbison 2008, Kauffman 2009), donde actuaría como mediador de los efectos de retroalimentación de los esteroides sexuales sobre la liberación de GnRH en ambos sexos (Smith y col. 2005a y b). Además del patrón dimórfico del circuito kisspeptina-GPR54, las neuronas GABAérgicas y glutamatérgicas también establecen conexiones muy importantes con las neuronas GnRH, y están implicadas en el establecimiento de las diferencias sexuales del cerebro en desarrollo por la acción de los esteroides perinatales (McCarthy y col. 2002). El glutamato es uno de los transmisores excitatorios dominantes en el hipotálamo y funciona como un mediador central fundamental en la regulación neuroendócrina de diversos procesos como el inicio de la pubertad, la ciclicidad menstrual, la conducta reproductiva, etc (Brann y Mahesh 1997). A su vez, la exocitosis de glutamato puede ser inhibida por GABA (Feleder y col. 1999); estos dos sistemas se encuentran íntimamente relacionados ya que el glutamato es el precursor natural de la síntesis de GABA, a través de la acción de la enzima glutamato decarboxilasa 67 (GAD67) (Davis y col. 1996). En las neuronas GnRH se identificaron receptores de glutamato del tipo NMDA y receptores de GABA tipo A y B (Pape y col. 2001; Miller y Gore 2002; Zhang y col. 2009a).

ASPECTOS PARTICULARES DE LA REPRODUCCIÓN

FEMENINA

➤ **La foliculogénesis, ovulación y formación del cuerpo lúteo**

Se considera al folículo como la unidad funcional del ovario. La *foliculogénesis* es un evento que se inicia en la etapa embrionaria, cuando cientos de células germinales migran desde el surco urogenital a la gónada primitiva, se diferencian a ovogonias y proliferan por división mitótica. Cuando la división mitótica cesa, las ovogonias entran en meiosis y se transforman en ovocitos primarios, que quedan detenidos en *profase de la primera división meiótica*. Los folículos formados en la vida fetal se denominan **folículos primordiales** y consisten en un ovocito rodeado por una capa de células foliculares planas, que se ubican dentro de una lámina basal. A intervalos regulares a través de la vida fetal, prepuberal y adulta una cohorte de folículos primordiales comienza a madurar espontáneamente. Las células foliculares que rodean al ovocito cambian su morfología de planas a cúbicas y dan origen a las *células de la granulosa*. Estas células comienzan a secretar glicoproteínas y forman una capa translúcida, denominada *zona pelúcida*, formándose el **folículo primario**. Las células de la granulosa continúan dividiéndose y forman un estrato; las células del estroma ovárico se condensan alrededor del folículo formando una pared, la teca, que comienza a vascularizarse. En condiciones fisiológicas, los vasos sanguíneos de la teca nunca atraviesan la lámina basal que separa las células tecales de las células de la granulosa. En este punto, los folículos se encuentran como **folículos secundarios o preantrales**, comienzan a producir esteroides y se vuelven sensibles a la regulación mediada por gonadotrofinas (Gore-Langton y Armstrong, 1994).

A partir del folículo preantral en adelante, la maduración folicular se encuentra bajo el control hormonal de las gonadotrofinas y ocurre en forma cíclica. Los ciclos reproductivos son la expresión repetida de la función del eje HHG, con cambios estructurales y funcionales asociados a los distintos tejidos blanco. Los folículos preantrales forman un “*pool*” que se dirige a la muerte

celular o atresia, a menos que sean rescatados. El factor de rescate es FSH, que selecciona aquellos folículos cuya llegada al estadio preantral coincide con la etapa de estrógeno en el ciclo estral de roedores, cuando los niveles circulantes de esta hormona son elevados. Los folículos rescatados comienzan a producir estrógenos, que inducen la proliferación de las células de la granulosa. De acuerdo con la teoría de “*dos células, dos gonadotropinas*” (Fortune y Armstrong 1977), la producción de estrógenos ováricos depende de la acción coordinada de las células de la teca y de las células de la granulosa (Fig. 7). LH estimula la síntesis de andrógenos a partir de colesterol en las células de la teca, induciendo la expresión de CYP11A y CYP17; estos andrógenos son precursores necesarios para la producción de estrógenos por las células de la granulosa, las cuales carecen de la enzima CYP17 (Mills 1975). FSH, en tanto, actúa en las células de la granulosa, donde induce la expresión de LHCGR y CYP19, regulando de este modo la producción de estrógenos a partir de la aromatización de los andrógenos derivados de las células tecales. FSH también estimula la proliferación de las células de la granulosa y la secreción de líquido folicular, permitiendo que el folículo aumente de tamaño (McNatty y col. 1979). Durante esta etapa folicular, FSH también regula la producción de inhibina B por las células de la granulosa (Woodruff y col. 1996), la cual actúa a nivel hipofisario disminuyendo la secreción de FSH (Buckler y col. 1989). A partir de la mitad de la fase de diestro II del ciclo estral, las células de la granulosa de los folículos preantrales incrementan fuertemente su índice mitótico, por cuanto aumenta el número de FSHRs. Los folículos se hacen más sensibles a esta hormona, formándose una cavidad o antro llena de líquido, rasgo característico del **folículo terciario o antral** (Greenway y Roy 1994, Richards 1994).

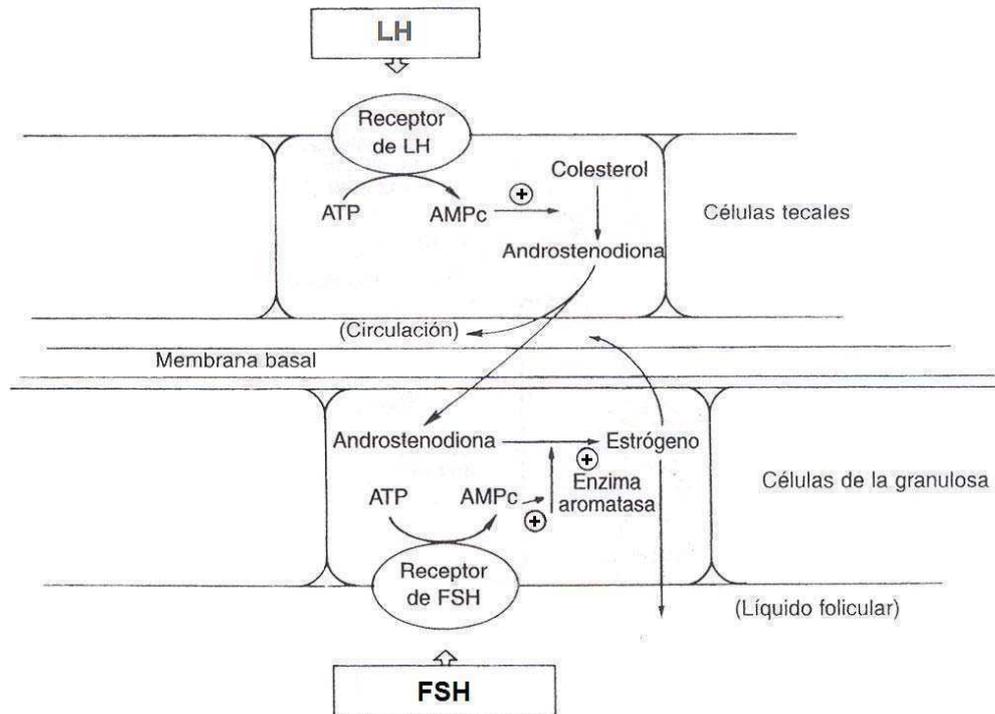


Figura 7. Esquema que muestra la síntesis de esteroides en un folículo ovárico, de acuerdo a la teoría "dos células, dos gonadotropinas" (tomado y modificado de Yeh y Adashi 2001).

A medida que el tamaño del folículo y el volumen de líquido antral aumentan, el ovocito queda flotando en el antro unido a la pared del folículo por un pequeño cuello de células de la granulosa que lo rodean, denominadas *células del cumulus*, que mantienen una estrecha relación con el ovocito mediante uniones de tipo comunicantes o GAP. Al desprenderse el ovocito, una o más capas de las células del cumulus permanecerán unidas a él, formando la *corona radiata*, envoltura celular laxa que persiste alrededor del ovocito aún después de la ovulación. La aparición de LHCGR en las células de la granulosa ocurre durante la transición del folículo antral hacia el folículo preovulatorio, debido a la estimulación de FSH. Este paso es fundamental para que el folículo progrese hacia el paso final, la ovulación. En esta etapa del desarrollo, los **folículos preovulatorios**, también denominados *folículos de de Graaf*, se transforman en atrésicos o son seleccionados para continuar el desarrollo hacia **folículos ovulatorios**. En roedores, la selección folicular ocurre durante la fase de proestro previa al ciclo estral en el cual estos folículos ovularán. En esta etapa los altos niveles de estrógenos producidos por los folículos preovulatorios ejercen una retroalimentación negativa en el hipotálamo e hipófisis, inhibiendo la liberación de GnRH y de gonadotropinas, respectivamente. Los bajos niveles

de FSH rescatan de la atresia sólo a los folículos de mayor tamaño, los que contienen un mayor número de FSHRs y pueden responder mejor a los bajos niveles circulantes de esta hormona, produciéndose de este modo la selección folicular (Greenway y Roy 1994).

Como se mencionó previamente, cuando el folículo llega al estadio preovulatorio FSH induce la expresión de LHCGR en las células de la granulosa, un efecto que requiere estradiol y es inhibido por los andrógenos (Erickson y col. 1979). Es importante destacar que LHCGR no se encuentra expresado de forma homogénea en estos folículos, sino que los mismos presentan un gradiente de expresión que disminuye desde las capas externas de la granulosa hacia las células del cúmulus (Amsterdam y col. 1975; Oxberry y Greenwald 1982). El caso más extremo es el de las células del cúmulus de ratón, donde LHCGR es indetectable (Peng y col. 1991). Por esta razón, el reinicio de la meiosis inducida por LH y la expansión de las células del cúmulus requeridas para la ovulación serían eventos mediados por las células más cercanas a la membrana basal, denominadas *células de la granulosa murales* (Dekel y col. 1988). Por otra parte, estos folículos se caracterizan por una baja tasa mitótica de las células foliculares y una alta relación estrógenos/andrógenos y estrógenos/progesterona en el fluido folicular (contrario a lo que se observa en los folículos atrésicos, asociado a la pérdida de capacidad de aromatización por parte de las células de la granulosa) (Drummond 2006). 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 (Kumar y col. 1997). A este folículo destinado a ovular, se lo denomina **folículo dominante**.

El primer efecto del pico de LH sobre el folículo ovulatorio es el silenciamiento de genes involucrados en la proliferación de las células de la granulosa, tales como IGF-I, ER β , ciclina D2, etc, y la estimulación de genes involucrados en la ovulación, tales como *prostaglandina-endoperoxidasa sintasa-2* (PTGS-2, también conocida como ciclooxigenasa 2 o COX-2) y PR, entre otros. Genes involucrados en la luteinización también se inducen rápidamente por el pico de LH, tales como StAR y CYP11A. Si bien el pico preovulatorio de LH estimula los procesos de ovulación y luteinización

simultáneamente, estos eventos están funcionalmente disociados y es crítico que los mecanismos que controlan la ovulación precedan a los que conducen a la luteinización. Si la luteinización ocurre muy rápido, o si los eventos asociados a la ovulación se impiden o retrasan, los ovocitos pueden quedar atrapados dentro del cuerpo lúteo (Richards y col. 2002). Previo a la ovulación se produce la expansión de las células del cúmulus. Estas células producen una matriz por la cual se expanden que está compuesta por ácido hialurónico y al menos dos proteínas ligadoras del mismo: TSG-6 e $\alpha 1$. El pico preovulatorio de LH induce la expresión de genes necesarios para la expansión del cúmulus en un patrón temporal específico que se inicia con a) PTGS-2, la enzima limitante para la producción de prostaglandinas como PGE_2 , b) ácido hialurónico-sintasa 2 (HAS-2), que cataliza la síntesis de ácido hialurónico, y c) TSG-6, la cual es inducida por PGE_2 y se une al ácido hialurónico. La activación de PTGS-2 en las células del cúmulus es inducida por miembros de la familia del factor de crecimiento epidermal (EGF) denominados anfiregulina, epiregulina y betacelulina, los cuales son producidos por las células de la granulosa murales en respuesta a LH (Park y col. 2004). PTGS-2 induce la producción de PGE_2 , que juega un rol clave no sólo en la expansión del cúmulus sino también en la maduración meiótica del ovocito (Takahashi y col. 2006). En el momento de la ovulación, la lámina basal que separa las células de la granulosa de las tecaes se rompe, permitiendo la entrada de $\alpha 1$ al interior del folículo, la cual forma uniones covalentes con el ácido hialurónico a través de polipéptidos adicionales, formándose de este modo la matriz necesaria para la expansión de las células del cúmulus. A su vez, las células de la granulosa murales del folículo preovulatorio expresan PR-A en respuesta al pico preovulatorio de LH, cuya acción es clave en la ovulación ya que ratones que carecen de PR presentan fallas en este proceso, incluso luego de la estimulación con hormonas exógenas (Lydon y col. 1995; Pall y col. 2000; Conneely y col. 2001). Uno de los blancos más estudiados de PR es ADAMTS-1, un miembro de la familia de metaloproteinasas de matriz (MMPs) (Richards y col. 2002). El aumento de progesterona y la expresión transitoria de PR, prostaglandinas y enzimas proteolíticas como MMPs, colagenasas y activadores del plasminógeno provoca la ruptura del folículo ovulatorio y la liberación del ovocito. La ovulación ocurre en las primeras horas de la fase de estro, y las

células foliculares remanentes dan origen al *cuerpo lúteo* del ciclo estral (Greenway y Roy 1994).

Una vez producida la expulsión del ovocito, la cavidad folicular es invadida por fibroblastos, células endoteliales y células sanguíneas, y se constituye el cuerpo lúteo. En el proceso de *luteinización*, las células de la teca interna y las células de la granulosa sufren numerosos cambios bioquímicos y morfológicos como consecuencia del incremento en los niveles séricos de LH que disparan la ovulación, transformándose en *células luteales*. Estas células expresan elevados niveles de LHCGR. La función primaria del cuerpo lúteo es la producción de progesterona, estimulada por LH. Esta hormona esteroidea tiene numerosas funciones, entre ellas, la inhibición de la secreción de gonadotrofinas, el acondicionamiento del útero para el período de preñez y la regulación de las contracciones del oviducto para el transporte del ovocito al útero. Durante la fase luteínica, LH estimula la producción de inhibina A por las células luteales (Muttukrishna y col. 1997), la cual previene el aumento en los niveles de FSH (McLachlan y col. 1989). LH estimula la producción de progesterona en las células luteales a través de dos mecanismos: 1) la inducción de receptores de lipoproteínas de baja densidad (LDL), que permite una mayor captación de colesterol (Brannian y col. 1992), 2) un aumento en la expresión de los ARNm de CYP11A y 3 β -HSD, las enzimas necesarias para la síntesis de progesterona (Ravindranath y col. 1992). Si no ocurrió la fecundación, la disminución en los niveles de LH conduce a la regresión del cuerpo lúteo (proceso conocido como luteólisis), que implica la pérdida de su capacidad para sintetizar esteroides, acompañada de invasión leucocitaria y disminución de la irrigación. Esto conduce a una caída en los niveles de progesterona e inhibina, que permite un aumento en la concentración de gonadotrofinas, dando lugar a un nuevo reclutamiento de folículos preantrales (Greenway y Roy 1994).

La estimulación del cervix durante la copulación provoca la activación de un arco reflejo neuroendocrino que resulta en un aumento dramático de prolactina, LH y FSH en la mañana del estro (Spies y Niswender 1971). Así, la hembra entra en un estado de preñez o pseudopreñez, dependiendo de la presencia o ausencia de embriones en el útero. A partir de este momento comienza una liberación bifásica (nocturna y diurna) de prolactina que se

mantiene durante 8-10 días, extendiendo la función del cuerpo lúteo durante 10-12 días, transformándose en *cuerpo lúteo de la preñez*, que continúa secretando progesterona y otras hormonas como relaxina (Smith y Neill 1976). La placenta humana sintetiza hCG, con acción luteotrófica, la cual mantiene el cuerpo lúteo de la preñez. En roedores, hCG está ausente (Tepper y Roberts 1984), por cuanto la activación y mantenimiento de estos cuerpos lúteos ocurre a través de la acción conjunta de prolactina, lactógeno placentario (PL), LH y estrógenos. En este sentido, la acción luteotrófica de prolactina, manteniendo niveles de expresión de LHCGR elevados, es esencial para la conversión del cuerpo lúteo del ciclo estral en un cuerpo lúteo funcional de la preñez (Holt y col. 1976; Bachelot y Binart 2005). Si la hembra está preñada, la liberación bifásica de prolactina continúa durante 8 días. Si la hembra está pseudopreñada, la liberación diurna de prolactina culmina en el día 8, pero la nocturna se prolonga 2 días más y luego disminuye hacia el día 12, cuando comienza un nuevo ciclo estral (Smith y Neill 1976).

➤ El ciclo estral

Tanto el ciclo menstrual de primates como el ciclo estral del resto de los mamíferos se divide en una etapa preovulatoria y otra postovulatoria. Entre ambas tiene lugar la ovulación, que en el caso de la rata y ratón ocurre espontáneamente. El ciclo estral del ratón se desarrolla en 4 ó 5 días, observándose un orden cronológico de 4 etapas de distinta duración: *proestro*, de 12 a 14 horas; *estro*, de 25 a 27 horas; *diestro I* (o *metaestro*), de 6 a 8 horas y *diestro II*, de 55 a 57 horas. El crecimiento y maduración de los folículos comprende los días de diestro y proestro, finalizando con la ovulación espontánea en la madrugada del estro (Fig. 8) (Smith y col. 1975; Greenway y Roy 1994). En cada fase del ciclo estral se suceden una serie de cambios característicos a nivel de ovario, útero, vagina, así como cambios comportamentales (Marcondes y col. 2002):

- **Cambios en el ovario:** durante las fases de proestro y estro temprano, un grupo de folículos ováricos completa la etapa de maduración, pero sólo una parte de este grupo termina ovulando, mientras que el resto sufre atresia. Tras la ovulación (al final del estro), los folículos que ovularon se

transforman en cuerpos lúteos que crecen durante dos o tres días (fase de diestro) y luego degeneran lentamente. Se pueden encontrar así tres o cuatro generaciones de cuerpos lúteos en distintos estadios en cualquier fase del ciclo estral. En ausencia de gestación, el cuerpo lúteo degenera a la vez que otros folículos ováricos empiezan a madurar, iniciándose un nuevo ciclo.

- **Cambios en el útero:** los cambios en el ovario vienen acompañados por cambios en el útero. Así, durante la etapa preovulatoria, bajo la influencia de los estrógenos, se produce un aumento en la irrigación (hiperemia) y contenido hídrico del endometrio, con el consiguiente aumento del tamaño del útero. En la etapa postovulatoria, si no ha habido fertilización del ovocito, el útero disminuye en vascularización, contenido hídrico y tamaño.
- **Cambios en la vagina:** los cambios cíclicos en el epitelio vaginal son muy notorios, permitiendo identificar la fase del ciclo a partir de un extendido vaginal. Durante el proestro, el epitelio vaginal es un epitelio característico de células nucleadas que, bajo la influencia de los estrógenos, se transforma hacia el final de esta fase en un epitelio de células escamosas anucleadas, debido a la queratinización citoplásmica y degeneración nuclear. Este epitelio se descama en la fase de estro. En la fase de diestro I los leucocitos empiezan a invadir el epitelio vaginal, aunque todavía son abundantes las células escamosas. En diestro II los leucocitos son abundantes, y hacia el final de esta fase se inicia la regeneración epitelial.
- **Cambios conductuales:** durante el ciclo estral también se suceden cambios comportamentales relacionados con la conducta de apareamiento. La hembra murina está sexualmente receptiva durante la fase de estro, en coincidencia con la fase en la que es fértil.

La Figura 8 muestra las variaciones en los niveles de gonadotrofinas y esteroides sexuales durante el ciclo estral de la rata.

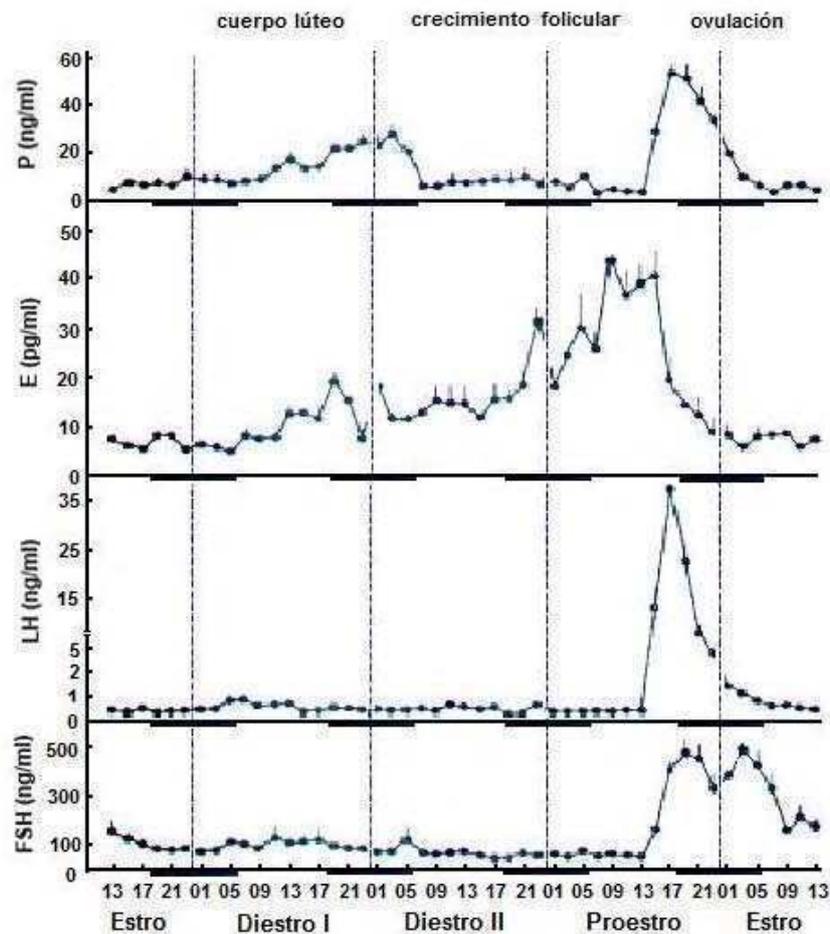


Figura 8. Variaciones hormonales en el ciclo estral de la rata. E: estradiol, P: progesterona, LH: hormona luteinizante, FSH: hormona folículo estimulante. Los trazos oscuros representan el período de oscuridad del ciclo diario (tomado y modificado de Smith y col. 1975).

NIVELES ELEVADOS DE GONADOTROFINAS Y SU RELACIÓN CON PATOLOGÍAS

A lo largo de la vida humana existen una variedad de condiciones fisiológicas y patológicas en las cuales las gonadotrofinas pueden encontrarse elevadas, ya sea en forma transitoria o crónica. Entre estas situaciones, la producción de hCG por la placenta durante el primer trimestre del embarazo es un claro ejemplo de una condición fisiológica temporaria. Otro ejemplo es la menopausia, donde el ovario carente de folículos cesa la producción de hormonas ováricas, acompañado de un aumento concomitante en los niveles de gonadotrofinas debido, entre otros factores, a la falta de retroalimentación negativa a nivel de la unidad hipotálamo-hipofisaria (Rulli y Huhtaniemi 2005).

Por otra parte, ciertas condiciones patológicas pueden inducir niveles altos de gonadotrofinas, tales como la castración química o quirúrgica, falla gonadal primaria con pérdida de la retroalimentación regulatoria, disfunción hipotalámica o adenomas de gonadotropos. También se ha detectado expresión de hCG en testículos de pacientes con el síndrome de Klinefelter, en enfermedades trofoblásticas, y tumores de ovario, testiculares de células germinales, gástricos, pancreáticos, etc (Stenman y col. 2004).

Numerosos estudios clínicos y epidemiológicos sugieren que una secreción inapropiada de gonadotrofinas conlleva a la infertilidad, tanto masculina como femenina, y es causa de diversas patologías gonadales. En humanos, el aumento de los niveles séricos de LH es una de las causas asociadas al desarrollo del *Síndrome de Ovario Poliquístico* (PCOS) que, junto a una resistencia a la insulina, serían responsables de la elevada producción de andrógenos ováricos, formación de quistes ováricos múltiples, infertilidad y anovulación crónica (Franks y col. 2006). Asimismo, la exposición prolongada a elevados niveles de gonadotrofinas a partir de la menopausia o en tratamientos de fertilidad es una situación de riesgo para el desarrollo de tumores de ovario (Riman y col. 2004).

LA TUMORIGÉNESIS GONADAL

➤ **La tumorigénesis ovárica: el teratoma**

El cáncer de ovario provoca más muertes que cualquier otro tipo de cáncer ginecológico y representa el 5% de las muertes por cáncer entre las mujeres. Existen diferentes tipos de tumores de ovario, dependiendo de la célula de la cual se originan. En la mayoría de los casos, aproximadamente el 80%, son derivados de células epiteliales. El resto se origina a partir de ovocitos (denominados células germinales) y de células que sirven de estructura de sostén del órgano (Amsterdam y Selvaraj 1997).

Los teratomas representan un 10-20% de las neoplasias ováricas, siendo uno de los tipos de tumores de ovario más frecuentes en la mujer. Son tumores benignos que pertenecen a la familia de *tumores de células*

germinales. Dentro de los teratomas maduros, los teratomas quísticos son los más comunes, constituyendo alrededor del 95% de todos los teratomas (Koss 2005). Se originan a partir de células germinales benignas, varían de tamaño desde pocos centímetros a grandes tumores de varios kilos de peso, y se los conoce con distintos nombres como *quiste dermoide*, *teratoma quístico adulto* o *teratoma quístico benigno*. Están compuestos de elementos bien diferenciados derivados de las tres láminas embrionarias, predominando los elementos ectodérmicos como piel y sus apéndices (de ahí el nombre quiste dermoide), tejido neuronal, intestino, pulmón, tiroides, etc (Koss 2005). En su forma pura este tumor es siempre benigno, pero ocasionalmente (1 a 2% de los casos) puede sufrir transformación maligna de uno de sus elementos. Estos tumores son diploides, y casi siempre tienen un cariotipo normal 46 XX. Distintas evidencias indican que en su mayoría dichos tumores derivan de células germinales que completaron meiosis I pero no meiosis II, y son generalmente homocigotas, lo que refuerza la idea del origen por *partenogénesis* de la célula germinal. El desarrollo de estos tumores es más común durante los años reproductivos (Ulbright 2004).

En la literatura se han descrito distintos modelos animales que desarrollan teratomas espontáneamente. La cepa murina LT/Sv mostró ser susceptible al desarrollo de teratomas espontáneos, los cuales surgen de ovocitos que presentan una primera división meiótica disfuncional, la cual conduce a la activación partenogenética (Stevens y Varnum 1974). Esta disfunción resultó ser inherente a la cepa y el resultado de la combinación de alelos permisivos (Eppig y col. 1996). Asimismo, en la línea de ratones deficientes en el proto-oncogen *c-mos* se observó una falla de los ovocitos en el arresto en metafase II, activándose espontáneamente sin fertilización y conduciendo ocasionalmente al desarrollo de teratomas (Colledge y col. 1994; Hashimoto y col. 1994). Sin embargo, no se encontró correlación entre mutaciones en la región codificante de *c-mos* y la incidencia de teratomas ováricos en humanos (de Foy y col. 1998). Se demostró además, que ratones transgénicos que sobreexpresan el factor antiapoptótico bcl-2 en el ovario son susceptibles a desarrollar teratomas en edades avanzadas (Hsu y col. 1996). También se demostró un rol de la fosfolipasa C-zeta de esperma en la activación partenogenética del ovocito y el desarrollo de teratomas ováricos, a

través de la inducción de oscilaciones en los niveles de calcio (Yoshida y col. 2007; Ross y col. 2008).

➤ **La tumorigénesis testicular: el adenoma de células de Leydig**

La incidencia de tumores de células de Leydig es muy baja en humanos, con una tasa de 0,4 por millón (Gilliland y Key 1995), aunque son frecuentes en animales de laboratorio, especialmente en roedores. En humanos, los tumores de células de Leydig raramente son malignos y suelen presentar una estructura nodular. Debido a su rareza, la definición patológica entre hiperplasia y adenoma no existe, pero se estableció un criterio arbitrario según el cual, cuando el diámetro del nódulo excede al del túbulo seminífero, se puede considerar un adenoma (Clegg y col. 1997). En humanos, ciertas mutaciones activantes de LHCGR conducen al desarrollo de adenomas de células de Leydig (Liu y col. 1999; Richter-Unruh y col. 2002) resaltando el rol de LH/hCG en el desarrollo de neoplasias gonadales. Recientemente se ha descrito la presencia de micronódulos de células de Leydig en el testículo de pacientes con espermatogénesis alterada y con una tasa de testosterona/LH disminuida, que resalta la importancia de niveles elevados de LH/hCG en la tumorigénesis de estas células (Holm y col. 2003).

La administración exógena de hCG induce hiperplasia/hipertrofia de células de Leydig en roedores (Christensen y Peacock 1980; Mendis-Handagama 1997). Se encontró además que una gran variedad de fármacos son inductores de hiperplasia de células de Leydig, y en su mayoría actúan aumentando los niveles de LH, ya sea: a) inhibiendo la síntesis testicular de testosterona (inhibidores enzimáticos, estrógenos), b) disminuyendo la acción de testosterona en los tejidos blanco (inhibidores de 5α -Red o antagonistas de AR), o c) actuando sobre la hipófisis y aumentando la secreción de LH (inhibidores de CYP19) (Cook y col. 1999). Todos estos estudios enfatizan el rol de LH/hCG y su receptor como mediadores del desarrollo de tumores de células de Leydig. También se describieron tumores de estas células en otros modelos de ratones modificados genéticamente, como en modelos de sobreexpresión de CYP19 (Fowler y col. 2000; Li y col. 2003; Sirianni y col.

2007) y en el de expresión del antígeno SV-40 T bajo el promotor de la subunidad α de inhibina (Kananen y col. 1996; Mikola y col. 2003).

RATONES TRANSGÉNICOS COMO HERRAMIENTAS DE ESTUDIO DE LA FUNCIÓN DEL EJE HHG

La producción de animales transgénicos y “*knock-out*” llevó el estudio de la función génica *in vivo* a una nueva dimensión. En el caso de la biología de la reproducción, el desarrollo de estas tecnologías ha contribuido a una mejor comprensión de la fisiología normal y patológica del eje HHG. La generación de diferentes modelos animales modificados genéticamente, con sobre-expresión, disrupción o mutación dirigida a genes involucrados en el funcionamiento del eje HHG, permitió dilucidar numerosos aspectos de la fisiología de estos genes. Asimismo, las alteraciones asociadas a un funcionamiento anormal de los mismos dieron lugar a modelos de estudio de diversas patologías humanas (Markkula y Huhtaniemi 1996).

➤ **El modelo de sobreexpresión de hCG**

Los modelos transgénicos han aportado evidencias sobre la contribución de las gonadotrofinas en disfunciones reproductivas y tumorigénesis gonadal. Muchos desórdenes endocrinos son atribuidos a la secreción excesiva de una hormona, superando los niveles fisiológicos. En este sentido, distintos modelos indican a LH como un factor promotor de tumores (Sutton y Keri 2007).

Recientemente se han desarrollado ratones transgénicos capaces de secretar niveles elevados de hCG (Rulli y col. 2002, 2003). A través de dicha hiper-producción intencional de hCG se han logrado reconocer fenotipos novedosos, tanto en machos como en hembras, que no podrían haber sido detectados siguiendo protocolos de administración exógena de gonadotrofinas, o en modelos animales con moderada secreción de gonadotrofinas. Para tal fin, se crearon dos modelos de ratones transgénicos: ratones conteniendo el gen de la subunidad hCG α y ratones conteniendo el gen de la subunidad hCG β . Ambos transgenes se encuentran bajo el control del promotor humano

ubiquitina C, el cual dirige la expresión génica en una amplia variedad de tejidos desde las últimas etapas de la vida fetal, y no responde a la retroalimentación negativa de las hormonas gonadales. Posteriormente, a partir de cruzamientos de los animales transgénicos para hCG α (ratones hCG α +) y para hCG β (ratones hCG β +) se obtuvieron animales doble transgénicos que sobreexpresan ambas subunidades de hCG (ratones hCG $\alpha\beta$ +) (Fig. 9).

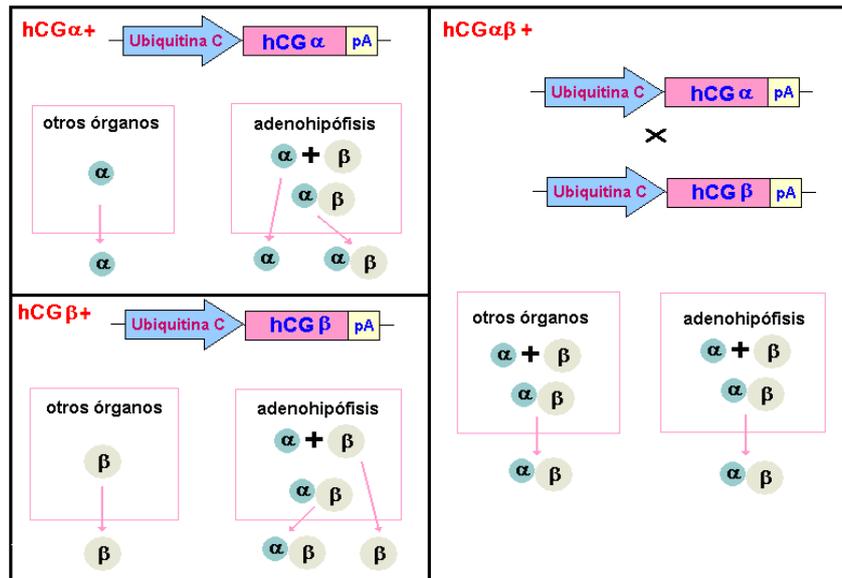


Figura 9. Representación esquemática de la producción de hCG en los modelos hCG α +, hCG β + y hCG $\alpha\beta$ + (tomado y adaptado de Huhtaniemi y col. 2005).

Para generar los animales, se utilizó la técnica de *microinyección pronuclear*, que consiste en la introducción de un fragmento purificado de ADN doble cadena con la secuencia de interés, en un huevo fertilizado en etapa pronuclear, es decir, cuando los pronúcleos materno y paterno todavía no se han fusionado. El material genético transferido se integra al azar en alguno de los cromosomas, y así el futuro animal contendrá un número variable de copias de esta información genética en cada una de sus células (Markkula y Huhtaniemi 1996). Para la construcción de los modelos hCG β + y hCG α + se introdujo un fragmento conteniendo la región codificante de la subunidad β , y un fragmento genómico correspondiente a la subunidad α , en ambos casos bajo el promotor ubiquitina C humano y seguido por la secuencia de poliadenilación de la hormona de crecimiento bovina (Rulli y col. 2002, 2003). A continuación se describen los modelos de sobreexpresión de hCG: hCG α +,

hCG β + y hCG $\alpha\beta$ +, los cuales han sido utilizados en el desarrollo de la presente Tesis Doctoral:

➤ **Sobreexpresión de la subunidad hCG α (modelo hCG α +)**

Los ratones transgénicos para la subunidad α son fértiles, sanos y carecen de cambios fenotípicos detectables (Huhtaniemi y col. 2005).

➤ **Sobreexpresión de la subunidad hCG β (modelo hCG β +)**

En este modelo, la producción de hCG bioactiva se encuentra limitada por la disponibilidad de la subunidad α endógena producida en la hipófisis, para unirse a la subunidad hCG β producida por el transgen y formar un dímero biológicamente activo. Por este motivo, el modelo hCG β + presenta un moderado aumento de hCG bioactiva (Rulli y col. 2002). El fenotipo de la hembra hCG β + se caracteriza por presentar pubertad precoz e infertilidad debido a defectos ováricos y uterinos. Los ovarios presentan quistes hemorrágicos y masiva luteinización. La esteroidogénesis se encuentra aumentada como consecuencia de una activa estimulación ovárica por hCG, conduciendo a niveles elevados de estradiol, testosterona y progesterona desde estadios tempranos del desarrollo sexual. Las hembras son hiperprolactinémicas y presentan hiperplasia de lactotopos, seguido de desarrollo de prolactinomas y tumores mamarios altamente metastásicos a edades avanzadas (Rulli y col. 2002; Kuorelahti y col. 2007; Ahtiainen y col., 2010). Estos efectos son estrictamente dependientes de la función ovárica, ya que animales sometidos a ovariectomía no desarrollan ninguna de estas patologías (Rulli y col. 2002). A diferencia de las hembras, los machos hCG β + son fértiles y muestran un cambio fenotípico moderado. Presentan una espermatogénesis completa y la calidad espermática es normal, a pesar de mostrar una disminución en el tamaño testicular (Rulli y col. 2003).

➤ **Sobreexpresión de las subunidades hCG α y hCG β (modelo hCG $\alpha\beta$ +))**

Con la intención de obtener un modelo animal capaz de producir niveles de hCG superiores a aquellos secretados en el modelo hCG β +, se desarrollaron ratones doble transgénicos conteniendo ambas subunidades, hCG α y hCG β , bajo el mismo promotor ubiquitina C (Rulli y col. 2003). Estos ratones doble transgénicos co-expresan ambas subunidades de hCG en diferentes tejidos, y secretan niveles elevados de la forma dimérica de hCG (1000 veces superior en términos de bioactividad de hCG/LH), que si bien alcanzan valores farmacológicos, en comparación con los humanos, no exceden los hallados en el embarazo (Rulli y col. 2003; Huhtaniemi y col. 2005).

A diferencia de los machos hCG β +, los doble transgénicos son infértiles, presentan severas alteraciones en los órganos reproductivos y un significativo aumento en la esteroidogénesis testicular (Rulli y col. 2003). El análisis histológico del testículo revela la aparición de adenomas de las células de Leydig en la etapa prepuberal, pero no en el adulto, ya que derivan de la población de células de Leydig fetales, indicando que sólo estas células son capaces de responder a niveles suprafisiológicos de LH/hCG y desarrollar adenomas (Ahtiainen y col. 2005).

Las hembras doble transgénicas presentan pubertad precoz, infertilidad, y aumento en la esteroidogénesis gonadal. En coincidencia con el modelo simple transgénico hCG β +, las hembras hCG $\alpha\beta$ + adultas presentan hiperplasia de hipófisis e hiperprolactinemia. Estos animales desarrollan tumores ováricos en las células germinales, que presentan características fenotípicas comparables a los *teratomas ováricos humanos*. Dichos tumores se generarían por activación partenogénica de los ovocitos localizados dentro del ovario, y están compuestos por una variedad de tejidos derivados de las tres capas embrionarias: endodermo, mesodermo y ectodermo (Rulli y Huhtaniemi 2005; Huhtaniemi y col. 2005).

HIPÓTESIS Y OBJETIVOS

HIPÓTESIS DE TRABAJO

La hipersecreción de hCG en los ratones hCG $\alpha\beta$ + impacta en las gónadas desde edades tempranas del desarrollo, estimulando fuertemente la esteroidogénesis. Se postuló como Hipótesis que los niveles elevados de esteroides gonadales en los ratones hCG $\alpha\beta$ +, actuarían sobre el eje HHG alterando la síntesis y secreción de hormonas y factores claves en la función reproductiva. Dichos esteroides participarían, directa o indirectamente, en las disfunciones reproductivas y el inicio y progresión de los tumores gonadales que desarrolla este modelo.

OBJETIVOS GENERALES

El objetivo general de la presente Tesis Doctoral fue caracterizar distintos aspectos del eje HHG en machos y hembras hCG $\alpha\beta$ +, estudiando el posible rol de los esteroides gonadales en el fenotipo transgénico.

OBJETIVOS ESPECÍFICOS

- Caracterizar el fenotipo de los machos hCG $\alpha\beta$ + a distintas edades, estudiando principalmente la regulación de la unidad hipotálamo-hipofisaria.
- Estudiar la influencia de la gónada y los esteroides sexuales sobre el fenotipo de los machos hCG $\alpha\beta$ + durante las distintas etapas del desarrollo.
- Caracterizar el fenotipo de las hembras hCG $\alpha\beta$ + a distintas edades, estudiando la funcionalidad de la unidad hipotálamo-hipofisaria y las etapas que conducen a la formación y progresión del tumor de ovario.

- Estudiar la influencia de la gónada sobre la regulación de la unidad hipotálamo-hipofisaria en las hembras hCG $\alpha\beta$ +
- Estudiar la influencia de los esteroides sexuales sobre el fenotipo gonadal de las hembras hCG $\alpha\beta$ +, y su posible participación en el inicio y progresión del teratoma.

MATERIALES Y MÉTODOS

1. Drogas y reactivos

Los siguientes productos se adquirieron en Sigma-Aldrich Chemical Co.: fulvestrant, mifepristona, ácido etilen diamino tetracético (EDTA), dietilpirocarbonato (DEPC), bacitracina, 3,3'-diaminobencidina (DAB), ácido 4-(2-hidroxi-etil)-1-piperazin-etanosulfónico (HEPES), 4',6'-diamidino-2-phenylindole (DAPI), oligonucleótidos sintéticos y todos los reactivos necesarios para la preparación de soluciones. eCG (Novormon 5000) se adquirió en Syntex, y hCG (Profasi HP 5000) se adquirió en Serono. Albúmina sérica bovina (BSA), dodecilsulfato sódico (SDS) y saponina se obtuvieron en MP Biomedicals y agarosa en Biodynamics. Hexámeros aleatorios (*random primers*), inhibidor de ribonucleasas RNAsin, ADN polimerasa *GoTaq*, transcriptasa reversa M-MLV y bromuro de etidio se adquirieron en Promega. *SYBR Green Master Mix Reagent* se obtuvo de Applied Biosystems. TRIZOL, desoxirribonucleasa (DNAsa), proteinasa K, desoxinucleótidos trifosfato (dNTPs) y marcador de peso molecular (MK) de 100 pares de bases (pb) se adquirieron en Invitrogen. La flutamida fue cedida por Schering, Canadá, a través de la cortesía del Dr. Fernand Labrie. Los solventes utilizados fueron de Merck. El complejo avidina-biotina (Vectastain ABC kit), suero normal de conejo, cabra y caballo se adquirieron en Vector Laboratories, Inc. El medio de montaje para microscopía de fluorescencia Fluoromount Aqueous Mounting Medium, fue adquirido en Dako. Los anticuerpos contra: a) VEGF y PIGF se adquirieron en Santa Cruz; b) PL-1 y CYP11A en Chemicon Int.; c) FSH, FSH β y prolactina fueron provistos por NIDDK (Bethesda, Maryland, EEUU); c) testosterona y progesterona se adquirieron en Medicorp, d) GnRH (HU-60) se obtuvo a través de una donación del Dr. H. Urbanski (Urbanski y col. 1990); e) IgG de conejo e IgG de cabra biotinilados se adquirieron en Vector Laboratories, Inc. (1,2,6,7- ^3H)-Testosterona (actividad específica 80,4 Ci/mmol), (1,2,6,7- ^3H)-Progesterona (actividad específica 96,6 Ci/mmol) y ^{125}I Na (actividad específica 17,4 Ci/g) fueron adquiridos a New England Nuclear Co. El aceite de ricino fue adquirido en Laborit, la ketamina y xilacina en Holliday-Scott S.A, y el isofluorano en Baxter Healthcare Co. El kit para medir estradiol fue el Ultra-sensitive Estradiol RIA Kit DSL-4800 y se obtuvo de Diagnostic Systems Laboratories.

2. Cría y cuidado de los animales

Se utilizaron cepas de ratones transgénicos portadores de los genes de las subunidades hCG α y hCG β bajo el promotor universal de ubiquitina C humana, desarrollados a partir de la cepa FVB/n por la técnica de microinyección pronuclear, según descrito por Rulli y col. (2002, 2003). Los animales fueron generados en la Universidad de Turku (Finlandia) y posteriormente transportados y mantenidos en reproducción en el Bioterio del Instituto de Biología y Medicina Experimental (Buenos Aires). Los mismos fueron mantenidos a una temperatura constante de 22 °C, con períodos de 12 horas de luz y 12 horas de oscuridad. Los animales recibieron una dieta balanceada y agua *ad libitum*, respetándose en todo momento las reglas de la “Guía para el cuidado y utilización de animales de laboratorio” del *Instituto Nacional de Salud* de los Estados Unidos (NIH), y siendo supervisados por el Comité de Ética del Instituto de Biología y Medicina Experimental. Para la obtención de animales doble transgénicos hCG $\alpha\beta$ +, se cruzaron líneas independientes de machos hCG β + con hembras hCG α +. Como controles se utilizaron ratones de la cepa salvaje FVB/n (WT).

3. Identificación de los animales transgénicos

La identificación del genotipo de los animales transgénicos se realizó a partir del análisis del ADN genómico obtenido de biopsias de cola de las crías, por la técnica de reacción en cadena de la polimerasa (PCR). Se utilizaron oligonucleótidos sintéticos específicos para cada uno de los transgenes, correspondientes a secuencias del promotor y de cada una de las subunidades hCG α y hCG β (Rulli y col. 2002) (Fig. 10).

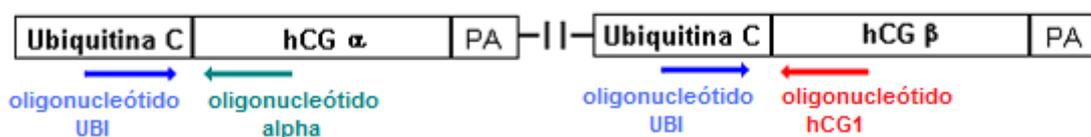


Figura 10. Esquema representativo de la estructura de los transgenes, conformados por el promotor ubiquitina C, los genes hCG α o hCG β y la señal de poliadenilación (PA). Las flechas representan la localización de los oligonucleótidos específicos para cada transgen, utilizados en la detección de los animales transgénicos.

3.1. Extracción de ADN genómico

El tejido obtenido de las biopsias de cola de los animales se colocó en *buffer* conteniendo TRIS 10 mM, EDTA 1 mM, Acetato de Na 0,3 M, SDS 1% (pH=8), proteinasa K 0,2 mg/ml, y se incubó durante una noche a 37 °C. Al día siguiente se agregó NaCl sol.sat., se centrifugó a 12000 x *g* a 4 °C durante 15 min y se transfirió el sobrenadante a otro tubo. Se agregó etanol 96%, se centrifugó a 10000 x *g* durante 10 min a temperatura ambiente y se descartó el sobrenadante. Luego se lavó con etanol 70%, se centrifugó a 10000 x *g* durante 10 min a temperatura ambiente, se descartó el sobrenadante y se dejó secar el pellet. Por último, se disolvió el pellet en H₂O destilada estéril y se determinó la concentración de ADN de las muestras a través de la medición de la absorbancia a 260/280 nm. Se guardaron alícuotas a -20 °C para la determinación del genotipo por PCR.

3.2. Técnica de PCR

Para la reacción de PCR, se agregó 1 µg de ADN genómico a una mezcla de reacción de 50 µl conteniendo: *buffer* de reacción (*green GoTaq reaction buffer 2X*), volumen óptimo para un ensayo de 50 µl, dNTPs 200 µM, oligonucleótido UBI 0,8 µM, oligonucleótidos Alpha y hCG1 0,4 µM, y 1 UI de ADN polimerasa (GoTaq). Se utilizó ADN de un animal de genotipo hCG $\alpha\beta$ + como control positivo. Se incluyeron, además, dos controles negativos: un tubo con ADN de un animal WT y otro tubo con la mezcla de reacción en ausencia de ADN. La reacción de PCR se realizó en un termociclador con los siguientes tiempos y temperaturas de reacción: 4 min a 94 °C (desnaturalización de ADN), 38 ciclos de 30 seg a 94 °C (desnaturalización), 1 min a 57 °C (hibridación) y 1 min 30 seg a 72 °C, seguidos por un ciclo final de 6 min a 72 °C (extensión).

Secuencia de los oligonucleótidos utilizados para la detección del genotipo:

UBI	5' CGCGCCCTCGTCGTGTC 3'
Alpha	5' CCGGTCGGGAGAAGAATGG 3'
hCG1	5' AAGCGGGGGTCATCACAGGTC 3'

3.3. Electroforesis en gel de agarosa

Los productos provenientes de la reacción de PCR fueron separados por electroforesis en gel de agarosa 2% en *buffer* TBE (TRIS 90 mM, ácido bórico 90 mM, EDTA 20 mM, pH=8) conteniendo bromuro de etidio. Las bandas se visualizaron con un transiluminador de luz UV y se compararon con un marcador de fragmentos de ADN de número de pb conocidas. En la Figura 11 se muestran, como ejemplo, los resultados obtenidos en la determinación del genotipo de una camada de ratones transgénicos. Los fragmentos correspondientes a hCG α y hCG β tienen un tamaño de 600 y 800 pb, respectivamente.

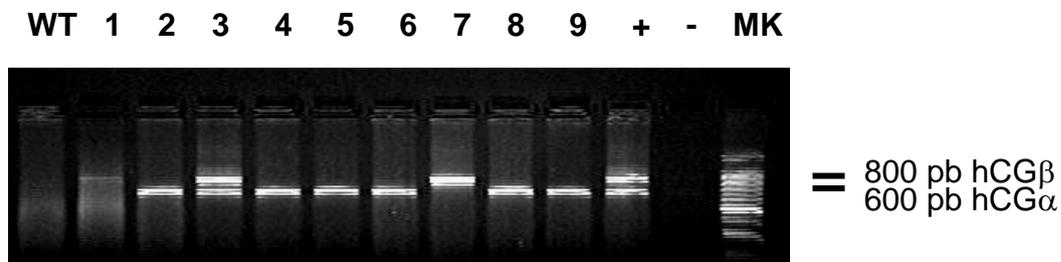


Figura 11. Determinación del genotipo de una camada representativa de ratones transgénicos. WT: control negativo de un animal WT; calles 1 a 9: muestras de distintas crías; +: control positivo de un animal doble transgénico; -: control negativo en ausencia de ADN; MK: marcador de fragmentos de ADN (cada 100 pb).

4. Animales para la caracterización del fenotipo

Con el fin de caracterizar el fenotipo del modelo de ratones doble transgénicos hCG $\alpha\beta$ +, se utilizaron animales machos y hembras portadores de ambas subunidades hCG α y hCG β , a distintas edades. Como controles se utilizaron ratones WT.

5. Tratamientos *in vivo*

Con el fin de evaluar el rol de los esteroides gonadales sobre el fenotipo de los ratones hCG $\alpha\beta$ +, los animales fueron sometidos a alguno de los siguientes tratamientos, a las edades señaladas oportunamente:

- a) Administración del antiandrógeno no esteroideo flutamida, el cual compite con la testosterona y DHT por la unión a AR y bloquea la transducción de la señal androgénica (Simard y col. 1986; Rulli y col. 1995).
- b) Administración del antiestrógeno fulvestrant, también conocido como ICI 182,780, el cual es un antagonista de ER α y ER β , sin efectos agonistas. Fulvestrant actúa induciendo una regulación por descenso (*down regulation*) de la expresión de los receptores y su posterior degradación (Zhang y col. 2009b).
- c) Administración del antiprogéstágeno mifepristona, también conocido como RU-486, el cual es un esteroide sintético que actúa como antagonista de PR (Im y Appleman 2010).
- d) Gonadectomía.

5.1. Tratamientos *in vivo* en machos

5.1.1. Tratamiento antiandrogénico

La forma de administración de la flutamida dependió de las edades de los animales a tratar. En aquellos casos en que fue necesario utilizar neonatos, se administró una inyección de flutamida en aceite de ricino en forma subcutánea (s.c.). Para protocolos de administración prolongados, y una vez que los animales alcanzaron un tamaño apropiado para su manipulación (a partir de los 7 días de edad), se utilizaron implantes s.c. de pellets de flutamida, como se muestra en la Figura 12. Los pellets de flutamida fueron preparados manualmente, utilizando una matriz de metal con una perforación circular de 3 mm de diámetro y una varilla de metal del mismo diámetro. Se agregó 20 mg de flutamida en polvo en la perforación, se encajó la varilla metálica en la matriz y se presionó suavemente con un martillo hasta formar un pellet compacto.



Figura 12. Implante s.c. de un pellet de flutamida (20 mg), en un ratón de 2 semanas de edad.

5.1.1.1. Tratamiento antiandrogénico perinatal

Para evaluar el tratamiento con flutamida durante el estadio perinatal, se aparearon hembras $hCG\alpha+$ con machos $hCG\beta+$ y se tomó el día de aparición de tapón vaginal como el DG1. A los 18 días de gestación las hembras embarazadas fueron anestesiadas por inhalación con isoflurano e implantadas con un pellet de flutamida (20 mg). El día de nacimiento de las crías (DG20-21) se tomó como el DPN1. Las crías se inyectaron con 5, 10 y 15 μ l de una solución de flutamida en aceite de ricino (50 mg/kg) a los DPN1, 3 y 5, respectivamente. Un grupo de controles $hCG\alpha\beta+$ recibieron vehículo solamente, siguiendo el mismo protocolo. En el DPN7 los machos recibieron un pellet de flutamida, el cual fue reemplazado por un nuevo pellet 15 días después. Como controles se utilizaron ratones WT sometidos al mismo tratamiento. Los machos fueron sacrificados a la edad de 28 días (Fig. 13).

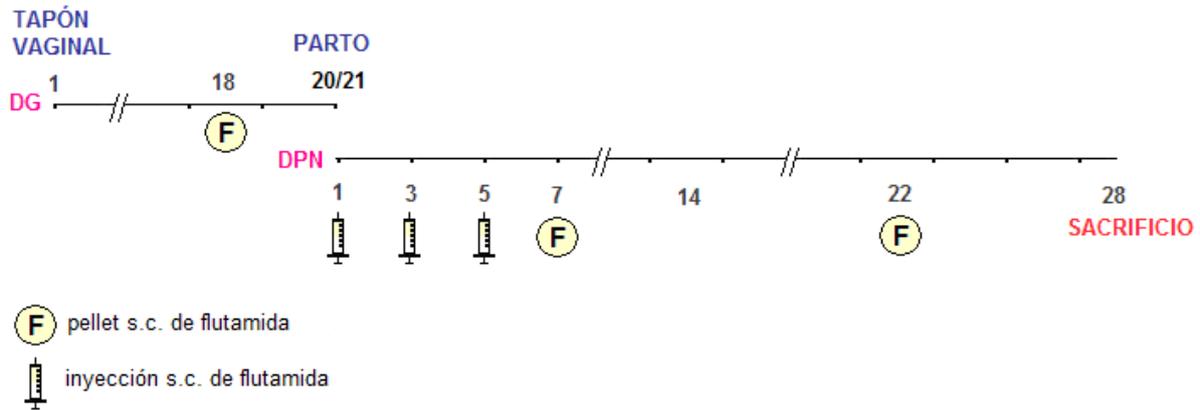


Figura 13. Esquema del tratamiento antiandrogénico perinatal en machos WT y hCG $\alpha\beta$ +. La línea representa la edad en días.

5.1.1.2. Tratamiento antiandrogénico desde la edad infantil

Machos WT y hCG $\alpha\beta$ + de 14 días de edad fueron implantados en forma s.c. con un pellet de 20 mg de flutamida. Los pellets fueron renovados cada 15 días hasta la edad de sacrificio a la edad de 28 ó 90 días (Fig. 14).

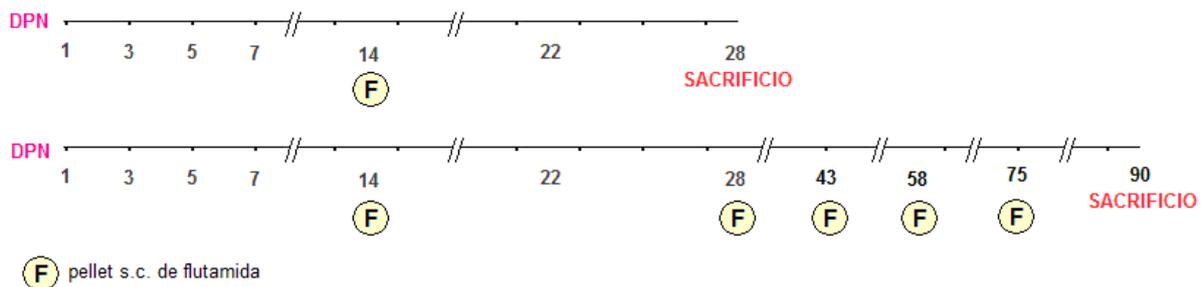


Figura 14. Esquema del tratamiento antiandrogénico prepuberal en machos WT y hCG $\alpha\beta$ +. La línea representa la edad en días.

5.1.2. Castración

Ratones machos WT y hCG $\alpha\beta$ + de 14 ó 75 días de edad fueron anestesiados con una solución de ketamina:xilacina (60:10 mg/kg) y los testículos fueron removidos junto con los epidídimos a través de una incisión abdominal. Finalmente se realizó una sutura por planos de músculo y piel. Los animales se sacrificaron 15 días después de la cirugía, a la edad de 28 ó 90 días (Fig. 15).

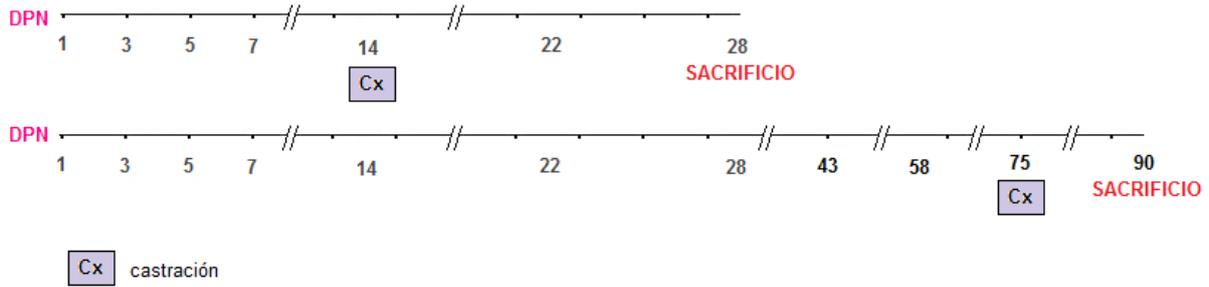


Figura 15. Esquema de la castración (Cx) en machos WT y hCG $\alpha\beta$ +. La línea representa la edad en días.

5.2. Tratamientos *in vivo* en hembras

5.2.1. Tratamiento antiandrogénico

Hembras WT y hCG $\alpha\beta$ + de 2 semanas de edad recibieron un pellet de flutamida (20 mg). Los pellets fueron renovados cada 15 días, hasta el momento del sacrificio a las 6 ó 12 semanas de edad (Fig. 16).

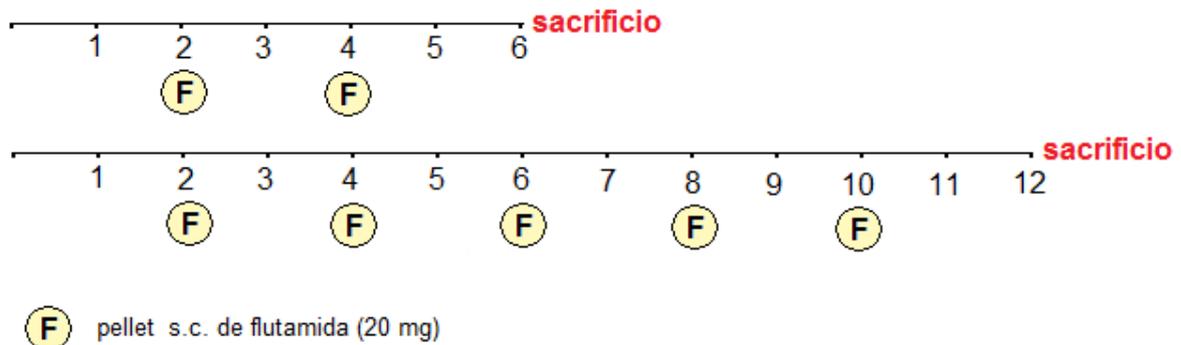


Figura 16. Esquema del tratamiento antiandrogénico en hembras WT y hCG $\alpha\beta$ +. La línea representa la edad en semanas.

5.2.2. Tratamiento antiestrogénico

Hembras WT y hCG $\alpha\beta$ + de 2 semanas de edad fueron inyectadas en forma s.c. con una solución de fulvestrant en aceite de ricino (2 mg/kg) 3 veces por semana, hasta el momento del sacrificio a las 6 ó 12 semanas de edad (Fig. 17).

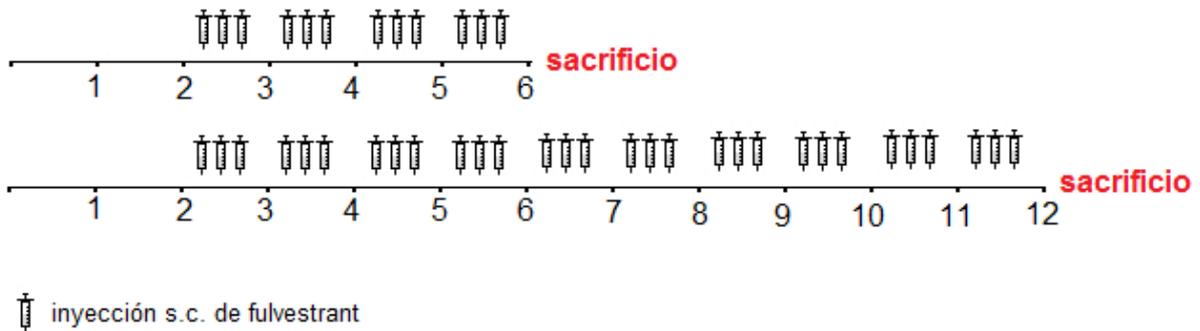


Figura 17. Esquema del tratamiento antiestrogénico en hembras WT y hCG $\alpha\beta$ +. La línea representa la edad en semanas.

5.2.3. Tratamiento combinado antiandrogénico y antiestrogénico

Hembras WT y hCG $\alpha\beta$ + de 2 semanas de edad recibieron un pellet de flutamida (20 mg), el cual fue reemplazado con un nuevo pellet cada 15 días, e inyectadas con una solución de fulvestrant en aceite de ricino (2 mg/kg) 3 veces por semana, hasta el momento del sacrificio a las 6 ó 12 semanas de edad (Fig. 18).

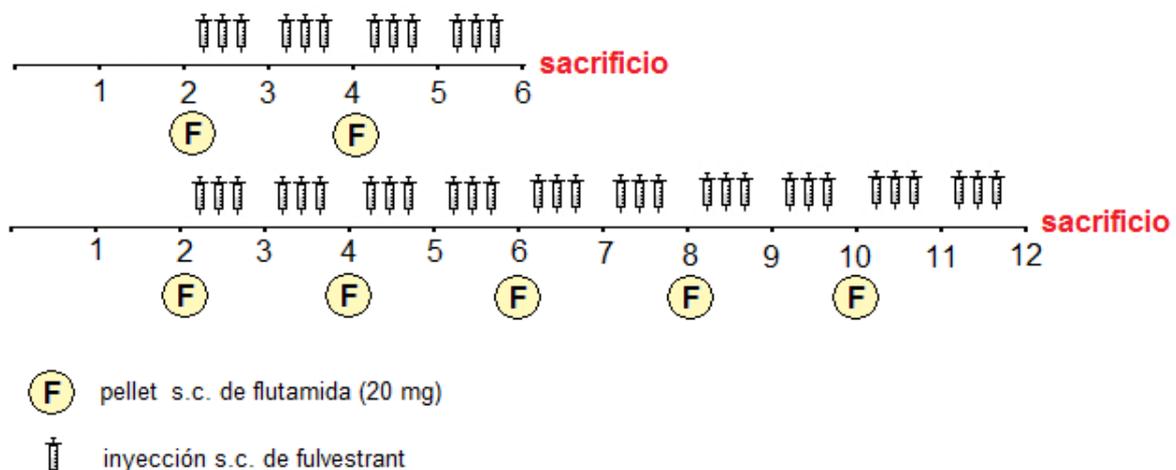


Figura 18. Esquema del tratamiento combinado antiandrogénico y antiestrogénico en hembras WT y hCG $\alpha\beta$ +. La línea representa la edad en semanas.

5.2.4. Tratamiento antiprogestagénico

Hembras WT y hCG $\alpha\beta$ + de 2 semanas de edad fueron inyectadas en forma s.c. con una solución de mifepristona en aceite de ricino (50 mg/kg) 3 veces por semana, hasta el momento del sacrificio a las 6 ó 12 semanas de edad (Fig. 19).

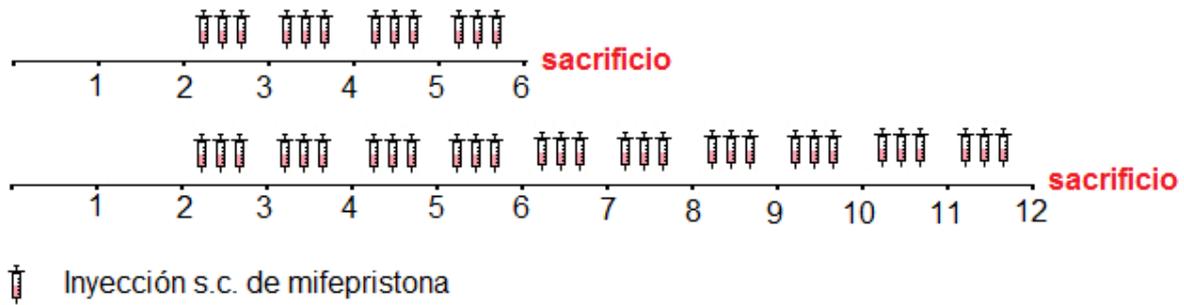


Figura 19. Esquema del tratamiento antiprogestagénico en hembras WT y hCG $\alpha\beta$ +. La línea representa la edad en semanas.

5.2.5. Ovariectomía

Hembras WT y hCG $\alpha\beta$ de 2 semanas de edad se anestesiaron con una solución de ketamina: xilacina (60:10 mg/kg) y los ovarios fueron removidos a través de una incisión dorso-lateral profunda, realizada a cada lado de la columna vertebral, por debajo del reborde costal. Los cuernos uterinos se reubicaron en la cavidad abdominal, y finalmente se realizó una sutura por planos de músculo y piel. Los animales fueron sacrificados una semana después de la cirugía, a la edad 3 semanas (Fig. 20).

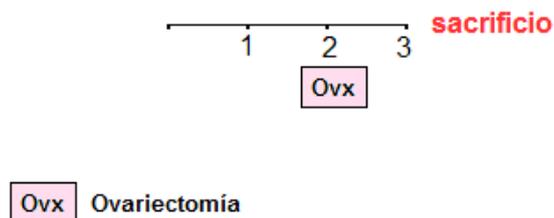


Figura 20. Esquema de la ovariectomía en hembras WT y hCG $\alpha\beta$ +. La línea representa la edad en semanas.

6. Estudios de fertilidad

Hembras WT de 6-8 semanas de edad fueron sometidas a un protocolo de superovulación mediante la administración de 7,5 UI de eCG, seguido de 5 UI de hCG 47 hr después, e inmediatamente apareadas individualmente con machos WT o hCG $\alpha\beta$ de 2 meses de edad. A la mañana siguiente se monitoreó la presencia de

tapón vaginal para confirmar el apareo. A los 20-21 días de aparición del tapón vaginal se confirmó la presencia de crías vivas.

7. Obtención del suero y procesamiento de los tejidos

Los animales fueron sacrificados por asfixia con CO₂ e inmediatamente se recolectó sangre por punción cardíaca. Se disecaron los distintos órganos de interés: hipotálamo, hipófisis, útero, ovarios y testículos. La disección del hipotálamo se realizó de la siguiente manera: el límite anterior fue establecido según la altura de la comisura anterior, los límites laterales fueron las fisuras hipotalámicas, y el límite posterior se fijó por debajo de los cuerpos mamilares (Bianchi y col. 2004). Para separar las áreas hipotalámicas anterior y medio basal-posterior se realizó una incisión a la altura del quiasma óptico (Catalano y col. 2010). Embriones fueron obtenidos a partir hembras WT preñadas en el DG11,5.

7.1. Obtención del suero

La sangre recolectada se colocó a 4 °C durante 1 hr para la formación del coágulo, y se centrifugó a 1200 x g durante 10 min. Se separó el suero y se guardaron alícuotas a -20 °C para ser utilizadas posteriormente en las distintas determinaciones hormonales.

7.2. Almacenamiento de los tejidos

Los tejidos fueron pesados rápidamente y almacenados según la metodología a seguir posteriormente: a) congelados a -20 °C para determinaciones hormonales, b) sumergidos en RNAlater y guardados a -70 °C para extracción de ARN, ó c) fijados en paraformaldehído 4% para técnicas histológicas.

7.3. Procesamiento de los sueros y tejidos para determinación hormonal

7.3.1. Procesamiento de los sueros para determinación de hormonas esteroideas

El procesamiento de los sueros para la determinación de la concentración sérica de hormonas esteroideas se realizó según el método descrito por Suescun y col. (1985). Alícuotas de 300 μ l de suero se extrajeron 2 veces con 2 ml de éter dietílico. Los extractos etéreos fueron separados por congelación y evaporados a sequedad con N_2 . Los residuos se resuspendieron en *buffer* (HNa_2PO_4 40 mM, H_2NaPO_4 35 mM, NaCl 0,15 M, gelatina 0,1%, azida sódica 0,1%, pH=7,4), en una proporción vol suero: vol resuspensión de 1:1, colocando los tubos en baño de agua a 50 °C y agitando vigorosamente para favorecer la resuspensión.

7.3.2. Procesamiento de los tejidos para determinación de hormonas esteroideas

El tejido testicular se procesó según la técnica utilizada por Zhang y col. (2001) para la extracción de esteroides de gónadas de ratón. Se homogeneizó en acetona en una relación peso:vol de 1:10, utilizando un homogeneizador Ultraturax. Las suspensiones resultantes se centrifugaron a 1600 x *g* durante 10 min. Los sobrenadantes fueron trasvasados a tubos cónicos, se evaporaron a sequedad y resuspendieron en 500 μ l de agua destilada, colocando los tubos en un baño de agua a 50 °C y agitando vigorosamente para favorecer la resuspensión. Las suspensiones se extrajeron 2 veces con 2 ml de éter dietílico. Los extractos etéreos fueron separados por congelación y evaporados a sequedad con N_2 . Los residuos se resuspendieron en 500 μ l de *buffer*, en baño de agua a 50 °C y agitando vigorosamente para favorecer la resuspensión.

7.3.3. Procesamiento de los tejidos para determinación de hormonas proteicas

Hipófisis individuales se homogeneizaron en 100 μ l de PBS, y se guardó el homogenato a -20 °C hasta el momento de la determinación. Los hipotálamos individuales se homogeneizaron en 100 μ l de HCl 0,1N helado, y se centrifugaron a 13000 x *g* durante 30 min a 4 °C. Se separó el sobrenadante y se repitió el

procedimiento una vez más con el precipitado. El homogenato obtenido se guardó a -20 °C hasta el momento de la determinación.

8. Determinaciones Hormonales

8.1. Hormonas proteicas

La determinación de las hormonas GnRH, FSH y prolactina se realizó por el método de radioinmunoensayo (RIA). La iodinación de los estándares proteicos se realizó siguiendo el método de cloramina T y posterior purificación, a través de columna de poliacrilamida-agarosa (Aca 44, Ultrogel; Charreau y col. 1977).

8.1.1. FSH y prolactina séricas

Las concentraciones séricas de FSH y prolactina se determinaron utilizando una técnica de doble anticuerpo (Baraño y col. 1981). Para la determinación de FSH se utilizaron alícuotas de 200 µl de suero para las hembras, y de 25 a 200 µl de suero para los machos. Para la determinación de prolactina se utilizaron alícuotas de 50 µl. Todas las muestras se midieron por duplicado, utilizando anticuerpos específicos. Las incubaciones con el primer anticuerpo y el trazador se realizaron a 4 °C durante 24 hs. La incubación se detuvo por el agregado del segundo anticuerpo y polietilenglicol 8%. La hormona libre se separó por centrifugación (1660 x g, 15 min), se descartaron los sobrenadantes y se determinó la radioactividad en los precipitados. Los resultados se expresaron en ng/ml de suero con respecto a los estándares NIDDK-rFSH-RP-2 para FSH y NIDDK-AFP-6476 para prolactina. La sensibilidad del ensayo fue de 0,24 ng/tubo para FSH y 0,1 ng/tubo para prolactina. Los coeficientes de variación intra- e inter-ensayo fueron menores al 7 y 12%, respectivamente.

8.1.2. Niveles hipofisarios de FSH

La determinación de los niveles hipofisarios de FSH se realizó por RIA, siguiendo el protocolo descrito en el ítem 8.1.1., a partir de una dilución del homogenato obtenido según el ítem 7.3.3. Los resultados se expresaron como ng de FSH/ hipófisis y ng de FSH/ mg de tejido.

8.1.3. GnRH en medios de incubación

La cantidad de GnRH liberada al medio de incubación por explantos hipotalámicos (ver ítem 9.) se evaluó por RIA (Mongiat y col. 2006), utilizándose alícuotas de 150 μ l. Las incubaciones con el primer anticuerpo y el trazador se realizaron a 4 °C durante 24 hs, y luego se precipitaron las inmunoglobulinas mediante el agregado de 1,5 ml de etanol 100%, mezclando vigorosamente con agitador. Luego de una incubación de 30 min a 4 °C, se centrifugó a 1660 x g durante 30 min a 4 °C, separando de este modo el complejo hormona-anticuerpo (precipitado) de la hormona libre (sobrenadante). Finalmente se descartaron los sobrenadantes y se determinó la radioactividad en los precipitados. La sensibilidad del ensayo fue de 1,5 pg/tubo, y los coeficientes de variación intra- e inter-ensayo menores al 12% en todos los casos. Los resultados se expresaron como pg de GnRH liberado al medio de incubación.

8.1.4. Concentración hipotalámica de GnRH

La determinación de la concentración hipotalámica de GnRH se realizó por RIA, siguiendo el protocolo descrito en el ítem 8.1.3., a partir de una dilución de los sobrenadantes obtenidos según el ítem 7.3.3. Una alícuota fue utilizada en la determinación de proteínas por el método de Lowry y col. (1951). Los resultados se expresaron como pg de GnRH/ mg de proteína.

8.2. Hormonas esteroideas

Las concentraciones de testosterona y progesterona en los extractos séricos (ítem 7.3.1) y tisulares (ítem 7.3.2.) se determinaron por RIA, utilizando una suspensión de carbón:dextrano (0,5%:0,05%) para separar el esteroide libre del complejo esteroide-anticuerpo (Suescun y col. 1985). La sensibilidad del ensayo fue de 0,09 pmol/ml para testosterona y 0,19 pmol/ml para progesterona. La concentración de estradiol sérica e intratesticular se determinó por RIA con el kit Ultra-sensitive Estradiol RIA Kit DSL-4800, siguiendo las instrucciones del fabricante. La sensibilidad del ensayo fue de 0,008 pmol/ml. Los coeficientes de variación intra- e inter-ensayo fueron menores al 12% en todos los casos.

9. Ensayos de pulsatilidad de GnRH *ex vivo*

Se determinó la pulsatilidad de GnRH *ex vivo* en hipotálamos de machos WT y hCG $\alpha\beta$ + controles y castrados de 28 días de edad, siguiendo el método descrito por Heger y col. (2003), y puesto a punto previamente en el laboratorio (Catalano y col. 2010). Los explantos hipotalámicos individuales (hipotálamo anterior e hipotálamo medio basal-posterior) se pesaron y luego se incubaron a 37 °C en 250 μ l de *buffer* Krebs-Ringer con bicarbonato (NaCl 115 mM, KCl 4,7 mM, KH₂PO₄ 1,2 mM, MgSO₄ 1,2 mM, CaCl₂ 2,56 mM, NaHCO₃ 20 mM), al que se le agregó 4,5 mg/ml de glucosa y 16 mM HEPES, pH=7,4, preparado en el momento. Luego de una preincubación de 30 min, se colectó el medio de cada tubo a intervalos de 8 minutos durante 6 hr y se reemplazó por medio fresco. Los medios se guardaron en PBS con bacitracina 2,5 mM (para evitar la degradación del GnRH) y congelaron a -20 °C. Posteriormente se midió la concentración de GnRH en el medio de incubación por RIA (ver ítem 8.1.3.). Los resultados fueron analizados utilizando el algoritmo computacional Cluster8, desarrollado por Veldhuis y Johnson (1986) y obtenido por M.L. Johnson (University of Virginia; disponible en: <http://mljohnson.pharm.virginia.edu/home.html>).

10. Determinación de la expresión génica

10.1. Extracción de ARN

Se realizó la extracción de ARN total con el reactivo Trizol, según las instrucciones del fabricante. Se homogeneizaron los tejidos en un homogeneizador Ultraturrax, en una relación de 50 mg de tejido/ ml de Trizol. Luego se incubó 5 min a temperatura ambiente, se agregó 0,2 ml de cloroformo y se centrifugó a 10000 x *g* durante 15 min a 4 °C. Se transfirió la fase superior acuosa a otro tubo y se agregó 0,5 ml de isopropanol frío. Luego de 10 min de incubación a temperatura ambiente, las muestras fueron centrifugadas a 10000 x *g* durante 10 min a 4 °C. Se descartó el sobrenadante, se lavó el pellet con etanol 75% en agua-DEPC 0,1% y centrifugó a 6250 x *g* durante 10 min a 4 °C. Se descartó el sobrenadante y el pellet obtenido se resuspendió en agua-DEPC 0,1%. Por último, se determinó la concentración de ARN de las muestras a través de la medición de la absorbancia a 260/280 nm. Alícuotas de ARN se conservaron a -70 °C.

10.2. Reacción de retrotranscripción (RT)

2 μ g de ARN se trataron con DNAsa y se agregaron a una mezcla de reacción de 20 μ l conteniendo *buffer* de reacción (*M-MLV 5X Reaction Buffer*, volumen óptimo para una reacción de 20 μ l), 16 UI de RNAsin, dNTPs 1 mM, 1 μ g de *random primers* y 200 UI de transcriptasa reversa M-MLV. Como control negativo, se utilizó un tubo de reacción en ausencia de ARN. La RT se llevó a cabo a 37 °C durante 60 min, seguido de 5 min a 95 °C.

10.3. PCR

10.3.1. PCR semicuantitativa

Se agregaron 2 μ l del producto de la RT a una mezcla de reacción conteniendo: *buffer* de reacción (*green GoTaq reaction buffer 2X*, volumen óptimo para un ensayo de 50 μ l), oligonucleótido sentido 1 μ M y oligonucleótido antisentido 1 μ M específicos para cada gen, dNTPs 0,2 mM y 1 UI de ADN polimerasa (GoTaq). Como control negativo se utilizó un tubo de reacción sin templado. La cantidad de ciclos de PCR para cada gen se puso a punto previamente. Como ejemplo, se muestra la amplificación del fragmento para *Cyp11a1* a distinto número de ciclos (Fig. 21): se ensayó una PCR con las concentraciones de reactivos detalladas previamente y los oligonucleótidos específicos del gen a estudiar. En este ejemplo, la reacción se detuvo a los 25, 30 y 35 ciclos. El control negativo se detuvo a los 35 ciclos. El producto de reacción se sembró en un gel de agarosa 2% con *buffer* TBE y bromuro de etidio, y se cuantificó la intensidad de banda obtenida en cada ensayo (la cuantificación se detalla más abajo). Se graficó la intensidad de banda promedio en función del número de ciclos (Fig. 22), viendo que la relación se mantuviera lineal, lo que indica que no se llegó a una saturación del sistema.

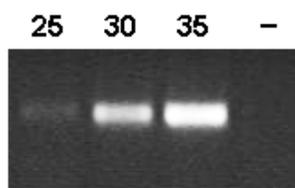


Figura 21. Bandas obtenidas de RT-PCR para *Cyp11a1* luego de 25, 30 y 35 ciclos de PCR; -: control negativo sin templado.

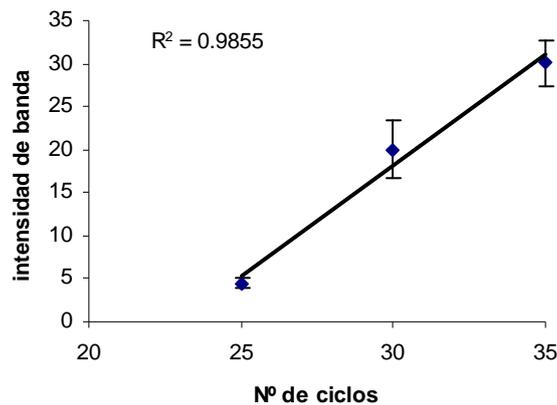


Figura 22. Intensidad promedio de banda en función del número de ciclos para *Cyp11a1*; (n=4).

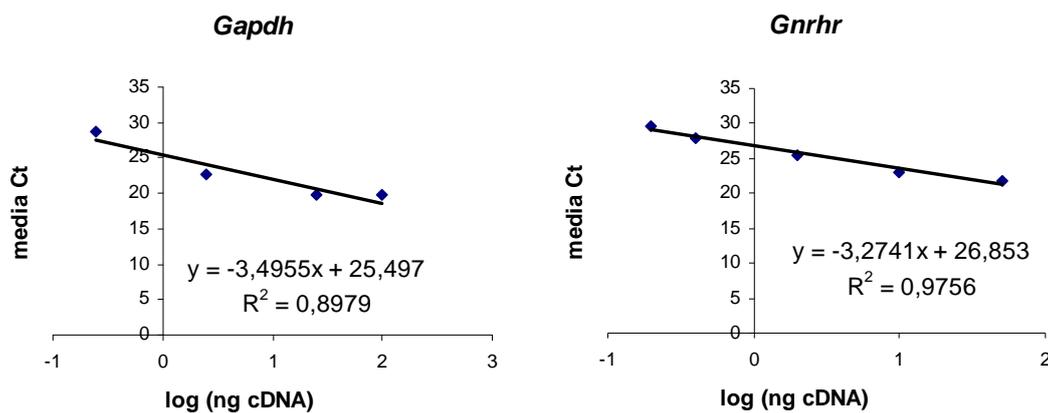
La reacción de PCR se realizó en un termociclador Bio-Rad con los siguientes tiempos y temperaturas de reacción: 4 min a 94 °C; el número de ciclos óptimo para la amplificación de cada gen de: 30 seg a 94 °C, 1 min a la temperatura de hibridización óptima de cada par de oligonucleótidos (ver Tabla 1) y 1 min 30 seg a 72 °C, seguidos por un ciclo de 6 min a 72 °C. Los fragmentos fueron separados por electroforesis en gel de agarosa 2% en *buffer* TBE conteniendo bromuro de etidio. Las bandas se visualizaron con un transiluminador de luz UV y se compararon con un marcador de fragmentos de ADN de número de pb conocido. Se utilizó *Gapdh* como gen de expresión constitutiva.

Los geles con las bandas obtenidas se fotografiaron y la intensidad de cada banda se cuantificó con el software ScionImage (Scion Corporation, National Institutes of Health, USA). Los resultados se presentaron como el valor de intensidad promedio relativo a *Gapdh* \pm error estándar medio (ESM) para cada grupo.

10.3.2. PCR en Tiempo Real

El análisis cuantitativo de la PCR se realizó utilizando una reacción conteniendo: SYBR Green Master Mix 1X, 4 pmol de cada oligonucleótido y 5 μ l de una dilución del producto de la RT conteniendo entre 2 y 20 ng de ADNc, en un volumen final de reacción de 13 μ l, por duplicado. La reacción de amplificación se llevó a cabo en un equipo ABI PRISM 7700 Sequence Detection System (Applied Biosystems). Las diferencias cuantitativas entre las muestras se determinaron a

través del cálculo de la expresión relativa entre el gen de interés y el gen de expresión constitutiva. El cálculo de la expresión relativa se obtuvo aplicando el modelo matemático descrito por Pfaffl (2001), utilizándose *Gapdh* como gen de expresión constitutiva. La Figura 23 ilustra la metodología empleada para el cálculo de la expresión relativa para *Gnrhr*: a partir de diluciones seriadas de un ADNc de tejido WT y del valor de Ct correspondiente se obtuvo una relación lineal de cuya pendiente (p) se obtuvo un valor de eficiencia (E) para cada par de oligonucleótidos. A partir de la E de cada par de oligonucleótidos y de los Ct obtenidos para cada muestra de interés se calculó la expresión relativa. Como muestra control, se eligió arbitrariamente una muestra WT (muestra C) a la cual se refirieron el resto de las muestras WT y hCG $\alpha\beta$ + (muestras X). Son considerados óptimos los valores de eficiencia de $2 \pm 0,1$.



$$E = 10^{-1/p}$$

$$E (\text{Gapdh}) = 1,93 (93\%)$$

$$E (\text{Gnrhr}) = 2,02 (102\%)$$

$$\text{Expresión relativa} = \frac{E_{\text{Gnrhr}} \Delta\text{Ct}_{\text{Gnrhr}} (\text{muestra C} - \text{muestra X})}{E_{\text{Gapdh}} \Delta\text{Ct}_{\text{Gapdh}} (\text{muestra C} - \text{muestra X})}$$

Figura 23. Cálculo de expresión relativa para PCR en tiempo real. E: eficiencia, p: pendiente de la recta, ΔCt : $\text{Ct}_C - \text{Ct}_X$, muestra C: control (muestra WT elegida arbitrariamente), muestra X: incógnita.

Tabla 1. Secuencias de oligonucleótidos usados en los ensayos de expresión génica

Gen	Nº acceso a GenBank	Oligonucleótido sentido 5' - 3'	Oligonucleótido antisentido 5' - 3'	Producto (pb)	Temp. hibrid. (°C)
<i>Fshb</i>	NM_008045	AAACGACGATGGACATTGCC	GTCAGGACAGCGGCAAACAGT	139	60
<i>Lhb</i>	NM_008497	TGTC AACGCAACTCTGGCC	GGCAGTACTCGGACCATGCT	105	55
<i>Cga</i>	NM_009889	GACTTTATTATTCAGGGTTGCCCA	AGAAGCAACAGCCCATACTG	100	55
<i>Esr1</i>	NM_007956	ATGAAAGGCGGCATACGGAAAG	CACCCATTTCATTCGGCCTTC	94	60
<i>Esr2</i>	NM_207707	CCAGACTGCAAGCCCAAATGT	AGAAGCGATGATTGGCAGTGG	81	55
<i>Ar</i>	NM_013476	GGCGGTCCTTCACTAATGTCAACT	GAGACTTGTGCATGCGGTACTCAT	84	60
<i>Lhcgr</i>	NM_013582	GGATAGAAGCTAATGCCTTTGACAAC	TAAAAGCACCGGGTTCAATGTATAG	96	55
<i>Fshr</i>	NM_013523	CCTTGCTCCTGGTCTCCTTG	CTCGGTCACCTTGCTATCTTG	113	55
<i>Gnrhr</i>	NM_010323	GCCACAGTCTTCTCGCAATG	ATGAGGAGGGGGATGATGA	111	55
<i>Fst</i>	NM_008046	GCTGCTACTCTGCCAGTTCAT	CACATCCTCCTCGGTCCA	166	55
<i>Gnrh</i>	NM_008145	GAACCCAGCACTTCGAATGT	TGGCTTCTCTTCAATCAGACTTT	94	55
<i>Gad67</i>	NM_008077	GCGGGAGCGGATCCTAATA	TGGTGCATCCATGGGCTAC	79	58
<i>Cyp11a1</i>	NM_019779	CGATACTCTTCTCATGCGAG	CTTCTTCCAGGCATCTGAAC	126	60
<i>Cyp19a1</i>	NM_007810	CGGGCTACGTGGATGTGTT	GAGCTTGCCAGGCGTTAAAG	135	55
<i>Cyp17a1</i>	NM_007809	GATCGGTTTATGCTGAGCG	TCCGAAGGGCAAATAACTGG	81	60
<i>Srd5a2</i>	NM_053188	GTTTAGCGTCGGTGTCTTCT	GCCCATCCATTCAATAATCT	175	55
<i>Kiss1</i>	NM_178260	AGCTGCTGCTTCTCCTCTGT	AGGCTTGCTCTCTGCATACC	140	60
<i>Kiss1r</i>	NM_053244	TGCAAATTCGTCAACTACATC	GGAACACAGTCACATACCAG	97	55
<i>Ptgs2</i>	NM_011198	CTGGCGCTCAGCCATACAG	ACACTCATAACATACCTCGGT	97	60
<i>Gapdh</i>	NM_008084	CCAGAACATCATCCCTGCAT	GTTCAGCTCTGGGATGACCTT	67	60

11. Técnicas histológicas

11.1. Preparación de los tejidos

Los tejidos fueron fijados en paraformaldehído 4% durante una noche. Posteriormente fueron sometidos a deshidratación en concentraciones crecientes de etanol (70, 96 y 100%) y xilol, y finalmente embebidos en parafina. Se realizaron secciones de 5 μm de ancho en un micrótomo manual, para ser utilizados en tinción con hematoxilina-eosina o inmunohistoquímica (Rulli y col. 2002).

11.2. Tinción con hematoxilina y eosina

Los cortes histológicos se desparafinaron en xilol e hidrataron en concentraciones decrecientes de etanol (100, 96 y 70%) y finalmente en agua destilada. Se sumergieron en hematoxilina durante 2 min, y luego se lavaron en agua corriente hasta la visualización del viraje de color. A continuación, los cortes se sumergieron en eosina acuosa 1% durante 2 min y se lavaron en agua corriente. Por último, los mismos fueron deshidratados, sumergiéndolos en concentraciones crecientes de etanol (70, 96 y 100%), aclarados con xilol y montados en bálsamo.

11.3. Tinción con DAPI

Los cortes histológicos se desparafinaron en xilol e hidrataron en concentraciones decrecientes de etanol (100, 96 y 70%) y finalmente en agua destilada. Se incubaron con 0,4 mg/L de DAPI por 15 min a temperatura ambiente y en oscuridad. Luego de varios lavados con *buffer* TBS (NaCl 0,15 mM, Tris 50 mM, pH= 7,5), los cortes fueron montados en medio acuoso Fluoromount y visualizados en microscopio de fluorescencia.

11.4. Inmunohistoquímica

La localización inmunohistoquímica se realizó utilizando la técnica de estreptavidina-biotina-peroxidasa. Los cortes histológicos se desparafinaron en xilol e hidrataron en concentraciones decrecientes de etanol y *buffer* TBS. En el caso de PIGF, se realizó una exposición antigénica, sometiendo las muestras a microondas en *buffer* citrato 0,01 M (pH= 6): 4 min a 700 W, 14 min a 280 W, seguido de 20 min

en reposo. Luego se agregó sobre cada corte saponina 0,5 % en TBS por 5 min, seguido de un bloqueo con suero normal (de cabra o caballo, según la especie en la que se realizó el segundo anticuerpo) 10% en *buffer* TBS con 1% de BSA, y se incubó 1 hr a temperatura ambiente en cámara húmeda. A continuación se agregó el primer anticuerpo: a) policlonal anti VEGF, desarrollado en conejo, dilución 1:1000 en 2% suero normal de cabra-TBS; b) policlonal anti PIGF, desarrollado en cabra, dilución 1:500 en 2% suero normal de caballo-TBS; c) policlonal anti PL-1, desarrollado en conejo, dilución 1:1000 en 2% suero normal de cabra-TBS, d) policlonal anti FSH β , desarrollado en conejo (NIDDK-anti-rFSH-IC-1), dilución 1:500 en 2% suero normal de cabra-TBS, d) policlonal anti CYP11A, desarrollado en conejo, dilución 1:500 en 2% suero normal de cabra-TBS. La incubación con el primer anticuerpo se realizó en cámara húmeda a 4 °C durante una noche. Se realizaron controles negativos en ausencia de primer anticuerpo. Al día siguiente se llevó a temperatura ambiente durante 30 min, se lavó con TBST (Tween-20 0,05% en TBS), se agregó el segundo anticuerpo biotinilado: para VEGF-A, PL-1, FSH β y CYP11A: anticuerpo anti IgG de conejo desarrollado en cabra, dilución 1:1000, en 2% suero normal de cabra-TBS; para PIGF: anticuerpo policlonal anti IgG de cabra desarrollado en caballo, dilución 1:500, en 2% suero normal de caballo-TBS. El segundo anticuerpo se incubó durante 1 hr 30 min en cámara húmeda a temperatura ambiente. Luego se agregó el complejo avidina-biotina, se incubó 1 hr a temperatura ambiente en cámara húmeda y se lavó con *buffer* TBS. El material fue revelado con DAB (0,5 mg/ml) en *buffer* Tris-HCl 50 mM (pH=7,6). Luego se lavó con *buffer* TBS, y en algunos casos se realizó una contracoloración con hematoxilina. Por último, se deshidrataron los cortes sumergiéndolos en una serie de concentraciones ascendentes de etanol, se aclaró con xilol y se montó en bálsamo.

12. Análisis estadístico de los datos

El análisis estadístico de los datos experimentales se realizó utilizando el programa Infostat (versión estudiantil, disponible en www.infostat.com.ar). Los resultados se expresaron como la media \pm ESM. Se aplicaron los siguientes test paramétricos: a) prueba t de Student, para comparar las medias de dos grupos

independientes; b) análisis de varianza (ANOVA) de 1 factor, para comparar las medias de 3 o más grupos independientes; c) ANOVA de 2 factores, en aquellos casos donde se deseó evaluar el efecto de 2 factores y su interacción (edad y genotipo, edad y tratamiento). Para efectuar las comparaciones múltiples de a pares luego del ANOVA, se aplicó el test post-hoc de Bonferroni, el cual permite el análisis de modelos no balanceados. Valores de $p < 0,05$ fueron considerados estadísticamente significativos. En ciertos casos, los datos fueron transformados para cumplir con los supuestos de normalidad y homogeneidad de varianzas requeridos para aplicar test paramétricos, aplicándose transformaciones logarítmicas o raíz cuadrada.

RESULTADOS

CAPITULO 1

FENOTIPO DE LOS MACHOS $hCG\alpha\beta+$

A lo largo de este capítulo se describirá el fenotipo de los machos transgénicos durante las distintas fases del desarrollo sexual, en las etapas neonatal, infantil, prepuberal y adulta. Se estudiaron parámetros morfológicos, bioquímicos y moleculares claves en la caracterización del eje reproductivo de los machos $hCG\alpha\beta+$, poniendo especial énfasis en el funcionamiento de la unidad hipotálamo-hipofisaria.

1.1. Peso corporal y testicular de los machos $hCG\alpha\beta+$

1.1.1. Peso corporal

Se realizó un seguimiento del peso corporal de los machos WT y $hCG\alpha\beta+$ desde los 7 a los 90 días de edad. Se observó una reducción significativa en el peso corporal de los machos transgénicos comparados con los WT a los 28 y 90 días de edad ($p<0,01$) (Fig. 24A).

1.1.2. Peso testicular

Se estudió el peso absoluto de los testículos de los machos WT y $hCG\alpha\beta+$ desde los 7 a los 90 días de edad, observándose una reducción significativa en el peso testicular de los machos transgénicos comparados con los WT a partir de los 10 días de edad ($p<0,01$) (Fig. 24B). Se determinó además el peso del testículo relativo al peso corporal, obteniéndose la misma tendencia y significancia observada en el peso absoluto.

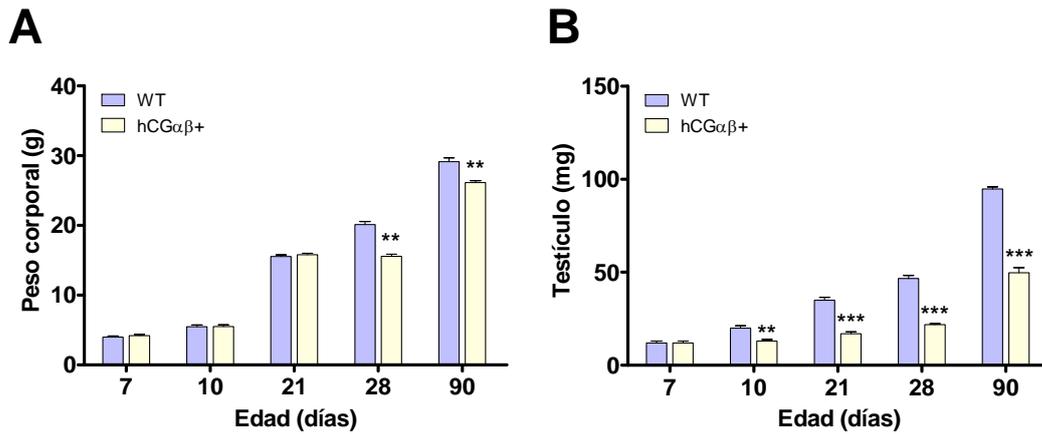


Figura 24. A) peso corporal, y **B)** peso testicular de ratones macho WT y hCG $\alpha\beta$ + de 7, 10, 21, 28 y 90 días de edad. ANOVA de 2 factores – Bonferroni. Los asteriscos muestran diferencias significativas para WT vs hCG $\alpha\beta$ + dentro de cada edad. N=4-6. **: p<0.01, ***: p<0.001.

1.2. Peso de los órganos sexuales accesorios de los machos hCG $\alpha\beta$ +

Se estudió el peso de los órganos sexuales accesorios, epidídimo y vesícula seminal, a edades representativas de las etapas prepuberal y adulta, es decir a los 28 y 90 días, respectivamente.

1.2.1. Peso del epidídimo

Se observó un aumento significativo en el peso del epidídimo de ratones hCG $\alpha\beta$ + comparado con los WT a los 28 días de edad (p<0,05), sin detectarse cambios a los 90 días de edad entre los genotipos (Fig. 25A). Se estudió además el peso del epidídimo relativo al peso corporal, obteniéndose la misma tendencia y significancia observada en el peso absoluto.

1.2.2. Peso de la vesícula seminal

El peso de la vesícula seminal resultó significativamente mayor en los machos hCG $\alpha\beta$ + comparados con los WT a los 28 y 90 días de edad (p<0,001) (Fig. 25B). Se estudió además el peso de la vesícula seminal relativo al peso

corporal, obteniéndose la misma tendencia y significancia observada en el peso absoluto.

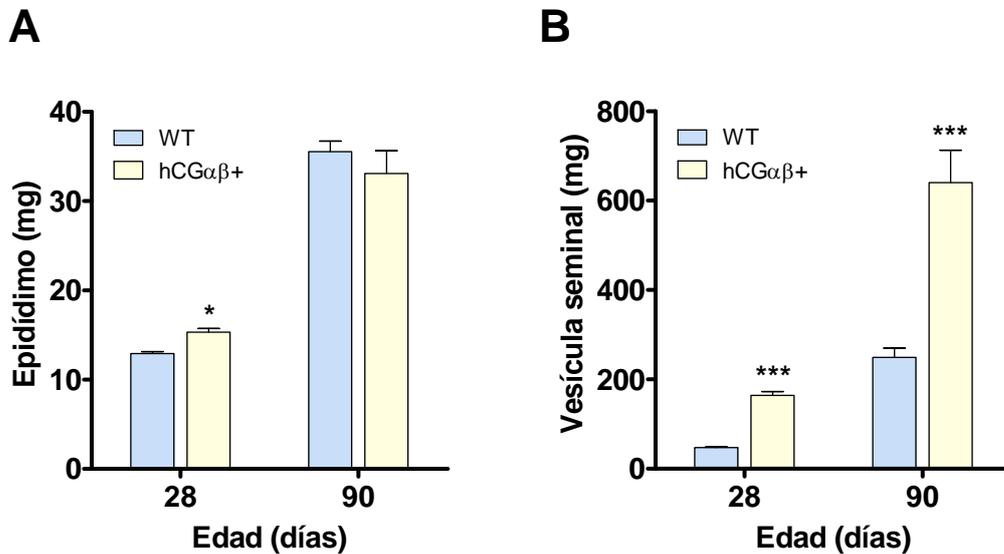
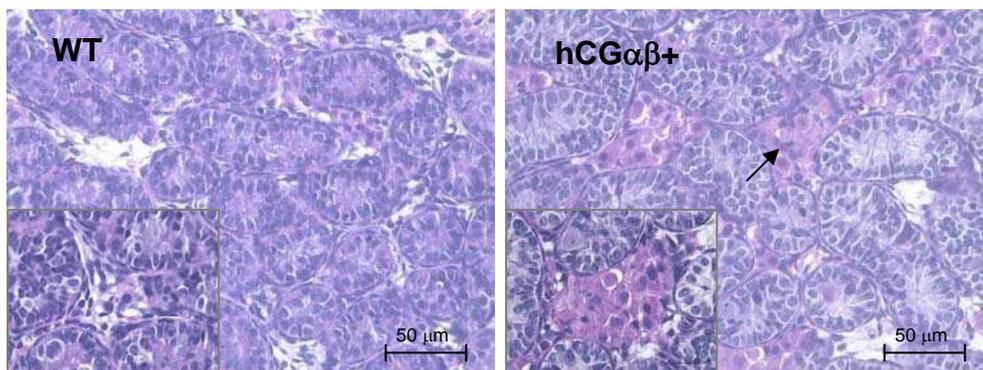


Figura 25. A) peso del epidídimo, y B) peso de las vesículas seminales de ratones macho WT y hCG $\alpha\beta$ + a los 28 y 90 días de edad. ANOVA de 2 factores – Bonferroni. Los asteriscos muestran diferencias significativas para WT vs hCG $\alpha\beta$ + dentro de cada edad. N=4-6. *: p<0,05, ***: p<0,001.

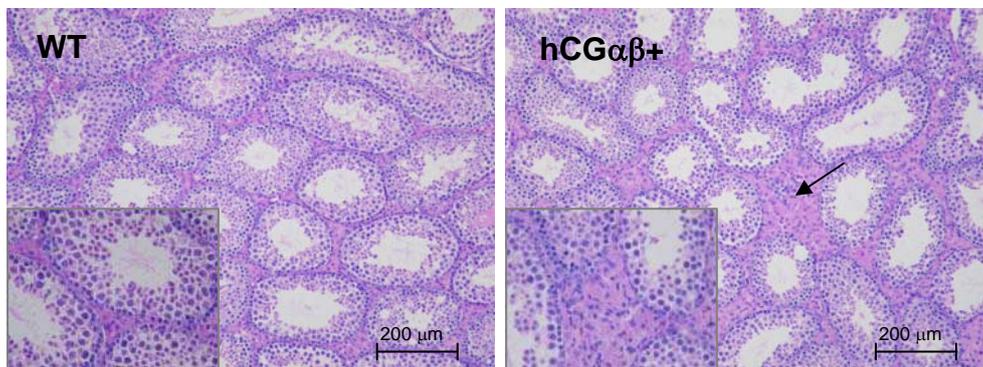
1.3. Cambios morfológicos en el testículo de ratones hCG $\alpha\beta$ +

Se estudió la morfología testicular de los ratones WT y hCG $\alpha\beta$ + a distintas edades: 4, 28 y 90 días (Fig. 26). A los 4 días de edad, los machos hCG $\alpha\beta$ + presentaron hiperplasia/hipertrofia de las células de Leydig con características de adenoma. Se considera adenoma cuando el diámetro de los focos de células de Leydig supera el diámetro del túbulo seminífero (Clegg y col. 1997; Cook y col. 1999). A los 28 días de edad, los machos hCG $\alpha\beta$ + presentaron una marcada hiperplasia/hipertrofia de las células de Leydig. A los 90 días de edad, se observó un fenotipo moderadamente hipertrófico de las células de Leydig en los ratones hCG $\alpha\beta$ +. Estas observaciones concuerdan con las previamente reportadas por Ahtiainen y col. (2005).

4 días



28 días



90 días

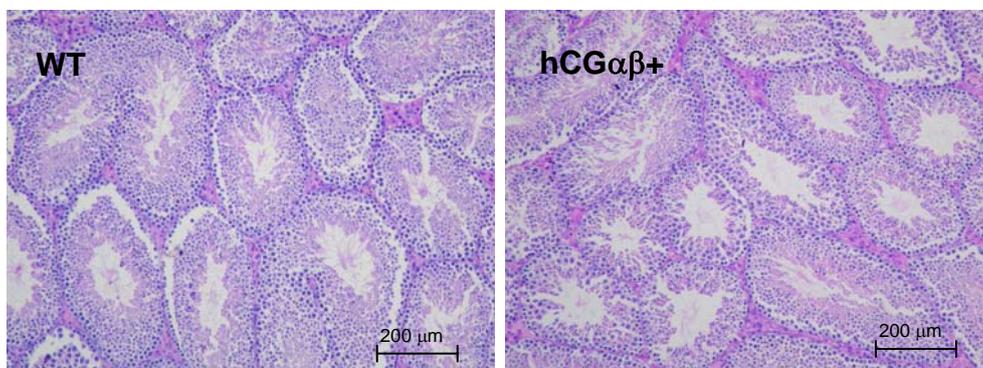


Figura 26. Morfología testicular de los machos WT y hCG $\alpha\beta$ + a los 4, 28 y 90 días de edad. Detalle: intersticio. Flechas: hiperplasia de células de Leydig. Tinción con hematoxilina y eosina.

1.4. Perfil hormonal de los machos $hCG\alpha\beta+$: FSH y testosterona sérica

Se estudiaron los niveles séricos de FSH y testosterona en las edades infantil (7 y 10 días), prepuberal (21 y 28 días) y adulta (90 días).

1.4.1. Niveles séricos de FSH

La concentración sérica de FSH mostró un aumento significativo en los machos WT entre los días 10 a 28, mientras que en los machos $hCG\alpha\beta+$ los valores se mantuvieron bajos y sin cambios en todas las edades estudiadas, siendo significativamente menores que los del WT a partir de los 10 días de edad ($p < 0,05$) (Fig. 27A).

1.4.2. Niveles séricos de testosterona

La concentración sérica de testosterona en los machos WT mostró una disminución a los 10 y 21 días, en comparación con los 7 días, y luego un aumento a partir de los 28 días. En los machos $hCG\alpha\beta+$ la concentración sérica de testosterona resultó significativamente elevada, comparados con los WT, en todas las edades estudiadas ($p < 0,05$) (Fig. 27B).

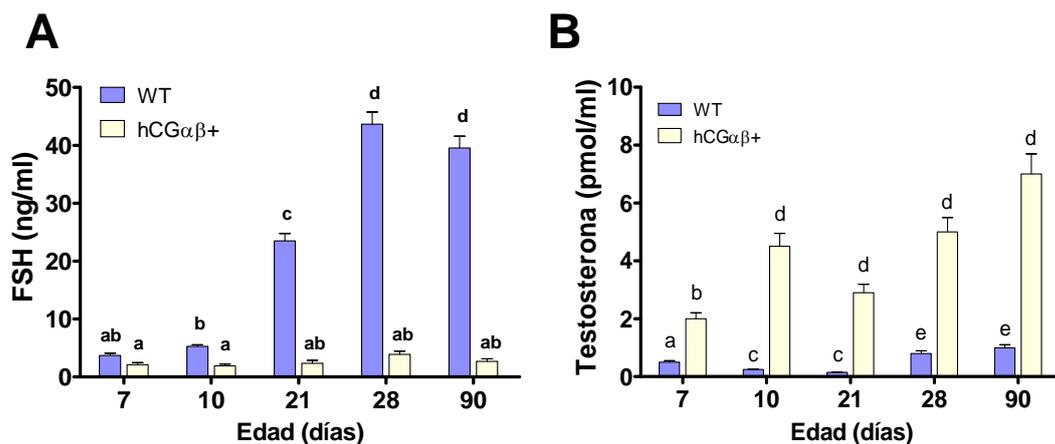


Figura 27. A) Concentración sérica de FSH en machos WT y $hCG\alpha\beta+$ a los 7, 10, 21, 28 y 90 días de edad. ANOVA de 2 factores – Bonferroni. Se obtuvieron efectos significativos del genotipo, la edad y la interacción ($p < 0,001$). N=5-7, letras distintas: $p < 0,05$. **B)** Concentración sérica de testosterona en machos WT y $hCG\alpha\beta+$ a los 7, 10, 21, 28 y 90 días de edad. ANOVA de 2 factores – Bonferroni. Se obtuvieron efectos significativos del genotipo ($p < 0,001$). N=5-7, letras distintas: $p < 0,05$.

1.5. Perfil hormonal de los machos $hCG\alpha\beta+$: niveles intratesticulares de hormonas esteroideas

Se estudiaron los niveles intratesticulares de testosterona y estradiol en la edad infantil (10 días), prepuberal (28 días) y adulta (90 días).

1.5.1. Concentración intratesticular de testosterona

Coincidiendo con el perfil sérico, se detectaron valores elevados de la concentración de testosterona en el testículo de los machos $hCG\alpha\beta+$ comparados con los WT a las tres edades estudiadas ($p < 0,001$) (Fig. 28A).

1.5.2. Concentración intratesticular de estradiol

Se observó una elevada concentración intratesticular de estradiol en los machos $hCG\alpha\beta+$ comparados con los WT a los 10 días de edad ($p < 0,001$), mientras que a los 28 y 90 días no se detectaron diferencias significativas entre los genotipos (Fig. 28B).

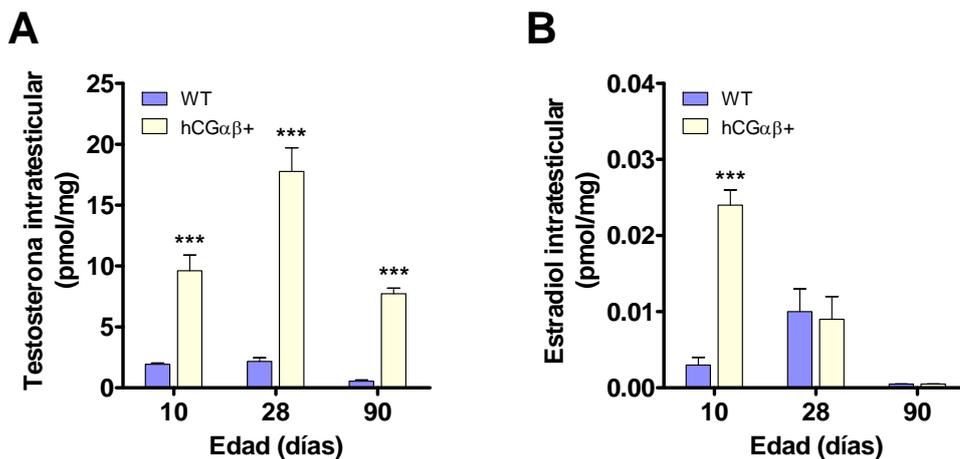


Figura 28. Concentración intratesticular de **A)** testosterona, y **B)** estradiol de machos WT y $hCG\alpha\beta+$ a los 10, 28 y 90 días de edad. Los datos se expresan en pmol/ mg de tejido. ANOVA de 2 factores – Bonferroni. Los asteriscos muestran diferencias significativas para WT vs $hCG\alpha\beta+$ dentro de cada edad. N=4-6. ***: $p < 0.001$.

1.6. Niveles de FSH en hipófisis de machos $hCG\alpha\beta+$ prepúberes

Debido a que los machos $hCG\alpha\beta+$ mostraron valores séricos de FSH permanentemente deprimidos, se analizó en mayor profundidad la producción de esta hormona por la hipófisis a una edad representativa del estadio prepuberal, como es a los 28 días de edad, considerando que éste es un momento relevante en la maduración y regulación del eje HHG (Ojeda y Skinner 2006). Se estudió el peso de la glándula hipofisaria, los niveles intrahipofisarios de FSH y la inmunolocalización de la subunidad β de FSH en hipófisis de machos WT y $hCG\alpha\beta+$.

1.6.1. Peso de la hipófisis

El peso de la hipófisis resultó significativamente reducido en el grupo $hCG\alpha\beta+$ comparado con el WT ($p<0,01$) (Fig. 29A). Se estudió además el peso de la hipófisis relativo al peso corporal, obteniéndose la misma tendencia y significancia observada en el peso absoluto.

1.6.2. Niveles hipofisarios de FSH

Coincidiendo con el perfil sérico, el contenido hipofisario de FSH presentó valores significativamente reducidos en el grupo $hCG\alpha\beta+$ comparado con el WT ($p<0,001$) (Fig. 29B). Al expresarse los resultados como concentración, las diferencias también resultaron significativas (WT: $173,44 \pm 11,92$, $hCG\alpha\beta+$: $16,60 \pm 2,95$ ng FSH/mg de tejido, $p<0,001$).

1.6.3. Inmunolocalización de FSH β en la hipófisis

La inmunomarcación para la subunidad β de FSH mostró un menor número e intensidad de células productoras de FSH en las hipófisis $hCG\alpha\beta+$ con respecto a las WT (WT: $109,25 \pm 15,35$, $hCG\alpha\beta+$: $28,50 \pm 3,12$ células FSH β -positivas/campo, $p<0,001$) (Fig. 29C).

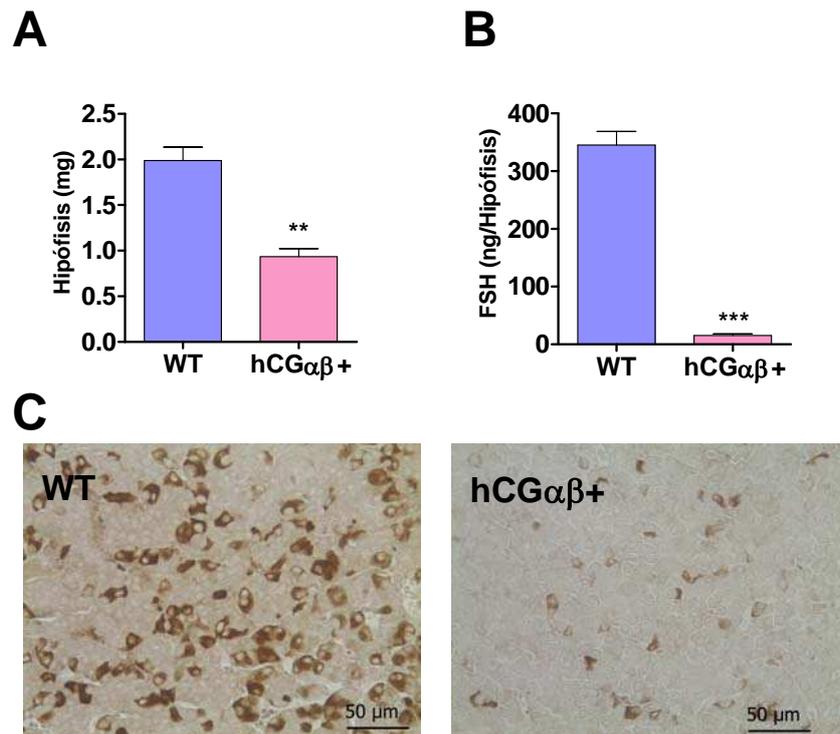


Figura 29. **A)** peso de la hipófisis, **B)** contenido hipofisario de FSH, **C)** inmunomarcación para la subunidad β de FSH en hipófisis de machos WT y hCG $\alpha\beta$ + a los 28 días de edad. Prueba t de Student, N=4, **: $p < 0.01$, ***: $p < 0.001$.

1.7. Perfil de expresión génica en hipófisis de machos hCG $\alpha\beta$ + prepúberes

Se analizó la expresión génica de las subunidades de gonadotrofinas FSH β (*Fshb*), LH β (*Lhb*) y la subunidad común α (*Cga*) en hipófisis de machos WT y hCG $\alpha\beta$ + de 28 días de edad (Fig. 30). En coincidencia con los niveles séricos e intrahipofisarios de FSH, los niveles de expresión de *Fshb* y *Cga* resultaron significativamente disminuidos (~50 veces), al igual que los de *Lhb* (~100 veces) en la hipófisis de machos hCG $\alpha\beta$ + comparados con los WT ($p < 0,001$). Se analizó también la expresión de genes claves en la regulación de gonadotrofinas, tales como ER α (*Esr1*), GnRHR (*Gnrhr*) y folistatina (*Fst*) (Fig. 30). *Esr1* y *Gnrhr* mostraron niveles de expresión disminuidos alrededor de 4 y 2 veces, respectivamente (*Gnrhr*: $p < 0,001$, *Esr1*: $p < 0,05$), mientras que *Fst*

mostró un aumento de alrededor de 2 veces ($p < 0,01$) en los machos $hCG\alpha\beta+$ comparados con los WT.

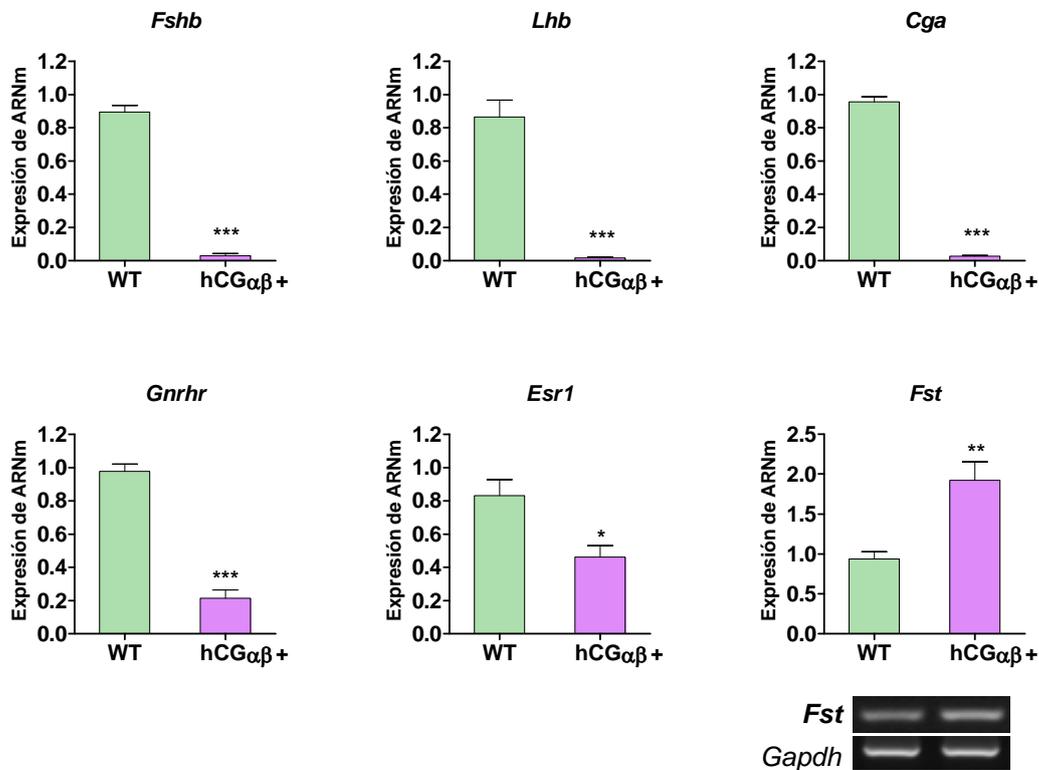


Figura 30. Perfil de expresión génica en hipófisis de machos WT y $hCG\alpha\beta+$ de 28 días de edad. La expresión de ARNm de *Fshb*, *Lhb*, *Cga*, *Esr1* y *Gnrhr* se evaluó por PCR en Tiempo Real. Debido a que *Fst* presentó valores de Ct cercanos al límite de detección del ensayo, la expresión de este gen se evaluó por RT-PCR semicuantitativa. Debajo del gráfico se muestra una banda representativa de *Fst* y *Gapdh* para cada genotipo. Prueba t de Student, N=4, *: $p < 0.05$, **: $p < 0.01$, ***: $p < 0.001$.

1.8. Expresión de GnRH en hipófisis de machos $hCG\alpha\beta+$ prepúberes

Se evaluó la expresión génica de GnRH (*Gnrh*) en el hipotálamo, como también la concentración hipotalámica de GnRH, en machos WT y $hCG\alpha\beta+$ de 28 días de edad (Fig. 31). No se detectaron diferencias significativas en la expresión génica de *Gnrh* entre los genotipos, en cambio la concentración de GnRH en el hipotálamo resultó significativamente mayor en el grupo $hCG\alpha\beta+$ comparado con el WT ($p < 0,01$).

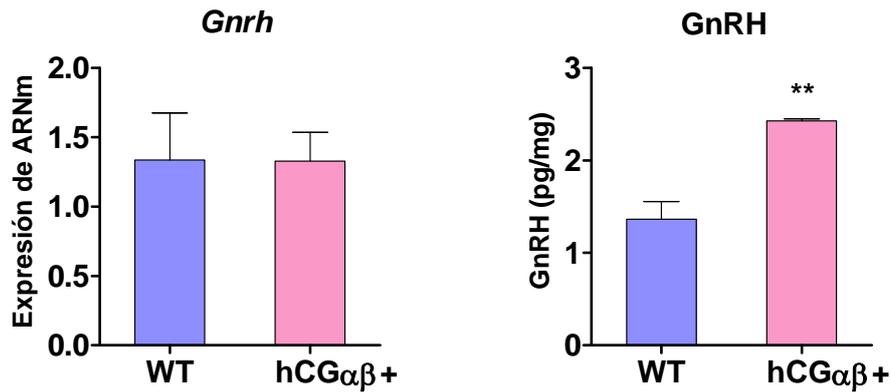


Figura 31. Expresión génica de *Gnrh* por PCR en Tiempo Real y concentración de GnRH en hipotálamo (pg/mg de proteína) de machos WT y hCG $\alpha\beta$ + de 28 días de edad. Prueba t de Student, N=4, **: p<0,01.

1.9. Perfil de expresión génica en hipotálamo de machos hCG $\alpha\beta$ + neonatos y prepúberes

Con el fin de estudiar la posible influencia de la metabolización de esteroides gonadales sobre la regulación de la producción de las gonadotropinas hipofisarias, se evaluó el perfil de expresión de las enzimas esteroidogénicas reguladas por andrógenos CYP19 (*Cyp19a1*) y 5 α -Red tipo II (*Srd5a2*) (Negri-Cesi y col. 2008) en el hipotálamo de machos WT y hCG $\alpha\beta$ +. Se evaluó también la expresión génica de kisspeptina (*Kiss1*) y GAD67 (*Gad67*), como posibles mecanismos moduladores de la actividad de las neuronas GnRH en el hipotálamo. Se estudiaron estos parámetros en dos momentos relevantes de la regulación de la función hipotalámica, como es el estadio neonatal (a los 4 días de edad) y prepuberal (a los 28 días de edad).

1.9.1. Expresión de enzimas esteroidogénicas

La expresión de *Cyp19a1* presentó un aumento significativo en el hipotálamo de machos hCG $\alpha\beta$ + a los 28 días de edad comparados con los WT (p<0,05), mientras que a los 4 días no mostró diferencias significativas entre genotipos. La expresión de *Srd5a2* no presentó cambios a ninguna de las edades estudiadas (Fig. 32).

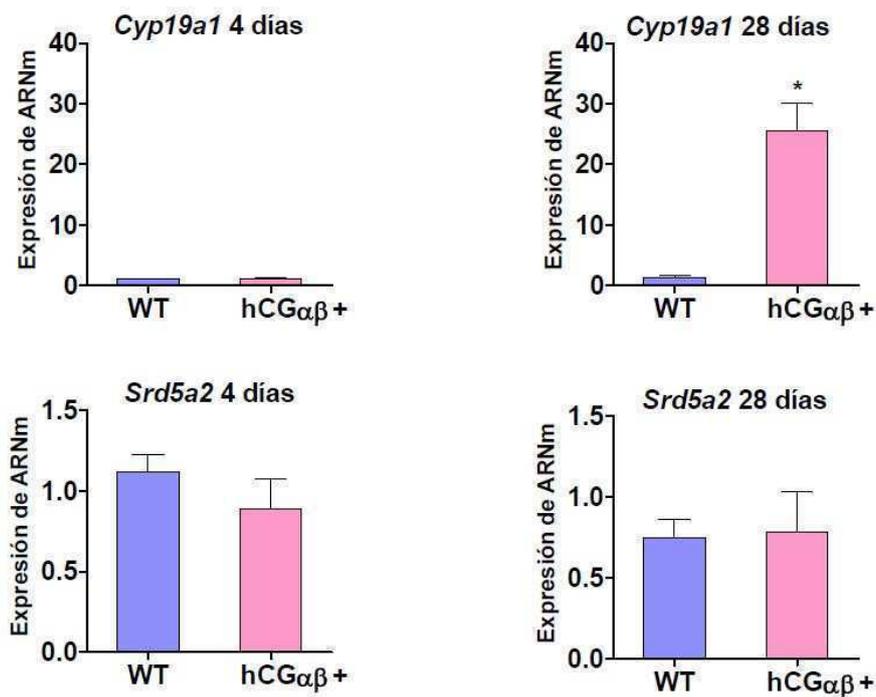


Figura 32. Perfil de expresión génica en el hipotálamo de machos WT y hCG $\alpha\beta$ + a los 4 y 28 días de edad. La expresión génica de *Cyp19a1* y *Srd5a2* se evaluó por PCR en Tiempo Real. Prueba t de Student, N=4, *: p<0,05.

1.9.2. Expresión de *Kiss1* y *Gad67*

Mientras que a los 4 días de edad la expresión de *Kiss1* no mostró diferencias significativas entre genotipos, a los 28 días la misma resultó significativamente menor en el hipotálamo del grupo hCG $\alpha\beta$ + con respecto al WT (p<0,01). En el caso de *Gad67* se encontró lo opuesto a *Kiss1*, observándose niveles de expresión elevados de *Gad67* en el hipotálamo hCG $\alpha\beta$ + de 4 días, sin detectarse diferencias entre genotipos a los 28 días (Fig. 33).

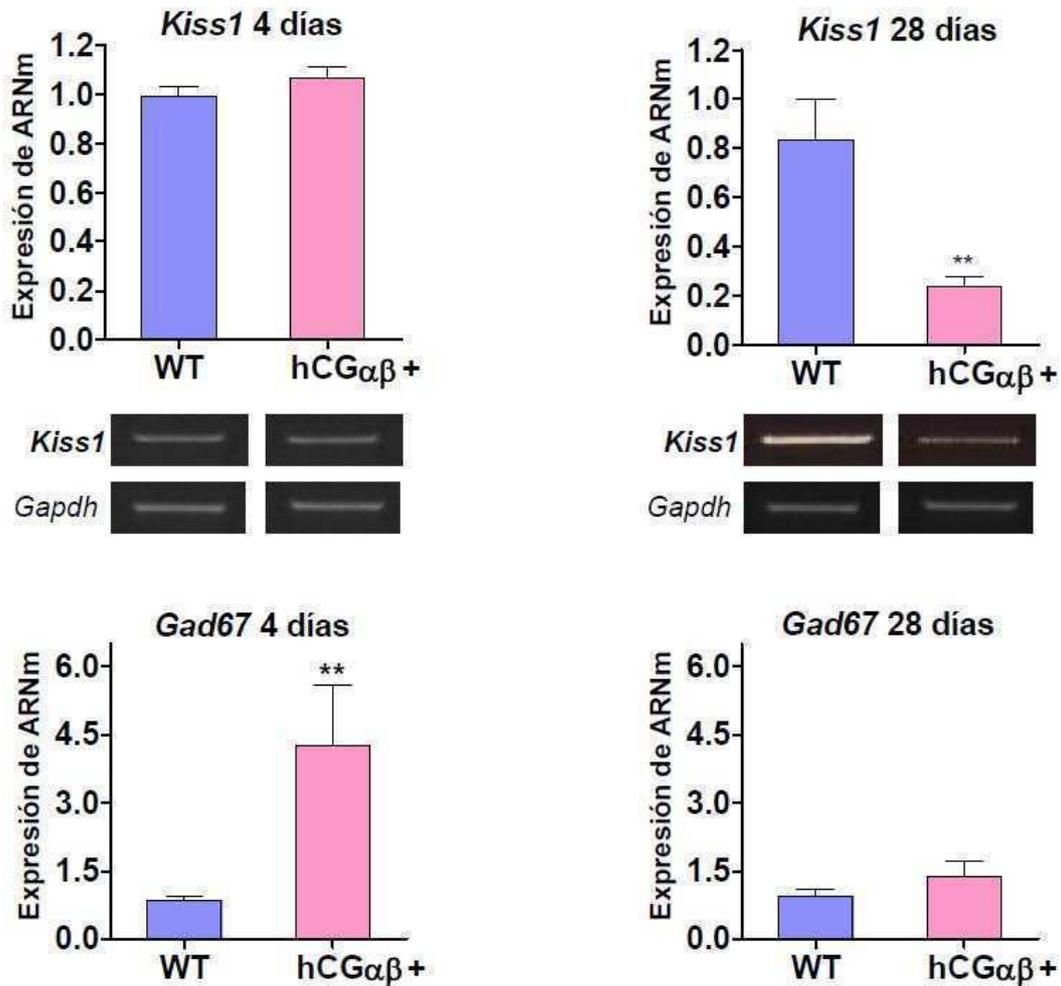


Figura 33. Perfil de expresión génica en el hipotálamo de machos WT y hCG $\alpha\beta$ + a los 4 y 28 días de edad. Debido a que *Kiss1* presentó valores de Ct cercanos al límite de detección del ensayo de PCR en Tiempo Real, la expresión de este gen se evaluó por RT-PCR semicuantitativa, y debajo de cada gráfico se muestra una banda representativa de *Kiss1* y *Gapdh* para cada genotipo. La expresión de *Gad67* se evaluó por PCR en Tiempo Real. Prueba t de Student, N=4, **: p<0,01.

1.10. Análisis de la pulsatilidad de GnRH *ex vivo* en machos hCG $\alpha\beta$ + prepúberes

Debido a que la acción fisiológica de GnRH sobre la liberación de gonadotrofinas es ejercida de manera pulsátil, se realizaron estudios *ex vivo* de hipotálamos de machos WT y hCG $\alpha\beta$ + de 28 días de edad, con el fin de determinar si la pulsatilidad de GnRH también estaba afectada en este modelo. La Figura 34A muestra patrones de pulsatilidad representativos de machos WT y hCG $\alpha\beta$ +, observándose una mayor ocurrencia de picos de liberación de

GnRH en el macho hCG $\alpha\beta$ + comparado con el WT. El patrón de pulsatilidad se expresó en términos de frecuencia de pulsos, amplitud del pulso, intervalo interpulso y masa total liberada durante el experimento (Fig. 34B-E). Los machos hCG $\alpha\beta$ + mostraron mayor frecuencia ($p<0,001$) (Fig. 34B), mayor masa total liberada ($p<0,05$) (Fig. 34E) y menor intervalo interpulso ($p<0,05$) (Fig. 34D) comparados con los WT, mientras que no se detectaron diferencias significativas en la amplitud del pulso entre genotipos (Fig. 34C).

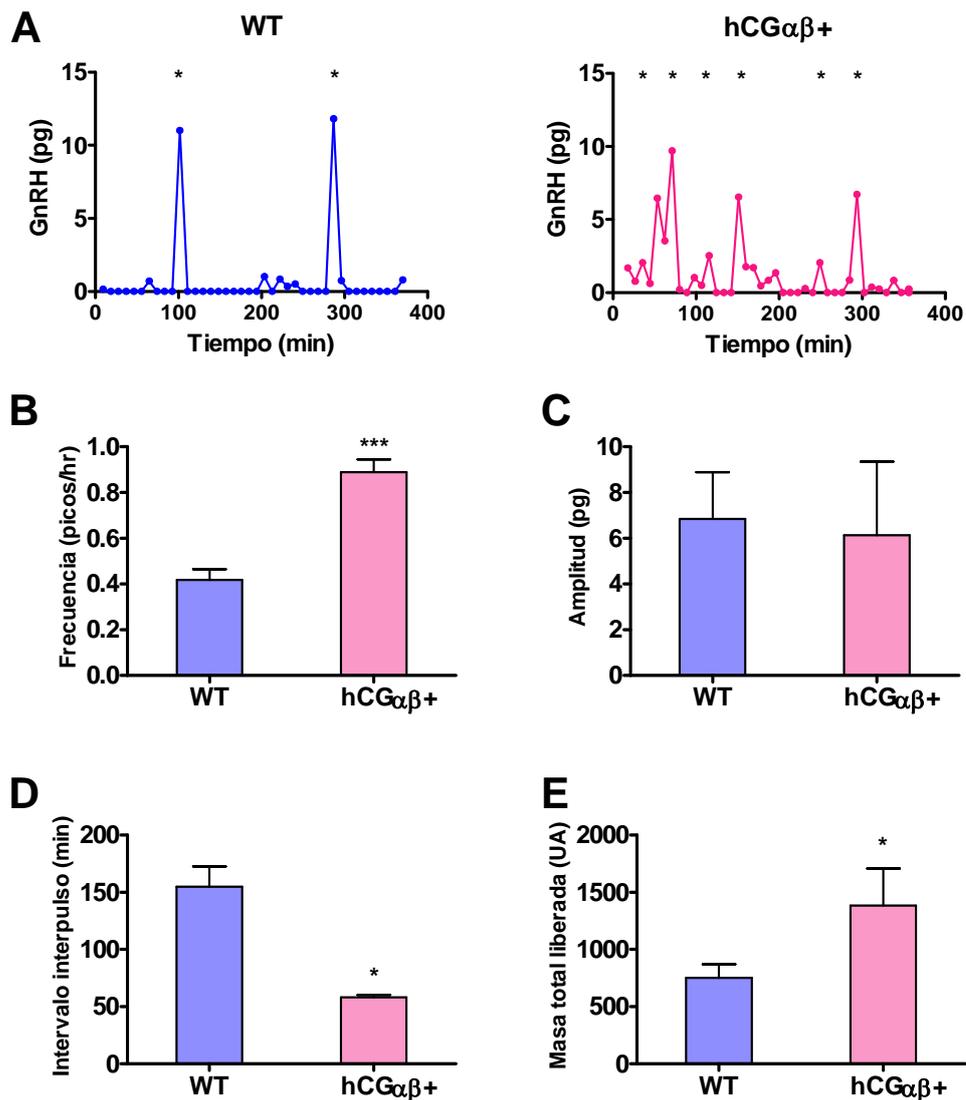


Figura 34. **A)** estudios *ex vivo* de la pulsatilidad de GnRH en explantos hipotalámicos. Hipotálamos individuales se incubaron en 250 μ l de buffer durante 6 hr, cambiando el medio en intervalos de 8 min. El GnRH liberado al medio de incubación se midió por RIA. Los resultados se expresaron como pg de GnRH por incubado. La figura muestra patrones de pulsatilidad representativos de machos WT y hCG $\alpha\beta$ + de 28 días de edad. Los asteriscos indican los pulsos de GnRH detectados por el algoritmo Cluster8. **B)** Frecuencia de pulsos de GnRH, **C)** amplitud del pulso, **D)** intervalo interpulso y **E)** masa total liberada durante el experimento, en unidades arbitrarias (UA). Prueba t de Student, N=3, *: $p<0,05$, ***: $p<0,001$.

CAPITULO 2

TRATAMIENTOS *IN VIVO* EN MACHOS hCG $\alpha\beta$ +

La caracterización del fenotipo de los ratones macho hCG $\alpha\beta$ +, descrita en el capítulo 1, demostró que la hipersecreción de hCG indujo un aumento significativo en la esteroidogénesis gonadal y alteraciones en la regulación de las gonadotropinas a nivel de la unidad hipotálamo-hipofisaria, que fueron detectadas desde edades tempranas del desarrollo postnatal.

Con el fin de estudiar la influencia del bloqueo de los andrógenos sobre el fenotipo de los machos hCG $\alpha\beta$ +, se realizaron tratamientos *in vivo*, basados en la administración del antiandrógeno flutamida desde los estadios perinatal e infantil/prepuberal, analizando sus efectos en la prepubertad y la adultez. Se compararon dichos tratamientos con el efecto de la castración.

A lo largo de este capítulo se describirán los resultados obtenidos a partir de dichos tratamientos, reevaluando el fenotipo a través de parámetros morfológicos, bioquímicos y moleculares.

2.1. Tratamiento antiandrogénico desde la edad infantil: peso de los órganos sexuales y fertilidad

Se estudiaron los pesos relativos al peso corporal del testículo, epidídimo y vesícula seminal de machos WT y hCG $\alpha\beta$ + tratados con flutamida desde los 14 días de edad y sacrificados a los 28 ó 90 días de edad. En los machos adultos se evaluó además la fertilidad.

2.1.1. Peso del testículo, epidídimo y vesícula seminal

El tratamiento con flutamida no tuvo efecto sobre el peso corporal ni sobre el peso testicular relativo en ninguna de las edades estudiadas, observándose siempre un menor peso testicular en los machos hCG $\alpha\beta$ + comparados con los WT. Sobre el peso relativo del epidídimo, el tratamiento

indujo una reducción significativa tanto en los machos WT como en los $hCG\alpha\beta+$ únicamente a los 28 días de edad ($p<0,05$), sin detectarse cambios significativos a los 90 días de edad. Sobre la vesícula seminal, el tratamiento con flutamida causó una disminución significativa en el peso relativo a los 28 días de edad en ambos genotipos, mientras que a los 90 días sólo se redujo significativamente en el grupo $hCG\alpha\beta+$ ($p<0,05$). Tanto a los 28 como a los 90 días de edad, el tratamiento logró normalizar el tamaño de la vesícula seminal de los animales $hCG\alpha\beta+$ a valores comparables con el WT (Fig. 35).

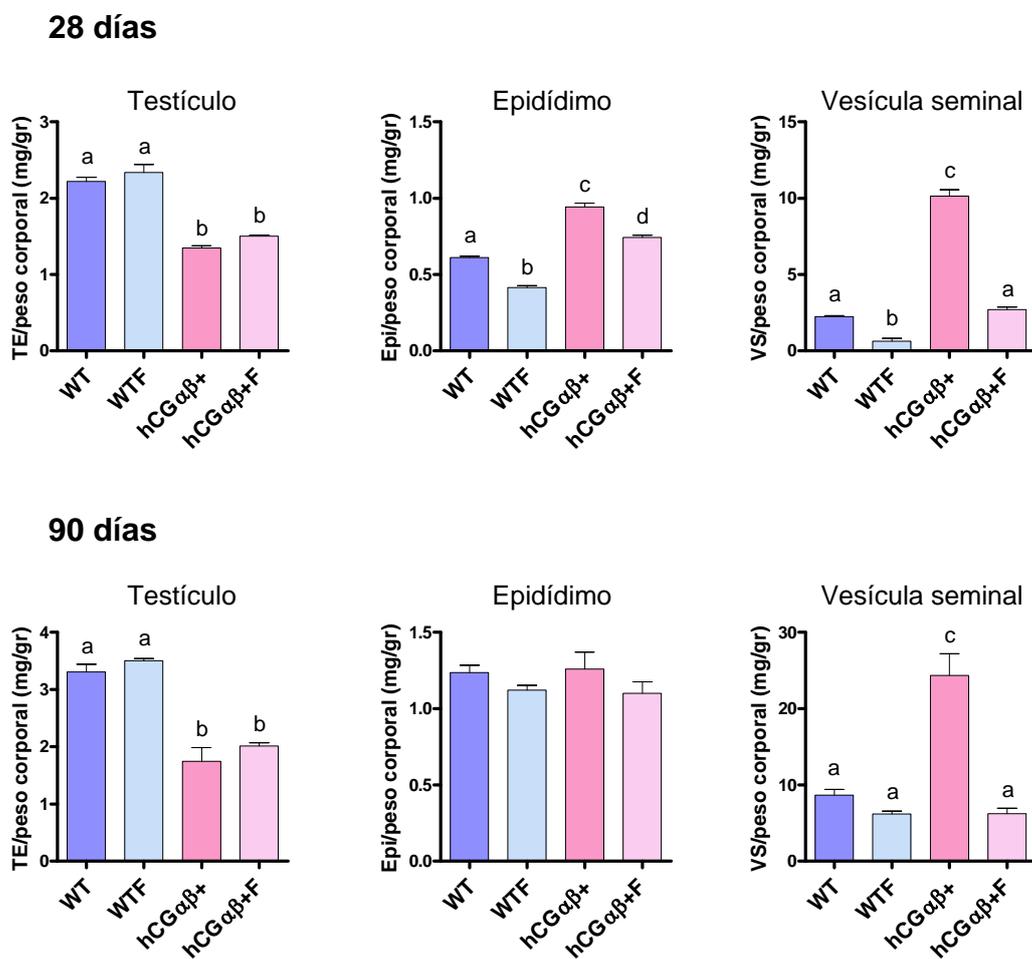


Figura 35. Peso relativo del testículo (TE), epidídimo (Epi) y vesícula seminal (VS) de ratones WT y $hCG\alpha\beta+$ controles y tratados con flutamida (WTF y $hCG\alpha\beta+F$) desde los 14 días hasta los 28 ó 90 días de edad. ANOVA de 2 factores – Bonferroni. N=4-5, letras distintas: $p<0,05$. A los 28 días se encontraron efectos significativos del genotipo y tratamiento para TE, Epi y VS ($p<0,001$), y de la interacción para VS ($p<0,001$). A los 90 días se encontró efecto significativo del genotipo para TE y VS ($p<0,001$), y del tratamiento y la interacción para VS ($p<0,001$).

2.1.2. Efecto del tratamiento antiandrogénico sobre la fertilidad

Se estudió el efecto del tratamiento con flutamida desde los 14 días de edad sobre la fertilidad de los machos adultos WT y hCG $\alpha\beta$ + de 90 días, evaluando el índice de apareo y la fecundidad. La Tabla 2 muestra que la fertilidad de los adultos WT resultó afectada, mientras que en los adultos hCG $\alpha\beta$ + la misma no se logró restablecer luego del tratamiento prolongado con flutamida, indicando que, al menos durante el tiempo de tratamiento aplicado, los altos niveles de andrógenos circulantes no serían la causa primaria de la infertilidad en este modelo.

Tabla 2. Fertilidad de machos adultos WT y hCG $\alpha\beta$ + controles y tratados con flutamida (F) desde la etapa prepuberal hasta los 90 días.

	Índice de apareo (%) ^a	Fecundidad (%) ^b
WT	3/3 (100)	3/3 (100)
WTF	1/3 (33)	0/3 (0)
hCG $\alpha\beta$ +	0/4 (0)	0/4 (0)
hCG $\alpha\beta$ +F	0/4 (0)	0/4 (0)

^a Porcentaje de machos con capacidad de apareo. Los machos fueron apareados con hembras adultas WT superovuladas por inducción hormonal con eCG-hCG. A la mañana siguiente se monitoreó la presencia de tapón vaginal.

^b Porcentaje de machos capaces de fecundar a hembras adultas WT, obteniendo crías vivas.

2.2. Tratamiento antiandrogénico desde la edad infantil y castración: niveles séricos de FSH

Con el fin de evaluar el efecto de los andrógenos sobre la regulación de la secreción de FSH, se utilizaron machos WT y hCG $\alpha\beta$ + tratados con flutamida desde los 14 días de edad y sacrificados a los 28 ó 90 días de edad. De manera comparativa se realizaron castraciones en machos WT y hCG $\alpha\beta$ + (14 días previos al sacrificio) y se los sacrificó a la edad de 28 ó 90 días. En el grupo WT, los niveles séricos de FSH aumentaron significativamente en respuesta al tratamiento con flutamida y a la castración a los 28 días de edad ($p < 0,05$) (Fig. 36); lo mismo ocurrió en el grupo WT castrado de 90 días de edad. Por el contrario, en los machos hCG $\alpha\beta$ + castrados o tratados con

flutamida, los niveles séricos de FSH permanecieron significativamente menores a los WT para ambas edades ($p < 0,001$). La castración indujo sólo un leve aumento en los niveles de FSH sérica a las edades estudiadas ($p < 0,05$). Estos resultados indican que ni la castración ni el tratamiento antiandrogénico desde la edad infantil lograron restaurar los niveles séricos de FSH en los machos $hCG\alpha\beta+$ al alcanzar la edad prepuberal o adulta. En base a estos resultados, los estudios sobre la función hipotálamo-hipofisaria se continuaron sólo en el modelo experimental castrado.

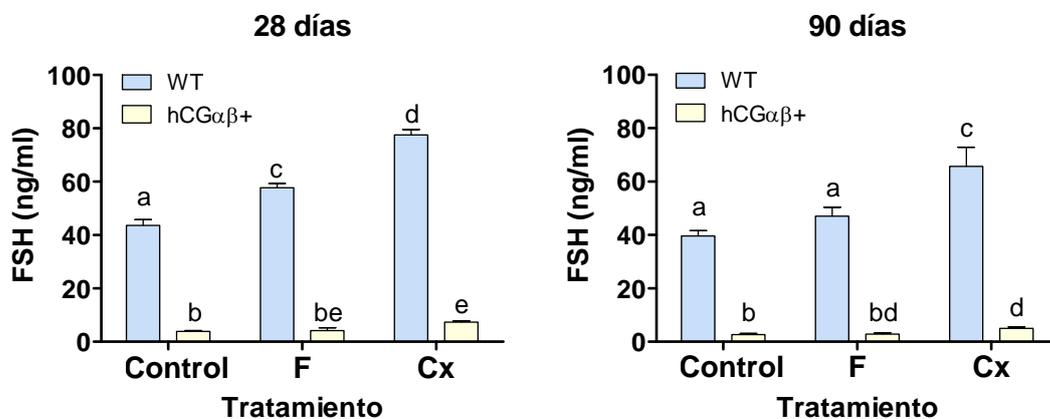


Figura 36. Niveles séricos de FSH en machos WT y $hCG\alpha\beta+$ controles, tratados con flutamida (F) desde los 14 días de edad o castrados 14 días antes del sacrificio (Cx), de 28 y 90 días de edad. ANOVA de 2 factores – Bonferroni, $N=5-7$, letras distintas: $p < 0,05$. A los 28 días se detectaron efectos significativos del tratamiento, el genotipo y la interacción ($p < 0,001$), mientras que a los 90 días se detectaron efectos del genotipo y el tratamiento ($p < 0,001$).

2.3. Efecto de la castración en machos $hCG\alpha\beta+$ prepúberes: parámetros de la función hipotálamo-hipofisaria

Con el objetivo de evaluar en mayor detalle el efecto de 14 días de castración en ratones macho $hCG\alpha\beta+$ prepúberes, se analizó la expresión de genes claves en la función de la unidad hipotálamo-hipofisaria, la concentración intrahipotalámica de GnRH y la pulsatilidad de GnRH *ex vivo*.

2.3.1. Perfil de expresión génica en hipófisis e hipotálamo

La expresión de ARNm de los marcadores hipofisarios *Fshb*, *Lhb*, *Esr1*, *Gnrhr* y *Fst*, como la de los marcadores hipotalámicos *Kiss1* y *Gnrh*, se mantuvieron sin cambios en los machos hCG $\alpha\beta$ + luego de 14 días de castración (Tabla 3). Por el contrario, se observó un aumento significativo en la expresión de *Cga* ($p < 0,001$).

Tabla 3. Perfil de expresión génica en hipófisis e hipotálamo de machos hCG $\alpha\beta$ + controles y castrados (hCG $\alpha\beta$ +Cx) de 28 días de edad.

	hCG $\alpha\beta$ +	hCG $\alpha\beta$ +Cx
Hipófisis		
<i>Fshb</i>	0.031 \pm 0.012	0.024 \pm 0.003
<i>Lhb</i>	0.016 \pm 0.005	0.012 \pm 0.002
<i>Cga</i>	0.027 \pm 0.006	0.070 \pm 0.004 ***
<i>Gnrhr</i>	0.362 \pm 0.062	0.313 \pm 0.021
<i>Esr1</i>	0.462 \pm 0.067	0.446 \pm 0.087
<i>Fst</i>	2.057 \pm 0.249	2.340 \pm 0.138
Hipotálamo		
<i>Kiss1</i>	0.29 \pm 0.02	0.23 \pm 0.02
<i>Gnrh</i>	1.33 \pm 0.21	0.75 \pm 0.32

Los resultados están presentados como media \pm ESM. La expresión de ARNm en la hipófisis e hipotálamo se evaluó por PCR en Tiempo Real. Los datos se expresan como nivel de expresión relativo a machos WT controles. Prueba t de Student, N=3-4, ***: $p < 0,001$.

2.3.2. Concentración intrahipotalámica de GnRH

Se estudió la concentración intrahipotalámica de GnRH en machos WT y hCG $\alpha\beta$ + controles y castrados de 28 días de edad, observándose que los niveles elevados de GnRH en los machos transgénicos no fueron modificados por el efecto de la castración (Fig. 37).

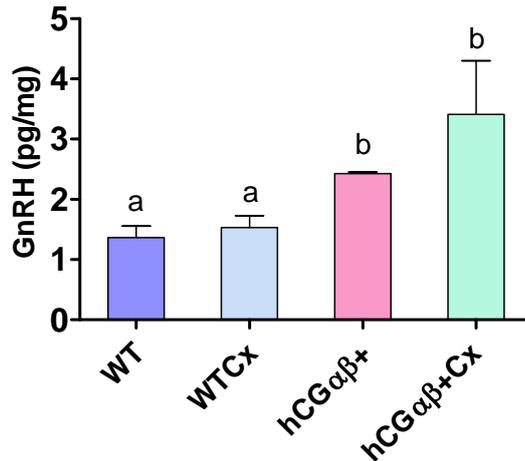


Figura 37. Concentración intrahipotalámica de GnRH, expresada como pg/mg de proteína, de machos WT y hCG $\alpha\beta$ + controles y castrados (WTCx y hCG $\alpha\beta$ +Cx) de 28 días de edad. ANOVA de 2 factores – Bonferroni. Letras distintas: $p < 0,05$. Se detectó efecto significativo del genotipo ($p < 0,001$).

2.3.3. Pulsatilidad de GnRH *ex vivo*

Se estudió la pulsatilidad de GnRH *ex vivo* en machos WT y hCG $\alpha\beta$ + controles y castrados de 28 días de edad. La Figura 38 muestra patrones de pulsatilidad representativos de machos WT y hCG $\alpha\beta$ + controles y castrados (Cx), observándose una mayor ocurrencia de picos de liberación de GnRH en los machos WTCx y hCG $\alpha\beta$ + comparados con los WT y hCG $\alpha\beta$ +Cx. El patrón de pulsatilidad se expresó en términos de frecuencia de pulsos (Fig. 39A), amplitud del pulso (Fig. 39B), intervalo interpulso (Fig. 39C) y masa total liberada durante el experimento (Fig. 39D). En los machos WT, la castración provocó un aumento en la frecuencia de pulsos y una disminución concomitante en el intervalo interpulso, sin detectarse cambios en la masa total liberada ni en la amplitud. En los machos hCG $\alpha\beta$ +, la castración indujo una disminución en la frecuencia de pulsos, alcanzando un valor comparable con el WT y WTCx, mientras que el intervalo interpulso mostró una tendencia a aumentar que no fue estadísticamente significativa. La castración indujo además una disminución en la masa total liberada, sin detectarse cambios en la amplitud de los pulsos.

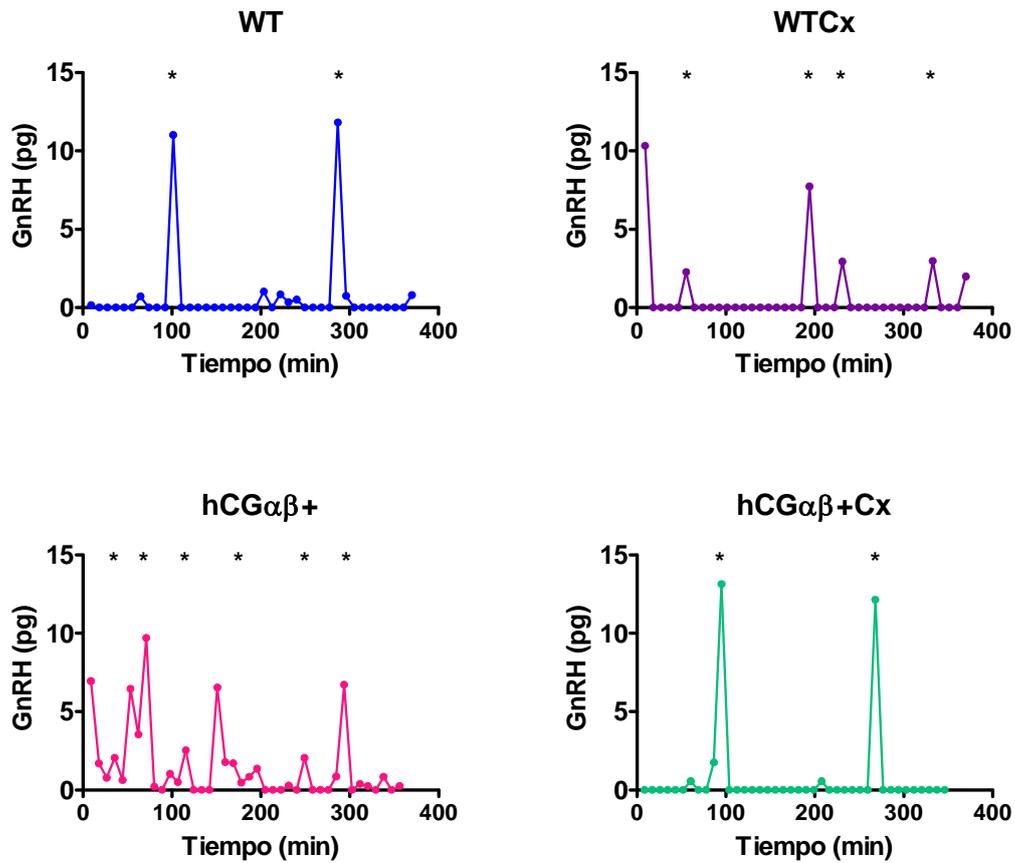


Figura 38. Estudios de la pulsatilidad de GnRH con explantos hipotalámicos *ex vivo*. Hipotálamos individuales se incubaron en 250 μ l de buffer durante 6 hr, cambiando el medio en intervalos de 8 min. El GnRH liberado al medio de incubación se midió por RIA. Los resultados se expresan como pg de GnRH por incubado. La figura muestra patrones de pulsatilidad representativos de machos WT y hCG $\alpha\beta$ + controles y castrados (WTCx y hCG $\alpha\beta$ +Cx) de 28 días de edad. Los asteriscos indican los pulsos de GnRH detectados por el algoritmo Cluster8.

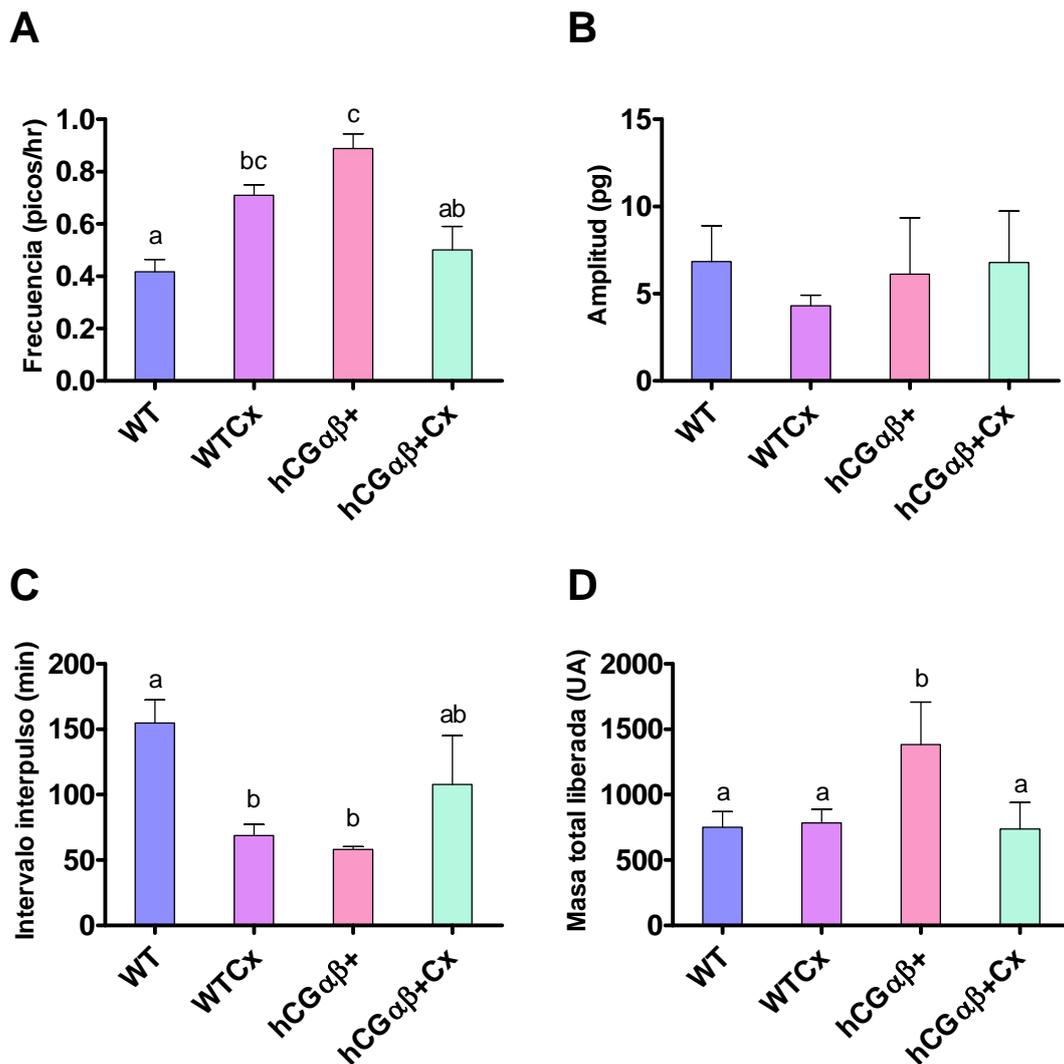


Figura 39. Parámetros de pulsatilidad de GnRH de explantos hipotalámicos en machos WT y hCGαβ+ controles y castrados (WTCx y hCGαβ+Cx) de 28 días de edad, determinados por el algoritmo Cluster8. **A)** Frecuencia de pulsos de GnRH, **B)** amplitud del pulso, **C)** intervalo interpulso y **D)** masa total liberada durante el experimento, en unidades arbitrarias (UA). ANOVA de 2 factores – Bonferroni. N=3-4. Letras distintas: p<0,05. Se detectaron efectos significativos de la interacción para la frecuencia y el intervalo interpulso (p<0,001), y del genotipo, el tratamiento y la interacción para la masa total liberada (p<0,05).

2.4. Tratamiento antiandrogénico perinatal

Con el fin de estudiar el efecto del bloqueo de los andrógenos desde la etapa perinatal, se administró flutamida a machos WT y hCGαβ+ desde el DG18 hasta a los 28 días de edad. Se analizó el peso de los órganos sexuales, los niveles séricos de FSH y la expresión génica en hipotálamo e hipófisis.

2.4.1. Peso de los órganos sexuales

En los machos WT, el tratamiento antiandrogénico desde la etapa perinatal indujo una disminución significativa en el peso relativo del testículo y el epidídimo, y una caída muy drástica en el peso relativo de la vesícula seminal. En los machos hCG $\alpha\beta$ +, el tratamiento indujo una disminución significativa en el peso relativo de la vesícula seminal en comparación tanto con el grupo hCG $\alpha\beta$ + como con el WT, mientras que el peso relativo del epidídimo alcanzó valores comparables con el WT, y el peso testicular valores comparables con el WT tratado. El tratamiento no indujo cambios significativos en el peso corporal en ningún genotipo.

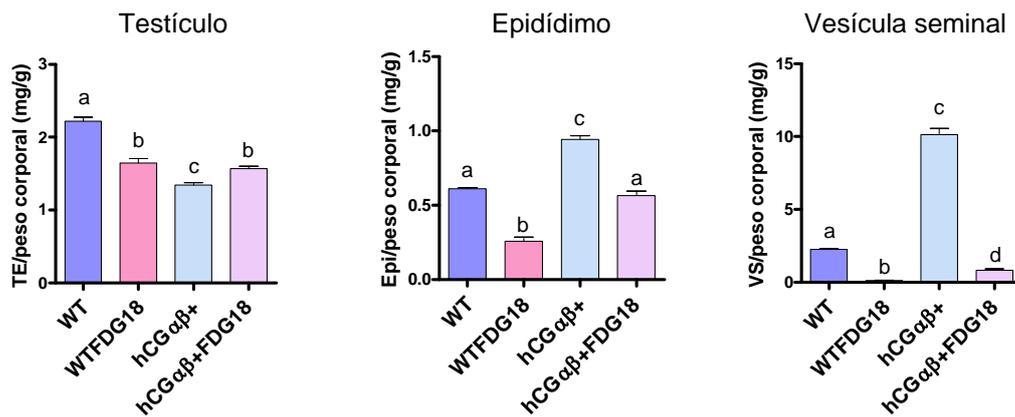


Figura 40. Peso relativo al peso corporal del testículo (TE), epidídimo (Epi) y vesícula seminal (VS) de machos WT y hCG $\alpha\beta$ + controles y tratados con flutamida desde el DG18 (WTFDG18 y hCG $\alpha\beta$ +FDG18) hasta los 28 días de edad. ANOVA de 2 factores – Bonferroni, N=4, letras distintas: p<0,05. Se observaron efectos significativos del genotipo y la interacción para TE (p<0,001), y del genotipo y el tratamiento para Epi y VS.

2.4.2. Niveles séricos de FSH y expresión génica en hipotálamo e hipófisis

Se estudió el efecto del tratamiento antiandrogénico perinatal sobre los niveles séricos de FSH en machos hCG $\alpha\beta$ + de 28 días de edad. El tratamiento perinatal con flutamida fue capaz de elevar significativamente los niveles séricos de FSH en los machos hCG $\alpha\beta$ + (p<0,05) (Fig. 41A). Coincidiendo con el perfil obtenido para la FSH sérica, la expresión génica de *Fshb* hipofisaria aumentó en el grupo hCG $\alpha\beta$ + tratado con flutamida comparado con el

hCG $\alpha\beta$ +, siendo acompañado por un aumento concomitante en la expresión génica de *Gnrhr* (Fig. 41B). En el hipotálamo, el tratamiento perinatal con flutamida normalizó la expresión génica de *Cyp19a1* y *Kiss1* ($p < 0,05$), sin observarse cambios en la expresión de *Gad67* (Fig. 42).

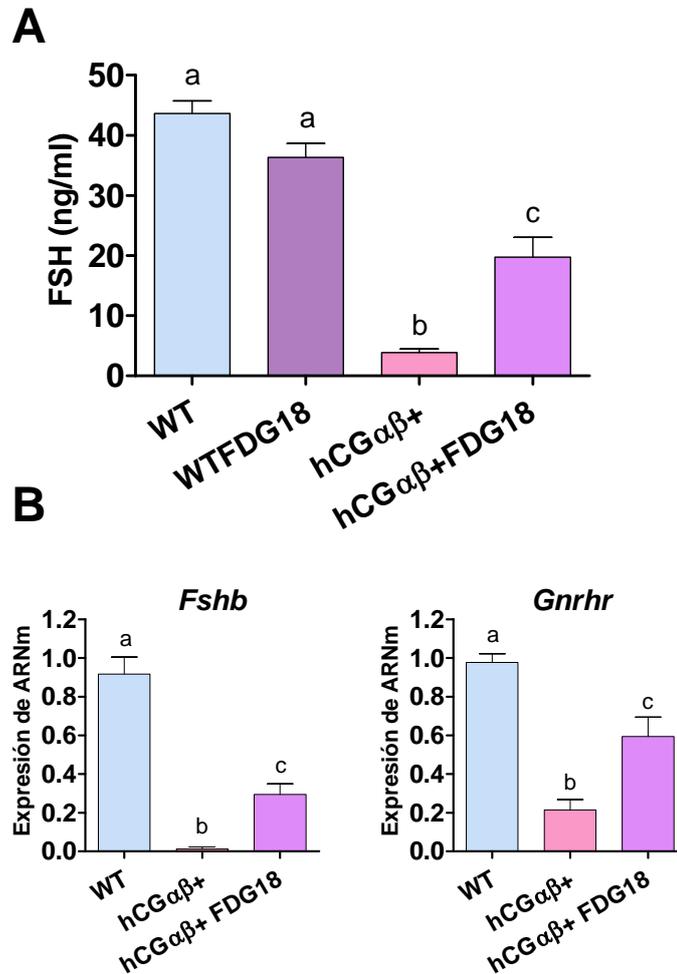


Figura 41. Efecto del tratamiento perinatal con flutamida sobre los niveles de FSH sérica y expresión génica de *Fshb* y *Gnrhr* en hipófisis de machos WT, hCG $\alpha\beta$ + y hCG $\alpha\beta$ + tratados con flutamida desde el DG18 hasta los 28 días de edad (hCG $\alpha\beta$ +FDG18). **A)** efecto del tratamiento perinatal con flutamida sobre los niveles séricos de FSH; ANOVA de 2 factores – Bonferroni, N=4, letras distintas: $p < 0,05$. Se observaron efectos significativos del genotipo, el tratamiento y la interacción ($p < 0,001$). **B)** Expresión génica de *Fshb* y *Gnrhr* en hipófisis, por PCR en Tiempo Real. ANOVA de 1 factor – Bonferroni, N=4, letras distintas: $p < 0,05$.

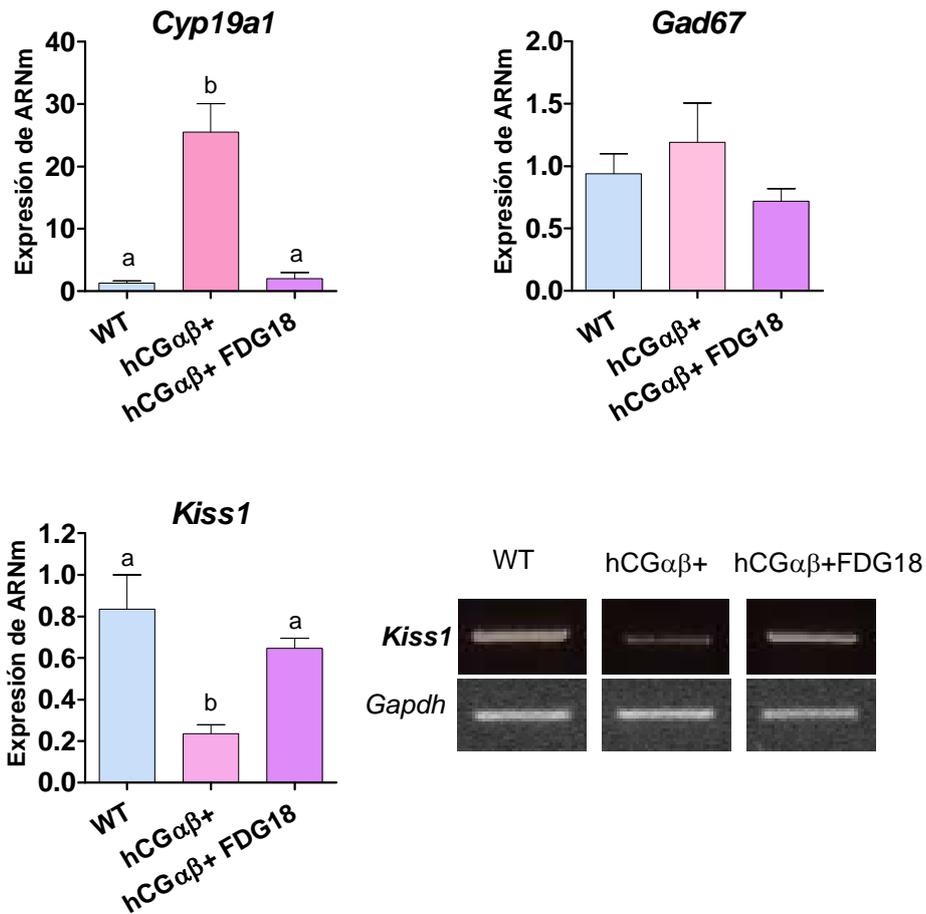


Figura 42. Efecto del tratamiento perinatal con flutamida sobre la expresión génica de *Cyp19a1*, *Gad67* y *Kiss1* en hipotálamos de machos WT, hCG $\alpha\beta$ + y hCG $\alpha\beta$ + tratados con flutamida desde el DG18 hasta los 28 días de edad (hCG $\alpha\beta$ +FDG18). La expresión génica de *Cyp19a1* y *Gad67* se evaluó por PCR en Tiempo Real. Debido a que *Kiss1* presentó valores de Ct cercanos al límite de detección del ensayo, la expresión de este gen se evaluó por RT-PCR semicuantitativa. A la derecha del gráfico se muestran bandas representativas de *Kiss1* y *Gapdh* para cada grupo. ANOVA de 1 factor – Bonferroni, N=4, letras distintas: $p < 0,05$.

CAPITULO 3

FENOTIPO DE LAS HEMBRAS $hCG_{\alpha\beta+}$

A lo largo de este capítulo se describirá el fenotipo de las hembras transgénicas desde la etapa prepuberal a la adulta. Se estudiaron parámetros morfológicos, bioquímicos y moleculares claves en la caracterización del eje reproductivo de las hembras $hCG_{\alpha\beta+}$, poniendo especial énfasis en la función gonadal.

3.1. Peso corporal, del ovario, útero e hipófisis de las hembras $hCG_{\alpha\beta+}$

3.1.1. Peso corporal

Se realizó un seguimiento del peso corporal de las hembras WT y $hCG_{\alpha\beta+}$ desde las 3 a las 12 semanas de edad, observándose que el peso de las hembras transgénicas aumentó significativamente con respecto a las WT a partir de las 8 semanas de edad ($p < 0,001$) (Fig. 43A).

3.1.2. Peso del ovario

Se estudió el peso del ovario de las hembras WT y $hCG_{\alpha\beta+}$ desde las 3 a las 12 semanas de edad. El peso ovárico de las hembras transgénicas resultó significativamente incrementado con respecto al grupo WT en todas las edades estudiadas ($p < 0,001$) (Fig. 43B), observándose un aumento muy notorio, de más de 100 veces, a partir de las 8 semanas. Se estudió además el peso del ovario relativo al peso corporal, obteniéndose la misma tendencia y significancia observada en el peso absoluto.

3.1.3. Peso del útero

Se evaluó el peso del útero de las hembras WT y hCG $\alpha\beta$ + desde las 3 a las 12 semanas de edad, observándose que en las hembras hCG $\alpha\beta$ + el peso uterino resultó significativamente mayor a las 3, 4 y 12 semanas ($p < 0,001$), sin mostrar cambios en las edades intermedias (Fig. 43C). Se estudió además el peso del útero relativo al peso corporal, obteniéndose la misma tendencia y significancia observada en el peso absoluto.

3.1.4. Peso de la hipófisis

Se evaluó el peso de la hipófisis de las hembras WT y hCG $\alpha\beta$ + desde las 3 a las 12 semanas de edad, observándose que en las hembras hCG $\alpha\beta$ + el peso hipofisario resultó significativamente mayor a partir de las 8 semanas ($p < 0,001$), sin mostrar cambios en las edades previas (Fig. 43D). Se estudió además el peso de la hipófisis relativo al peso corporal, obteniéndose la misma tendencia y significancia observada en el peso absoluto.

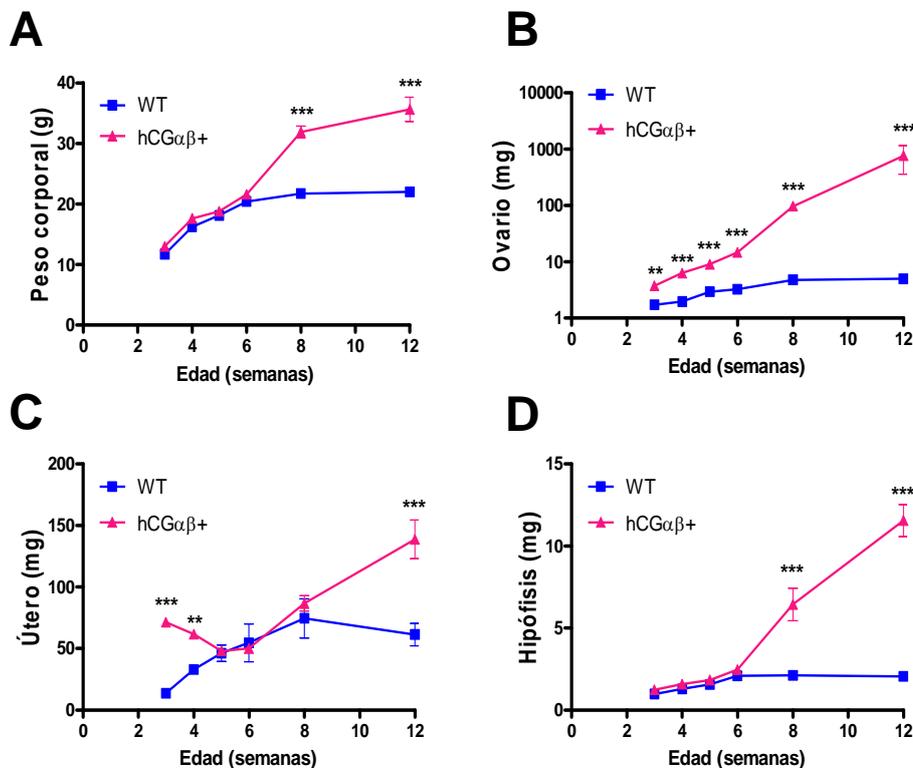


Figura 43. A) Peso corporal, B) peso del ovario, C) peso del útero, y D) peso de la hipófisis de hembras WT y hCG $\alpha\beta$ + de 3 a 12 semanas de edad. ANOVA de 2 factores – Bonferroni. Los asteriscos muestran diferencias significativas para WT vs hCG $\alpha\beta$ + dentro de cada edad. N=4-6. *: $p < 0,05$, **: $p < 0,01$, ***: $p < 0,001$.

3.1.5. Apertura vaginal

Se observó la ocurrencia de pubertad precoz en las hembras hCG $\alpha\beta$ +, evidenciada por la apertura vaginal 5-6 días antes que en las hembras WT (hCG $\alpha\beta$ +: 20 \pm 1 vs WT: 25 \pm 1 días de edad).

3.2. Perfil hormonal de las hembras hCG $\alpha\beta$ +

Se analizaron los niveles séricos de las hormonas hipofisarias FSH y prolactina y de las hormonas gonadales testosterona, progesterona y estradiol, en hembras WT y hCG $\alpha\beta$ + a distintas edades.

3.2.1. Niveles séricos de testosterona

Se analizaron los niveles séricos de testosterona en hembras transgénicas y controles desde las 3 a las 12 semanas de edad, encontrándose significativamente elevados en las hembras hCG $\alpha\beta$ + comparadas con las WT en todas las edades estudiadas ($p < 0,001$) (Fig. 44A).

3.2.2. Niveles séricos de progesterona

Se determinaron los niveles séricos de progesterona en hembras transgénicas y controles desde las 3 a las 12 semanas de edad, encontrándose significativamente elevados en las hembras hCG $\alpha\beta$ + comparadas con las WT en todas las edades estudiadas ($p < 0,001$) (Fig. 44B).

3.2.3. Niveles séricos de estradiol

Se determinaron los niveles séricos de estradiol en hembras transgénicas y controles desde las 2 a las 12 semanas de edad, encontrándose significativamente elevados en las hembras hCG $\alpha\beta$ + comparadas con las WT únicamente a las 3 semanas de edad ($p < 0,001$) (Fig. 44C).

3.2.4. Niveles séricos de FSH

Se analizaron los niveles séricos de FSH en hembras transgénicas y controles desde las 2 a las 12 semanas de edad, encontrándose significativamente disminuidos en las hembras hCG $\alpha\beta$ + comparadas con las WT a las 2 y 3 semanas de edad ($p < 0,001$), sin detectarse cambios en las edades subsiguientes (Fig. 44D).

3.2.5. Niveles séricos de prolactina

Se estudiaron los niveles séricos de prolactina en hembras transgénicas y controles desde las 3 a las 12 semanas de edad, encontrándose significativamente elevados en las hembras hCG $\alpha\beta$ + comparadas con las WT a las 3 semanas de edad, y posteriormente a las 8 y 12 semanas de edad ($p < 0,001$) (Fig. 44E).

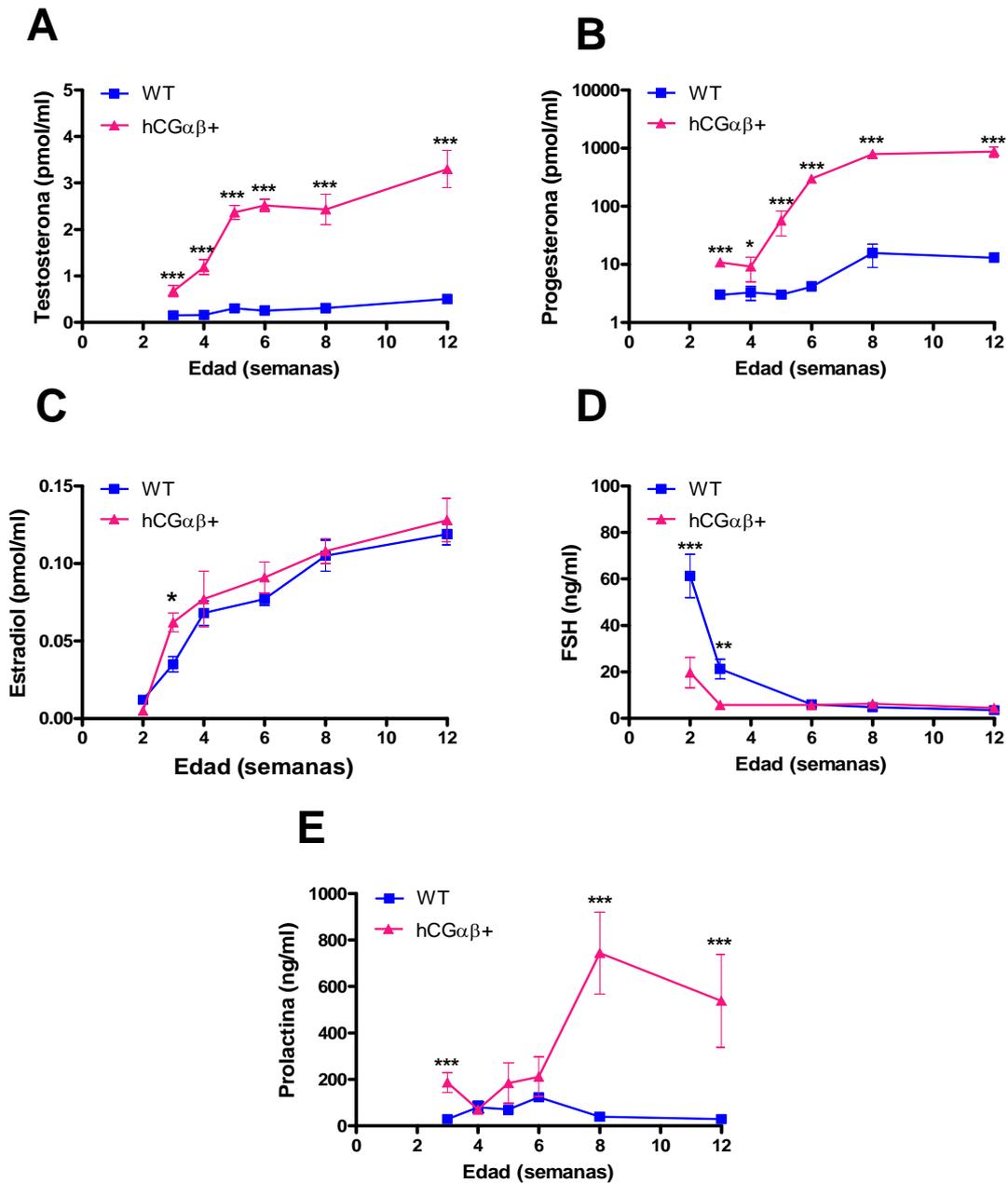


Figura 44. Niveles séricos de **A)** testosterona, **B)** progesterona, **C)** estradiol, **D)** FSH, y **E)** prolactina, en hembras WT y hCG $\alpha\beta$ + a distintas edades. ANOVA de 2 factores – Bonferroni. Los asteriscos muestran diferencias significativas para WT vs hCG $\alpha\beta$ + dentro de cada edad. N=4-6. *: p<0,05, **: p<0,01, ***: p<0,001.

3.3. Análisis de la función hipotálamo-hipofisaria de las hembras $hCG\alpha\beta+$

Se analizó la funcionalidad de la unidad hipotálamo-hipofisaria, a través del estudio de los niveles intrahipofisarios de FSH y la expresión de genes marcadores claves en hipófisis e hipotálamo.

3.3.1. Niveles hipofisarios de FSH a distintas edades

El contenido hipofisario de FSH resultó significativamente reducido a las 3 semanas de edad ($p < 0,001$), sin detectarse cambios en las demás edades estudiadas (Fig. 45). A esta edad, la concentración hipofisaria de FSH fue de $119,91 \pm 15,88$ ng FSH/mg de tejido para WT y $4,44 \pm 0,56$ ng FSH/mg de tejido para $hCG\alpha\beta+$ ($p < 0,001$).

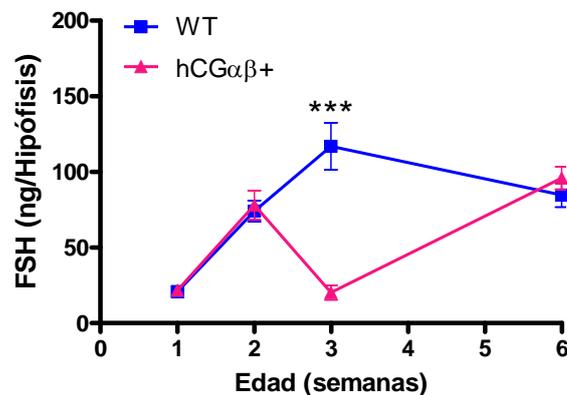


Figura 45. Contenido de FSH en hipófisis de hembras WT y $hCG\alpha\beta+$ de 1, 2, 3 y 6 semanas de edad. ANOVA de 2 factores – Bonferroni. Los asteriscos muestran diferencias significativas para WT vs $hCG\alpha\beta+$ dentro de cada edad. N=3-4. ***: $p < 0,001$.

3.3.2. Perfil de expresión génica en hipófisis a las 3 semanas de edad

Se analizó la expresión génica de *Fshb*, *Lhb* y *Cga* en hipófisis de hembras WT y $hCG\alpha\beta+$ de 3 semanas de edad (Fig. 46). En coincidencia con los niveles séricos e intrahipofisarios de FSH, los niveles de expresión de *Fshb* y *Cga* resultaron significativamente disminuidos, al igual que de *Lhb* en hipófisis de las hembras $hCG\alpha\beta+$ comparados con las WT ($p < 0,001$). Se analizó también la expresión de genes claves en la regulación de gonadotropinas, tales

como *Gnrhr* y *Fst* (Fig. 46). *Gnrhr* mostró niveles de expresión significativamente disminuidos en hCG $\alpha\beta$ + ($p < 0,001$), mientras que *Fst* no mostró cambios entre genotipos a esta edad.

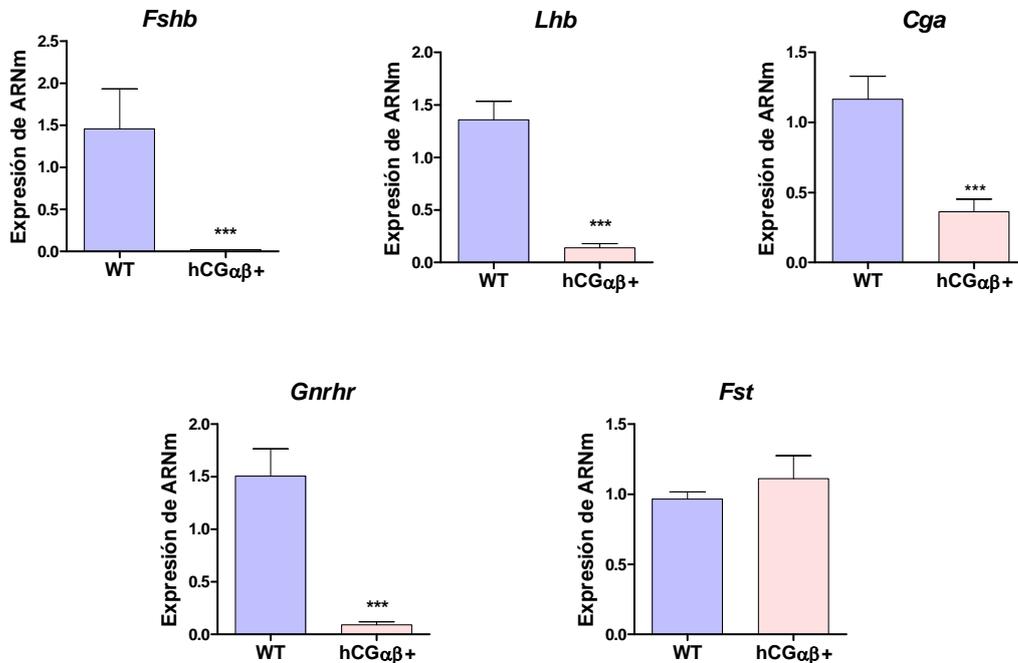


Figura 46. Análisis de la expresión génica en hipófisis de hembras WT y hCG $\alpha\beta$ + de 3 semanas de edad. La expresión de *Fshb*, *Lhb*, *Cga* y *Gnrhr* se evaluó por PCR en Tiempo Real. Debido a que *Fst* presentó valores de Ct cercanos al límite de detección del ensayo, la expresión de este gen se evaluó por RT-PCR semicuantitativa. Prueba t de Student, N=4. ***: $p < 0,001$.

3.3.3. Perfil de expresión génica en hipotálamo a las 3 semanas de edad

Los estudios de expresión génica en el hipotálamo de las hembras se realizaron separando las áreas anterior y medio basal-posterior, ya que las mismas están implicadas en dos procesos importantes de la fisiología femenina: el control del pulso preovulatorio de LH por retroalimentación positiva de los estrógenos, en el HA, y la retroalimentación negativa de los esteroides gonadales, en el HMB (Kauffman 2009). Se analizó la expresión génica de *Gnrh* y *Kiss1* en ambas áreas hipotalámicas de hembras WT y hCG $\alpha\beta$ + de 3 semanas de edad (Fig. 47). Se detectó un aumento en la expresión de *Gnrh* en el hipotálamo medio basal-posterior de las hembras hCG $\alpha\beta$ + comparadas con las WT ($p < 0,05$) sin detectarse cambios en el hipotálamo anterior. En el caso

de *Kiss1* se detectó un aumento en la expresión en el hipotálamo anterior de las hembras hCG $\alpha\beta$ + comparadas con las WT ($p < 0,01$), sin observarse cambios significativos en el hipotálamo medio basal-posterior.

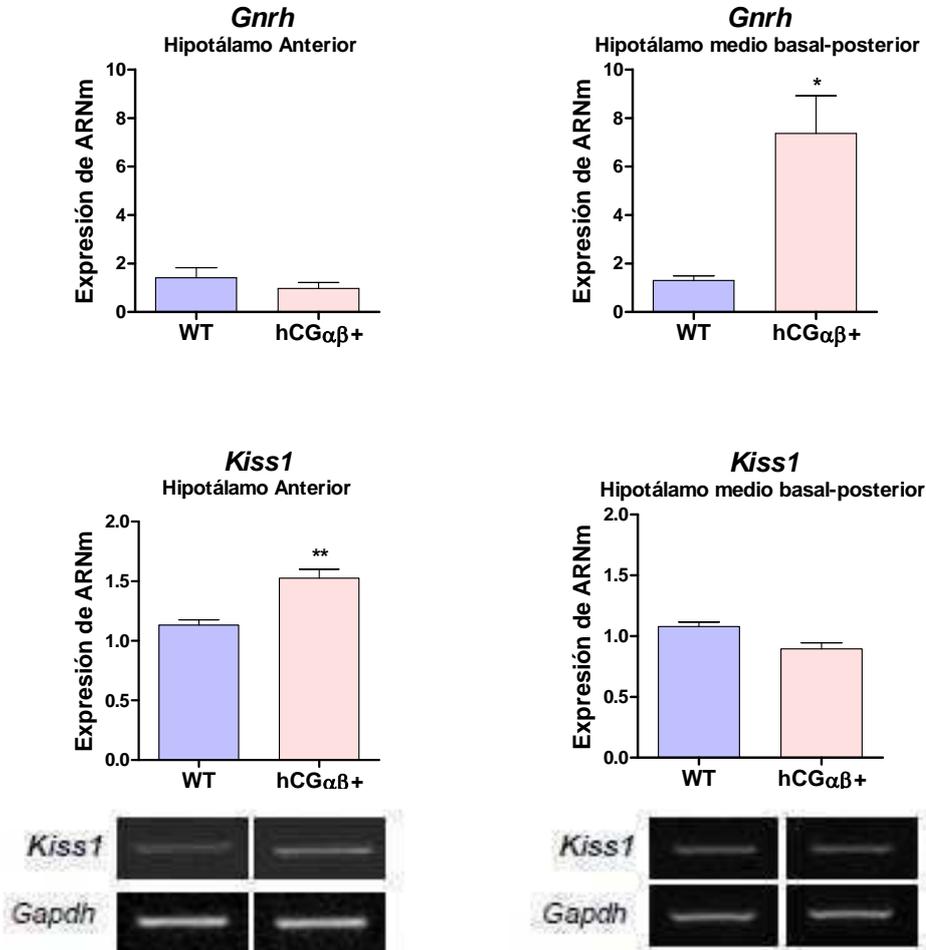


Figura 47. Análisis de la expresión génica en el hipotálamo anterior e hipotálamo medio basal-posterior de hembras WT y hCG $\alpha\beta$ + de 3 semanas de edad. La expresión de *Gnrh* se evaluó por PCR en Tiempo Real. Debido a que *Kiss1* presentó valores de Ct cercanos al límite de detección del ensayo, la expresión de este gen se evaluó por RT-PCR semicuantitativa, y debajo de cada gráfico se muestra una banda de *Kiss1* y *Gapdh* representativa de cada grupo. Prueba t de Student, N=4. **: $p < 0,01$.

3.4. Cambios morfológicos en el ovario de las hembras $hCG\alpha\beta+$

Se realizó un seguimiento de la morfología del ovario $hCG\alpha\beta+$ a las 2, 3, 6 y 8 semanas de edad, en comparación con el ovario WT, utilizando técnicas de histología clásica e inmunohistoquímica.

3.4.1. Histología ovárica a las 2 semanas de edad

A las 2 semanas de edad no se observaron cambios morfológicos evidentes en el ovario $hCG\alpha\beta+$ con respecto al WT, detectándose la presencia de folículos preantrales en ambos grupos (Fig. 48).

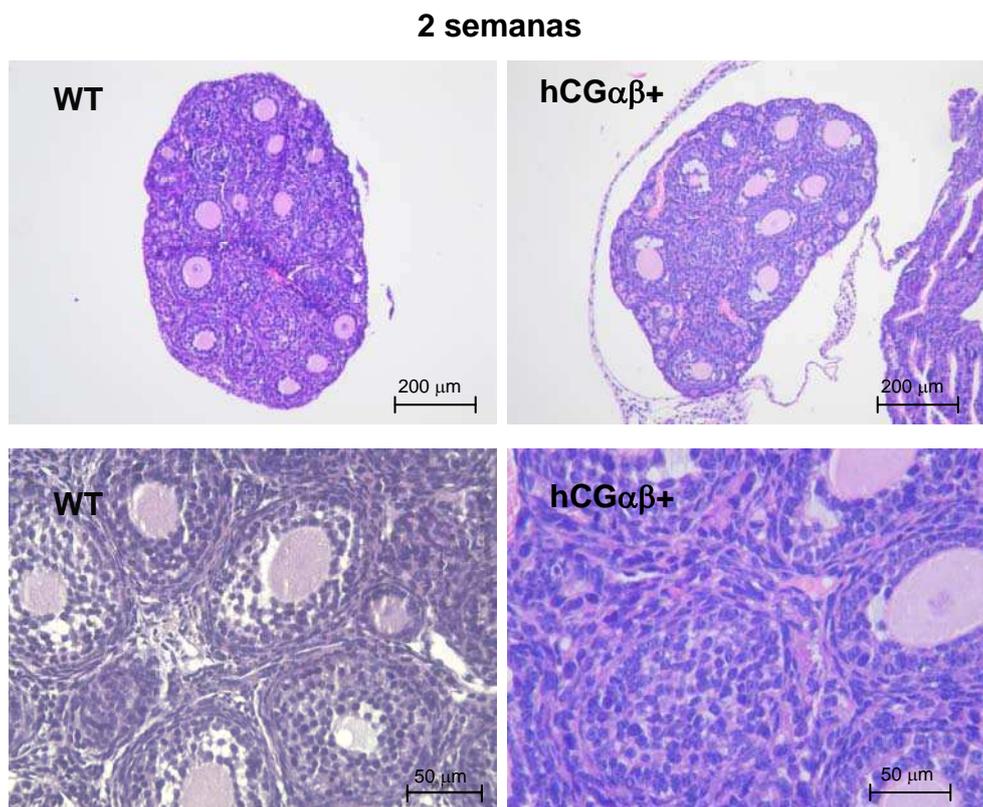


Figura 48. Histología del ovario WT y $hCG\alpha\beta+$ de 2 semanas de edad. Tinción con hematoxilina y eosina.

3.4.2. Histología ovárica a las 3 semanas de edad

A las 3 semanas de edad la morfología del ovario transgénico presentó diferencias sustanciales en comparación con el WT (Fig. 49). Mientras que el ovario WT presentó folículos preantrales y antrales tempranos, en el ovario hCG $\alpha\beta$ + se detectó una mayor proporción de folículos antrales, muchos de ellos atrésicos, evidenciados por la irregularidad de las capas de células de la granulosa y la presencia de núcleos picnóticos. Asimismo, se observó la aparición de quistes hemorrágicos y áreas de luteinización prematura.

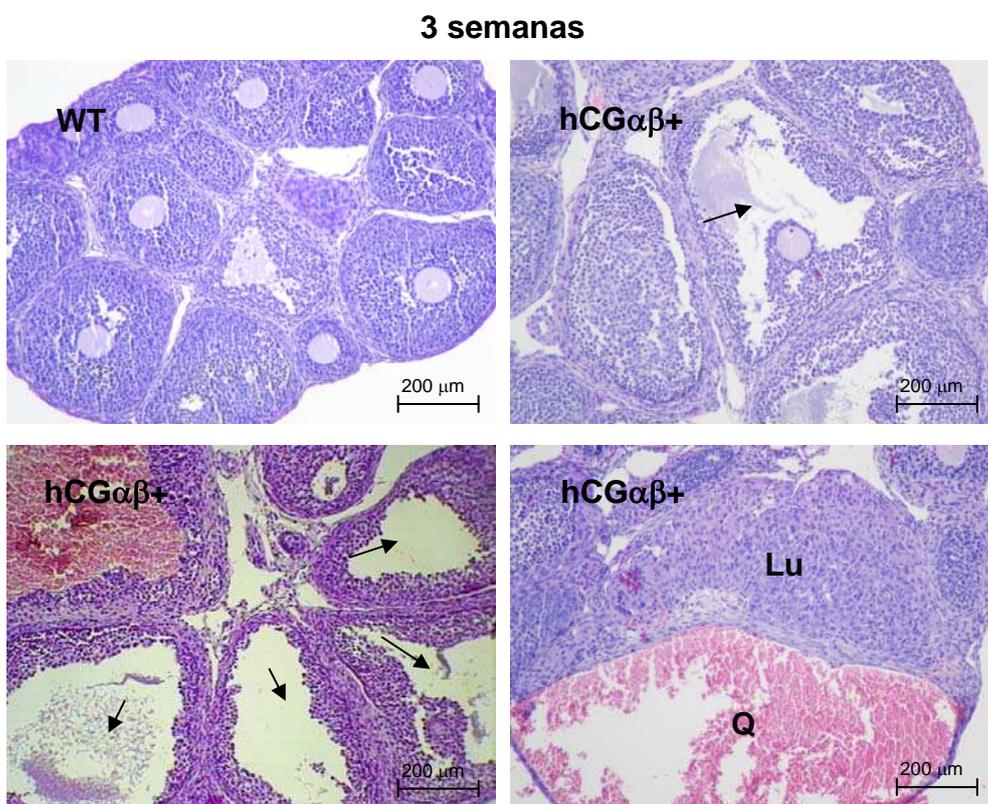


Figura 49. Histología del ovario WT y hCG $\alpha\beta$ + de 3 semanas de edad. Flechas: folículos atrésicos. Lu: área luteinizada. Q: quiste hemorrágico. Hematoxilina y eosina.

3.4.3. Histología ovárica a las 6 semanas de edad

A las 6 semanas de edad los ovarios WT se caracterizaron por la presencia de folículos en distintos estadios del desarrollo y cuerpos lúteos (Fig. 50A). En contraste, los ovarios hCG $\alpha\beta$ + presentaron una masiva luteinización y quistes hemorrágicos ocasionales (Fig. 50B). A esta edad comenzaron a evidenciarse estructuras atípicas en el ovario, compuestas por células gigantes de núcleos grandes conteniendo varios nucleolos evidentes (Fig. 50C,D). Estas células se identificaron como células gigantes del trofoblasto, de origen placentario, a través de la inmunotinción positiva para el marcador PL-1 en un ovario hCG $\alpha\beta$ + y en un embrión WT de 11,5 días (Yamaguchi y col. 1994) (Fig. 51). La presencia de estas células en el ovario resultó la primera evidencia del desarrollo de un tumor con características de teratoma en las hembras hCG $\alpha\beta$ +. Se observaron, además, estructuras similares a embriones post-implantatorios (Fig. 51E,F), que corresponderían a la activación partenogenética de un ovocito dentro del ovario.

6 semanas

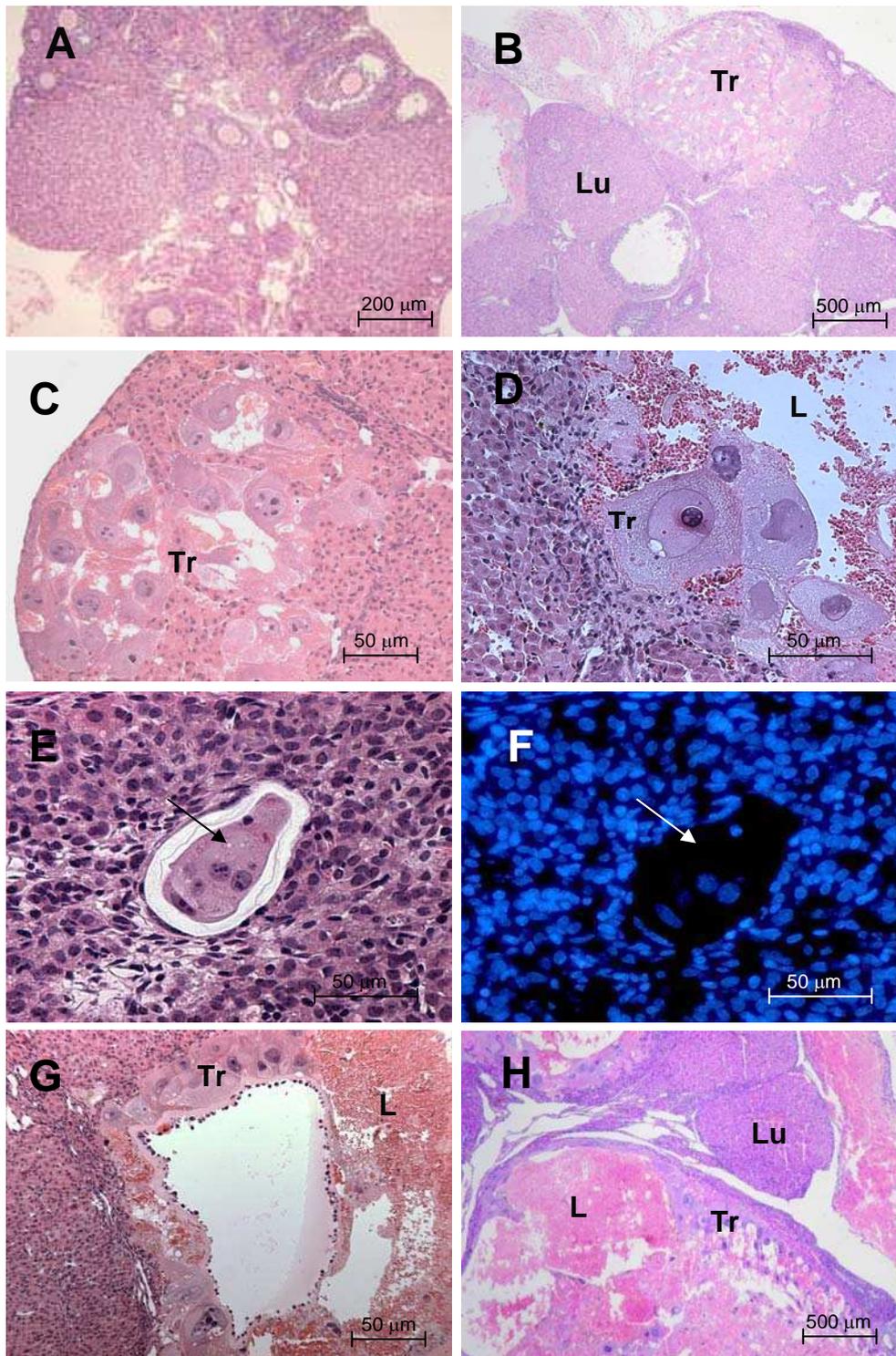


Figura 50. Histología del ovario WT (A) y hCG $\alpha\beta$ + (B-H) de 6 semanas de edad. Flechas: estructura que se asemeja a un embrión post-implantatorio. Lu: área luteinizada. Tr: células gigantes del trofoblasto. L: laguna sanguínea. Tinción con hematoxilina y eosina (A-E,G-H); tinción con DAPI (F).

En el desarrollo embrionario normal, las células gigantes del trofoblasto se encuentran en la interfase materno-fetal, invadiendo la decidua materna y promoviendo la formación de lagunas sanguíneas (Rossant y Cross 2001). En el ovario hCG $\alpha\beta$ +, estas células presentaron características típicamente invasivas hacia áreas de tejido ovárico luteinizado (Fig. 50G,H). Se detectó la presencia de los marcadores angiogénicos VEGF y PlGF (Fig. 51). Estos factores estarían participando en la formación de lagunas sanguíneas en las zonas de invasión trofoblástica, favoreciendo la rápida proliferación y diferenciación del tumor (Adamson y col. 2002; Zhou y col. 2003).

3.4.4. Histología ovárica a las 8 semanas de edad

A partir de las 8 semanas de edad, los ovarios hCG $\alpha\beta$ + desarrollaron una masa tumoral sólida que desplazó hacia la periferia el remanente de tejido ovárico luteinizado (Fig. 52A y B). La masa tumoral presentó características típicas de un teratoma, compuesto por una variedad de tejidos derivados de las tres capas embrionarias, organizados en forma desordenada, tales como folículos pilosos (Fig. 52C), cartílago (Fig. 52D), neuroepitelio (Fig. 52E), germen dentario (Fig. 52E), entre otras.

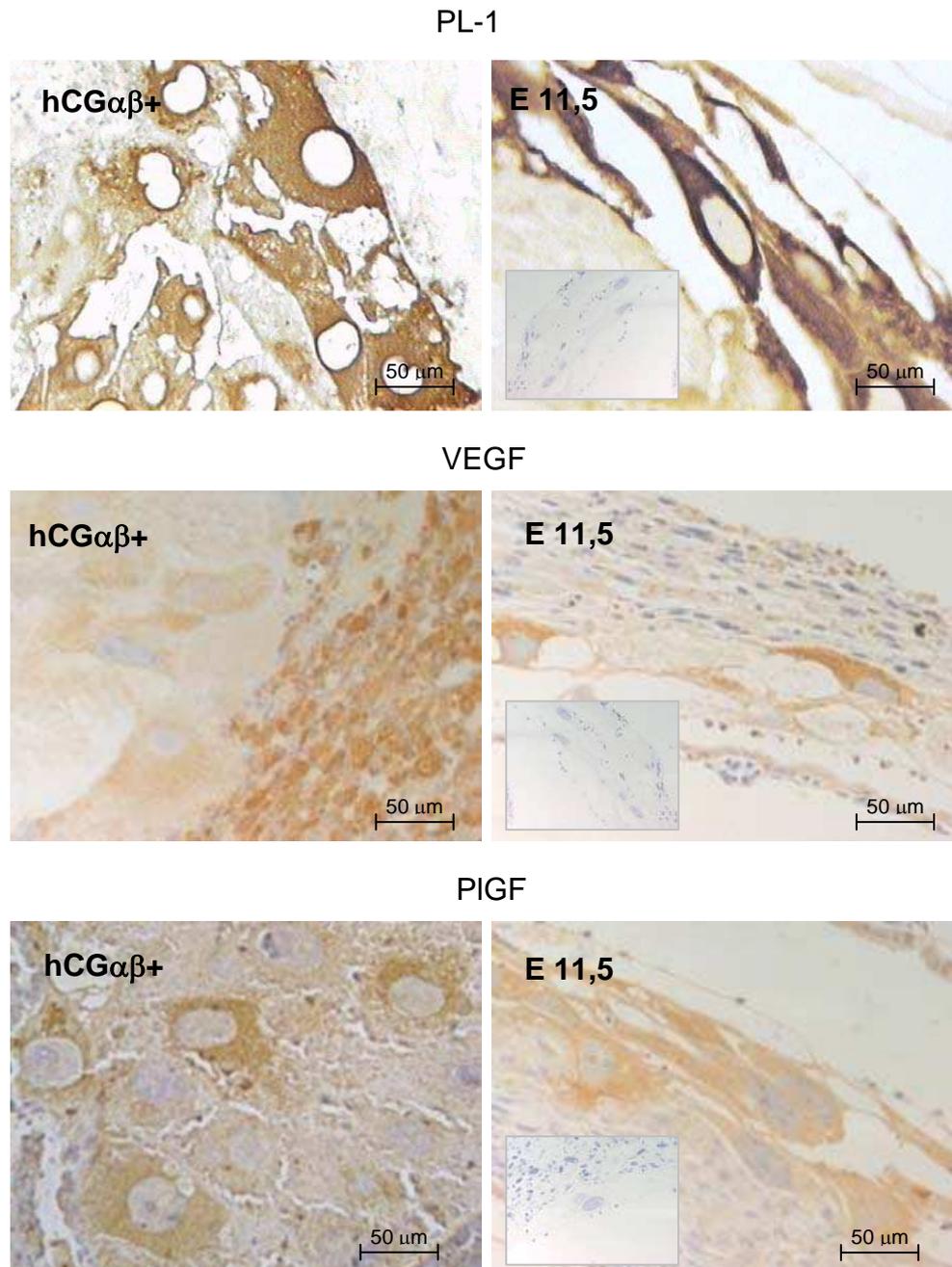


Figura 51. Inmunolocalización de PL-1, VEGF y PlGF en ovarios hCG $\alpha\beta$ + de 6 semanas de edad. Control positivo: embrión de 11,5 días (E11.5). Detalle: control negativo por omisión del primer anticuerpo.

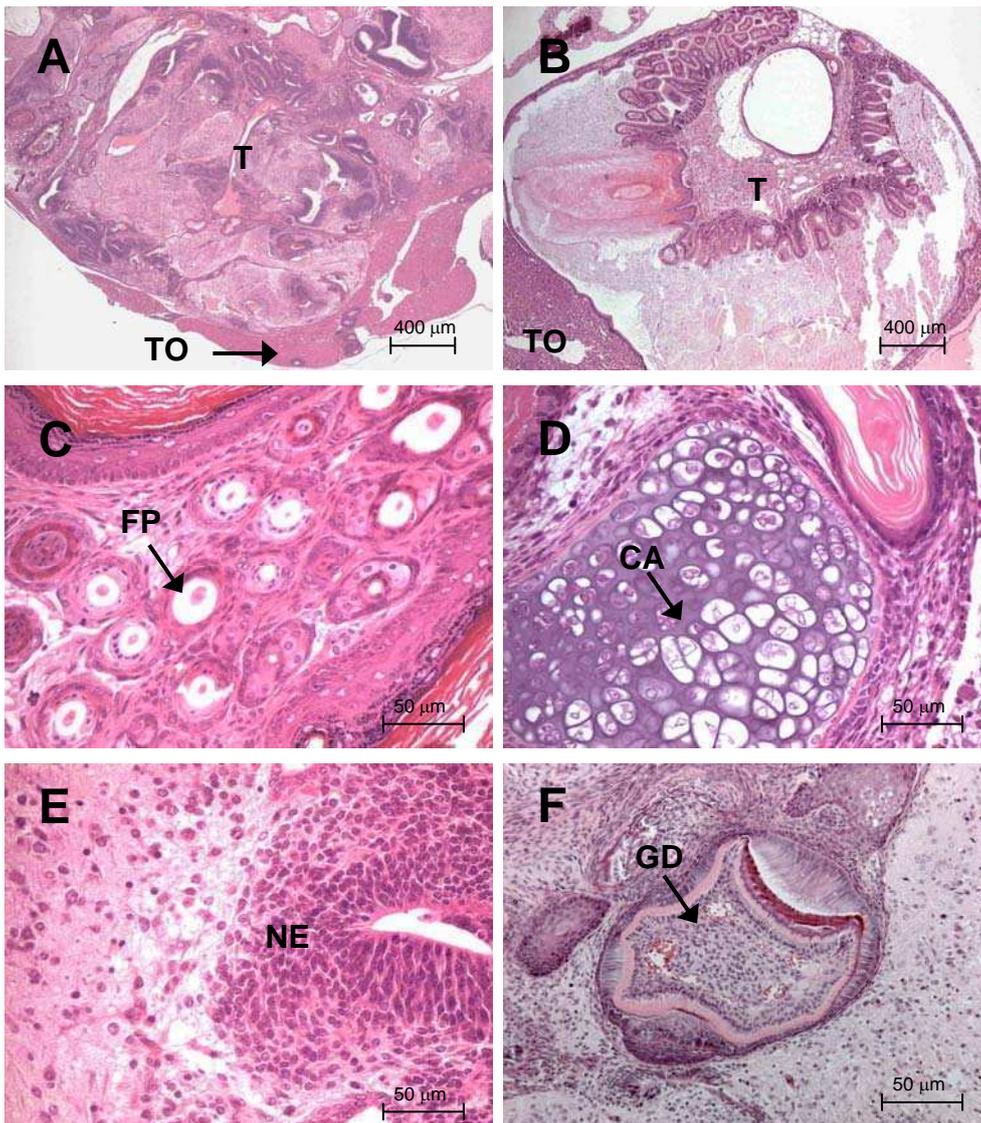
hCG $\alpha\beta$ + 8 semanas

Figura 52. Histología del ovario hCG $\alpha\beta$ + de 8 semanas de edad (A-F). T: teratoma, TO: tejido ovárico, FP: folículo piloso, CA: cartílago, NE: neuroepitelio, GD: germen dentario. Tinción con hematoxilina y eosina.

3.5. Expresión génica en ovarios WT y hCG $\alpha\beta$ +

Dado que se detectaron alteraciones significativas en el perfil hormonal sérico y en la estructura del ovario de las hembras hCG $\alpha\beta$ + en las distintas edades estudiadas, se decidió evaluar la función ovárica a través de la expresión de genes marcadores de la esteroidogénesis, foliculogénesis y ovulación. Se analizaron hembras WT y hCG $\alpha\beta$ + a tres edades claves en la manifestación del fenotipo: a las 2 semanas de edad, sin cambios aparentes en la morfología ovárica; a las 3 semanas de edad, con alteraciones significativas en el perfil hormonal y en el desarrollo de los folículos ováricos; a las 6 semanas de edad, coincidente con el comienzo del desarrollo del tumor.

Marcadores de esteroidogénesis:

Lhcgr: gen que codifica para el receptor de LH

Cyp11a1: gen que codifica para CYP11A

Cyp17a1: gen que codifica para CYP17

Cyp19a1: gen que codifica para CYP19

Marcadores de foliculogénesis

Fshr: gen que codifica para el receptor de FSH

Lhcgr: gen que codifica para el receptor de LH

Esr1: gen que codifica para el receptor de estrógeno α

Esr2: gen que codifica para el receptor de estrógeno β

Ar: gen que codifica para el receptor de andrógenos

Marcadores de ovulación

Ptgs2: gen que codifica para prostaglandina-endoperoxidasa sintasa 2

3.5.1. Evaluación de la expresión génica a las 2 semanas de edad

A las 2 semanas de edad se observó un aumento significativo en la expresión de *Cyp11a1* y *Lhcgr* ($p < 0,01$ y $p < 0,05$, respectivamente) en el ovario hCG $\alpha\beta$ + comparado con el WT, sin detectarse cambios significativos en el resto de los genes estudiados *Ptgs2*, *Cyp19a1* y *Cyp17a1* (Fig.53).

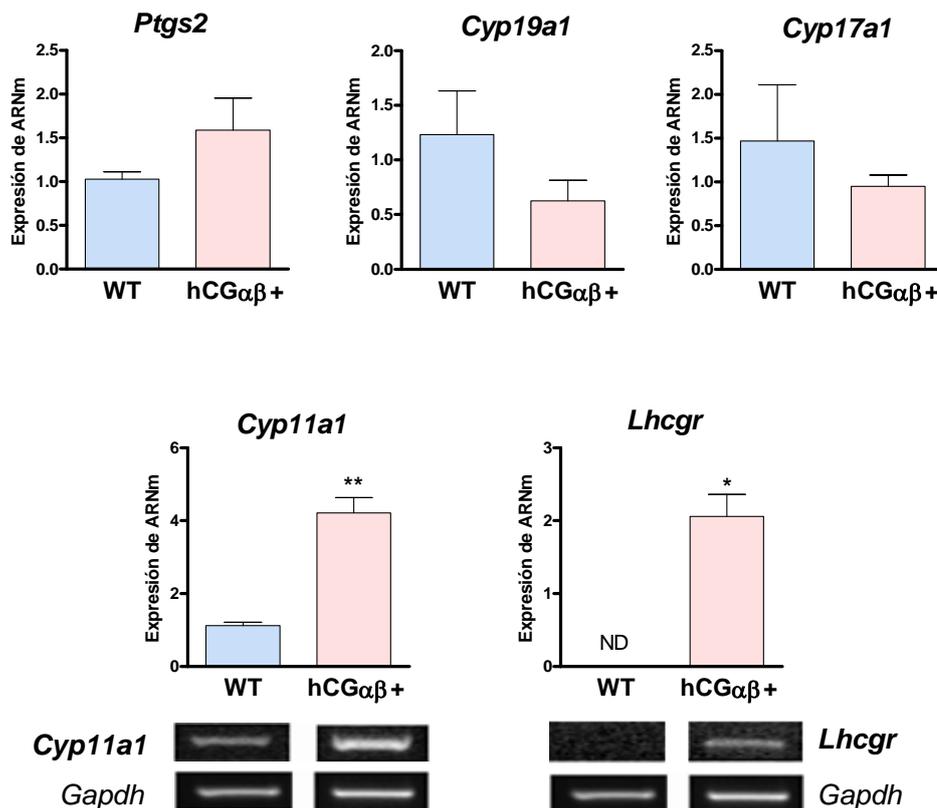


Figura 53. Evaluación de la expresión génica de marcadores de la esteroidogénesis, foliculogénesis y ovulación en ovarios WT y hCG $\alpha\beta$ + a las 2 semanas de edad, por PCR semicuantitativa. Los resultados se muestran como veces de aumento con respecto al WT. ND: no detectable. Prueba t de Student. N=4. *: $p < 0,05$; **: $p < 0,01$.

3.5.2. Evaluación de la expresión génica a las 3 semanas de edad

A las 3 semanas de edad se observó un aumento significativo en la expresión génica de los marcadores de esteroidogénesis *Cyp11a1* ($p < 0,01$), *Cyp17a1* y *Cyp19a1* ($p < 0,05$), resultando alrededor de 10 veces mayor en el ovario hCG $\alpha\beta$ + con respecto al WT. Asimismo, la expresión de *Lhcgr* mostró un aumento de 70 veces ($p < 0,01$), y el de ovulación *Ptgs2* de 15 veces

($p < 0,01$) en el ovario $hCG\alpha\beta+$ con respecto al WT. No se detectaron cambios en la expresión de *Esr1*, *Esr2*, *Ar* y *Fshr* a esta edad (Fig. 54).

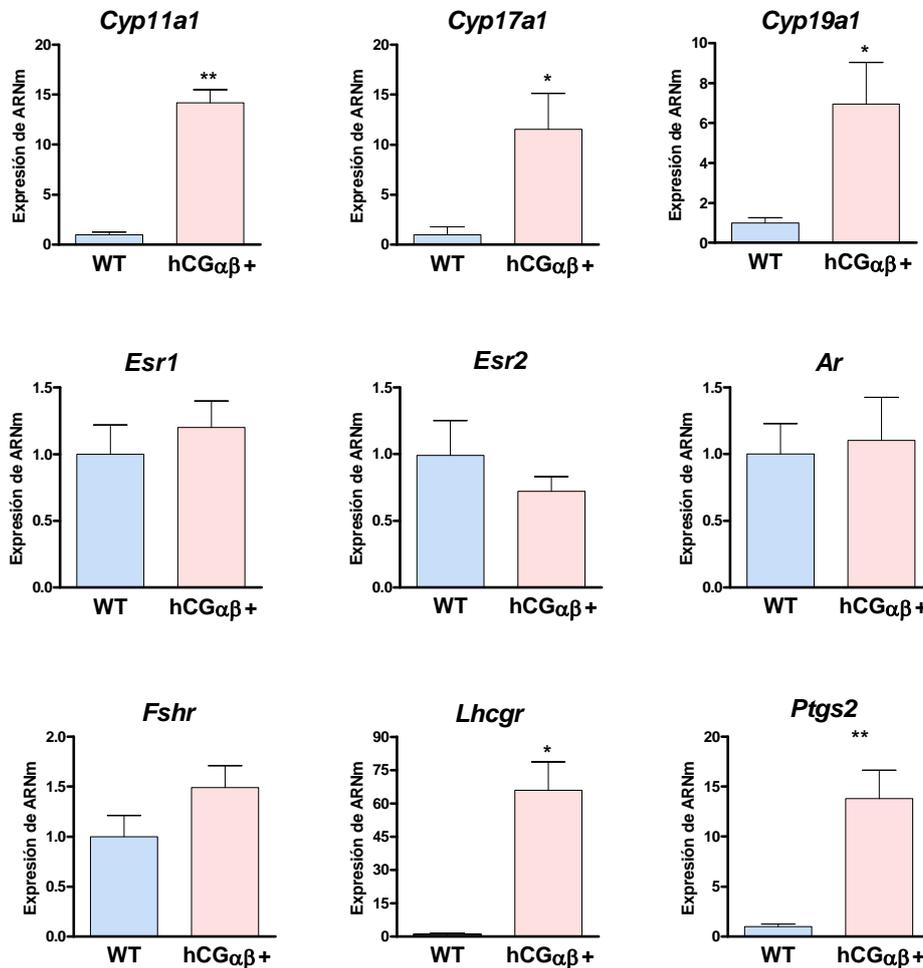


Figura 54. Evaluación de la expresión génica de marcadores de la esteroidogénesis, foliculogénesis y ovulación en ovarios WT y $hCG\alpha\beta+$ a las 3 semanas de edad, por PCR en Tiempo Real. Prueba t de Student. N=4. *: $p < 0,05$; **: $p < 0,01$.

3.5.3. Evaluación de la expresión génica a las 6 semanas de edad

A las 6 semanas de edad se detectó un aumento de alrededor de 200 veces en la expresión de *Ptgs2* ($p < 0,001$) en el ovario $hCG\alpha\beta+$ comparado con el WT (Fig. 55). Se observó también una disminución significativa en la expresión de *Esr2* en el ovario $hCG\alpha\beta+$ ($p < 0,05$). En contraste, la expresión génica del resto de los marcadores de la función ovárica analizados no presentó cambios significativos a esta edad.

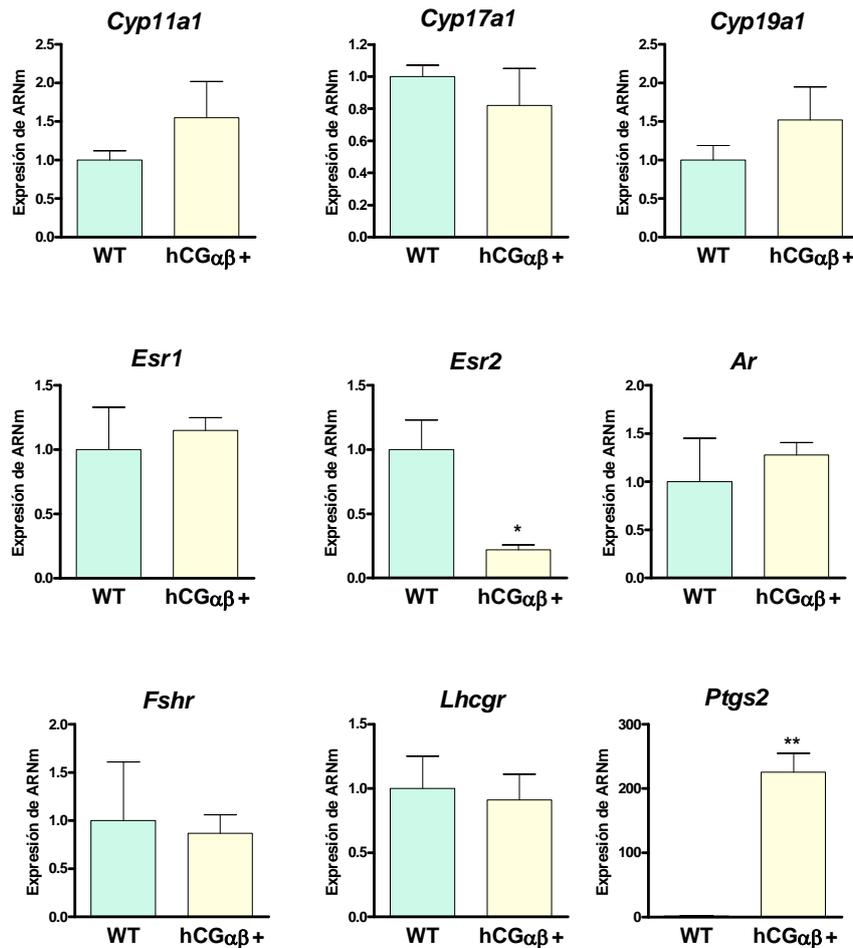


Figura 55. Evaluación de la expresión génica de marcadores de la esteroidogénesis, foliculogénesis y ovulación en ovarios WT y hCG $\alpha\beta$ + a las 6 semanas de edad, por PCR en Tiempo Real. Prueba t de Student. N=4. *: p<0,05; ***: p<0,001.

3.6. Inmunolocalización de CYP11A en el ovario WT y hCG $\alpha\beta$ +

Dado que la expresión del gen *Cyp11a1* resultó significativamente aumentada en los ovarios hCG $\alpha\beta$ + desde edades tempranas del desarrollo sexual, fue de interés analizar la inmunolocalización de la enzima CYP11A en el ovario WT y hCG $\alpha\beta$ + a las 2, 3 y 6 semanas de edad (Fig. 56).

3.6.1. Inmunolocalización de CYP11A a las 2 semanas de edad

A las 2 semanas se observó una tinción muy tenue en las células tecales de ambos grupos, siendo ésta más evidente en el ovario hCG $\alpha\beta$ +

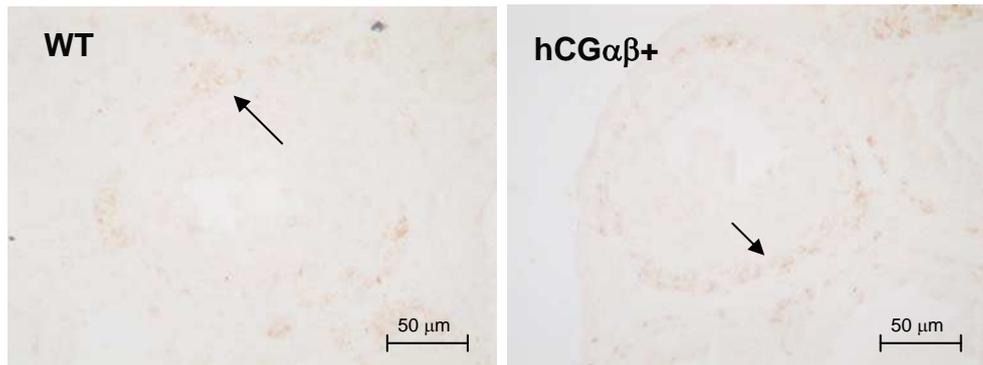
3.6.2. Inmunolocalización de CYP11A a las 3 semanas de edad

A las 3 semanas el ovario WT presentó tinción sólo en las células tecales, mientras que el ovario hCG $\alpha\beta$ + presentó mayor tinción de las células tecales, y se observó la presencia de estructuras luteinizadas, fuertemente teñidas, ausentes en el ovario WT.

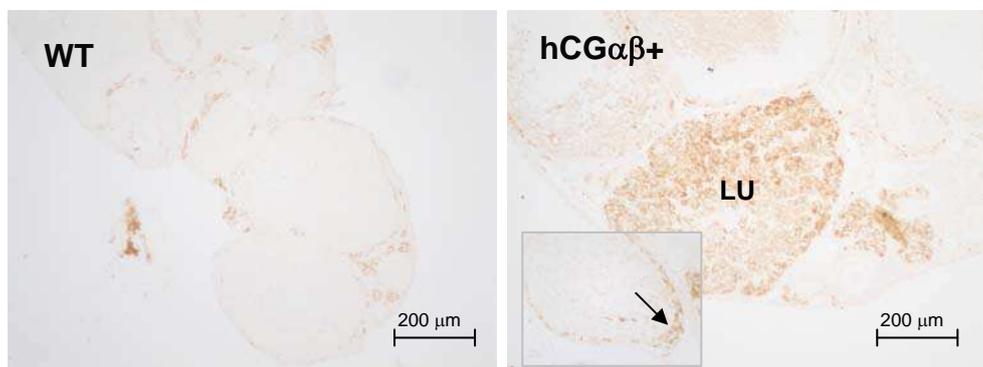
3.6.3. Inmunolocalización de CYP11A a las 6 semanas de edad

A las 6 semanas se observó tinción en los cuerpos lúteos, células tecales e intersticiales en el ovario WT. En el ovario hCG $\alpha\beta$ + se observó una fuerte tinción en las zonas de luteinización masiva.

2 semanas



3 semanas



6 semanas

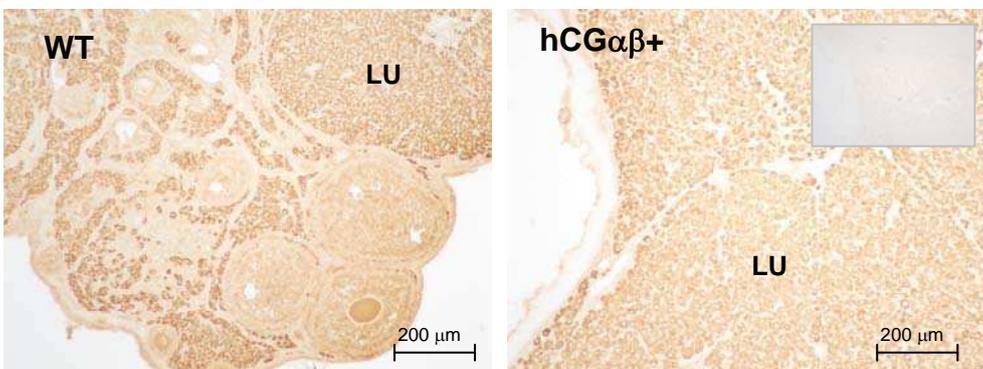


Figura 56. Inmunolocalización del marcador de esteroidogénesis CYP11A en ovarios WT y hCG $\alpha\beta$ a las 2, 3 y 6 semanas de edad. Flechas: células tecales. LU: áreas con predominio de luteinización. Detalle inferior izquierdo a las 3 semanas: detalles de células tecales. Detalle superior derecho a las 6 semanas: control negativo por omisión del 1er anticuerpo.

CAPITULO 4

TRATAMIENTOS *IN VIVO* EN HEMBRAS hCG $\alpha\beta$ +

La caracterización del fenotipo de las hembras hCG $\alpha\beta$ + descrita en el capítulo 3 demostró que la hipersecreción de hCG indujo un aumento significativo en la esteroidogénesis gonadal, alteraciones en el desarrollo folicular y formación de teratomas ováricos. A lo largo de este capítulo se describirán los resultados obtenidos luego de la aplicación de tratamientos *in vivo* específicos en las hembras transgénicas: ovariectomía, tratamiento antiandrogénico con flutamida, tratamiento antiestrogénico con fulvestrant, tratamiento combinado con flutamida y fulvestrant y tratamiento antiprogestagénico con mifepristona, reevaluando el fenotipo a través de parámetros morfológicos, bioquímicos y moleculares.

4.1. Efecto de la ovariectomía sobre la unidad hipotálamo-hipofisaria a las 3 semanas

4.1.1. Niveles séricos de FSH

Se estudiaron los niveles séricos de FSH de hembras WT y hCG $\alpha\beta$ + de 3 semanas de edad, controles y ovariectomizadas a las 2 semanas (Fig. 57). Coincidiendo con el perfil sérico presentado en el capítulo 3, ítem 3.2.4., los niveles séricos de FSH de las hembras hCG $\alpha\beta$ + se encontraron significativamente disminuidos con respecto a las WT, los cuales aumentaron luego de la ovariectomía, hasta alcanzar valores comparables a los controles. En las hembras WT, la ovariectomía no produjo cambios significativos, si bien se observó una tendencia a aumentar.

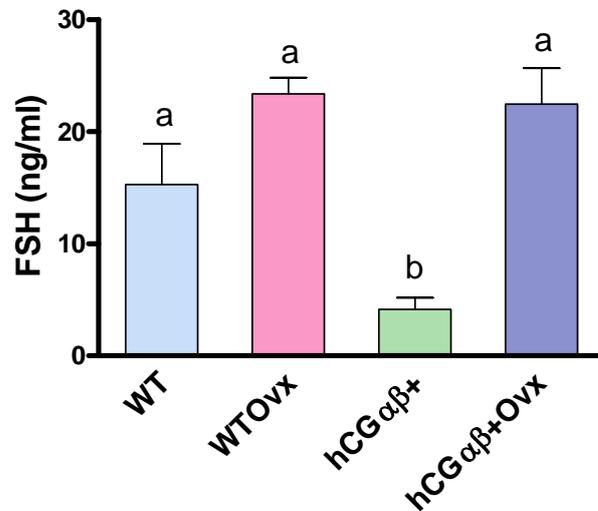


Figura 57. Niveles séricos de FSH de hembras WT y hCG $\alpha\beta$ + de 3 semanas de edad controles y ovariectomizadas (Ovx) a la edad de 2 semanas. ANOVA de 2 factores – Bonferroni. N=4-5. Letras distintas: $p < 0,05$. Se observaron efectos significativos del genotipo ($p < 0,01$), ovariectomía ($p < 0,001$) e interacción ($p < 0,05$).

4.1.2. Perfil de expresión génica en hipófisis

Se analizó la expresión génica de *Fshb*, *Lhb* y *Cga*, como también la expresión de *Gnrhr* y *Fst*, en hipófisis de hembras WT y hCG $\alpha\beta$ + de 3 semanas de edad, controles y ovariectomizadas a las 2 semanas (Fig. 58). Si bien los niveles de expresión de las tres subunidades de gonadotrofinas fueron menores en las hembras hCG $\alpha\beta$ + comparadas con las WT (como se mostró en el capítulo 3, ítem 3.3.2.), la ovariectomía en las hembras hCG $\alpha\beta$ + indujo un aumento en la expresión de *Fshb* y *Cga* comparable con las WT ovariectomizadas, y de *Lhb* comparable con las WT controles. En el caso de *Gnrhr*, se observó que la ovariectomía provocó una caída en los niveles de expresión de dicho gen en las hembras WT, mientras que en las hCG $\alpha\beta$ + no se observó ningún efecto. Por último, la ovariectomía indujo un aumento significativo en los niveles de expresión de *Fst* tanto en las hembras WT como en las hCG $\alpha\beta$ +

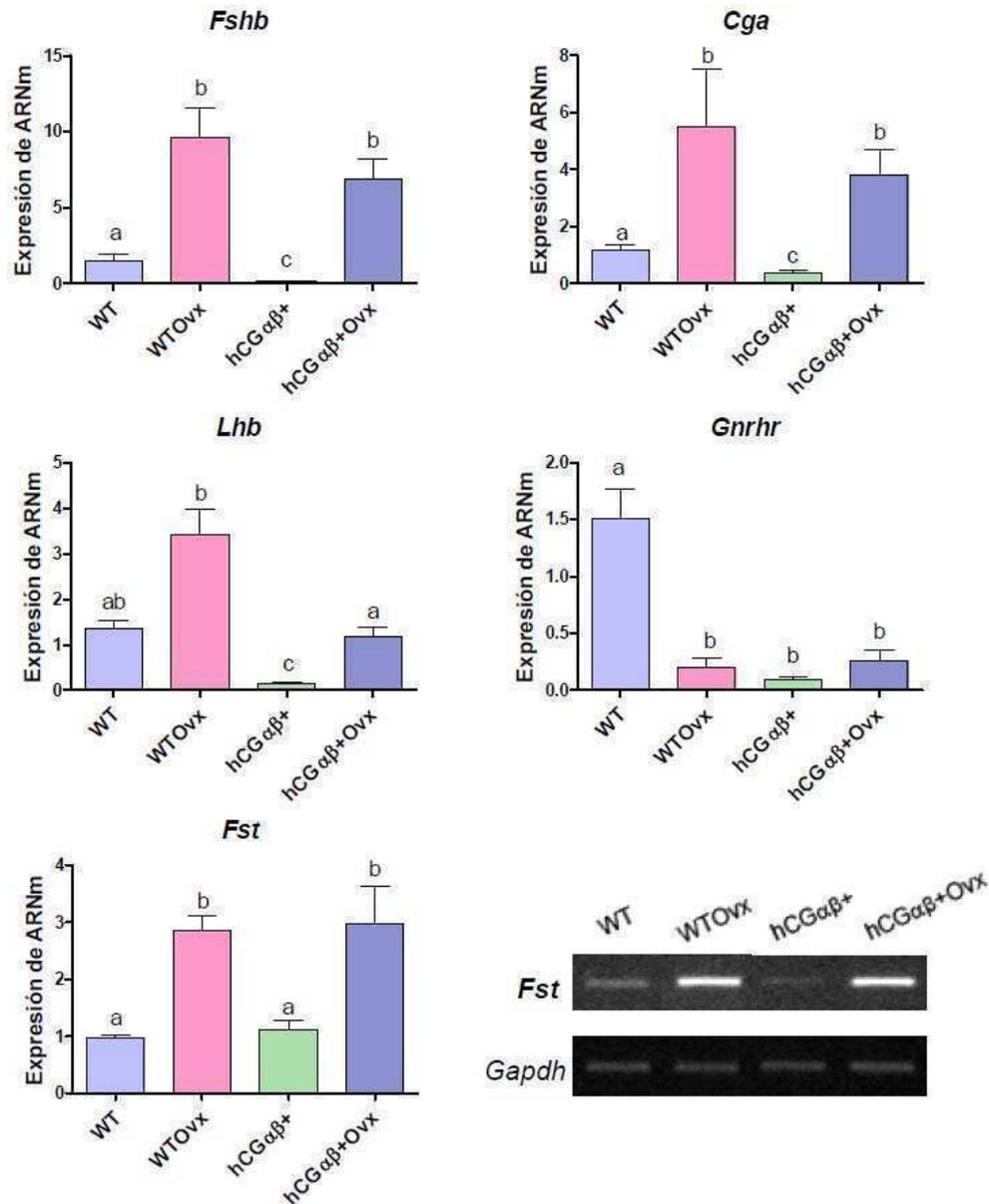


Figura 58. Expresión génica hipofisaria en hembras WT y $hCG\alpha\beta+$ de 3 semanas de edad controles y ovariectomizadas (Ovx) a las 2 semanas. La expresión génica de *Fshb*, *Lhb*, *Cga* y *Gnhr* se evaluó por PCR en Tiempo Real. Debido a que *Fst* presentó valores de Ct cercanos al límite de detección del ensayo, la expresión de este gen se evaluó por RT-PCR semicuantitativa, y a la derecha del gráfico se muestran bandas representativas de *Fst* y *Gapdh* para cada grupo. ANOVA de 2 factores – Bonferroni. $N=4$. Letras distintas $p < 0,05$. Se observaron efectos significativos del genotipo, ovariectomía e interacción en *Fshb*, *Lhb* y *Cga* ($p < 0,001$), mientras que para *Gnhr* se observaron efectos significativos del genotipo y la interacción ($p < 0,01$), y para *Fst* sólo de la ovariectomía ($p < 0,001$).

4.1.3. Perfil de expresión génica en hipotálamo

Se estudió la expresión génica de *Gnhr* y *Kiss1* en el hipotálamo anterior e hipotálamo medio basal-posterior de hembras WT y $hCG\alpha\beta+$ de 3 semanas de edad, controles y ovariectomizadas a las 2 semanas (Fig. 59). En el hipotálamo

medio basal-posterior la ovariectomía indujo un aumento en la expresión de *Gnrh* en las hembras WT, mientras que en las $hCG\alpha\beta+$ se observó una disminución. En el hipotálamo anterior la ovariectomía no tuvo efecto sobre los niveles de expresión de *Gnrh* en ningún genotipo. En cuanto a la expresión de *Kiss1*, la ovariectomía en las hembras $hCG\alpha\beta+$ indujo un disminución en el hipotálamo anterior y un aumento en el hipotálamo medio basal-posterior, sin observarse cambios significativos en las hembras WT.

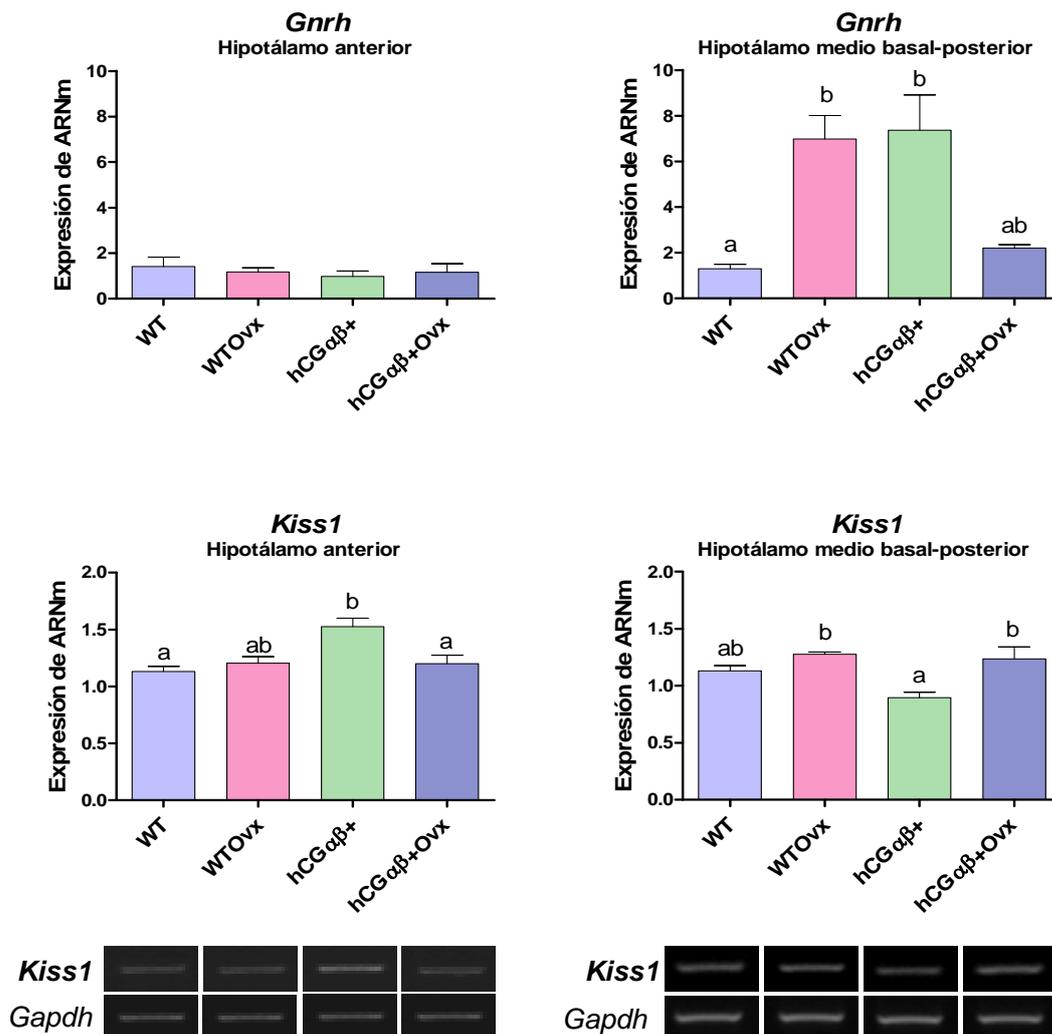


Figura 59. Análisis de la expresión génica en el hipotálamo anterior e hipotálamo medio basal-posterior de hembras WT y $hCG\alpha\beta+$ de 3 semanas de edad, controles y ovariectomizadas (Ovx) a las 2 semanas de edad. La expresión de *Gnrh* se evaluó por PCR en Tiempo Real. Debido a que *Kiss1* presentó valores de Ct cercanos al límite de detección del ensayo, la expresión de este gen se evaluó por RT-PCR semicuantitativa, y debajo del gráfico se muestra una banda de *Kiss1* y *Gapdh* representativa de cada grupo. ANOVA de 2 factores – Bonferroni. N=4. Letras distintas: $p < 0,05$. Se observaron efectos significativos de la interacción para *Gnrh* en hipotálamo medio basal-posterior ($p < 0,001$), del genotipo y la interacción para *Kiss1* en hipotálamo anterior ($p < 0,05$), y de la ovariectomía para *Kiss1* en hipotálamo medio basal-posterior ($p < 0,001$).

4.2. Validación de los tratamientos antihormonales

4.2.1. Validación del tratamiento antiandrogénico con flutamida

Para validar la eficacia del tratamiento antiandrogénico con flutamida, se utilizaron ratones macho y hembra WT de 2 semanas de edad, que fueron implantados con un pellet de 20 mg de flutamida y sacrificados a las 4 y 6 semanas de edad, respectivamente. La validación del tratamiento en machos consistió en la determinación del peso de los órganos andrógeno-dependientes vesícula seminal y epidídimo, observándose que el tratamiento con flutamida disminuyó significativamente el peso de ambos órganos (vesícula seminal: $p < 0,001$, epidídimo: $p < 0,05$) (Fig. 60A). En la validación del tratamiento en las hembras, se realizaron cortes histológicos del ovario y se cuantificaron las estructuras presentes por sección: folículos preantrales, antrales, atrésicos y cuerpos lúteos. Se observó una disminución de folículos atrésicos en las hembras tratadas con flutamida comparadas con las controles ($p < 0,05$), siendo éste un efecto esperable debido a una disminución en la proporción de andrógenos/estrógenos en el microambiente ovárico (Drummond 2006) (Fig. 60B). En las hembras tratadas con flutamida se detectaron además defectos en la ovulación, evidenciados por ovocitos atrapados dentro de cuerpos lúteos (Fig. 60C). Estos experimentos demostraron que el tratamiento prolongado con flutamida a través de la implantación de un pellet de 20 mg fue capaz de bloquear la acción androgénica tanto en ratones hembras como machos WT, quienes normalmente presentan niveles de andrógenos circulantes significativamente más elevados que las hembras.

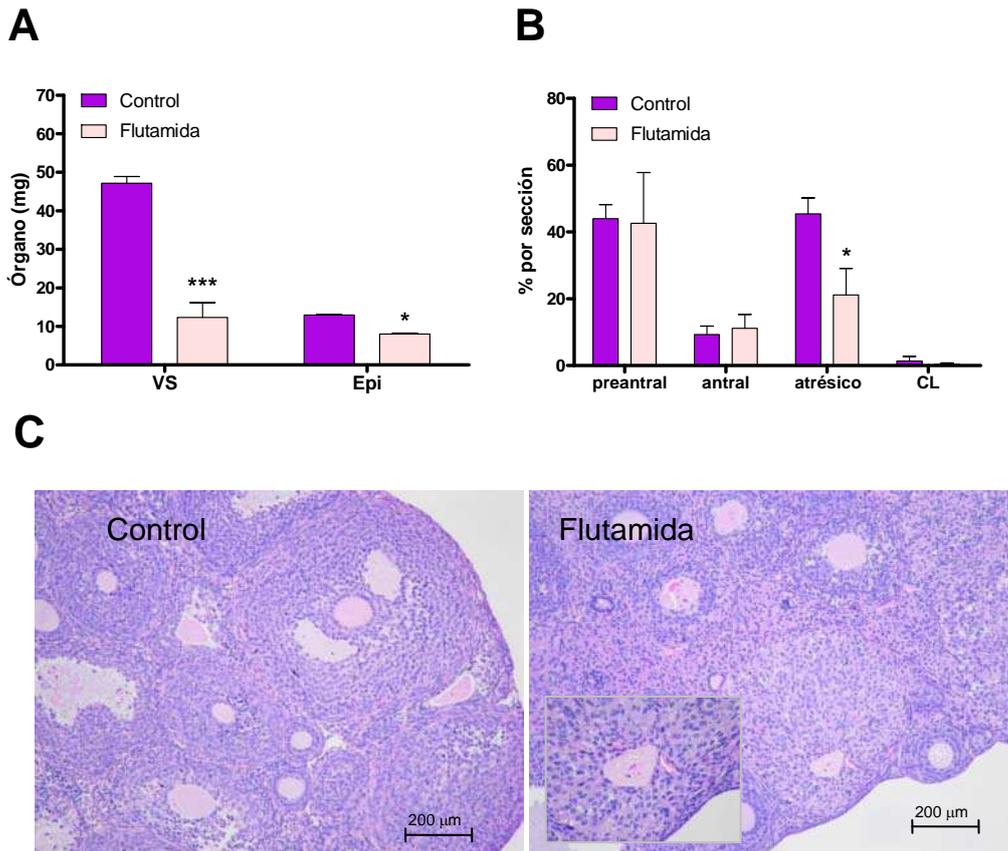


Figura 60. Validación del tratamiento antiandrogénico con flutamida. **A)** Peso de los órganos dependientes de andrógenos vesícula seminal (VS) y epidídimo (Epi) en machos WT de 4 semanas de edad controles y tratados con flutamida durante 2 semanas. Prueba t de Student para control vs flutamida dentro de cada órgano, N=4, *: $p < 0.05$, ***: $p < 0.001$. **B)** Conteo de folículos preantrales, antrales, atrésicos y cuerpos lúteos (CL) por sección en cortes histológicos de ovarios WT de 6 semanas de edad, controles y tratados con flutamida durante 4 semanas. Prueba t de Student para control vs flutamida dentro de cada estructura, N=4-6, *: $p < 0.05$. **C)** Histología ovárica de hembras WT de 6 semanas de edad controles y tratadas con flutamida durante 4 semanas, hematoxilina-eosina. Detalle: ovocito atrapado en cuerpo lúteo.

4.2.2. Validación del tratamiento antiestrogénico con fulvestrant

Para validar la eficacia del tratamiento antiestrogénico con fulvestrant, hembras WT de 2 semanas de edad fueron administradas en forma s.c. con dos dosis distintas del antiestrógeno (0,5 y 2 mg/kg) hasta las 6 semanas de edad. La validación del tratamiento consistió en la determinación del peso del útero y el análisis histológico del ovario. Se observó una disminución en el peso del útero de las hembras tratadas con fulvestrant comparadas con las controles ($p < 0,05$) (Fig. 61A). En los ovarios de las hembras tratadas con la dosis de 2 mg/kg, se observó la presencia de quistes hemorrágicos (Fig. 61B). A partir de estos resultados se eligió la dosis de 2 mg/kg para los tratamientos con las hembras hCG $\alpha\beta$ +

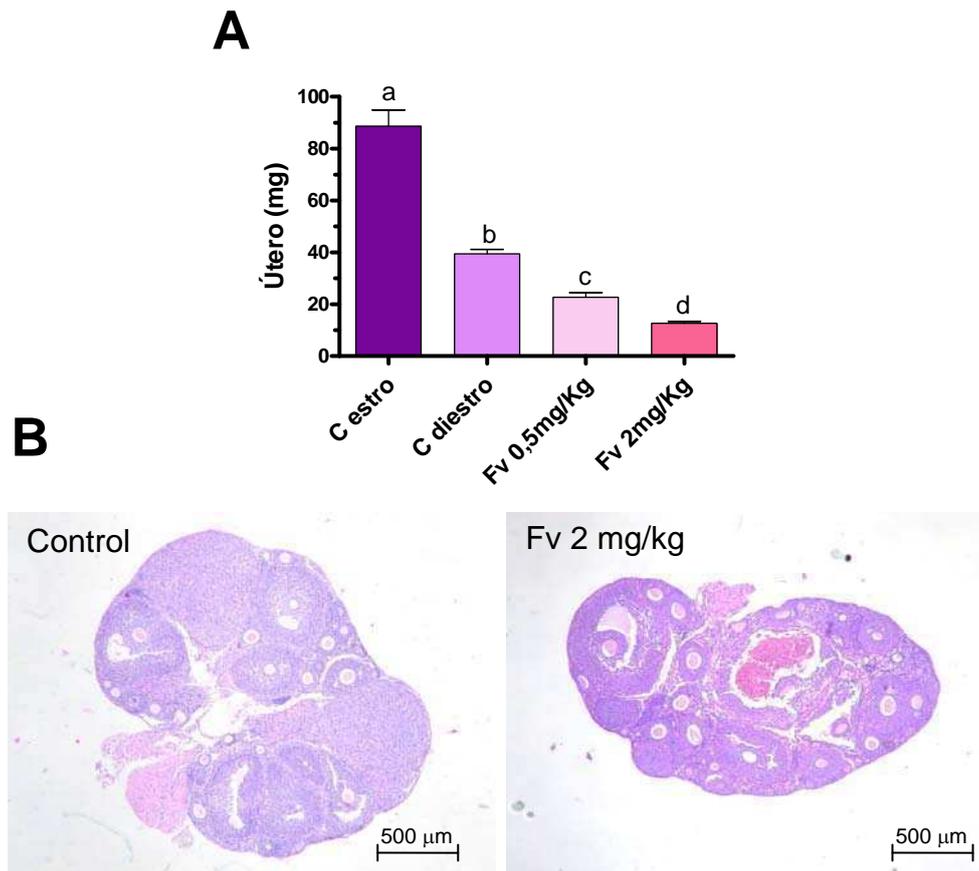


Figura 61. Validación del tratamiento antiestrogénico. **A)** Peso del útero de hembras WT de 6 semanas de edad control (C) en estro y diestro, y tratadas con las dosis de 0,5 y 2 mg/kg de fulvestrant (Fv) durante 4 semanas. ANOVA de 1 factor – Bonferroni. N=4. Letras distintas: $p < 0,05$. **B)** Histología ovárica de las hembras control y Fv 2 mg/kg de 6 semanas de edad. Hematoxilina-eosina.

4.2.3. Validación del tratamiento antiprogestagénico con mifepristona

Para validar la eficacia del tratamiento antiprogestagénico con mifepristona, hembras WT de 8 semanas de edad fueron administradas en forma s.c. con una dosis de mifepristona (50 mg/kg), 3 veces por semana. El día de la primera inyección las hembras tratadas con mifepristona o vehículo fueron apareadas con machos WT. Se confirmó la ocurrencia de tapón vaginal 1-3 días post apareo. Luego de 14 días de tratamiento, se determinó la presencia o ausencia de embriones implantados en el útero, como índice de la capacidad contraceptiva del antiprogestágeno. No se observaron embriones implantados en las hembras WT tratadas con mifepristona (Fig. 62).

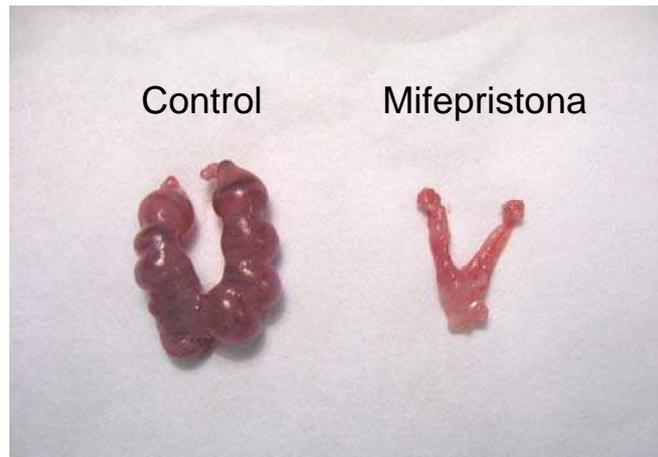


Figura 62. Validación del tratamiento antiprogestagénico con mifepristona. Hembras WT preñadas fueron tratadas con 50 mg/kg de mifepristona s.c. desde el apareamiento, por 14 días. Se observó la presencia o ausencia de embriones implantados en el útero. N=3.

4.3. Tratamientos antihormonales a las 6 semanas de edad: peso ovárico y uterino

4.3.1. Peso ovárico

Se estudió el peso de los ovarios de hembras WT y $hCG\alpha\beta+$ de 6 semanas de edad, tratadas durante 4 semanas con los distintos tratamientos antihormonales (Fig. 63A). Tanto los tratamientos individuales con flutamida y fulvestrant como el tratamiento combinado indujeron una disminución significativa en el peso de los ovarios $hCG\alpha\beta+$, siendo los distintos tratamientos igualmente eficaces ($p < 0,05$). El tratamiento con mifepristona fue el menos efectivo, ya que si bien se observó una tendencia a la disminución del peso ovárico ésta no fue estadísticamente significativa. Se estudió además el peso ovárico relativo al peso corporal, obteniéndose la misma tendencia y significancia observada en el peso absoluto.

4.3.2. Peso uterino

No se detectaron cambios en el peso uterino de las hembras $hCG\alpha\beta+$ controles y tratadas, siendo comparables con los de hembras WT en diestro (Fig. 63B). Se estudió además el peso uterino relativo al peso corporal,

obteniéndose la misma tendencia y significancia observada en el peso absoluto.

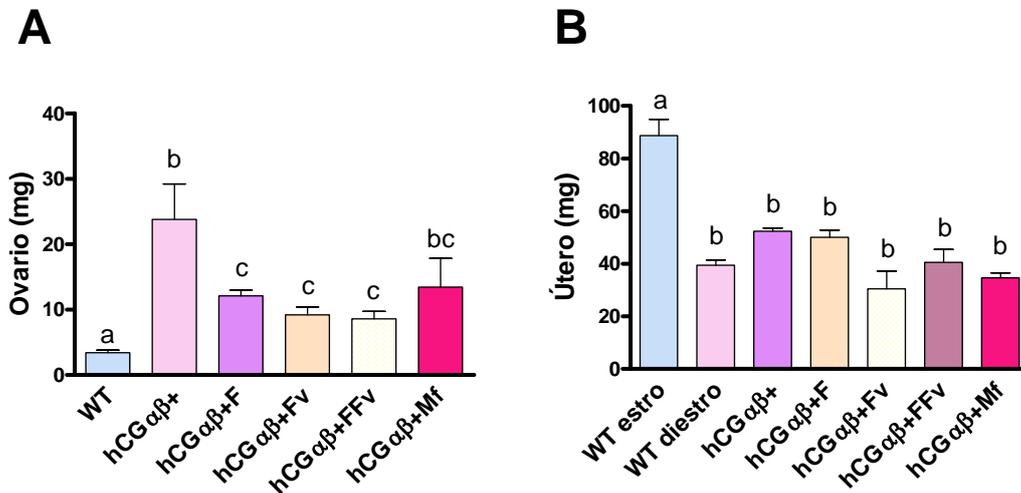


Figura 63. A) peso ovárico, y B) peso uterino de hembras WT y hCG $\alpha\beta$ + de 6 semanas de edad tratadas con flutamida (F), fulvestrant (Fv), flutamida-fulvestrant (FFv) y mifepristona (Mf) durante 4 semanas. ANOVA – Bonferroni. N=4-5. Letras distintas: p<0,05.

4.4. Tratamientos antihormonales a las 6 semanas de edad: histología ovárica

4.4.1. Tratamiento con flutamida

En el tratamiento con flutamida se observó una masiva luteinización, focos incipientes de células gigantes del trofoblasto, y una importante reducción en la ocurrencia de lagunas hemorrágicas en los ovarios hCG $\alpha\beta$ + tratados comparados con los controles (Fig. 64A-D). Se observó además que las células gigantes del trofoblasto presentaron una forma más compacta y núcleos picnóticos en el ovario tratado comparado con el control (Fig. 64B,D)

4.4.2. Tratamiento con fulvestrant

En el tratamiento con fulvestrant se observó un cambio en la estructura general del ovario hCG $\alpha\beta$ +, detectándose en algunos casos una alta

luteinización, con cuerpos lúteos definidos y ovocitos atrapados, y en otros casos una importante proporción de estructuras foliculares, en un gran número con expansión de las células del cúmulus. Asimismo, se observaron focos de diferenciación de células gigantes del trofoblasto muy incipientes en el ovario hCG $\alpha\beta$ + tratado con fulvestrant, en comparación con los grandes focos presentes en el ovario hCG $\alpha\beta$ + control (Fig. 64E,F).

4.4.3. Tratamiento combinado con flutamida y fulvestrant

En el tratamiento combinado con flutamida-fulvestrant se observó el ovario altamente luteinizado, con cuerpos lúteos definidos, en algunos casos con restos de quistes hemorrágicos. Sin embargo, no se detectó la presencia de focos de células gigantes del trofoblasto (Fig. 64G).

4.4.4. Tratamiento con mifepristona

En el tratamiento con mifepristona se observó una histología muy similar a la del ovario hCG $\alpha\beta$ + control, observándose luteinización y zonas de invasión trofoblástica con lagunas sanguíneas (Fig. 64F).

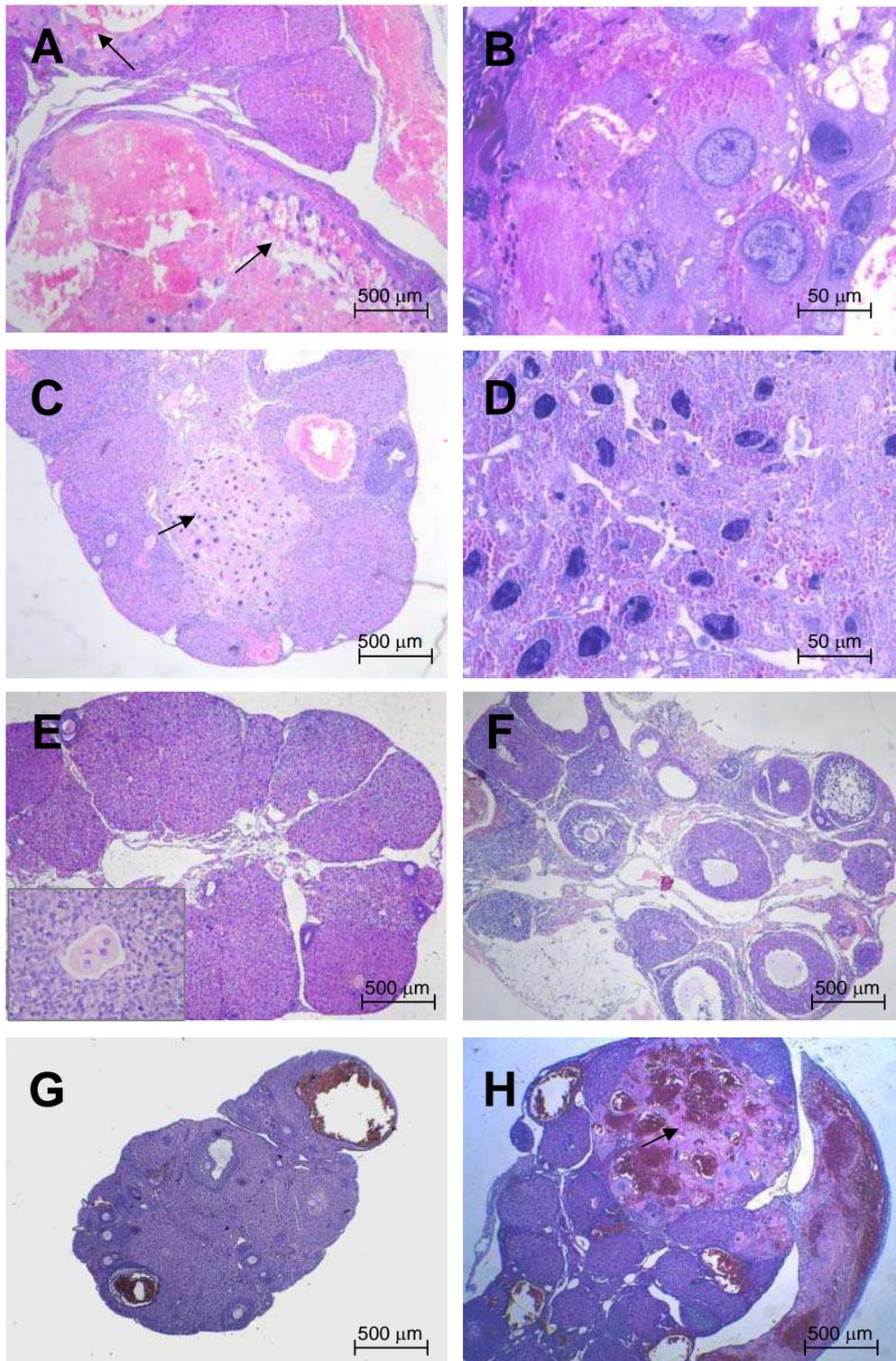


Figura 64. Morfología ovárica de hembras $hCG\alpha\beta+$ de 6 semanas de edad controles (A,B), tratadas con flutamida (F) (C,D), fulvestrant (Fv) (E,F), flutamida-fulvestrant (FFv) (G) o mifepristona (Mf) (H) durante 4 semanas. Tinción con hematoxilina y eosina. Flechas: sitios de diferenciación de células gigantes del trofoblasto. Detalle en figura E: ovocito activado.

4.5. Tratamientos antihormonales a las 6 semanas de edad: niveles séricos de FSH

Los niveles séricos de FSH no resultaron alterados como consecuencia de los distintos tratamientos (Fig. 65). Por lo tanto, el fenotipo ovárico observado con los tratamientos no se debería a efectos sobre la regulación de gonadotrofinas.

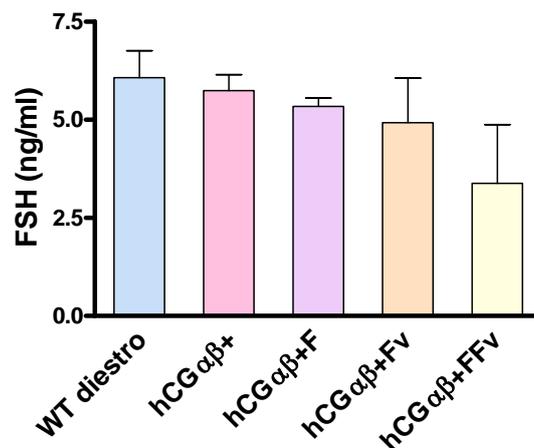


Figura 65. Niveles séricos de FSH de hembras WT en diestro y hCG $\alpha\beta$ + de 6 semanas de edad, tratadas durante 4 semanas con flutamida (F), fulvestrant (Fv), flutamida-fulvestrant (FFv) o mifepristona (Mf). ANOVA – Bonferroni. N=4-5.

4.6. Tratamiento antiandrogénico: expresión génica en ovario a las 6 semanas de edad

Se estudió la expresión génica de los marcadores de esteroidogénesis *Cyp11a1*, *Cyp17a1* y *Cyp19a1*, de foliculogénesis *Esr1*, *Esr2* y *Ar*, así como de ovulación *Ptgs2*, en ovarios hCG $\alpha\beta$ + de 6 semanas de edad controles y tratados con flutamida (Tabla 4). El tratamiento indujo un aumento significativo en la expresión de *Cyp17a1* en el ovario tratado ($p < 0,05$), mientras que los demás marcadores se mantuvieron sin cambios en su expresión génica.

Tabla 4. Perfil de expresión génica en ovarios de hembras hCG $\alpha\beta$ + de 6 semanas de edad, controles y tratadas con flutamida durante 4 semanas (hCG $\alpha\beta$ +F), por PCR en Tiempo Real.

	hCG $\alpha\beta$ +	hCG $\alpha\beta$ +F
<i>Cyp11a1</i>	1,55 \pm 0,47	1,22 \pm 0,20
<i>Cyp19a1</i>	1,52 \pm 0,43	0,74 \pm 0,18
<i>Cyp17a1</i>	0,82 \pm 0,23	2,26 \pm 0,41*
<i>Esr1</i>	1,15 \pm 0,10	1,08 \pm 0,33
<i>Esr2</i>	0,22 \pm 0,04	0,35 \pm 0,17
<i>Ar</i>	1,28 \pm 0,13	1,43 \pm 0,38
<i>Ptgs2</i>	225,71 \pm 29,51	187,02 \pm 38,49

Los datos están presentados como la media \pm ESM. La expresión de ARNm se presenta relativa a hembras WT controles. Prueba t de Student, N=4, *: p<0,05.

4.7. Tratamientos antihormonales a las 12 semanas de edad: peso corporal, ovárico y uterino.

4.7.1. Peso corporal

No se detectaron cambios en el peso corporal de las hembras hCG $\alpha\beta$ + sometidas a los tratamientos con flutamida, fulvestrant y flutamida-fulvestrant, siendo en todos los casos significativamente mayor al de las hembras WT (p<0,05). En contraste, el tratamiento con mifepristona indujo una disminución en el peso corporal de las hembras hCG $\alpha\beta$ + a valores comparables con las hembras WT (Fig. 66A)

4.7.2. Peso uterino

Los tratamientos individuales con flutamida y fulvestrant no modificaron el peso del útero de las hembras hCG $\alpha\beta$ +, si bien se observó una tendencia a la disminución que no fue estadísticamente significativa. Por el contrario, el tratamiento combinado y el tratamiento con mifepristona indujeron una disminución significativa del peso del útero hCG $\alpha\beta$ +, alcanzando valores comparables al de las hembras WT en diestro (p<0,05) (Fig. 66B). Se estudió

además el peso uterino relativo al peso corporal, obteniéndose la misma tendencia y significancia observada en el peso absoluto.

4.7.3. Peso ovárico

Tanto los tratamientos individuales con flutamida, fulvestrant o mifepristona como el tratamiento combinado indujeron una disminución significativa en el peso del ovario hCG $\alpha\beta$ +, siendo los distintos tratamientos igualmente eficaces ($p < 0,05$) (Fig. 66C). Se estudió además el peso del ovárico relativo al peso corporal, obteniéndose la misma tendencia y significancia observada en el peso absoluto. En la Figura 67 se muestran imágenes macroscópicas del ovario WT y hCG $\alpha\beta$ + control y tratado con los distintos tratamientos.

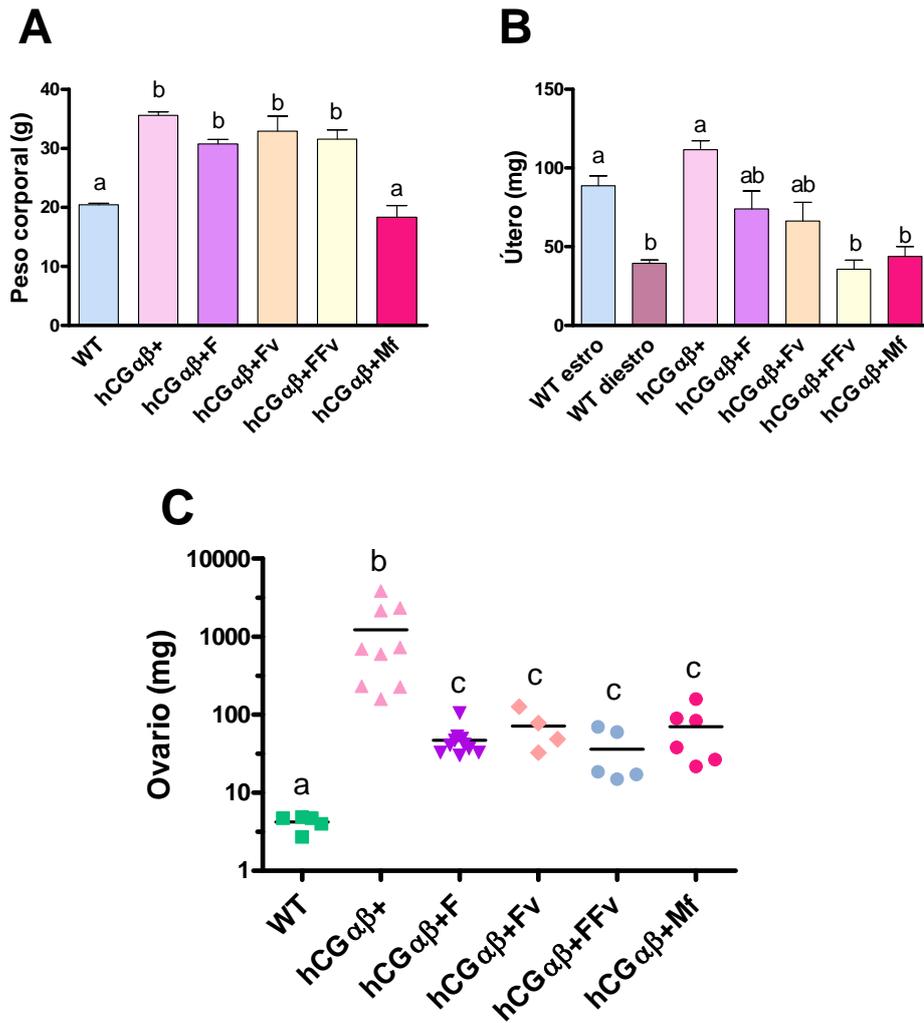


Figura 66. A) peso corporal, **B)** peso del útero, y **C)** peso del ovario de hembras WT y hCG $\alpha\beta$ + de 12 semanas de edad, tratadas con flutamida (F), fulvestrant (Fv), flutamida-fulvestrant (FFv) o mifepristona (Mf). ANOVA de 1 factor – Bonferroni. N=4-9. Letras distintas: p<0.05.

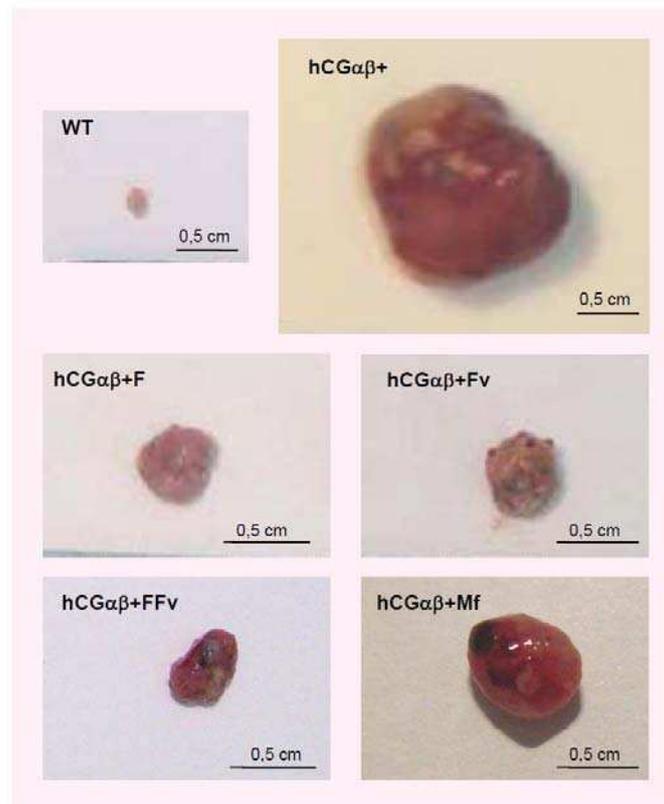


Figura 67. Imágenes macroscópicas del ovario de hembras WT y $hCG\alpha\beta+$ de 12 semanas de edad, tratadas con flutamida (F), fulvestrant (Fv), flutamida-fulvestrant (FFv) o mifepristona (Mf).

4.8. Tratamientos antihormonales a las 12 semanas de edad: histología ovárica

4.8.1. Tratamiento con flutamida

En los ovarios de las hembras $hCG\alpha\beta+$ de 12 semanas de edad tratadas con flutamida, se observó una notable reducción en la presencia de focos de tejidos diferenciados, cuya proliferación resultó delimitada dentro de la estructura del ovario luteinizado (Fig. 68A, E y F). En algunos casos se observaron focos de células gigantes del trofoblasto (Fig. 68B), normalmente presentes en estadios previos del tumor, y ausentes a esta edad. Se detectaron también estructuras hialinizadas (Fig. 68C y D).

4.8.2. Tratamiento con fulvestrant

En los ovarios de las hembras hCG $\alpha\beta$ + de 12 semanas de edad tratadas con fulvestrant, se detectó la presencia de una mayor variedad de tejidos diferenciados en comparación con aquellos animales bajo tratamiento con flutamida (Fig. 69B, D y E). Se observaron también focos de células gigantes del trofoblasto alrededor de tejidos diferenciados (Fig. 69C). El tejido ovárico resultó altamente luteinizado, con cuerpos lúteos definidos, y en algunos casos con ovocitos atrapados dentro del cuerpo lúteo (Fig. 69A y F).

4.8.3. Tratamiento combinado con flutamida y fulvestrant

En los ovarios de las hembras hCG $\alpha\beta$ + de 12 semanas de edad tratadas con el tratamiento combinado se observó la presencia de grandes zonas hemorrágicas con células gigantes del trofoblasto (Fig. 70B, D, E y F), como también la presencia de estructuras hialinizadas (Fig. 70A, C). En algunos casos se detectaron pequeños focos de proliferación tisular en la periferia del ovario (Fig. 70A).

4.8.4. Tratamiento con mifepristona

El análisis histológico de los ovarios de las hembras hCG $\alpha\beta$ + de 12 semanas de edad tratadas con mifepristona mostró variabilidad en la respuesta al tratamiento. En algunos casos se detectó una gran diferenciación tisular, con pocos restos de tejido ovárico y ausencia de focos de células gigantes del trofoblasto (Fig. 71A, B). En otros casos se observó un retraso en la progresión tumoral, observándose focos de células gigantes del trofoblasto y diferenciación tisular muy incipiente (Fig. 71C, D).

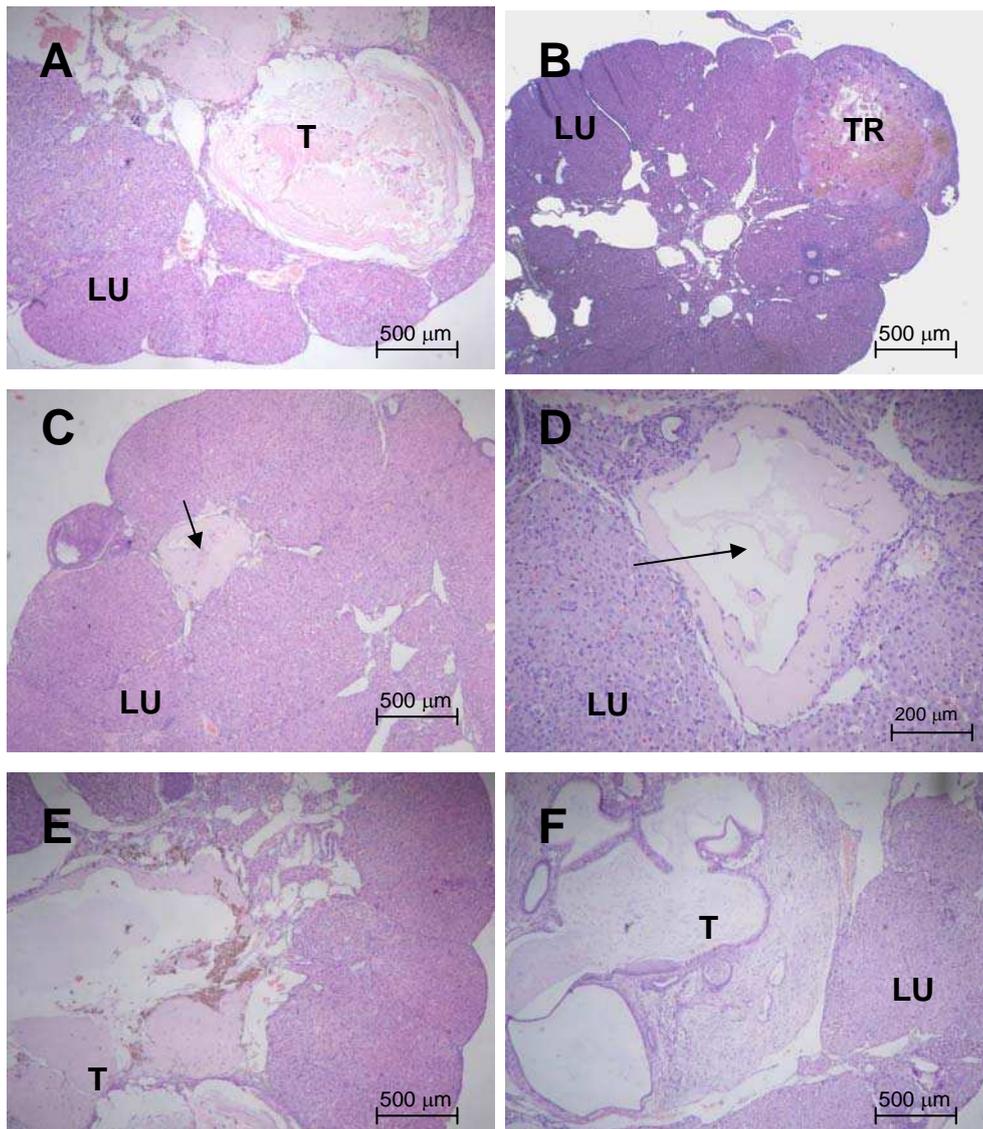
hCG $\alpha\beta$ +F de 12 semanas

Figura 68. A-F) Histología ovárica de hembras hCG $\alpha\beta$ + de 12 semanas de edad tratadas con flutamida (F) durante 10 semanas. T: teratoma, LU: luteinización, TR: células gigantes del trofoblasto, flechas: estructuras hialinizadas. Tinción con hematoxilina y eosina.

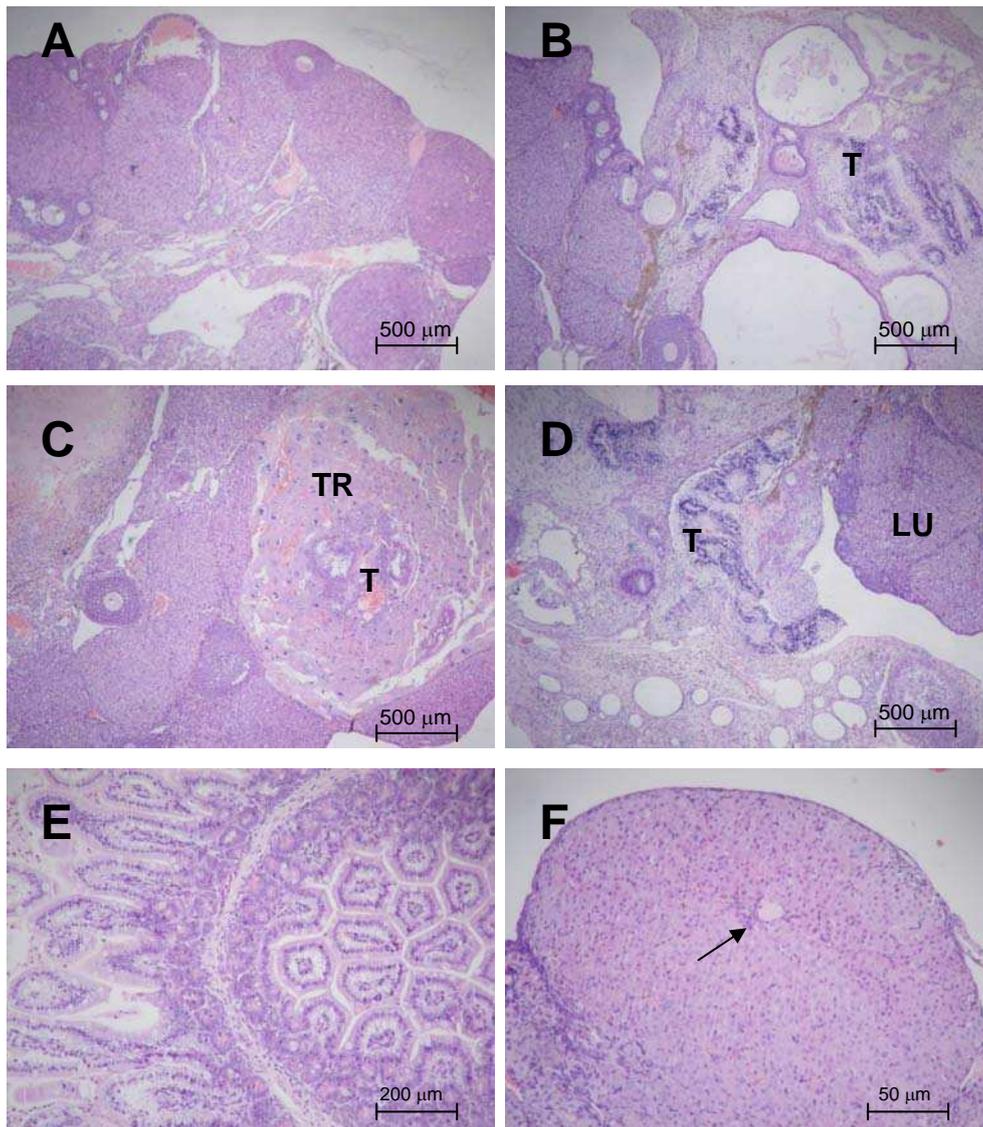
hCG $\alpha\beta$ +Fv de 12 semanas

Figura 69. A-F) Histología ovárica de hembras hCG $\alpha\beta$ + de 12 semanas de edad tratadas con fulvestrant (Fv) durante 10 semanas. T: teratoma, LU: luteinización, TR: células gigantes del trofoblasto, flecha: ovocito atrapado en cuerpo lúteo. Tinción con hematoxilina y eosina.

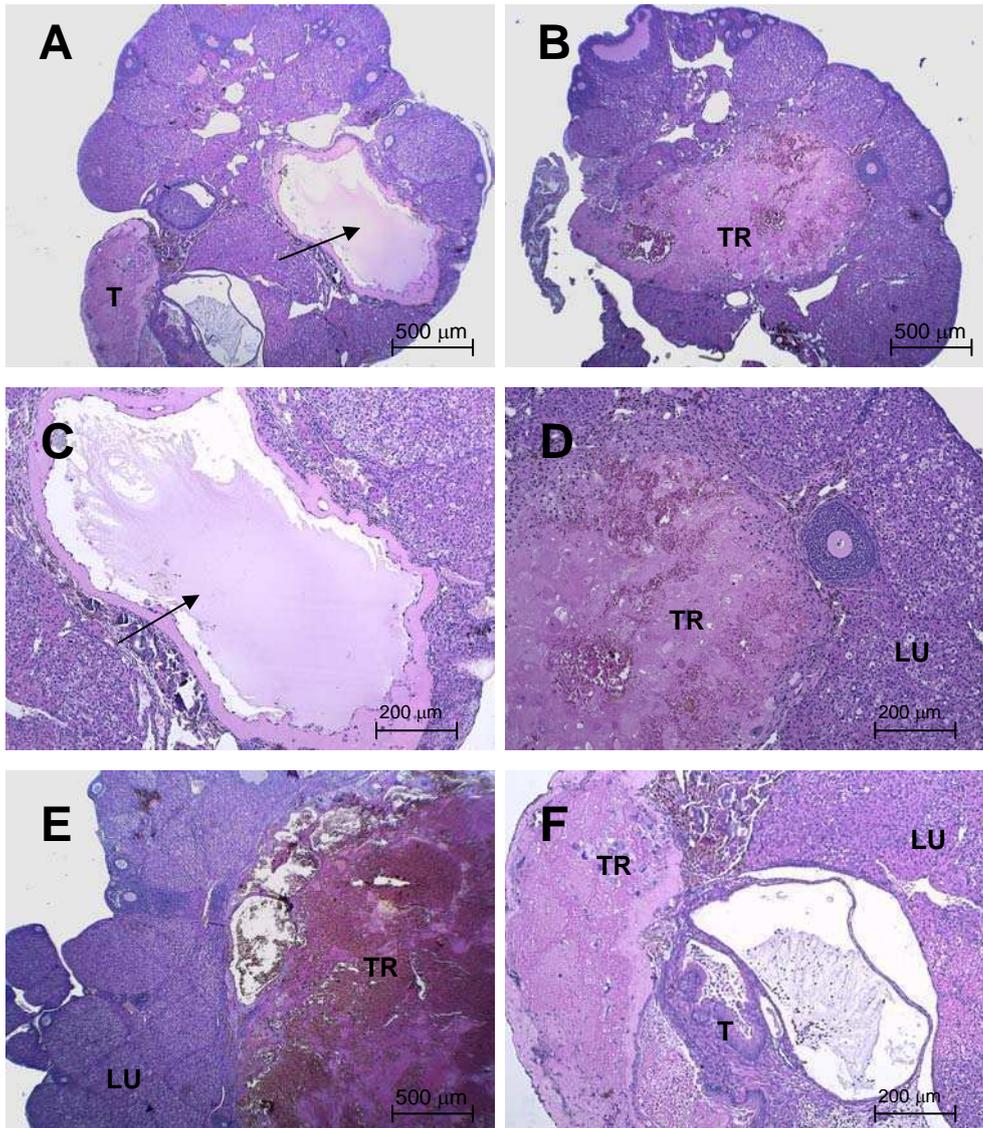
hCG $\alpha\beta$ +FFv de 12 semanas

Figura 70. A-F) Histología ovárica de hembras hCG $\alpha\beta$ + de 12 semanas de edad tratadas con flutamida y fulvestrant (FFv) durante 10 semanas. T: teratoma, LU: luteinización, TR: células gigantes del trofoblasto, flechas: estructuras hialinizadas. Tinción con hematoxilina y eosina.

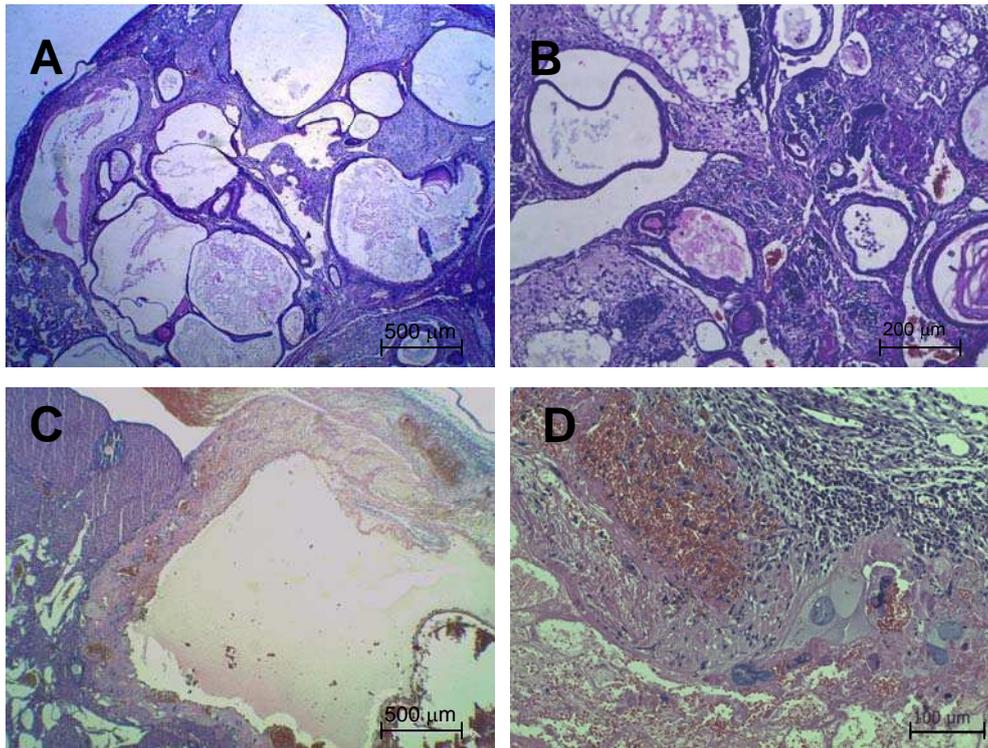
hCG $\alpha\beta$ +Mf de 12 semanas

Figura 71. A-D) Histología ovárica de hembras hCG $\alpha\beta$ + de 12 semanas de edad tratadas con mifepristona (Mf) durante 10 semanas. T: teratoma, LU: luteinización, TR: células gigantes del trofoblasto. Tinción con hematoxilina y eosina.

DISCUSIÓN

El eje HHG es el pilar fundamental en la regulación endocrina de la función reproductiva. Cualquier alteración en el control de las diferentes hormonas o receptores involucrados en el funcionamiento de este eje pueden provocar cambios en el inicio de la pubertad, infertilidad, desarrollo de cáncer, y otras alteraciones relacionadas con niveles elevados o reducidos de hormonas esteroideas (Achermann y Jameson 1999; Themmen y Huhtaniemi 2000). En esta Tesis se estudiaron distintos aspectos de la funcionalidad del eje HHG en un modelo de ratones transgénicos que expresa, desde edades tempranas, elevados niveles de la hormona hCG y desarrolla tumores gonadales. En una primera etapa se caracterizó en profundidad el fenotipo de machos y hembras hCG $\alpha\beta$ +, estudiando parámetros morfológicos como la histología de las gónadas, bioquímicos como los niveles de hormonas esteroideas y proteicas, y moleculares como la expresión génica de marcadores de la función gonadal e hipotálamo-hipofisaria. Los resultados obtenidos en esta primera etapa de caracterización mostraron un marcado dimorfismo sexual en el fenotipo de los ratones hCG $\alpha\beta$ +, donde los machos se vieron severa e irreversiblemente afectados a nivel de la unidad hipotálamo-hipofisaria, y las hembras mostraron signos de pubertad precoz acompañados de alteraciones reversibles en la regulación del eje gonadotrófico. También se observaron diferencias sustanciales a nivel de las gónadas, donde el inicio de la edad reproductiva marcó la remisión de la tumorigénesis testicular y el comienzo de la tumorigénesis ovárica. A partir de estas observaciones, en una segunda etapa se enfocaron los estudios en la regulación del eje HHG en dicho modelo, siendo de particular interés estudiar el rol de los esteroides sexuales en el fenotipo de los machos y hembras hCG $\alpha\beta$ +. Para tal fin, se aplicaron distintos tratamientos antihormonales, o bien se eliminó la fuente de hormonas sexuales por medio de la gonadectomía.

El fenotipo de los machos hCG $\alpha\beta$ +

El tumor de células de Leydig es una rara patología cuya patogénesis no ha sido aún claramente definida. En esta Tesis se mostró la histología del testículo hCG $\alpha\beta$ + a edades representativas de la etapa neonatal, prepuberal y

adulta, observándose una marcada hiperplasia/hipertrofia de las células de Leydig, que a edades muy tempranas responde a las características de adenoma, éste último definido según el criterio en que los islotes de células de Leydig deben presentar un diámetro mayor al del túbulo seminífero (Clegg y col. 1997; Cook y col. 1999). En condiciones normales, las células de Leydig fetales son responsables de la masculinización del feto, y una pequeña población permanece quiescente en el testículo hasta la adultez (Kerr y Knell 1988; Mendis-Handagama y Ariyaratne 2001). Trabajos previos del grupo demostraron que los adenomas de células de Leydig presentes en los machos $hCG_{\alpha\beta+}$ están conformados por células de Leydig fetales (Ahtiainen y col. 2005). En coincidencia con dichas observaciones, otros trabajos demostraron que las células de Leydig fetales son capaces de responder a un estímulo mitogénico de LH/hCG (Kuopio y col. 1989), lo cual explicaría que los adenomas en los machos $hCG_{\alpha\beta+}$ regresionen al comienzo de la edad reproductiva, cuando las células de Leydig adultas se hacen predominantes. Las diferencias funcionales entre las células de Leydig fetales y las adultas podrían explicar por qué sólo las fetales son capaces de responder a LH/hCG desarrollando adenomas, ya que estas células no poseen los mecanismos de regulación por descenso y de desensibilización de LHCGR en respuesta a niveles elevados de LH/hCG (Huhtaniemi y col. 1982; Pakarinen y col. 1990). La importancia fisiológica de esta falta de desensibilización en las células de Leydig fetales sería la de asegurar la producción de los niveles adecuados de testosterona necesarios en la masculinización del embrión.

Algunos estudios sugieren que los estrógenos jugarían un rol clave en el desarrollo de hiperplasia de las células de Leydig (Li y col. 2006; Carpino y col. 2007). Estas observaciones están en concordancia con los niveles elevados de estradiol hallados en los testículos de ratones $hCG_{\alpha\beta+}$ a los 10 días de edad, coincidiendo con el momento descrito como de máxima hiperplasia (Ahtiainen y col. 2005). La producción de testosterona, en cambio, se mantiene elevada durante toda la vida del ratón $hCG_{\alpha\beta+}$. Así, si bien existe una variedad de estudios que muestran la influencia de LH/hCG sobre el desarrollo de hiperplasia y/o adenoma de células de Leydig (Clegg y col. 1997; Cook y col. 1999), es interesante la posible participación de los estrógenos producidos por

el testículo hCG $\alpha\beta$ + en desarrollo bajo el estímulo directo de la acción de hCG. En este sentido, los ratones hCG $\alpha\beta$ + resultan un modelo interesante para estudiar mecanismos estrógeno-dependientes asociados a alteraciones de la función testicular durante el desarrollo.

Varias líneas de evidencia indican que las hormonas esteroideas producidas por las gónadas en desarrollo son capaces de programar la función neuroendócrina y el comportamiento de machos y hembras. Estos procesos pueden alterarse durante etapas críticas de la diferenciación sexual del cerebro y manifestarse como disfunciones reproductivas en la adultez (Gore 2008). En el presente estudio, se demostró que los machos hCG $\alpha\beta$ + presentan niveles elevados de testosterona y disminuidos de FSH durante toda la vida, como también una falta de respuesta de FSH a la castración y al tratamiento con el antiandrógeno flutamida, tanto en la etapa prepuberal como en la adultez. Estos resultados evidenciaron alteraciones persistentes en la regulación neuroendócrina que controla el eje de las gonadotrofinas. La mayor parte de los estudios se realizaron a la edad de 28 días, debido a que se la considera un momento relevante en la maduración del eje HHG (Ojeda y Skinner 2006). Además, la función del eje a esta edad es dependiente de una programación perinatal adecuada y altamente sensible al efecto de los esteroides sexuales (Navarro y col. 2009).

En los estudios sobre la funcionalidad del eje gonadotrófico en los machos hCG $\alpha\beta$ +, se estudió principalmente la regulación de FSH en lugar de LH, ya que las similitudes de estructura y función entre LH y hCG, junto con los elevados niveles de hCG producidos por los machos hCG $\alpha\beta$ +, dificultan la interpretación de los resultados basados en la secreción de LH. Sin embargo, la expresión génica hipofisaria de *Fshb*, *Lhb* y *Cga* reveló que ambas gonadotrofinas resultaron suprimidas en los machos hCG $\alpha\beta$ + comparados con los WT, indicando que no sólo la producción de FSH sino también la de LH se encuentra afectada en este modelo. Aún más, la expresión de *Esr1*, que es un mediador clave en la regulación negativa de LH por esteroides gonadales (Lindzey y col. 1998), también se encontró disminuida.

En contraste con la función hipofisaria, la función hipotalámica de los machos hCG $\alpha\beta$ + prepúberes resultó activada, observándose una mayor

concentración hipotalámica y un aumento en la frecuencia de pulsos de GnRH *ex vivo*. Existen evidencias de que la capacidad de respuesta de los gonadotropos a GnRH se correlaciona con el número de GnRHR en la hipófisis y la frecuencia hipotalámica de pulsos de GnRH (Meidan y col. 1982). La secreción pulsátil de GnRH en tiempos cortos induce regulación por aumento de GnRHR, mientras que la exposición prolongada a altas concentraciones y/o a una alta frecuencia de pulsos de GnRH induce regulación por descenso del receptor, seguido de supresión de la síntesis y secreción de gonadotrofinas (Conn y col. 1984; Cheng y col. 2000). Se ha demostrado además, que la aplicación de GnRH de manera continua o en pulsos de alta frecuencia induce un aumento en los niveles de ARNm de folistatina en la hipófisis (Kirk y col. 1994). En los machos hCG $\alpha\beta$ +, el aumento en la concentración hipotalámica y la secreción pulsátil de GnRH fue acompañado por un aumento en la expresión de *Fst* y una disminución en la expresión de *Gnrhr* en hipófisis. Es posible, por lo tanto, que la supresión de la producción de gonadotrofinas en los machos hCG $\alpha\beta$ + se deba, al menos en parte, a un aumento en la descarga de GnRH desde el hipotálamo, que induciría una regulación por descenso prematura de *Gnrhr*, y podría alterar el desarrollo y/o funcionalidad de los gonadotropos. Este escenario concuerda con el número reducido de gonadotropos productores de FSH β observado en la hipófisis de los machos hCG $\alpha\beta$ +. En este sentido, estudios previos demostraron que GnRH estimula la capacidad de respuesta y la proliferación de los gonadotropos durante la diferenciación hipofisaria temprana (Kudo y col. 1994; Childs y Unabia 2001). Aún más, se observó que es necesaria una correcta conexión entre el hipotálamo y la hipófisis para el desarrollo de un número normal de tirotropos y gonadotropos durante la gestación tardía en ovinos (Szarek y col. 2008). Recientemente también se demostró que la ausencia de la señalización fetal de GnRH inhibe específicamente el desarrollo de gonadotropos productores de FSH (Wen y col. 2010).

La disparidad observada en el grado de activación de la función hipotalámica, que no se reflejó en una activación del eje gonadotrófico en la hipófisis de los machos hCG $\alpha\beta$ +, sugiere la posibilidad que los efectos estimulatorios a nivel central, manifestados a través de los estudios de

pulsatilidad *ex vivo*, estén enmascarados por los mecanismos de retroalimentación negativa por esteroides a nivel hipofisario. Este tipo de efectos fue observado previamente con tratamientos de esteroides *in vivo*, donde la combinación de estradiol y DHT administrada en machos castrados indujo la activación de las neuronas GnRH, a pesar de los efectos supresores observados sobre la secreción de gonadotrofinas a nivel hipofisario (Pielecka y Moenter 2006). Aún más, se demostró un sinergismo central entre estradiol y DHT sobre el control de la actividad de CYP19 en el hipotálamo de rata (Roselli 1991). Es muy probable que en la unidad hipotálamo-hipofisaria del macho hCG $\alpha\beta$ + se recree un escenario donde los niveles de estradiol y DHT se encuentren elevados, ya que en estos ratones la testosterona está disponible crónicamente y en exceso para ser aromatizada y 5 α -reducida. En este sentido, debe considerarse, además, que la expresión hipotalámica de *Cyp19a1* también se encontró aumentada en el hipotálamo hCG $\alpha\beta$ +

La activación temprana del generador de pulsos de GnRH podría interpretarse como un signo de pubertad precoz en los machos hCG $\alpha\beta$ +. Sin embargo, estudios previos realizados en el modelo no encontraron signos de pubertad precoz, estimados por la edad de ocurrencia de la separación balano-prepucial, a pesar de los niveles elevados de andrógenos presentes en el modelo (Ahtiainen y col. 2005), reforzando el concepto que indica que el inicio de la pubertad es un fenómeno intrínseco del sistema nervioso central, que involucra tanto mecanismos dependientes como también independientes de hormonas gonadales (Foster y col. 2006).

Distintas evidencias sugieren que kisspeptina y su receptor GPR54 son un componente esencial del eje neuroendócrino reproductivo, los cuales actúan sobre la estimulación de la secreción de GnRH que dispara el despertar de la función reproductiva al comienzo de la pubertad (Navarro y col. 2005; Dungan y col. 2006). Distintos estudios mostraron un rol central de kisspeptina como mediador en el mecanismo de retroalimentación negativa de los esteroides gonadales que controlan la secreción de GnRH en ambos sexos (Smith y col. 2005a y b). Recientemente, Navarro y col. (2009) demostraron que la administración neonatal de compuestos estrogénicos resultó en una disminución dosis-dependiente en los niveles de expresión génica de *Kiss1*

tanto en machos como en hembras prepúberes. Los niveles reducidos de la expresión de *Kiss1* detectados en los hipotálamos de machos hCG $\alpha\beta$ + prepúberes concuerdan con la acción supresora de los elevados niveles circulantes de testosterona y de los estrógenos convertidos localmente. Sin embargo, los bajos niveles de expresión de *Kiss1* no explican la concentración y pulsatilidad de GnRH elevadas que se observó en el hipotálamo de los machos hCG $\alpha\beta$ +. Este efecto podría atribuirse a la participación de otros moduladores igualmente implicados en el control de la liberación de GnRH, tales como GABA y glutamato (McCarthy y col. 2002), como también moléculas de señalización derivadas de la glía (Ojeda y col. 2003; García-Segura y col. 2008). Un hecho importante es que los circuitos de neurotransmisores excitatorios y factores trans-sinápticos gliales dependen del modelado ejercido por los esteroides gonadales durante la vida perinatal, que resulta en diferencias dimórficas sobre la arquitectura celular de machos y hembras (Davis y col. 1996; McCarthy y col. 2002; Garcia-Segura y col. 2008).

Si bien el rol inhibitorio de GABA sobre la neurona GnRH está extensamente documentado, se demostró la existencia de un período sensible durante la vida perinatal donde tanto GABA como glutamato son excitatorios, luego del cual GABA lentamente cambia su acción y comienza a mediar procesos inhibitorios (McCarthy 2008). En este sentido, se demostró que el estradiol estimula la síntesis de GABA, y es capaz de extender el tiempo durante el cual este neurotransmisor es excitatorio en células hipotalámicas en cultivo (McCarthy y col. 2002). Se detectó, en hipotálamos de machos hCG $\alpha\beta$ + de 4 días de edad, niveles elevados de *Gad67*, la enzima limitante en la síntesis de GABA. Estos datos sugieren que la testosterona crónicamente elevada y/o sus metabolitos podrían estar alterando los circuitos excitatorios durante la vida perinatal, causando la aceleración de la pulsatilidad de GnRH en la edad prepuberal.

Además de la capacidad de los esteroides gonadales de alterar parámetros de la neurotransmisión GABAérgica y glutamatérgica durante la vida perinatal, se demostró que el estradiol es capaz de modular la funcionalidad de las células de la glía en el núcleo arcuato, alterando su morfología y sus acciones neuroplásticas, lo que conduce a alteraciones en las

sinapsis (García-Segura y col. 2008). Finalmente, las neuronas GnRH expresan ER β y LHCGR (Mores y col. 2006; Chu y col. 2009), por lo que la presencia de niveles elevados de agonistas podría estar alterando la fisiología de dichas neuronas. Investigaciones futuras se dirigirán a determinar si algunos de los factores previamente mencionados están compensando los niveles disminuidos de expresión de *Kiss1* y son la causa principal de la activación prematura de la neurona GnRH en los machos hCG $\alpha\beta$ +

Tratamientos *in vivo* en los machos hCG $\alpha\beta$ +

Uno de los hallazgos más sorprendentes en los machos hCG $\alpha\beta$ +

 fue la inhibición de la síntesis de gonadotrofinas, independientemente de los esteroides gonadales, evidenciada por la falta de respuesta de FSH a la liberación de la regulación negativa por medio de la castración o del tratamiento con flutamida, tanto en la prepubertad como en la adultez. Incluso los niveles de expresión de *Fshb*, *Lhb* y *Cga* permanecieron bajos luego de dos semanas de castración. En contraste, la frecuencia acelerada de los pulsos de GnRH en los machos hCG $\alpha\beta$ + se normalizó luego de la castración, indicando que, a diferencia de la regulación de las gonadotrofinas, el aumento de la pulsatilidad de GnRH estaría influenciado por señales de origen gonadal. Por el contrario, cuando el tratamiento con flutamida se inició el DG18 y se mantuvo hasta los 28 días de edad en los machos hCG $\alpha\beta$ +, ocurrió una recuperación parcial de la síntesis y secreción de FSH, que fue acompañada por un aumento en la expresión hipofisaria de *Gnrhr*. Estos resultados sugieren la existencia de una ventana de tiempo crítica en la vida perinatal, donde los andrógenos determinarían el nivel de activación del eje HHG. Durante este período, niveles elevados de andrógenos serían capaces de inducir un apagado irreversible de la diferenciación de los gonadotropos, junto con la síntesis y secreción de gonadotrofinas, procesos en los cuales la regulación de GnRHR juega un rol clave (Wen y col. 2010). Estos resultados sugieren que el exceso de andrógenos durante la vida perinatal/infantil es capaz de perturbar de manera permanente la programación del eje reproductivo, y podría ser la causa fundamental de la infertilidad en los machos hCG $\alpha\beta$ +, ya que el tratamiento con flutamida a partir de los 14 días de edad no fue capaz de restaurar la fertilidad.

En las hembras, está bien establecido que la exposición temprana a andrógenos provoca profundas alteraciones sobre el control neuroendócrino de los ciclos reproductivos en la adultez, lo que conduce a la pérdida de la capacidad de generar picos ovulatorios de GnRH/LH y a la infertilidad (Robinson 2006). En los machos, la posible influencia de niveles elevados de andrógenos ha sido poco explorada, probablemente debido a que están normalmente expuestos a andrógenos desde etapas muy tempranas del desarrollo fetal. Este trabajo pone de manifiesto que en los machos, la exposición a un exceso de andrógenos durante etapas claves del desarrollo bien podría ser causa de infertilidad en la adultez.

La administración de flutamida a machos hCG $\alpha\beta$ + desde el DG18 demostró una inducción directa de los andrógenos a través de su receptor, sobre la expresión de *Cyp19a1* hipotalámica en la edad prepuberal, sugiriendo que junto con los andrógenos de origen gonadal, la conversión hipotalámica a estrógenos podría ser clave en los mecanismos de supresión de gonadotropinas en los machos hCG $\alpha\beta$ +. *Cyp19a1* no se encontró aumentada a los 4 días de edad, lo cual nos lleva a especular que la acción de los andrógenos elevados sobre la expresión de *Cyp19a1* hipotalámica sólo se hace evidente, al menos en términos de expresión génica, en un evento posterior a la ventana perinatal de diferenciación. En este sentido, ha sido demostrado que la expresión de *Cyp19a1* hipotalámica está aumentada en coincidencia con los picos de testosterona perinatales (Colciago y col. 2005).

El hecho que la recuperación de FSH luego del tratamiento antiandrogénico perinatal fue parcial, sugiere un bloqueo incompleto de la acción androgénica por flutamida, o la intervención de otros mecanismos además de los andrógenos, probablemente mediados por el estradiol producido localmente a través de la activación de ambos ER (Lindzey y col. 1998; Chu y col. 2009). De hecho, la aromatización hipotalámica de testosterona sería un pre-requisito en la regulación mediada por estrógenos, debido a que el estradiol producido perinatalmente fuera del sistema nervioso central no estaría biodisponible debido a su unión a α -fetoproteína en suero (De Mees y col. 2006).

Resulta interesante que los modelos transgénicos de sobreexpresión de LH/hCG o de activación constitutiva de LHCGR presentaron niveles deprimidos de FSH y peso testicular reducido (Rulli y col. 2003; Matzuk y col. 2003; Meehan y col. 2005). Estos estudios muestran por primera vez que los bajos niveles de FSH asociados a la acción crónica y elevada de LH/hCG no se deberían a la retroalimentación negativa ejercida por los elevados niveles de esteroides gonadales, sino a una falla en la impronta perinatal ejercida por los altos niveles de andrógenos y/o sus metabolitos sobre la unidad hipotálamo-hipofisaria. Investigaciones recientes identificaron la presencia de compuestos químicos en el medio ambiente con capacidad de mimetizar a los andrógenos en sus mecanismos de señalización (Gray y col. 2006; Khalaf y col. 2009). Debido a que la infertilidad idiopática en las parejas es relativamente alta (Dey 2010), la posibilidad de que la exposición a concentraciones anormales de esteroides o compuestos con actividad esteroidea durante la gestación sea responsable de la perturbación en el control neuroendócrino de la reproducción masculina debería ser considerada en mayor profundidad en humanos. En este sentido, el modelo $hCG_{\alpha\beta+}$ es una valiosa herramienta para investigar nuevos mecanismos mediados por los andrógenos y sus metabolitos en la (des)regulación del eje reproductor masculino.

El fenotipo de las hembras $hCG_{\alpha\beta+}$

La caracterización del fenotipo en las hembras $hCG_{\alpha\beta+}$ a distintas edades ha permitido analizar el impacto que ejerce la estimulación persistente y elevada por hCG sobre el ovario, y cuáles son los efectos sobre el eje reproductivo. La hipersecreción crónica de hCG en las hembras $hCG_{\alpha\beta+}$ provocó cambios significativos en la estructura y funcionalidad del ovario desde edades tempranas, que culminaron en el desarrollo de tumores de ovario con características de teratomas al inicio de la edad reproductiva. Estos eventos fueron acompañados de profundas alteraciones en el perfil hormonal, pubertad precoz e infertilidad.

Los elevados niveles de hCG circulantes provocaron perturbaciones en la capacidad esteroideogénica del ovario desde edades tempranas. Los estudios de expresión génica revelaron signos de activación del ovario $hCG_{\alpha\beta+}$ a las 2

semanas de edad, detectándose niveles de expresión elevados de *Lhcgr* y también de la enzima clave en la vía esteroidogénica *Cyp11a1*. Estudios previos en otros modelos animales mostraron que niveles elevados de LH, inducen un aumento en la expresión de su propio receptor *Lhcgr* en el ovario inmaduro (Couse y col. 1999), y que el tratamiento con gonadotrofinas induce un aumento en la expresión de CYP11A en ovarios de ratas prepúberes (Zlotkin y col. 1986). La inmunomarcación para CYP11A mostró que la fuente activa de esteroidogénesis en los ovarios hCG $\alpha\beta$ + de esta edad son las células de la teca, indicando que estas células serían las responsables de proveer los andrógenos necesarios para la síntesis de estrógenos y, en consecuencia, el desarrollo del folículo en etapas tempranas de maduración folicular.

En coincidencia con la edad precoz en el inicio de la pubertad en estos animales, determinada por la ocurrencia de la apertura vaginal, se demostró un aumento en los niveles de testosterona, progesterona y estradiol a las 3 semanas de edad. Los niveles elevados de estradiol explicarían el aumento observado en el peso uterino y en los niveles circulantes de prolactina a esta edad (Freeman y col. 2000). La disminución en los niveles de FSH también se debería a la retroalimentación negativa ejercida por los esteroides gonadales a nivel de la unidad hipotálamo-hipofisaria. Se observó además, la ocurrencia de ovarios agrandados con cambios estructurales muy marcados, tales como la presencia de folículos antrales, muchos de ellos atrésicos, quistes hemorrágicos y estructuras prematuramente luteinizadas. Estos cambios estructurales fueron acompañados de un aumento significativo en la expresión de las enzimas involucradas en la síntesis de progesterona, testosterona y estradiol, *Cyp11a1*, *Cyp17a1* y *Cyp19a1*, y también de *Lhcgr*. Por otra parte, *Ptgs2*, la enzima clave en la síntesis de prostaglandinas, también resultó estimulada en los ovarios hCG $\alpha\beta$ + inmaduros. El fenotipo descrito para los ovarios hCG $\alpha\beta$ + a esta edad presenta características típicas de un ovario poliquístico (PCO), que en humanos se caracteriza por aumento en el peso ovárico, niveles elevados de testosterona, folículos quísticos y hemorrágicos en presencia de una capa disminuida de células de la granulosa y una capa engrosada de células de la teca, ocasionalmente con células sanguíneas en el fluido intrafolicular, y atresia elevada, entre otras características (Franks 1995;

Nelson y col. 2001; Carmina y col. 2005). Coincidiendo con el escenario observado en las hembras hCG $\alpha\beta$ +, se ha descrito que el desarrollo de PCO en humanos está frecuentemente asociado a niveles elevados de LH y andrógenos durante el desarrollo puberal (Franks 1995; Gilling-Smith y col. 1997). Una diferencia importante entre esta condición y lo observado en nuestro modelo son los niveles séricos de progesterona, que en las hembras hCG $\alpha\beta$ + resultaron significativamente elevados, mientras que en la patología humana los mismos suelen estar disminuidos, ya que no se llegan a formar cuerpos lúteos por su condición anovulatoria (Meenakumari y col. 2004). Esta diferencia se debería a que los niveles masivos de hCG circulante estarían forzando una luteinización prematura e induciendo la producción de progesterona, a pesar de la anovulación. La acción luteotrófica de la prolactina estaría favoreciendo la formación de áreas luteinizadas en el ovario hCG $\alpha\beta$ +. Así, la condición de PCO en estos animales es transitoria y se limita a la edad del inicio de la pubertad, ya que posteriormente el ovario se luteiniza y sólo perduran algunos quistes ocasionales. Se han desarrollado distintos modelos de PCO en ratas y primates, tales como a través de la administración de estradiol, testosterona, DHT, DHEA o inhibidores de aromatasa (Eisner y col. 2002; Kafali y col. 2004; Beloosesky y col. 2004; Mannerås y col. 2007). Debido a la etiología multifactorial de esta patología, ninguno ha logrado mimetizar completamente las características del PCOS humano. Sin embargo, todos ellos son de utilidad para avanzar en el entendimiento de esta patología y en el abordaje de nuevos tratamientos.

La regulación de la unidad hipotálamo-hipofisaria también resultó afectada en las hembras hCG $\alpha\beta$ +. Alrededor de las 2 semanas de edad, las hembras murinas normalmente presentan un pico de FSH (Dullaart y col. 1975), el cual se encontró alterado en las hembras hCG $\alpha\beta$ +. A las 3 semanas de edad, los bajos niveles séricos e intrahipofisarios de FSH fueron acompañados de una reducción en la expresión de *Lhb*, *Fshb*, *Cga* y *Gnrhr* en hipófisis. En el hipotálamo, se detectaron niveles elevados de *Kiss1* en el hipotálamo anterior, mientras que en el hipotálamo medio basal-posterior se observó una tendencia a la disminución que no fue estadísticamente significativa. Se ha demostrado previamente que la administración de estradiol

a hembras ovariectomizadas es capaz de estimular la expresión de *Kiss1* en el AVPV, localizado en el hipotálamo anterior, y de disminuirla en el núcleo arcuato, localizado en el hipotálamo medio basal-posterior (Smith y col. 2005a). En las hembras hCG $\alpha\beta$ + se observó esta misma tendencia, que podría explicarse por los niveles elevados de estradiol hallados a esta edad.

Estudios previos indican que la administración de estradiol a hembras inmaduras adelanta la edad de la apertura vaginal, y estimula la pulsatilidad de GnRH (Matagne y col. 2004). Si bien aún no está esclarecido si en el modelo de hembras hCG $\alpha\beta$ + se producen alteraciones en la secreción pulsátil de GnRH, los resultados sugieren que la ocurrencia de pubertad precoz en estos animales podría estar en relación a los niveles elevados de estradiol hallados a las 3 semanas de edad. El análisis de la expresión génica de *Gnrh* en ambas áreas hipotalámicas mostró un aumento en el hipotálamo medio-basal de las hembras hCG $\alpha\beta$ +, a niveles comparables con los hallados en las hembras WT ovariectomizadas. Un efecto de la remoción de los esteroides gonadales mediante la ovariectomía es la pérdida de la retroalimentación negativa a nivel central, y el consecuente aumento de la frecuencia de pulsos de GnRH (Levine y Ramirez 1980). En este sentido, el aumento en la expresión génica de *Gnrh* en las hembras WT ovariectomizadas y en las hCG $\alpha\beta$ + sugiere, nuevamente, que la pulsatilidad de GnRH bien podría estar alterada en el modelo de hembras transgénicas. Un aumento en la frecuencia de pulsos de GnRH explicaría los niveles disminuidos de *Gnrhr* en la hipófisis hCG $\alpha\beta$ +, a través de la regulación por descenso (Mo y col. 2010). Por último, es importante destacar que además del estradiol, las hembras hCG $\alpha\beta$ + también presentan niveles elevados de testosterona, progesterona y prolactina, las cuales también podrían estar contribuyendo al fenotipo alterado de la unidad hipotálamo-hipofisaria a las 3 semanas de edad.

En contraste con el fenotipo observado en los machos, las hembras hCG $\alpha\beta$ + fueron capaces de responder a la ovariectomía con un aumento en los niveles séricos de FSH y en la expresión hipofisaria de *Fshb*, *Lhb*, *Cga*, y también de *Fst*. Además, la ovariectomía logró normalizar la expresión de *Kiss1* en el hipotálamo anterior, y de elevarla en el hipotálamo medio basal-posterior. El dimorfismo sexual que mostraron los ratones hCG $\alpha\beta$ + frente a la respuesta

de la unidad hipotálamo-hipofisaria a la gonadectomía podría deberse a diferencias en el momento en que la hipersecreción de hCG comienza a estimular la esteroidogénesis gonadal, considerando que en el testículo, *Lhcgr* se expresa a partir del DG16 (O'Shaughnessy y col. 1998), mientras que en el ovario aparece posteriormente, alrededor del DPN5 (O'Shaughnessy y col. 1997). Esto conllevaría a alteraciones funcionales irreversibles ocurridas durante el período prenatal/postnatal temprano en los machos, y reversibles durante el desarrollo postnatal tardío en las hembras.

Hacia las 6 semanas de edad se observó un cambio en el fenotipo ovárico de las hembras hCG $\alpha\beta$ +. Así, en lugar del predominio de folículos atrésicos y quistes hemorrágicos, los ovarios presentaron luteinización masiva, en muchos casos con el ovocito atrapado en los cuerpos lúteos, indicativo de fallas en la ovulación. Este cambio estructural del ovario fue acompañado de niveles séricos elevados de progesterona y testosterona. A esta edad no se observaron diferencias en los niveles de expresión de *Cyp11a1*, *Cyp17a1* y *Cyp19a1* entre los genotipos. Esto podría deberse a que en las hembras WT, al haber completado el desarrollo puberal e incrementado su capacidad esteroidogénica, la expresión génica de las distintas enzimas relacionadas alcanzaron niveles comparables a los detectados en los ovarios hCG $\alpha\beta$ +. Por otra parte, la reducción en la expresión génica del marcador de foliculogénesis *Esr2* estaría reflejando alteraciones en la proporción de estructuras foliculares en los ovarios hCG $\alpha\beta$ +, ya que *Esr2* se expresa exclusivamente en las células de la granulosa de folículos en crecimiento y es regulado negativamente por LH/hCG (Byers y col. 1997; Jefferson y col. 2000). La disminución en la expresión de *Esr2* y la normalización de los niveles de *Lhcgr* en el ovario hCG $\alpha\beta$ + a las 6 semanas de edad resulta interesante, ya que se demostró que tanto la presencia de ER β (Couse y col. 2004) como niveles elevados de *Lhcgr* (Schomberg y col. 1998) son necesarios para que se desarrollen folículos quísticos y hemorrágicos mediados por LH. En este sentido, junto con la caída de *Esr2* y la normalización de *Lhcgr* se observó la desaparición del fenotipo folicular quístico y hemorrágico, que fue reemplazado por una luteinización generalizada. Por otra parte, *Ptgs2* alcanzó niveles de expresión elevados, a pesar de la condición anovulatoria de estas hembras. Dicha expresión tan

aumentada de *Ptgs2* podría deberse a la luteinización masiva que presenta el ovario hCG $\alpha\beta$ +, ya que se demostró que las células luteales también expresan esta enzima, la cual es inducida por PGF $_{2\alpha}$ en el cuerpo lúteo de ratas pseudopreñadas (Taniguchi y col. 2010). Se ha demostrado además que *Ptgs2* se encuentra aumentada en condiciones patológicas como en la inflamación aguda y distintos tipos de cáncer, donde es estimulada por citoquinas proinflamatorias en una variedad de tipos celulares como en células endoteliales, monocitos/macrófagos, osteoblastos, etc (Crofford 1997; Simon 1999).

Uno de los eventos más significativos ocurridos en el ovario hCG $\alpha\beta$ + a esta edad fue la aparición de los primeros signos de desarrollo tumoral, evidenciados por la presencia de ovocitos atípicos y de células gigantes del trofoblasto, las cuales fueron identificadas por inmunotinción positiva con PL-1, VEGF y PIGF (Yamaguchi y col. 1994; Zhou y col. 2003). La aparición de estas células como primer evento en el inicio del teratoma cumpliría un rol fundamental en la promoción del crecimiento tumoral, aportando factores angiogénicos y vasoactivos como PIGF y VEGF. El aporte de estos factores conduciría a la formación de grandes lagunas sanguíneas, permitiendo la rápida proliferación y diferenciación de los tejidos de origen embrionario que conforman el teratoma.

A partir de las 8 semanas de edad, las hembras hCG $\alpha\beta$ + presentaron tumores sólidos compuestos por distintos tejidos derivados de las tres capas embrionarias, característicos de los teratomas en estadios avanzados de diferenciación. Los teratomas se localizaron exclusivamente en el ovario, bilateralmente y con una penetrancia del 100%. A partir de esta edad se observó también un aumento en el peso corporal e hipofisario, y en los niveles séricos de prolactina, acompañados de niveles elevados de progesterona y testosterona sérica. Este perfil coincide con el modelo de sobreexpresión de hCG β , donde las hembras presentan, además de una activa esteroidogénesis gonadal, hiperprolactinemia y desarrollo de prolactinomas a edades avanzadas, como efecto de los elevados esteroides gonadales sobre las células lactotropas (Rulli y col. 2002; Ahtiainen y col. 2010). Este mecanismo contribuiría al mantenimiento de la masiva luteinización del ovario transgénico remanente, a través de las conocidas propiedades luteotróficas de la prolactina.

Debido a su condición única de totipotencialidad, los teratomas se originan a partir de la activación partenogenética de los ovocitos dentro del ovario, donde la división mitótica comienza antes que la meiosis se haya completado (Linder 1975; Mutter 1987). Así, la causa de la aparición de estos tumores ha sido históricamente vinculada a aberraciones durante la división meiótica (Mutter 1987; 1997). Sin embargo, los mecanismos que desencadenan este evento en el modelo hCG $\alpha\beta$ + son desconocidos. Dado que no ha podido demostrarse la presencia de LHCGR en ovocitos o en las células del cumulus (Peng y col. 1991), se sugiere una acción indirecta de hCG, mediada por esteroides intraováricos o péptidos con acción paracrina/autocrina provenientes de las células de la teca, granulosa o luteales, que son los tipos celulares respondedores a LH/hCG en el ovario. Así, la hiperestimulación de hCG estaría induciendo una respuesta funcional aberrante sobre las células del ovario, afectando el normal desarrollo de los folículos, que finalmente derivarían en la activación prematura del ovocito y subsecuente formación del teratoma. En este sentido, los primeros signos de activación atípica se han observado en ovocitos rodeados de células luteinizadas, sugiriendo que la comunicación con estas células puede tener un rol clave en el destino del ovocito. Es posible que un entorno de luteinización masiva estaría creando un ambiente permisivo para que el ovocito reanude la meiosis y se active partenogenéticamente, ya que en ningún caso se observó activación tumoral en edades más tempranas, cuando aún está presente el fenotipo de poliquistosis. En este sentido, el reinicio de la meiosis ocurre luego de una caída en la concentración intraovocitaria de AMPc, la cual está regulada tanto por la producción local de AMPc como por las comunicaciones célula-célula dentro del folículo (Jones 2008). Así, la luteinización prematura podría construir una barrera mecánica, probablemente a través de la remoción de las uniones que conectan a las granulosa murales, impidiendo el pasaje de AMPc hacia el ovocito (Sela-Abramovich y col. 2006; Norris y col. 2008) e induciendo de este modo la maduración del mismo sin que ocurra la ovulación. Coincidiendo con estas observaciones, estudios previos en la cepa murina LT/Sv mostraron que ovocitos de folículos con un número deficiente de células de la granulosa tienen una incidencia alta de activación partenogenética y potencial desarrollo de teratomas (Stevens y Varnum 1974; Eppig 1982; Eppig y col. 1996).

En la clínica, los teratomas ováricos ocurren en un amplio rango de edades, pero presentan mayor incidencia durante los años reproductivos (Ulbricht 2004). De manera similar, el crecimiento neoplásico en las hembras hCG $\alpha\beta$ + coincidió con el comienzo de la edad reproductiva, indicando que los cambios hormonales asociados al desarrollo puberal podrían ser críticos en la tumorigénesis de las células germinales. A pesar de que estudios epidemiológicos no encontraron factores causales, y que las conexiones genéticas con esta condición son débiles (Brooke y col. 2006), se han reportado casos describiendo el desarrollo de lesiones ováricas y de teratomas quísticos de rápido crecimiento durante la preñez (Patacchiola y col. 2005; Kumar y col. 2006; Donnadieu y col. 2006), sugiriendo nuevamente caminos mediados hormonalmente hacia el desarrollo tumoral. Siguiendo esta línea de razonamiento nos propusimos estudiar el rol de los esteroides gonadales en el inicio y progresión del teratoma, a través de la administración de antagonistas selectivos para AR, ER y PR desde la temprana edad de 2 semanas, y estudiando los dos momentos característicos del desarrollo tumoral: la aparición de células gigantes del trofoblasto a las 6 semanas de edad, como primeros signos de la activación tumoral, y el desarrollo de la masa tumoral a la edad de 12 semanas.

Tratamientos in vivo en las hembras hCG $\alpha\beta$ +

Tanto los tratamientos individuales con el antiandrógeno flutamida y el antiestrógeno fulvestrant, como el tratamiento combinado de ambos, provocaron una disminución significativa en el peso del ovario hCG $\alpha\beta$ + a las 6 semanas de edad. A las 12 semanas se observó esta tendencia con todos los tratamientos, incluido el tratamiento antiprogestagénico con mifepristona. Si bien no se logró prevenir la aparición del tumor, ya que en todos los casos se detectó la presencia de tejidos diferenciados a las 12 semanas de edad, se observaron diferencias morfológicas significativas en los ovarios hCG $\alpha\beta$ + tratados, en comparación con los controles, en las dos edades analizadas.

A las 6 semanas de edad, la aparición de células gigantes del trofoblasto y la formación de lagunas hemorrágicas resultaron reducidas en los ovarios sometidos a los tratamientos individuales con flutamida o fulvestrant, mientras

que, en el tratamiento combinado, no se llegaron a detectar dichos focos de diferenciación. La presencia limitada de estas células y del edema que las acompaña, podría explicar la reducción en el peso ovárico observado a esta edad. En contraste, el tratamiento con mifepristona no tuvo un efecto evidente sobre la morfología del ovario transgénico a las 6 semanas. De los resultados obtenidos se infiere que el bloqueo de la señalización de AR y/o ER estaría afectando la progresión tumoral en etapas iniciales de la diferenciación de los tejidos, cuando las células gigantes del trofoblasto y estructuras que se asemejan a embriones post-implantatorios se hacen presentes en el ovario transgénico control.

Al analizar la expresión génica de marcadores de la función ovárica en hembras hCG $\alpha\beta$ + tratadas con flutamida, se observó que el tratamiento antiandrogénico indujo un aumento en la expresión de *Cyp17a1*, sin observarse cambios en el resto de los marcadores de esteroidogénesis, foliculogénesis y ovulación. Esta misma enzima resultó aumentada en folículos de ratones *knock-out* para ER α , y en folículos incubados *in vitro* con fulvestrant o inhibidores de CYP19 (Taniguchi y col. 2007). Esto llevó a los autores a proponer la existencia de una retroalimentación negativa corta dentro del folículo, donde los estrógenos producidos por las células de la granulosa modularían negativamente la producción de andrógenos por las células de la teca, a través de una inhibición de la expresión de *Cyp17a1*. En las hembras hCG $\alpha\beta$ +, donde la producción de andrógenos se encuentra crónicamente estimulada por hCG, el aumento de *Cyp17a1* luego del bloqueo de AR podría deberse a una alteración en la relación andrógenos/estrógenos intrafolicular. Dicho efecto es factible, ya que los andrógenos, actuando a través de AR en las células de la granulosa, aumentan la producción de estrógenos en respuesta a la estimulación con FSH (Hillier y De Zwart 1981; Hillier y Tetsuka 1997). Inhibiendo tanto la acción de AR como de ER, el sistema tendería a compensar el desbalance hormonal a través de la modulación de la expresión de *Cyp17a1* y la producción de andrógenos, estando disponibles en mayor o menor medida para ser aromatizados a estrógenos. Es importante destacar que en el tratamiento combinado no se detectaron focos de diferenciación a las

6 semanas de edad, lo que sugiere que la combinación de ambos tratamientos sería más efectiva en inhibir el desarrollo del tumor.

Estudios previos mostraron que los andrógenos ejercen un rol en la diferenciación de tejidos durante el desarrollo embrionario temprano, previo a la diferenciación sexual (Goldman-Johnson y col. 2008). También se describió que el tratamiento de embriones pre-implantatorios con hidroxiflutamida, un metabolito de la flutamida que posee actividad antiandrogénica, provoca una inhibición dosis-dependiente en el desarrollo embrionario *in vitro*, la cual es revertida por el agregado de testosterona (Yallampalli y col. 1993). Estos estudios sugieren que el bloqueo de AR afectaría el desarrollo de tejidos embrionarios, y podrían explicar los cambios en la morfología del tumor observada con los tratamientos antiandrogénico y combinado a las 12 semanas de edad. En esta etapa, el tratamiento con flutamida, sola o en combinación con fulvestrant, provocó una disminución evidente en la proliferación y diferenciación tisular, observándose además la presencia de estructuras hialinizadas en zonas de activación tumoral, indicativas de procesos degenerativos. Se observó, además, que la flutamida alteró la morfología de las células gigantes del trofoblasto, las cuales presentaron el citoplasma rosado y los núcleos compactos. Estos resultados sugieren que el tratamiento sostenido con flutamida no sólo sería capaz de afectar la diferenciación tisular, sino también podría alterar la funcionalidad de las células gigantes del trofoblasto. Dicho efecto podría deberse a una inhibición en la producción de factores angiogénicos y la formación de lagunas sanguíneas, que proveerían al tumor de los nutrientes y factores necesarios para su rápido crecimiento.

La expresión de VEGF es normalmente inducida por hormonas sexuales, y muestra una clara correlación con la densidad de vasos sanguíneos, mediando la neoangiogénesis necesaria para el crecimiento de tumores (Hoeben y col. 2004). En tumores mamarios dependientes de estrógenos, se observó que el estradiol induce la producción de VEGF, mientras que el tratamiento con un antiestrógeno lo inhibe (Dabrosin y col. 2003; Garvin y Dabrosin 2003). Lo mismo se observó en tumores mamarios que expresan PR, donde el tratamiento con progestinas induce la expresión de VEGF y estimula la proliferación de células endoteliales y tumorales (Liang y Hyder 2005; Benakanakere y col. 2006). En un tumor dependiente de

andrógenos, se demostró que la castración indujo una regresión tumoral asociada a apoptosis de las células endoteliales, reduciendo la vasculatura tumoral y la expresión de VEGF (Jain y col. 1998). Tanto las células endoteliales como las células musculares lisas vasculares expresan ER, AR y PR, y numerosas evidencias indican que los esteroides sexuales ejercen efectos sobre los vasos sanguíneos (Orshal y Khalil 2004).

Resulta interesante que todos los tratamientos antihormonales hayan provocado una reducción significativa en el peso ovárico, previniendo el crecimiento explosivo del tumor observado en el ovario transgénico control. Esto podría deberse a cambios en el microambiente hormonal del ovario atípico, desencadenados por los distintos tratamientos. Un microambiente hormonal alterado podría afectar tanto a los vasos sanguíneos que alimentan el tumor, como directamente a los tejidos en desarrollo, ya que las hormonas esteroideas regulan una variedad de procesos fisiológicos que incluyen la diferenciación y homeostasis tisular. Estudios desarrollados por Sung y col. (2002), demostraron la producción de hormonas como estradiol, testosterona y progesterona por células embrionarias pluripotentes y cuerpos embrionarios, producidos *in vitro* a partir de la diferenciación de dichas células. Posteriormente, se observó que tanto las células embrionarias pluripotentes, como los cuerpos embrionarios expresan ER α , ER β y PR, y el tratamiento con hormonas esteroideas modula la proliferación y diferenciación de estas células hacia los distintos tejidos (Hong y col. 2004; Han y col. 2006). Estos estudios son particularmente relevantes para la interpretación del modelo hCG $\alpha\beta$ +, ya que las células embrionarias pluripotentes originan teratomas cuando son inoculadas en animales inmunosuprimidos (Li y col. 2009). Además, tanto la formación de teratomas *in vivo* como de cuerpos embrionarios *in vitro*, representan modelos de diferenciación tisular caótica, distinto de lo que ocurre en el desarrollo embrionario normal.

Los resultados obtenidos con los tratamientos *in vivo* indican que el fenotipo observado sobre el funcionamiento de la unidad hipotálamo-hipofisaria de las hembras hCG $\alpha\beta$ + se debe al impacto de hCG sobre la esteroidogénesis ovárica, ya que la ovariectomía fue capaz de revertir los efectos observados. En la tumorigénesis ovárica, por el contrario, el bloqueo de la acción

androgénica, estrogénica o progestagénica de las hembras hCG $\alpha\beta$ + no logró impedir la activación partenogenética del ovocito, indicando que, o bien el bloqueo de la acción de las diferentes hormonas ováricas no fue completo, o que este evento estaría influenciado por otros mecanismos desconocidos. Como se mencionó previamente, LHCGR comienza a expresarse en el ovario a partir del DPN5, mientras que los tratamientos antihormonales comenzaron a la edad de 2 semanas. Esto implica que no es posible descartar un impacto temprano de la hipersecreción de hCG, ejerciendo una impronta aberrante sobre la fisiología ovárica que se manifiesta al comienzo de la vida adulta a través del desarrollo tumoral.

Si bien los tratamientos antihormonales no lograron impedir la activación teratogénica, los mismos tuvieron un claro efecto sobre la progresión tumoral, frenando el crecimiento explosivo del teratoma. Estos resultados muestran una clara relación entre un perfil esteroideogénico alterado y la progresión de la teratogénesis ovárica.

CONCLUSIONES

En conjunto, los resultados obtenidos en esta Tesis Doctoral permiten extraer las siguientes conclusiones:

- La caracterización del fenotipo de los machos hCG $\alpha\beta$ + mostró profundas alteraciones sobre la regulación neuroendócrina del eje gonadotrófico, con niveles elevados de testosterona y disminuidos de FSH durante toda la vida del animal. Mientras que la función hipofisaria de los machos hCG $\alpha\beta$ + prepúberes resultó deprimida, la función hipotalámica se encontró activada, observándose una mayor concentración hipotalámica de GnRH y un aumento en la frecuencia de pulsos de GnRH *ex vivo*.
- La aplicación de tratamientos *in vivo* en los machos hCG $\alpha\beta$ + mostró una falta de respuesta de FSH a la castración y al tratamiento antiandrogénico con flutamida, tanto en la etapa prepuberal como en la adultez. Sin embargo, el tratamiento perinatal con flutamida fue capaz de aumentar los niveles de FSH sérica y la expresión de genes claves en la regulación de la unidad hipotálamo-hipofisaria. Estos resultados muestran una ventana de tiempo entre el día 18 de gestación y el día 14 de vida durante la cual los andrógenos crónicamente elevados y/o sus metabolitos producidos localmente son capaces de activar la función hipotalámica y apagar concomitantemente el eje de las gonadotropinas.
- La caracterización de las hembras hCG $\alpha\beta$ + mostró cambios significativos en la estructura y funcionalidad del eje HHG desde edades tempranas de la maduración sexual. Dichos cambios fueron acompañados de un aumento en el perfil de hormonas esteroideas y pubertad precoz a las 3 semanas de edad. Hacia las 6 semanas se detectaron los primeros signos de activación tumoral en el ovario, y a partir de las 8 semanas la presencia de teratomas sólidos de rápido crecimiento, acompañados de significativas alteraciones en el perfil hormonal.
- La aplicación de tratamientos *in vivo* en las hembras hCG $\alpha\beta$ + indicaron que el fenotipo observado sobre el funcionamiento de la unidad hipotálamo-hipofisaria se debe al impacto de hCG sobre la esteroidogénesis ovárica, ya

que la ovariectomía fue capaz de revertir los efectos observados. En la tumorigénesis ovárica, si bien el bloqueo de la acción androgénica, estrogénica o progestagénica en las hembras $hCG_{\alpha\beta+}$ no logró impedir la activación tumoral, dichos tratamientos tuvieron un claro efecto sobre la progresión del teratoma, frenando su crecimiento explosivo. Estos resultados muestran una clara relación entre un perfil esteroideogénico alterado y el desarrollo del teratoma ovárico.

REFERENCIAS

- Achermann, JC, Jameson, JL, 1999.** Fertility and infertility: genetic contributions from the hypothalamic-pituitary-gonadal axis. *Mol. Endocrinol.* 13, 812–818.
- Adamson SL, Lu Y, Whiteley KJ, Holmyard D, Hemberger M, Pfarrer C, Cross JC, 2002.** Interactions between trophoblast cells and the maternal and fetal circulation in the mouse placenta. *Dev Biol.* 250: 358-373.
- Ahtiainen P, Rulli SB, Shariatmadari R, Pelliniemi LJ, Toppari J, Poutanen M, Huhtaniemi IT, 2005.** Fetal but not adult Leydig cells are susceptible to adenoma formation in response to persistently high hCG level: a study on hCG overexpressing transgenic mice. *Oncogene* 24, 7301-7309.
- Ahtiainen P, Sharp V, Rulli SB, Rivero-Müller A, Mamaeva V, Røyttä M, Huhtaniemi I, 2010.** Enhanced LH action in transgenic female mice expressing hCGbeta-subunit induces pituitary prolactinomas; the role of high progesterone levels. *Endocr Relat Cancer.* 17, 611-621.
- Amsterdam A, Hanoch T, Dantes A, Tajima K, Strauss JF, Seger R, 2002.** Mechanisms of gonadotropin desensitization. *Mol Cell Endocrinol.* 187, 69-74.
- Amsterdam A, Koch Y, Lieberman ME, Lindner HR, 1975.** Distribution of binding sites for human chorionic gonadotropin in the preovulatory follicle of the rat. *J. Cell Biol.* 67, 894-900.
- Amsterdam A, Selvaraj N, 1997.** Control of differentiation, transformation, and apoptosis in granulosa cells by oncogenes, oncoviruses, and tumor suppressor genes. *Endocr Rev.* 18, 435-461.
- Anderson CM, Mendelson CR, 1985.** Regulation of steroidogenesis in rat Leydig cells in culture: effect of human chorionic gonadotropin and dibutyryl cyclic AMP on the synthesis of cholesterol side chain cleavage cytochrome P-450 and adrenodoxin. *Arch Biochem Biophys.* 238, 378-387.
- Ariyaratne HB, Chamindrani Mendis-Handagama S, 2000.** Changes in the testis interstitium of Sprague Dawley rats from birth to sexual maturity. *Biol Reprod.* 62, 680-690.
- Arnold AP, Gorski RA 1984.** Gonadal steroid induction of structural sex differences in the central nervous system. *Annu Rev Neurosci.* 7, 413-442.
- Aubert ML, Begeot M, Winiger BP, Morel G, Sizonenko PC, Dubois PM, 1985.** Ontogeny of hypothalamic luteinizing hormone-releasing hormone (GnRH) and pituitary GnRH receptors in fetal and neonatal rats. *Endocrinology* 116, 1565-1576.
- Bachelot A, Binart N, 2005.** Corpus luteum development: lessons from genetic models in mice. *Curr Top Dev Biol.* 68, 49-84.
- Baraño JL, Legnani B, Chiauzzi VA, Bertini LM, Suescun MO, Calvo JC, Charreau EH, Calandra RS, 1981.** Effects of prolactin on androgen metabolism in androgen target tissues of immature rats. *Endocrinology* 109, 2188-2195.
- Beloosesky R, Gold R, Almog B, Sasson R, Dantes A, Land-Bracha A, HirshL, Itskovitz-Eldor J, Lessing JB, Homburg R, Amsterdam A, 2004.** Induction of polycystic ovary by testosterone in immature female rats: modulation of apoptosis and attenuation of glucose/insulin ratio. *Int J Mol Med.* 14, 207–215.
- Benakanakere I, Besch-Williford C, Schnell J, Brandt S, Ellersieck MR, Molinolo A, Hyder SM, 2006.** Natural and synthetic progestins accelerate 7,12-dimethylbenz[a]anthracene-initiated mammary tumors and increase angiogenesis in Sprague-Dawley rats. *Clin Cancer Res.* 12, 4062-4071.
- Bianchi MS, Catalano PN, Bonaventura MM, Silveyra P, Bettler B, Libertun C, Lux-Lantos VA, 2004.** Effect of androgens on sexual differentiation of pituitary gamma-aminobutyric acid receptor subunit GABA(B) expression. *Neuroendocrinology* 80, 129-142.
- Bilezikjian LM, Blount A, Leal AMO, Donaldson C, Fischer W, Vale W, 2004.** Autocrine/paracrine regulation of pituitary function by activin, inhibin and follistatin. *Mol Cell Endocrinol.* 225, 29–36.
- Brann DW, Chorich LP, Mahesh VB, 1993.** Effect of progesterone on galanin mRNA levels in the hypothalamus and the pituitary: correlation with the gonadotropin surge. *Neuroendocrinology* 58, 531-538.
- Brann DW, Mahesh VB, 1997.** Excitatory amino acids: evidence for a role in the control of reproduction and anterior pituitary hormone secretion. *Endocr Rev.* 18, 678-700.

- Brannian JD, Shiigi SM, Stouffer RL, 1992.** Gonadotropin surge increases fluorescent-tagged low-density lipoprotein uptake by macaque granulosa cells from preovulatory follicles. *Biol Reprod.* 47, 355-360.
- Brooke AM, Taylor NF, Shepherd JH, Gore ME, Ahmad T, Lin L, Rumsby G, Papari-Zareei M, Auchus RJ, Achermann JC, Monson JP, 2006.** A novel point mutation in P450c17 (CYP17) causing combined 17alpha-hydroxylase/17,20-lyase deficiency. *J Clin Endocrinol Metab.* 91, 2428-2431.
- Buckler HM, Healy DL, Burger HG, 1989.** Purified FSH stimulates production of inhibin by the human ovary. *J Endocrinol.* 122, 279-285.
- Burger LL, Haisenleder DJ, Dalkin AC, Marshall JC, 2004.** Regulation of gonadotropin subunit gene transcription. *J Mol Endocrinol.* 33, 559-584.
- Byers M, Kuiper GG, Gustafsson JA, Park-Sarge OK, 1997.** Estrogen receptor-beta mRNA expression in rat ovary: down-regulation by gonadotropins. *Mol Endocrinol.* 11, 172-82.
- Calandra RS, Baraño JL, Bertini L, Calvo JC, Charreau EH, Chiauszi VA, Suescun MO, Tesone M, 1982.** Effects of prolactin on the male gonad and sex accessory organs. *Prog Clin Biol Res.* 87, 87-112.
- Caraty A, Skinner DC, 1999.** Progesterone priming is essential for the full expression of the positive feedback effect of estradiol in inducing the preovulatory gonadotropin-releasing hormone surge in the ewe. *Endocrinology* 140, 165-170.
- Carmina E, Orio F, Palomba S, Longo RA, Lombardi G, Lobo RA 2005.** Ovarian size and blood flow in women with polycystic ovary syndrome and their correlations with endocrine parameters. *Fertil Steril.* 84, 413–419.
- Carpino A, Rago V, Pezzi V, Carani C, Andò S, 2007.** Detection of aromatase and estrogen receptors (ERalpha, ERbeta1, ERbeta2) in human Leydig cell tumor. *Eur J Endocrinol.* 157, 239-244.
- Catalano PN, Di Giorgio N, Bonaventura MM, Bettler B, Libertun C, Lux-Lantos VA, 2010.** Lack of functional GABA(B) receptors alters GnRH physiology and sexual dimorphic expression of GnRH and GAD-67 in the brain. *Am J Physiol Endocrinol Metab.* 298, E683-E696.
- Cesnjar M, Krsmanovic LZ, Catt KJ, Stojilkovic SS, 1993.** Autocrine induction of c-fos expression in GT1 neuronal cells by gonadotropin-releasing hormone. *Endocrinology* 133, 3042-3045.
- Chappell PE, Levine JE, 2000.** Stimulation of gonadotropin-releasing hormone surges by estrogen. I. Role of hypothalamic progesterone receptors. *Endocrinology* 141, 1477–1485.
- Charreau EH, Attramadal A, Torjesen PA, Calandra R, Purvis K, Hansson V, 1977.** Androgen stimulation of prolactin receptors in rat prostate. *Mol Cell Endocrinol.* 7, 1-7.
- Chen P, Moenter SM, 2009.** GABAergic transmission to gonadotropin-releasing hormone (GnRH) neurons is regulated by GnRH in a concentration-dependent manner engaging multiple signaling pathways. *J Neurosci.* 29, 9809-9818.
- Cheng KW, Ngan ES, Kang SK, Chow BK, Leung PC, 2000.** Transcriptional down-regulation of human gonadotropin-releasing hormone (GnRH) receptor gene by GnRH: role of protein kinase C and activating protein 1. *Endocrinology* 141, 3611-3622.
- Cheung CC, Thornton JE, Kuijper JL, Weigle DS, Clifton DK, Steiner RA, 1997.** Leptin is a metabolic gate for the onset of puberty in the female rat. *Endocrinology* 138, 855-858.
- Childs GV, Unabia G, 2001.** Epidermal growth factor and gonadotropin releasing hormone stimulate proliferation of enriched population of gonadotropes. *Endocrinology* 142, 847–853.
- Christensen AK, Peacock KC, 1980.** Increase in Leydig cell number in testes of adult rats treated chronically with an excess of human chorionic gonadotropin. *Biol Reprod.* 22, 383-391.
- Chu Z, Andrade J, Shupnik MA, Moenter SM, 2009.** Differential regulation of gonadotropin-releasing hormone neuron activity and membrane properties by acutely applied estradiol: dependence on dose and estrogen receptor subtype. *J. Neurosci.* 29, 5616-5627.
- Clegg ED, Cook JC, Chapin RE, Foster PM, Daston GP, 1997.** Leydig cell hyperplasia and adenoma formation: mechanisms and relevance to humans. *Reprod Toxicol.* 11, 107-121.

- Colciago A, Celotti F, Pravettoni A, Mornati O, Martini L, Negri-Cesi P, 2005.** Dimorphic expression of testosterone metabolizing enzymes in the hypothalamic area of developing rats. *Brain Res Dev Brain Res.* 155, 107-116.
- Colledge WH, Carlton MB, Udy GB, Evans MJ, 1994.** Disruption of c-mos causes parthenogenetic development of unfertilized mouse eggs. *Nature* 370, 65-68.
- Conn PM, Rogers DC, Seay SG, 1984.** Biphasic regulation of the gonadotropin-releasing hormone receptor by receptor microaggregation and intracellular Ca²⁺ levels. *Mol. Pharmacol.* 25, 51-55.
- Conneely OM, Mulac-Jericevic B, Lydon JP, DeMayo FJ, 2001.** Reproductive functions of the progesterone receptor isoforms: lessons from knockout mice. *Mol Cell Endocrinol.* 179, 97-103.
- Cook JC, Klinefelter GR, Hardisty JF, Sharpe RM, Foster PM, 1999.** Rodent Leydig cell tumorigenesis: a review of the physiology, pathology, mechanisms, and relevance to humans. *Crit Rev Toxicol.* 29, 169-261.
- Corbier P, Kerdelhue B, Picon R, Roffi J, 1978.** Changes in testicular weight and serum gonadotropin and testosterone levels before, during, and after birth in the perinatal rat. *Endocrinology* 103, 1985-1991.
- Counis R, Laverrière JN, Garrel G, Bleux C, Cohen-Tannoudji J, Lerrant Y, Kottler ML, Magre S, 2005.** Gonadotropin-releasing hormone and the control of gonadotrope function. *Reprod Nutr Dev.* 45, 243-254.
- Couse JF, Bunch DO, Lindzey J, Schomberg DW, Korach KS, 1999.** Prevention of the polycystic ovarian phenotype and characterization of ovulatory capacity in the estrogen receptor-alpha knockout mouse. *Endocrinology* 140, 5855-5865.
- Couse JF, Yates MM, Sanford R, Nyska A, Nilson JH, Korach KS, 2004.** Formation of cystic ovarian follicles associated with elevated luteinizing hormone requires estrogen receptor-beta. *Endocrinology* 145, 4693-4702.
- Crofford LJ, 1997.** COX-1 and COX-2 tissue expression: implications and predictions. *J Rheumatol Suppl.* 49, 15-19.
- Dabrosin C, Margetts PJ, Gauldie J, 2003.** Estradiol increases extracellular levels of vascular endothelial growth factor in vivo in murine mammary cancer. *Int J Cancer.* 107, 535-540.
- Dahlman-Wright K, Cavailles V, Fuqua SA, Jordan VC, Katzenellenbogen JA, Korach KS, Maggi A, Muramatsu M, Parker MG, Gustafsson JA, 2006.** International Union of Pharmacology. LXIV. Estrogen receptors. *Pharmacol Rev.* 58, 773-781
- Dalkin AC, Haisenleder DJ, Gilrain JT, Aylor K, Yasin M, Marshall JC, 1998.** Regulation of pituitary follistatin and inhibin/activin subunit messenger ribonucleic acids (mRNAs) in male and female rats: evidence for inhibin regulation of follistatin mRNA in females. *Endocrinology* 139, 2818-2823.
- Davis AM, Grattan DR, Selmanoff M, McCarthy MM, 1996.** Sex differences in glutamic acid decarboxylase mRNA in neonatal rat brain: implications for sexual differentiation. *Horm Behav.* 30, 538-552.
- Davis JS, 1994.** Mechanisms of hormone action: luteinizing hormone receptors and second-messenger pathways. *Curr Opin Obstet Gynecol.* 6, 254-261.
- de Foy KA, Gayther SA, Colledge WH, Crockett S, Scott IV, Evans MJ, Ponder BA, 1998.** Mutation analysis of the c-mos proto-oncogene in human ovarian teratomas. *Br J Cancer.* 77, 1642-1644.
- de Koning J, 1995.** Gonadotrophin surge-inhibiting/attenuating factor governs luteinizing hormone secretion during the ovarian cycle: physiology and pathology. *Hum Reprod.* 10, 2854-2861.
- De Mees C, Laes JF, Bakker J, Smitz J, Hennuy B, Van Vooren P, Gabant P, Szpirer J, Szpirer C, 2006.** Alpha-fetoprotein controls female fertility and prenatal development of the gonadotropin-releasing hormone pathway through an antiestrogenic action. *Mol. Cell. Biol.* 26, 2012-2018.
- Dekel N, Galiani D, Sherizly I, 1988.** Dissociation between the inhibitory and the stimulatory action of cAMP on maturation of rat oocytes. *Mol Cell Endocrinol.* 56, 115-121.
- Dey SK, 2010.** How we are born. *J Clin Invest.* 120, 952-955.

- Donnadiou AC, Deffieux X, Le Ray C, Mordefroid M, Frydman R, Fernandez H, 2006.** Unusual fast-growing ovarian cystic teratoma during pregnancy presenting with intracystic fat "floating balls" appearance. *Fertil Steril.* 86,1758-1759.
- Drummond AE, 2006.** The role of steroids in follicular growth. *Reprod Biol Endocrinol.* 4, 16.
- Dufau ML, Winters CA, Hattori M, Aquilano D, Barañao JL, Nozu K, Baukal A, Catt KJ, 1984.** Hormonal regulation of androgen production by the Leydig cell. *J Steroid Biochem.* 20, 161-173.
- Dullaart J, Kent J, Ryle M, 1975.** Serum gonadotrophin concentrations in infantile female mice. *J Reprod Fertil.* 43, 189-192.
- Dungan HM, Clifton DK, Steiner RA, 2006.** Minireview: kisspeptin neurons as central processors in the regulation of gonadotropin-releasing hormone secretion. *Endocrinology* 147, 1154-1158.
- Eisner JR, Barnett MA, Dumesic DA, Abbott DH, 2002.** Ovarian hyperandrogenism in adult female rhesus monkeys exposed to prenatal androgen excess. *Fertil Steril.* 77, 167-172.
- Eppig JJ, 1982.** The relationship between cumulus cell-oocyte coupling, oocyte meiotic maturation, and cumulus expansion. *Dev Biol.* 89, 268-272.
- Eppig JJ, Wigglesworth K, Varnum DS, Nadeau JH, 1996.** Genetic regulation of traits essential for spontaneous ovarian teratocarcinogenesis in strain LT/Sv mice: aberrant meiotic cell cycle, oocyte activation, and parthenogenetic development. *Cancer Res.* 6, 5047-5054.
- Erickson GF, Wang C, Hsueh AJ, 1979.** FSH induction of functional LH receptors in granulosa cells cultured in a chemically defined medium. *Nature.* 279, 336-338.
- Feleder C, Ginzburg M, Wuttke W, Moguilevsky JA, Arias P, 1999.** GABAergic activation inhibits the hypothalamic-pituitary-ovarian axis and sexual development in the immature female rat. Associated changes in hypothalamic glutamatergic and taurinergergic systems. *Brain Res Dev Brain Res.* 116, 151-157.
- Ferguson SS, 2001.** Evolving concepts in G protein-coupled receptor endocytosis: the role in receptor desensitization and signaling. *Pharmacol Rev.* 53, 1-24.
- Findell PR, Wong KH, Jackman JK, Daniels DV, 1993.** Beta 1-adrenergic and dopamine (D1)-receptors coupled to adenylyl cyclase activation in GT1 gonadotropin-releasing hormone neurosecretory cells. *Endocrinology* 132, 682-688.
- Fortune JE, Armstrong DT, 1977.** Androgen production by theca and granulosa isolated from proestrous rat follicles. *Endocrinology* 100, 1341-1347.
- Foster DL, Jackson LM, Padmanabhan V, 2006.** Programming of GnRH feedback controls timing puberty and adult reproductive activity. *Mol Cell Endocrinol.* 254-255, 109-119
- Fowler KA, Gill K, Kirma N, Dillehay DL, Tekmal RR, 2000.** Overexpression of aromatase leads to development of testicular Leydig cell tumors : an in vivo model for hormone-mediated Testicular Cancer. *Am J Pathol.* 156, 347-353.
- Franks S, 1995.** Polycystic ovary syndrome. *N Engl J Med.* 333, 853-861.
- Franks S, McCarthy MI, Hardy K, 2006.** Development of polycystic ovary syndrome: involvement of genetic and environmental factors. *Int J Androl.* 29, 278-285.
- Freeman ME, Kanyicska B, Lerant A, Nagy G, 2000.** Prolactin: structure, function, and regulation of secretion. *Physiol Rev.* 80, 1523-1631.
- Garcia-Segura LM, Lorenz B, DonCarlos LL, 2008.** The role of glia in the hypothalamus: implications for gonadal steroid feedback and reproductive neuroendocrine output. *Reproduction* 135, 419-429.
- Garvin S, Dabrosin C, 2003.** Tamoxifen inhibits secretion of vascular endothelial growth factor in breast cancer in vivo. *Cancer Res.* 63, 8742-8748.
- Geneser F, 2000a.** Órganos de la reproducción. En: *Histología sobre bases biomoleculares.* 3ra edición, Geneser F (Eds), Editorial Médica Panamericana S.A., Buenos Aires. Capítulo 22, 613-677.
- Geneser F, 2000b.** Sistema endócrino. En: *Histología sobre bases biomoleculares.* 3ra edición, Geneser F (Eds), Editorial Médica Panamericana S.A., Buenos Aires. Capítulo 21, 581-609.
- Gharib SD, Wierman ME, Shupnik MA, Chin WW, 1990.** Molecular biology of the pituitary gonadotropins. *Endocr Rev.* 11, 177-199.

- Gilliland FD, Key CR, 1995.** Male genital cancers. *Cancer* 75, 295-315.
- Gilling-Smith C, Story H, Rogers V, Franks S, 1997.** Evidence for a primary abnormality of thecal cell steroidogenesis in the polycystic ovary syndrome. *Clin Endocrinol. (Oxf)* 47, 93–99
- Goldman-Johnson DR, de Kretser DM, Morrison JR, 2008.** Evidence that androgens regulate early developmental events, prior to sexual differentiation. *Endocrinology* 149, 5-14.
- Gordon A, Aguilar R, Garrido-Gracia JC, Guil-Luna S, Sánchez-Céspedes R, Millán Y, Martín de las Mulas J, Sánchez-Criado JE, 2009.** Activation of estrogen receptor-alpha induces gonadotroph progesterone receptor expression and action differently in young and middle-aged ovariectomized rats. *Hum Reprod.* 24, 2618-2628.
- Gore AC, 2008.** Developmental programming and endocrine disruptor effects on reproductive neuroendocrine systems. *Front. Neuroendocrinol.* 29, 358-374.
- Gore-Langton RE, Armstrong DT, 1994.** Follicular Steroidogenesis and its Control. En: *The Physiology of Reproduction*, Second edition, Knobil E, Neill J (Eds), Raven Press, New York. Vol.1, 571-627.
- Gray LE Jr., Wilson VS, Stoker T, Lambright C, Furr J, Noriega N, Howdeshell K, Ankley GT, Guillette L, 2006.** Adverse effects of environmental antiandrogens and androgens on reproductive development in mammals. *Int. J. Androl.* 29, 96-108.
- Greenway GS, Roy SK, 1994.** Follicular Development and its Control. En: *The Physiology of Reproduction*, Second edition, Knobil E, Neill J (Eds), Raven Press, New York. Vol.1, 629-724.
- Haisenleder DJ, Dalkin AC, Marshall JC, 1994.** Regulation of gonadotropin gene expression. En: *The Physiology of Reproduction*, Second edition, Knobil E, Neill J (Eds), Raven Press, New York. Vol.1, 1793–1814.
- Han HJ, Heo JS, Lee YJ, 2006.** Estradiol-17beta stimulates proliferation of mouse embryonic stem cells: involvement of MAPKs and CDKs as well as protooncogenes. *Am J Physiol Cell Physiol.* 290, C1067-1075.
- Han SK, Gottsch ML, Lee KJ, Popa SM, Smith JT, Jakawich SK, Clifton DK, Steiner RA, Herbison AE, 2005.** Activation of gonadotropin-releasing hormone neurons by kisspeptin as a neuroendocrine switch for the onset of puberty. *J Neurosci.* 25, 11349-11356.
- Hardy MP, Kelce WR, Klinefelter GR, Ewing LL, 1990.** Differentiation of Leydig cell precursors in vitro: a role for androgen. *Endocrinology* 127, 488-490.
- Hardy MP, Zirkin BR, Ewing LL, 1989.** Kinetic studies on the development of the adult population of Leydig cells in testes of the pubertal rat. *Endocrinology* 124, 762-770.
- Hashimoto N, Watanabe N, Furuta Y, Tamemoto H, Sagata N, Yokoyama M, Okazaki K, Nagayoshi M, Takeda N, Ikawa Y, et al. 1994.** Parthenogenetic activation of oocytes in c-mos-deficient mice. *Nature* 370, 68-71.
- Heger S, Seney M, Bless E, Schwarting GA, Bilger M, Mungenast A, Ojeda SR, Tobet SA, 2003.** Overexpression of glutamic acid decarboxylase-67 (GAD-67) in gonadotropin-releasing hormone neurons disrupts migratory fate and female reproductive function in mice. *Endocrinology* 144, 2566–2579.
- Herbison AE, 2008.** Estrogen positive feedback to gonadotropin-releasing hormone (GnRH) neurons in the rodent: the case for the rostral periventricular area of the third ventricle (RP3V). *Brain Res Rev.* 57, 277-287.
- Hillier SG, De Zwart FA, 1981.** Evidence that granulosa cell aromatase induction/activation by follicle-stimulating hormone is an androgen receptor-regulated process in-vitro. *Endocrinology* 109, 1303-1305.
- Hillier SG, Tetsuka M, 1997.** Role of androgens in follicle maturation and atresia. *Baillieres Clin Obstet Gynaecol.* 11, 249-260.
- Hoeben A, Landuyt B, Highley MS, Wildiers H, Van Oosterom AT, De Bruijn EA, 2004.** Vascular endothelial growth factor and angiogenesis. *Pharmacol Rev.* 56, 549-580.
- Holm M, Rajpert-De Meyts E, Andersson AM, Skakkebaek NE, 2003.** Leydig cell micronodules are a common finding in testicular biopsies from men with impaired spermatogenesis and are associated with decreased testosterone/LH ratio. *J Pathol.* 199, 378-386.

- Holt JA, Richards JS, Midgley AR Jr, Reichert LE Jr, 1976.** Effect of prolactin on LH receptor in rat luteal cells. *Endocrinology*. 98, 1005-1013.
- Hong SH, Nah HY, Lee YJ, Lee JW, Park JH, Kim SJ, Lee JB, Yoon HS, Kim CH, 2004.** Expression of estrogen receptor-alpha and -beta, glucocorticoid receptor, and progesterone receptor genes in human embryonic stem cells and embryoid bodies. *Mol Cells*. 18, 320-325.
- Hsu SY, Lai RJ, Finegold M, Hsueh AJ, 1996.** Targeted overexpression of Bcl-2 in ovaries of transgenic mice leads to decreased follicle apoptosis, enhanced folliculogenesis, and increased germ cell tumorigenesis. *Endocrinology* 137, 4837-4843.
- Hu L, Gustofson RL, Feng H, Leung PK, Mores N, Krsmanovic LZ, Catt KJ, 2008.** Converse regulatory functions of estrogen receptor-alpha and -beta subtypes expressed in hypothalamic gonadotropin-releasing hormone neurons. *Mol Endocrinol*. 22, 2250-2259.
- Huang X, Harlan RE, 1993.** Absence of androgen receptors in LHRH immunoreactive neurons. *Brain Res*. 624, 309-311.
- Hughes IA, 2001.** Minireview: sex differentiation. *Endocrinology* 142, 3281-3287.
- Huhtaniemi I, Rulli S, Ahtainen P, Poutanen M, 2005.** Multiple sites of tumorigenesis in transgenic mice overproducing hCG. *Mol Cell Endocrinol*. 234, 117-126.
- Huhtaniemi IT, Nozu K, Warren DW, Dufau ML, Catt KJ, 1982.** Acquisition of regulatory mechanisms for gonadotropin receptors and steroidogenesis in the maturing rat testis. *Endocrinology* 111, 1711-1720.
- Im A, Appleman LJ, 2010.** Mifepristone: pharmacology and clinical impact in reproductive medicine, endocrinology and oncology. *Expert Opin Pharmacother*. 11, 481-488.
- Jain RK, Safabakhsh N, Sckell A, Chen Y, Jiang P, Benjamin L, Yuan F, Keshet E, 1998.** Endothelial cell death, angiogenesis, and microvascular function after castration in an androgen-dependent tumor: role of vascular endothelial growth factor. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 95, 10820-10825.
- Jameson JL, Hollenberg AN, 1993.** Regulation of chorionic gonadotropin gene expression. *Endocr Rev*. 14, 203-221.
- Jefferson WN, Couse JF, Banks EP, Korach KS, Newbold RR, 2000.** Expression of estrogen receptor beta is developmentally regulated in reproductive tissues of male and female mice. *Biol Reprod*. 62, 310-317.
- Jones KT, 2008.** Meiosis in oocytes: predisposition to aneuploidy and its increased incidence with age. *Hum Reprod Update*. 14, 143-58.
- Jost A, 1947.** Recherches sur le différenciation sexuelle de l'embryon de lapin III. Rôle des gonades foetales dans la différenciation sexuelle somatique. *Arch Anat Microsc Morphol Exp* 36, 271-315.
- Kafali H, Iriadam M, Ozardali I, Demir N, 2004.** Letrozole-induced polycystic ovaries in the rat: a new model for cystic ovarian disease. *Arch Med Res*. 35,103-108.
- Kaiser UB, Jakubowiak A, Steinberger A, Chin WW, 1997.** Differential effects of gonadotropin-releasing hormone (GnRH) pulse frequency on gonadotropin subunit and GnRH receptor messenger ribonucleic acid levels in vitro. *Endocrinology* 138, 1224-1231.
- Kananen K, Rilianawati, Pauku T, Markkula M, Rainio EM, Huhtaniemi I, 1997.** Suppression of gonadotropins inhibits gonadal tumorigenesis in mice transgenic for the mouse inhibin alpha-subunit promoter/simian virus 40 T-antigen fusion gene. *Endocrinology* 138, 3521-3531.
- Kauffman AS, 2009.** Sexual differentiation and the Kiss1 system: hormonal and developmental considerations. *Peptides* 30, 83-93.
- Kerr JB, Knell CM, 1988.** The fate of fetal Leydig cells during the development of the fetal and postnatal rat testis. *Development* 103, 535-544.
- Khalaf H, Larsson A, Berg H, McCrindle R, Arsenault G, Olsson PE, 2009.** Diastereomers of the brominated flame retardant 1,2-dibromo-4-(1,2 dibromoethyl)cyclohexane induce androgen receptor activation in the hepg2 hepatocellular carcinoma cell line and the Incap prostate cancer cell line. *Environ. Health Perspect*. 117, 1853-1859.

- Kirk SE, Dalkin AC, Yasin M, Haisenleder DJ, Marshall JC, 1994.** Gonadotropin-releasing hormone pulse frequency regulates expression of pituitary follistatin messenger ribonucleic acid: a mechanism for differential gonadotrope function. *Endocrinology* 135, 876-880.
- Koss LG, 2005.** Tumors of the Ovary and Fallopian Tube. En: *KOSS' DIAGNOSTIC CITOLGY and it's histopatologic basis*. 5th edition, Koss LG, Melamed MR (Eds), LWW, New York. 491-513.
- Kudo A, Park MK, Kawashima S, 1994.** Effects of gonadotropin-releasing hormone (GnRH) on the cytodifferentiation of gonadotropes in rat adenohipophysial primordia in organ culture. *Cell Tissue Res.* 276, 35-43.
- Kumar TR, Wang Y, Lu N, Matzuk MM, 1997.** Follicle stimulating hormone is required for ovarian follicle maturation but not male fertility. *Nat Genet.* 15, 201-204.
- Kumar V, Peng EW, Kurian KM, Smith C, Fitzpatrick MO, Whittle IR, 2006.** An unusual progression of benign thoracic spinal cord teratoma in pregnancy: a hormonally-mediated pathway?. *Br J Neurosurg* 20, 106-108.
- Kuopio T, Pelliniemi LJ, Huhtaniemi I, 1989.** Rapid Leydig cell proliferation and luteinizing hormone receptor replenishment in the neonatal rat testis after a single injection of human chorionic gonadotropin. *Biol Reprod.* 40, 135-143.
- Kuorelahti A, Rulli S, Huhtaniemi I, Poutanen M, 2007.** Human chorionic gonadotropin (hCG) up-regulates *wnt5b* and *wnt7b* in the mammary gland, and hCGbeta transgenic female mice present with mammary Gland tumors exhibiting characteristics of the Wnt/beta-catenin pathway activation. *Endocrinology* 148, 3694-3703.
- Leblanc H, Lachelin GC, Abu-Fadil S, Yen SS, 1976.** Effects of dopamine infusion on pituitary hormone secretion in humans. *J Clin Endocrinol Metab.* 43, 668-674.
- Levine JE, Ramirez VD, 1980.** In vivo release of luteinizing hormone-releasing hormone estimated with push-pull cannulae from the mediobasal hypothalami of ovariectomized, steroid-primed rats. *Endocrinology* 107, 1782-1790.
- Li X, Mäkelä S, Streng T, Santti R, Poutanen M, 2003.** Phenotype characteristics of transgenic male mice expressing human aromatase under ubiquitin C promoter. *J Steroid Biochem Mol Biol.* 86, 469-476.
- Li X, Strauss L, Kaatrasalo A, Mayerhofer A, Huhtaniemi I, Santti R, Mäkelä S, Poutanen M, 2006.** Transgenic mice expressing p450 aromatase as a model for male infertility associated with chronic inflammation in the testis. *Endocrinology* 147, 1271-1277.
- Li Z, Huang H, Boland P, Dominguez MG, Burfeind P, Lai KM, Lin HC, Gale NW, Daly C, Auerbach W, Valenzuela D, Yancopoulos GD, Thurston G, 2009.** Embryonic stem cell tumor model reveals role of vascular endothelial receptor tyrosine phosphatase in regulating Tie2 pathway in tumor angiogenesis. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 106, 22399-22404.
- Liang Y, Hyder SM, 2005.** Proliferation of endothelial and tumor epithelial cells by progestin-induced vascular endothelial growth factor from human breast cancer cells: paracrine and autocrine effects. *Endocrinology* 146, 3632-3641.
- Linder D, McCaw BK, Hecht F, 1975.** Parthenogenic origin of benign ovarian teratomas. *N Engl J Med.* 292, 63-66.
- Lindzey J, Wetsel WC, Couse JF, Stoker T, Cooper R, Korach KS, 1998.** Effects of castration and chronic steroid treatments on hypothalamic gonadotropin-releasing hormone content and pituitary gonadotropins in male wild-type and estrogen receptor-alpha knockout mice. *Endocrinology* 139, 4092-4101.
- Liu G, Duranteau L, Carel JC, Monroe J, Doyle DA, Shenker A, 1999.** Leydig-cell tumors caused by an activating mutation of the gene encoding the luteinizing hormone receptor. *N Engl J Med.* 341, 1731-1736.
- Liu JH, Yen SS, 1983.** Induction of midcycle gonadotropin surge by ovarian steroids in women: a critical evaluation. *J Clin Endocrinol Metab.* 57, 797-802.
- Lowry OH, Rosebrough NJ, Farr AL, Randall RJ, 1951.** Protein measurement with the Folin phenol reagent. *J. Biol. Chem.* 193, 265-275.
- Lydon JP, DeMayo F, Funk CR, Mani SK, Hughes AR, Montgomery CA, Shyamala G, Conneely OM, O'Malley BW, 1995.** Mice lacking progesterone receptor exhibit reproductive abnormalities. *Genes Dev.* 9, 2266-2278.

- Ma X, Dong Y, Matzuk MM, Kumar TR, 2004.** Targeted disruption of luteinizing hormone beta-subunit leads to hypogonadism, defects in gonadal steroidogenesis, and infertility. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 101, 17294-17299.
- Mahesh VB, Muldoon TG, 1987.** Integration of the effects of estradiol and progesterone in the modulation of gonadotropin secretion. *J Steroid Biochem.* 27, 665-675.
- Manna PR, Huhtaniemi IT, Stocco DM, 2004.** Responsive Expression of the Steroidogenic Acute Regulatory Protein in Mouse Leydig Cells. *Biol Proced Online.* 6, 83-93.
- Mannerås L, Cajander S, Holmäng A, Seleskovic Z, Lystig T, Lönn M, Stener-Victorin E, 2007.** A new rat model exhibiting both ovarian and metabolic characteristics of polycystic ovary syndrome. *Endocrinology* 148, 3781-3791.
- Marcondes FK, Bianchi FJ, Tanno AP, 2002.** Determination of the estrous cycle phases of rats: some helpful considerations. *Braz J Biol.* 62, 609-614.
- Marian J, Cooper RL, Conn PM, 1981.** Regulation of the rat pituitary gonadotropin-releasing hormone receptor. *Mol Pharmacol.* 19, 399-405.
- Markkula M, Huhtaniemi I, 1996.** Transgenic animals and gonadotrophins. *Rev Reprod.* 1, 97-106.
- Marshall JC, Dalkin AC, Haisenleder DJ, Griffin ML, Kelch RP, 1993.** GnRH pulses--the regulators of human reproduction. *Trans Am Clin Climatol Assoc.* 104, 31-46.
- Matagne V, Rasier G, Lebrethon MC, Gérard A, Bourguignon JP, 2004.** Estradiol stimulation of pulsatile gonadotropin-releasing hormone secretion in vitro: correlation with perinatal exposure to sex steroids and induction of sexual precocity in vivo. *Endocrinology* 145, 2775-2783.
- Matzuk MM, DeMayo FJ, Hadsell LA, Kumar TR, 2003.** Overexpression of human chorionic gonadotropin causes multiple reproductive defects in transgenic mice. *Biol Reprod.* 69, 338-346.
- McCarthy MM, 2008.** Estradiol and the developing brain. *Physiol Rev.* 88, 91-124.
- McCarthy MM, Auger AP, Perrit-Sinal TS, 2002.** Getting excited about GABA and sex differences in the brain. *Trends in Neurosc.* 25, 307-312.
- McLachlan RI, Cohen NL, Vale WW, Rivier JE, Burger HG, Bremner WJ, Soules MR, 1989.** The importance of luteinizing hormone in the control of inhibin and progesterone secretion by the human corpus luteum. *J Clin Endocrinol Metab.* 68, 1078-1085.
- McLaren A, 1991.** Development of the mammalian gonad: the fate of the supporting cell lineage. *Bioessays* 13, 151-156.
- McNatty KP, Makris A, DeGrazia C, Osathanondh R, Ryan KJ, 1979.** The production of progesterone, androgens, and estrogens by granulosa cells, thecal tissue, and stromal tissue from human ovaries in vitro. *J Clin Endocrinol Metab.* 49, 687-699.
- Meehan TP, Harmon BG, Overcast ME, Yu KK, Camper SA, Puett D, Narayan P, 2005.** Gonadal defects and hormonal alterations in transgenic mice expressing a single chain human chorionic gonadotropin-lutropin receptor complex. *J Mol Endocrinol.* 34, 489-503.
- Meenakumari KJ, Agarwal S, Krishna A, Pandey LK, 2004.** Effects of metformin treatment on luteal phase progesterone concentration in polycystic ovary syndrome. *Braz J Med Biol Res* 37,1637-1644.
- Meidan R, Aroya NB, Koch Y, 1982.** Variations in the number of pituitary LHRH receptors correlated with altered responsiveness to LHRH. *Life Sci.* 30, 535-541.
- Mellon PL, Windle JJ, Goldsmith PC, Padula CA, Roberts JL, Weiner RI, 1990.** immortalization of hypothalamic GnRH neurons by genetically targeted tumorigenesis. *Neuron* 5, 1-10.
- Mendis-Handagama SM, 1997.** Luteinizing hormone on Leydig cell structure and function. *Histol Histopathol.* 12, 869-882.
- Mendis-Handagama SM, Ariyaratne HB, 2001.** Differentiation of the adult Leydig cell population in the postnatal testis. *Biol Reprod.* 65, 660-671.
- Mikola M, Kero J, Nilson JH, Keri RA, Poutanen M, Huhtaniemi I, 2003.** High levels of luteinizing hormone analog stimulate gonadal and adrenal tumorigenesis in mice transgenic for the mouse inhibin-alpha-subunit promoter/Simian virus 40 T-antigen fusion gene. *Oncogene* 22, 3269-3278.
- Miller BH, Gore AC, 2002.** N-Methyl-D-aspartate receptor subunit expression in GnRH neurons changes during reproductive senescence in the female rat. *Endocrinology* 143, 3568-3574.

- Mills TM, 1975.** Effect of luteinizing hormone and cyclic adenosine 3',5'-monophosphate on steroidogenesis in the ovarian follicle of the rabbit. *Endocrinology* 96, 440-445.
- Mo Y, Peng P, Zhou R, He Z, Huang L, Yang D, 2010.** Regulation of gonadotropin-releasing hormone (GnRH) receptor-I expression in the pituitary and ovary by a GnRH agonist and antagonist. *Reprod Sci.*17, 68-77.
- Mongiat LA, Fernández MO, Lux-Lantos VA, Guilgur LG, Somoza GM, Libertun C, 2006.** Experimental data supporting the expression of the highly conserved GnRH-II in the brain and pituitary gland of rats. *Regul. Pept.* 136, 50–57.
- Mores N, Krsmanovic LZ, Catt KJ, 1996.** Activation of LH receptors expressed in GnRH neurons stimulates cyclic AMP production and inhibits pulsatile neuropeptide release. *Endocrinology* 137, 5731-5734.
- Mulac-Jericevic B, Conneely OM, 2004.** Reproductive tissue selective actions of progesterone receptors. *Reproduction* 128, 139-146.
- Murphy BD, Martinuk SD, 1991.** Equine chorionic gonadotropin. *Endocr Rev.* 1991 Feb;12(1):27-44.
- Mutter GL, 1987.** Teratoma genetics and stem cells: a review. *Obstet Gynecol Surv.* 42, 661-670.
- Mutter GL, 1997.** Role of imprinting in abnormal human development. *Mutat Res.* 396, 141-147.
- Muttukrishna S, Groome N, Ledger W, 1997.** Gonadotropic control of secretion of dimeric inhibins and activin A by human granulosa-luteal cells in vitro. *J Assist Reprod Genet.* 14, 566-574.
- Navarro CE, Saeed SA, Murdock C, Martinez-Fuentes AJ, Arora KK, Krsmanovic LZ, Catt KJ, 2003.** Regulation of cyclic adenosine 3',5'- monophosphate signaling and pulsatile neurosecretion by Gicoupled plasma membrane estrogen receptors in immortalized gonadotrophin-releasing hormone neurons. *Mol Endocrinol.* 17, 1792–1804.
- Navarro VM, Castellano JM, Fernandez-Fernandez R, Tovar S, Roa J, Mayen A, Barreiro ML, Gaytan F, Aguilar E, Pinilla L, Dieguez C, Tena-Sempere M, 2005.** Characterization of the potent luteinizing hormone-releasing activity of KISS-1 peptide, the natural ligand of GPR54. *Endocrinology* 146, 156-163.
- Navarro VM, Sánchez-Garrido MA, Castellano JM, Roa J, García-Galiano D, Pineda R, Aguilar E, Pinilla L, Tena-Sempere M, 2009.** Persistent impairment of hypothalamic KiSS-1 system after exposures to estrogenic compounds at critical periods of brain sex differentiation. *Endocrinology* 150, 2359-2367.
- Negri-Cesi P, Colciago A, Pravettoni A, Casati L, Conti L, Celotti F, 2008.** Sexual differentiation of the rodent hypothalamus: hormonal and environmental influences. *J Steroid Biochem Mol Biol.* 109, 294-299.
- Negro-Vilar A, Advis JP, Ojeda SR, McCann SM, 1982.** Pulsatile luteinizing hormone (LH) patterns in ovariectomized rats: involvement of norepinephrine and dopamine in the release of LH-releasing hormone and LH. *Endocrinology* 111, 932–938.
- Nelson DR, Koymans L, Kamataki T, Stegeman JJ, Feyereisen R, Waxman DJ, Waterman MR, Gotoh O, Coon MJ, Estabrook RW, Gunsalus IC, Nebert DW, 1996.** P450 superfamily: update on new sequences, gene mapping, accession numbers and nomenclature. *Pharmacogenetics* 6, 1-42.
- Nelson VL, Qin K-N, Rosenfield RL, Wood JR, Penning TM, Legro RS, Strauss III JF, McAllister JM, 2001.** The biochemical basis for increased testosterone production in theca cells propagated from patients with polycystic ovary syndrome. *J Clin Endocrinol Metab* 86, 5925–5933.
- Ng Y, Wolfe A, Novaira HJ, Radovick S, 2009.** Estrogen regulation of gene expression in GnRH neurons. *Mol Cell Endocrinol.* 303, 25-33.
- Norris RP, Freudzon M, Mehlmann LM, Cowan AE, Simon AM, Paul DL, Lampe PD, Jaffe LA, 2008.** Luteinizing hormone causes MAP kinase-dependent phosphorylation and closure of connexin 43 gap junctions in mouse ovarian follicles: one of two paths to meiotic resumption. *Development.* 135, 3229-3238.
- Ojeda SR, Prevot V, Heger S, Lomniczi A, Dzedzic B, Mungenast A, 2003.** Glia-to-neuron signalling and the neuroendocrine control of female puberty. *Ann Med.* 35, 244-255.

- Ojeda SR, Skinner MK, 2006.** Puberty in the rat. En: *The Physiology of Reproduction*. 3rd edition, Knobil E (Eds), San Diego, CA: Academic Press/Elsevier. Vol.1, 2061–2126.
- Olson BR, Scott DC, Wetsel WC, Elliot SJ, Tomic M, Stojilkovic S, Nieman LK, Wray S, 1995.** Effects of insulin-like growth factors I and II and insulin on the immortalized hypothalamic GTI-7 cell line. *Neuroendocrinology* 62, 155-165.
- O'Malley y Strott, 2001.** Hormonas esteroides: Metabolismo y Mecanismo de Acción. En: *Endocrinología de la reproducción. Fisiología, fisiopatología y manejo clínico*. 4a edición, Yen SSC, Jaffe RB, Barbieri RL (Eds), Panamericana, Buenos Aires. Capítulo 4, 118-143.
- Orshal JM, Khalil RA, 2004.** Gender, sex hormones, and vascular tone. *Am J Physiol Regul Integr Comp Physiol*. 286, R233-249.
- O'Shaughnessy PJ, Baker P, Sohnius U, Haavisto AM, Charlton HM, Huhtaniemi I, 1998.** Fetal development of Leydig cell activity in the mouse is independent of pituitary gonadotroph function. *Endocrinology* 139, 1141-1146.
- O'Shaughnessy PJ, McLelland D, McBride MW, 1997.** Regulation of luteinizing hormone-receptor and follicle-stimulating hormone-receptor messenger ribonucleic acid levels during development in the neonatal mouse ovary. *Biol Reprod*. 57, 602-608.
- Oxberry, A, Greenwald GS, 1982.** An autoradiographic study of the binding of ¹²⁵I-labeled follicle-stimulating hormone, human chorionic gonadotropin and prolactin to the hamster ovary throughout the estrous cycle. *Biol Reprod*. 27, 505-516.
- Padmanabhan V, Evans NP, Dahl GE, McFadden KL, Mauger DT, Karsch FJ, 1995.** Evidence for short or ultrashort loop negative feedback of gonadotropin-releasing hormone secretion. *Neuroendocrinology* 62, 248-258.
- Pakarainen T, Zhang FP, Mäkelä S, Poutanen M, Huhtaniemi I, 2005b.** Testosterone replacement therapy induces spermatogenesis and partially restores fertility in luteinizing hormone receptor knockout mice. *Endocrinology* 146, 596-606.
- Pakarainen T, Zhang FP, Poutanen M, Huhtaniemi I, 2005a.** Fertility in luteinizing hormone receptor-knockout mice after wild-type ovary transplantation demonstrates redundancy of extragonadal luteinizing hormone action. *J Clin Invest*. 115, 1862-1868.
- Pakarinen P, Vihko KK, Voutilainen R, Huhtaniemi I, 1990.** Differential response of luteinizing hormone receptor and steroidogenic enzyme gene expression to human chorionic gonadotropin stimulation in the neonatal and adult rat testis. *Endocrinology* 127, 2469-2474.
- Pall M, Mikuni M, Mitsube K, Brannstrom M, 2000.** Time-dependent ovulation inhibition of a selective progesterone-receptor antagonist (Org 31710) and effect on ovulatory mediators in the *in vitro* perfused rat ovary. *Biol Reprod* 63, 1642–1647.
- Pape JR, Skynner MJ, Sim JA, Herbison AE, 2001.** Profiling gamma-aminobutyric acid (GABA(A)) receptor subunit mRNA expression in postnatal gonadotropin-releasing hormone (GnRH) neurons of the male mouse with single cell RT-PCR. *Neuroendocrinology*. 74, 300-308.
- Park JY, Su YQ, Ariga M, Law E, Jin SL, Conti M, 2004.** EGF-like growth factors as mediators of LH action in the ovulatory follicle. *Science* 303, 682-684.
- Patacchiola F, Collecchio N, Di Ferdinando A, Palermo P, Di Stefano L, Mascaretti G, 2005.** Management of ovarian cysts in pregnancy: a case report. *Eur J Gynaecol Oncol*. 26, 651-653.
- Payne AH, 1990.** Hormonal regulation of cytochrome P450 enzymes, cholesterol side-chain cleavage and 17 alpha-hydroxylase/C17-20 lyase in Leydig cells. *Biol Reprod*. 42, 399-404.
- Payne AH, Sha LL, 1991.** Multiple mechanisms for regulation of 3beta-hydroxysteroid dehydrogenase/delta 5-delta 4- isomerase, 17 alpha-hydroxylase / C17-20 lyase cytochrome P450, and cholesterol side-chain cleavage cytochrome P450 messenger ribonucleic acid levels in primary cultures of mouse Leydig cells. *Endocrinology* 129, 1429-1435.
- Payne AH, Youngblood GL, 1995.** Regulation of expression of steroidogenic enzymes in Leydig cells. *Biol Reprod*. 52, 217-225.
- Peng XR, Hsueh AJ, LaPolt PS, Bjersing L, Ny T, 1991.** Localization of luteinizing hormone receptor messenger ribonucleic acid expression in ovarian cell types during follicle development and ovulation. *Endocrinology* 129, 3200-3207.

- Pertiwi AK, Kwan TK, Gower DB, 2002.** Pregnenolone metabolites in rat testis: endogenous concentrations, and intracellular distribution in whole testes during incubation in vitro. *J Steroid Biochem Mol Biol.* 81, 363-367.
- Pfaffl MW, 2001.** A new mathematical model for relative quantification in real-time RT-PCR. *Nucleic Acids Res.* 29, e45.
- Pielecka J, Moenter SM, 2006.** Effect of steroid milieu on gonadotropin-releasing hormone-1 neuron firing pattern and luteinizing hormone levels in male mice. *Biol Reprod.* 74, 931-937.
- Pierce JG, Parsons TF, 1981.** Glicoprotein hormones: structure and function. *Annu Rev Biochem.* 50, 465-495.
- Pimpinelli F, Parenti M, Guzzi F, Piva F, Hokfelt T, Maggi R, 2006.** Presence of delta opioid receptors on a subset of hypothalamic gonadotropin releasing hormone (GnRH) neurons. *Brain Res.* 1070, 15-23.
- Poletti A, Melcangi RC, Negri-Cesi P, Maggi R, Martini L, 1994.** Steroid binding and metabolism in the luteinizing hormone- releasing hormone-producing neuronal cell line GT1-1. *Endocrinology* 135, 2623–2628.
- Poletti A, Negri-Cesi P, Rabuffetti M, Colciago A, Celotti F, Martini L, 1998.** Transient expression of the 5alpha-reductase type 2 isozyme in the rat brain in late fetal and early postnatal life. *Endocrinology* 139, 2171-2178.
- Porter TD, Coon MJ, 1991.** Cytochrome P-450. Multiplicity of isoforms, substrates, and catalytic and regulatory mechanisms. *J Biol Chem.* 266, 13469-13472.
- Pralong FP, 2010.** Insulin and NPY pathways and the control of GnRH function and puberty onset. *Mol Cell Endocrinol.* 324, 82-86.
- Preslock JP, 1980.** A review of in vitro testicular steroidogenesis in rodents, monkeys and humans. *J Steroid Biochem.* 13, 965-975.
- Privalle CT, Crivello JF, Jefcoate CR, 1983.** Regulation of intramitochondrial cholesterol transfer to side-chain cleavage cytochrome P-450 in rat adrenal gland. *Proc Natl Acad Sci.* 80, 702-706.
- Rabinovici J, Jaffe RB, 1990.** Development and regulation of growth and differentiated function in human and subhuman primate fetal gonads. *Endocr Rev.* 11, 532-557.
- Ramakrishnappa N, Rajamahendran R, Lin YM, Leung PC, 2005.** GnRH in non-hypothalamic reproductive tissues. *Anim Reprod Sci.* 88, 95-113.
- Rao CV, Lei ZM, 2007.** The past, present and future of nongonadal LH/hCG actions in reproductive biology and medicine. *Mol Cell Endocrinol.* 269, 2-8.
- Rasmussen DD, Gambacciani M, Swartz W, Tueros VS, Yen SS, 1989.** Pulsatile gonadotropin-releasing hormone release from the human mediobasal hypothalamus in vitro: opiate receptor-mediated suppression. *Neuroendocrinology* 49, 150-156.
- Ravindranath N, Little-Ihrig L, Benyo DF, Zeleznik AJ, 1992.** Role of luteinizing hormone in the expression of cholesterol side-chain cleavage cytochrome P450 and 3 beta-hydroxysteroid dehydrogenase, delta 5-4 isomerase messenger ribonucleic acids in the primate corpus luteum. *Endocrinology* 131, 2065-2070.
- Reshef E, Lei ZM, Rao CV, Pridham DD, Chegini N, Luborsky JL, 1990.** The presence of gonadotropin receptors in nonpregnant human uterus, human placenta, fetal membranes, and decidua. *J Clin Endocrinol Metab.* 70, 421-430.
- Rey R, Campo S, Ayuso S, Nagle C, Chemes H, 1995.** Testicular steroidogenesis in the Cebus monkey throughout postnatal development. *Biol Reprod.* 52, 997-1002.
- Richards JS, 1994.** Hormonal control of gene expression in the ovary. *Endocr Rev.* 15:725-751.
- Richards JS, Russell DL, Ochsner S, Espey LL, 2002.** Ovulation: new dimensions and new regulators of the inflammatory-like response. *Annu Rev Physiol.* 64, 69-92.
- Richter-Unruh A, Wessels HT, Menken U, Bergmann M, Schmittmann-Ohters K, Schaper J, Tappeser S, Hauffa BP, 2002.** Male LH-independent sexual precocity in a 3.5-year-old boy caused by a somatic activating mutation of the LH receptor in a Leydig cell tumor. *J Clin Endocrinol Metab.* 87, 1052-1056.

- Riman T, Nilsson S, Persson IR, 2004.** Review of epidemiological evidence for reproductive and hormonal factors in relation to the risk of epithelial ovarian malignancies. *Acta Obstet Gynecol Scand.* 83, 783-795.
- Robinson J, 2006.** Prenatal programming of the female reproductive neuroendocrine system by androgens. *Reproduction* 132, 539–547.
- Roselli CE, 1991.** Synergistic induction of aromatase activity in the rat brain by estradiol and 5 alpha-dihydrotestosterone. *Neuroendocrinology* 53, 79-84.
- Ross PJ, Beyhan Z, Lager AE, Yoon SY, Malcuit C, Schellander K, Fissore RA, Cibelli JB, 2008.** Parthenogenetic activation of bovine oocytes using bovine and murine phospholipase C zeta. *BMC Dev Biol.* 19, 8-16.
- Rossant J, Cross JC, 2001.** Placental development: lessons from mouse mutants. *Nat Rev Genet.* 2, 538-548.
- Rulli SB, Ahtiainen P, Mäkelä S, Toppari J, Poutanen M, Huhtaniemi I, 2003.** Elevated steroidogenesis, defective reproductive organs, and infertility in transgenic male mice overexpressing human chorionic gonadotropin. *Endocrinology* 144, 4980-4990.
- Rulli SB, Gonzalez-Calvar SI, Campo S, Calandra RS, 1995.** Effects of two non-steroidal antiandrogens on testicular function in prepubertal rats. *J Androl.* 16, 225-232.
- Rulli SB, Huhtaniemi I, 2005.** What have gonadotrophin overexpressing transgenic mice taught us about gonadal function?. *Reproduction.* 130, 283-291.
- Rulli SB, Kuorelahti A, Karaer O, Pelliniemi LJ, Poutanen M, Huhtaniemi I, 2002.** Reproductive disturbances, pituitary lactotrope adenomas, and mammary gland tumors in transgenic female mice producing high levels of human chorionic gonadotropin. *Endocrinology* 143, 4084-4095.
- Russell DW, Wilson JD, 1994.** Steroid 5 alpha-reductase: two genes/two enzymes. *Annu Rev Biochem.* 63, 25-61.
- Sakuma Y, 2009.** Gonadal steroid action and brain sex differentiation in the rat. *J. Neuroendocrinol.* 21, 410-414.
- Sánchez-Criado JE, Garrido-Gracia JC, Bellido C, Aguilar R, Guelmes P, Abreu P, Alonso R, Barranco I, Millán Y, de Las Mulas JM, 2006.** Oestradiol-17beta inhibits tamoxifen-induced LHRH self-priming blocking hormone-dependent and ligand-independent activation of the gonadotrope progesterone receptor in the rat. *J Endocrinol.* 190, 73-84.
- Schomberg DW, Couse JF, Mukherjee A, Lubahn DB, Sar M, Mayo KE, Korach KS, 1999.** Targeted disruption of the estrogen receptor-alpha gene in female mice: characterization of ovarian responses and phenotype in the adult. *Endocrinology* 140, 2733-2744.
- Schwanzel-Fukuda M, Pfaff DW, 1989.** Origin of luteinizing hormone-releasing hormone neurons. *Nature.* 338, 161-164.
- Segaloff DL, Sprengel R, Nikolics K, Ascoli M, 1990.** Structure of the lutropin/choriogonadotropin receptor. *Recent Prog Horm Res.* 46, 261-303.
- Sela-Abramovich S, Edry I, Galiani D, Nevo N, Dekel N, 2006.** Disruption of gap junctional communication within the ovarian follicle induces oocyte maturation. *Endocrinology* 147, 2280-2286.
- Setchell BP, Maddocks S, Brooks DE, 1994.** Anatomy, vasculature, innervation and fluids of the male reproductive tract. En: *The physiology of reproduction*, Second edition, Knobil E, Neill J (eds), Raven Press, New York. Vol.1, 189-221.
- Shan L, Hardy DO, Catterall JF, Hardy MP, 1995.** Effects of luteinizing hormone (LH) and androgen on steady state levels of messenger ribonucleic acid for LH receptors, androgen receptors, and steroidogenic enzymes in rat Leydig cell progenitors in vivo. *Endocrinology* 136, 1686-1693.
- Shan LX, Phillips DM, Bardin CW, Hardy MP, 1993.** Differential regulation of steroidogenic enzymes during differentiation optimizes testosterone production by adult rat Leydig cells. *Endocrinology* 133, 2277-2283.
- Shikita M, Hall PF, 1973.** Cytochrome P-450 from bovine adrenocortical mitochondria: an enzyme for the side chain cleavage of cholesterol. I. Purification and properties. *J Biol Chem.* 248, 5598-5604.

- Shivers BD, Harlan RE, Morrell JI, Pfaff DW, 1983.** Absence of Oestradiol Concentration in Cell Nuclei of LHRH- Immunoreactive Neurons. *Nature* 304, 345–347.
- Silverman AJ, Jhamandas J, Renaud LP, 1987.** Localization of luteinizing hormone-releasing hormone (LHRH) neurons that project to the median eminence. *J Neurosci.* 7, :2312-2319.
- Silverman AJ, Kreyg LC, Zimmerman EA, 1979.** A comparative study of the luteinizing hormone releasing hormone (GnRH) neuronal network in mammals. *Biol Reprod.* 20, 98-110.
- Simard J, Luthy I, Guay J, Bélanger A, Labrie F, 1986.** Characteristics of interaction of the antiandrogen flutamide with the androgen receptor in various target tissues. *Mol Cell Endocrinol.* 44, 261-270.
- Simerly RB, 1998.** Organization and regulation of sexually dimorphic neuroendocrine pathways. *Behav Brain Res.* 92, 195-203.
- Simon LS, 1999.** Role and regulation of cyclooxygenase-2 during inflammation. *Am J Med.* 106, 37S-42S.
- Sirianni R, Chimento A, Malivindi R, Mazzitelli I, Andò S, Pezzi V, 2007.** Insulin-like growth factor-I, regulating aromatase expression through steroidogenic factor 1, supports estrogen-dependent tumor Leydig cell proliferation. *Cancer Res.* 67, 8368-8377.
- Siril Ariyaratne HB, Chamindrani Mendis-Handagama S, Buchanan Hales D, Ian Mason J, 2000.** Studies on the onset of Leydig precursor cell differentiation in the prepubertal rat testis. *Biol Reprod.* 63, 165-171.
- Sisk L, Foster DL, 2004.** The neural basis of puberty and adolescence. *Nature Neuroscience* 7, 1040-1047.
- Smith JT, Cunningham MJ, Rissman EF, Clifton DK, Steiner RA, 2005a.** Regulation of Kiss1 gene expression in the brain of the female mouse. *Endocrinology* 146, 3686-3692.
- Smith JT, Dungan HM, Stoll EA, Gottsch ML, Braun RE, Eacker SM, Clifton DK, Steiner RA, 2005b.** Differential regulation of Kiss-1 mRNA expression by sex steroids in the brain of the male mouse. *Endocrinology* 146, 2976-2984.
- Smith MS, Freeman ME, Neill JD, 1975.** The control of progesterone secretion during the estrous cycle and early pseudopregnancy in the rat: prolactin, gonadotropin and steroid levels associated with rescue of the corpus luteum of pseudopregnancy. *Endocrinology* 96, 219-226.
- Smith MS, Neill JD, 1976.** Termination at midpregnancy of the two daily surges of plasma prolactin initiated by mating in the rat. *Endocrinology* 98, 696-701.
- Solano AR, Vela AG, Catt KJ, Dufau ML, 1980.** Regulation of ovarian gonadotropin receptors and LH bioactivity during the estrous cycle. *FEBS Lett.* 122, 184-188.
- Spies HG, Niswender GD, 1971.** Levels of prolactin, LH and FSH in the serum of intact and pelvic-neurectomized rats. *Endocrinology* 88, 937-943.
- Stenman UH, Alfthan H, Hotakainen K, 2004.** Human chorionic gonadotropin in cancer. *Clin Biochem.* 37, 549-561.
- Stevens LC, Varnum DS, 1974.** The development of teratomas from parthenogenetically activated ovarian mouse eggs. *Dev Biol.* 37, 369-380.
- Stocco DM, 2000.** The role of the StAR protein in steroidogenesis: challenges for the future. *J Endocrinol.* 164, 247-253.
- Stocco DM, 2001.** Tracking the role of a star in the sky of the new millennium. *Mol Endocrinol.* 15, 1245-1254.
- Stojilkovic SS, Reinhart J, Catt KJ, 1994.** Gonadotropin-releasing hormone receptors: structure and signal transduction pathways. *Endocr Rev.* 15, 462-499.
- Suescun MO, González SI, Chiauzzi VA, Calandra RS, 1985.** Effects of induced hypoprolactinemia on testicular function during gonadal maturation in the rat. *J Androl.* 6, 77-82.
- Sung JH, Yoon HS, Lee JS, Kim CG, Kim MK, Yoon YD, 2002.** Differentiation and apoptosis of the mammalian embryo and embryonic stem cells (ESC). I. Establishment of mouse ESC and induction of differentiation by reproductive hormones. *Dev Reprod.* 6: 55–66.
- Sutton AL, Keri RA, 2007.** The pleiotropic effects of excessive luteinizing hormone secretion in transgenic mice. *Semin Reprod Med.* 25, 360-367.

- Szarek E, Farrand K, McMillen IC, Young IR, Houghton D, Schwartz J, 2008.** Hypothalamic input is required for development of normal numbers of thyrotrophs and gonadotrophs, but not other anterior pituitary cells in late gestation sheep. *J Physiol.* 586, 1185-1194.
- Takahashi T, Morrow JD, Wang H, Dey SK, 2006.** Cyclooxygenase-2-derived prostaglandin E(2) directs oocyte maturation by differentially influencing multiple signaling pathways. *J Biol Chem.* 281, 37117-37129.
- Taniguchi F, Couse JF, Rodriguez KF, Emmen JM, Poirier D, Korach KS, 2007.** Estrogen receptor-alpha mediates an intraovarian negative feedback loop on thecal cell steroidogenesis via modulation of Cyp17a1 (cytochrome P450, steroid 17alpha-hydroxylase/17,20 lyase) expression. *FASEB J.* 21:586-595.
- Taniguchi K, Matsuoka A, Kizuka F, Lee L, Tamura I, Maekawa R, Asada H, Taketani T, Tamura H, Sugino N, 2010.** Prostaglandin F2alpha stimulates cyclooxygenase-2 expression and prostaglandin F2alpha synthesis through NF-kB activation via reactive oxygen species in the corpus luteum of pseudopregnant rats. *Reproduction.* Sep 8. [Epub ahead of print]
- Tena-Sempere M, 2010.** Kisspeptin signaling in the brain: recent developments and future challenges. *Mol Cell Endocrinol.* 314, 164-169.
- Tepper MA, Roberts JL, 1984.** Evidence for only one beta-luteinizing hormone and no beta-chorionic gonadotropin gene in the rat. *Endocrinology.* 115, 385-391.
- Terasawa E, Fernandez DL, 2001.** Neurobiological mechanism of the onset of puberty in primates. *Endocr Rev.* 22, 111-151.
- Themmen APN, Huhtaniemi IT, 2000.** Mutations of gonadotropins and gonadotropin receptors: elucidating the physiology and pathophysiology of pituitary-gonadal function. *Endocr Rev.* 21, 551-583.
- Tsai PS, Werner S, Weiner RI, 1995.** Basic fibroblast growth factor is a neurotropic factor in GT1 gonadotropin-releasing hormone neuronal cell lines. *Endocrinology* 136, 3831-3838.
- Ulbright TM, 2004.** Gonadal teratomas: a review and speculation. *Adv Anat Pathol.* 11, 10-23.
- Urban RJ, Davis MR, Rogol AD, Johnson ML, Veldhuis JD, 1988.** Acute androgen receptor blockade increases luteinizing hormone secretory activity in men. *J Clin Endocrinol Metab.* 67, 1149-1155.
- Urbanski HF, Kim SO, Connolly ML, 1990.** Influence of photoperiod and 6-methoxybenzoxazolinone on the reproductive axis of inbred LSH/Ss Lak male hamsters. *J Reprod Fertil.* 90, 157-163.
- Veldhuis JD, 2001.** Eje Hipotalámico-Hipofisario-Gonadal Masculino. En: *Endocrinología de la reproducción. Fisiología, fisiopatología y manejo clínico.* 4a edición, Yen SSC, Jaffe RB, Barbieri RL (Eds), Panamericana. Capítulo 22, 664-673.
- Veldhuis JD, Johnson ML, 1986.** Cluster analysis: a simple versatile, and robust algorithm for endocrine pulse detection. *Am. J. Physiol.* 250, E486-E493.
- Verhoeven G, Willems A, Denolet E, Swinnen JV, De Gendt K, 2010.** Androgens and spermatogenesis: lessons from transgenic mouse models. *Philos Trans R Soc Lond B Biol Sci.* 365, 1537-1556.
- Walters KA, Allan CM, Handelsman DJ, 2008.** Androgen actions and the ovary. *Biol Reprod.* 78, 380-389.
- Weihua Z, Andersson S, Cheng G, Simpson ER, Warner M, Gustafsson JA, 2003.** Update on estrogen signaling. *FEBS Lett.* 546, 17-24.
- Weisz J, Ward IL, 1980.** Plasma testosterone and progesterone titers of pregnant rats, their male and female fetuses, and neonatal offspring. *Endocrinology* 106, 306-316.
- Wen S, Ai W, Alim Z, Boehm U, 2010.** Embryonic gonadotropin-releasing hormone signaling is necessary for maturation of the male reproductive axis. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 107, 16372-16377.
- Wendler A, Baldi E, Harvey BJ, Nadal A, Norman A, Wehling M, 2010.** Position paper: Rapid responses to steroids: current status and future prospects. *Eur J Endocrinol.* 162, 825-830.

- Wetsel WC, Valença MM, Merchenthaler I, Liposits Z, López FJ, Weiner RI, Mellon PL, Negro-Vilar A, 1992.** Intrinsic pulsatile secretory activity of immortalized luteinizing hormone-releasing hormone-secreting neurons. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 89, 4149-4153.
- Wildt L, Häusler A, Marshall G, Hutchison JS, Plant TM, Belchetz PE, Knobil E, 1981.** Frequency and amplitude of gonadotropin-releasing hormone stimulation and gonadotropin secretion in the rhesus monkey. *Endocrinology* 109, 376-385.
- Woller MJ, Terasawa E, 1992.** Estradiol enhances the action of neuropeptide Y on in vivo luteinizing hormone-releasing hormone release in the ovariectomized rhesus monkey. *Neuroendocrinology* 56, 921-925.
- Woodruff TK, Besecke LM, Groome N, Draper LB, Schwartz NB, Weiss J, 1996.** Inhibin A and inhibin B are inversely correlated to follicle-stimulating hormone, yet are discordant during the follicular phase of the rat estrous cycle, and inhibin A is expressed in a sexually dimorphic manner. *Endocrinology* 137, 5463-5467.
- Xu C, Xu XZ, Nunemaker CS, Moenter SM, 2004.** Dose-dependent switch in response of gonadotropin-releasing hormone (GnRH) neurons to GnRH mediated through the type I GnRH receptor. *Endocrinology* 145, 728-735.
- Yallampalli C, Osuamkpe C, Nagamani M, 1993.** Influence of the anti-androgen hydroxyflutamide on in vitro development of mouse embryos. *J Reprod Fertil.* 99, 467-470.
- Yamaguchi M, Ogren L, Endo H, Soares MJ, Talamantes F, 1994.** Co-localization of placental lactogen-I, placental lactogen-II, and proliferin in the mouse placenta at midpregnancy. *Biol Reprod.* 51, 1188-1192.
- Yeh J, Adashi EY, 2001.** El Ciclo Ovárico. En: *Endocrinología de la reproducción. Fisiología, fisiopatología y manejo clínico.* 4a edición, Yen SSC, Jaffe RB, Barbieri RL (Eds), Panamericana. Capítulo 6, 164-202.
- Yen SSC, 2001.** Neuroendocrinología de la reproducción. En: *Endocrinología de la reproducción. Fisiología, fisiopatología y manejo clínico.* 4a edición, Yen SSC, Jaffe RB, Barbieri RL (Eds), Panamericana. Capítulo 2, 31-85.
- Yoshida N, Amanai M, Fukui T, Kajikawa E, Brahmajosyula M, Iwahori A, Nakano Y, Shoji S, Diebold J, Hessel H, Huss R, Perry AC, 2007.** Broad, ectopic expression of the sperm protein PLCZ1 induces parthenogenesis and ovarian tumours in mice. *Development* 134, 3941-3952.
- Zhang C, Bosch MA, Rønnekleiv OK, Kelly MJ, 2009a.** Gamma-aminobutyric acid B receptor mediated inhibition of gonadotropin-releasing hormone neurons is suppressed by kisspeptin-G protein-coupled receptor 54 signaling. *Endocrinology* 150, 2388-2394.
- Zhang FP, Poutanen M, Wilbertz J, Huhtaniemi I, 2001.** Normal prenatal but arrested postnatal sexual development of luteinizing hormone receptor knockout (LuRKO) mice. *Mol Endocrinol.* 15, 172-183.
- Zhang Y, Zhao H, Asztalos S, Chisamore M, Sitabkhan Y, Tonetti DA, 2009b.** Estradiol-induced regression in T47D:A18/PKCalpha tumors requires the estrogen receptor and interaction with the extracellular matrix. *Mol Cancer Res.* 7, 498-510.
- Zhou Y, Bellingard V, Feng KT, McMaster M, Fisher SJ, 2003.** Human cytotrophoblasts promote endothelial survival and vascular remodeling through secretion of Ang2, PlGF, and VEGF-C. *Dev Biol.* 263, 114-125.
- Zlotkin T, Farkash Y, Orly J, 1986.** Cell-specific expression of immunoreactive cholesterol sidechain cleavage cytochrome P-450 during follicular development in the rat ovary. *Endocrinology* 119, 2809-2820.