

**UNIVERSIDAD DE LA LAGUNA**

**«Regulación intrínseca del ovario por el sistema  
Renina-angiotensina y apoptosis»**

**Autor: Ángela Palumbo  
Director: Dr. D. Carlos Hernández Calzadilla**

**Departamento de Bioquímica y Biología Molecular**

**DEPARTAMENTO DE BIOQUÍMICA Y BIOLOGÍA MOLECULAR  
UNIVERSIDAD DE LA LAGUNA**



Avda. Astrofísico Fco. Sánchez, s/n.  
38206 LA LAGUNA, TENERIFE  
Teléfono:34-22-318358. Fax: 34-22-318354.

DON CARLOS HERNÁNDEZ CALZADILLA, PROFESOR TITULAR DEL DEPARTAMENTO DE BIOQUÍMICA Y BIOLOGÍA MOLECULAR DE LA UNIVERSIDAD DE LA LAGUNA,

**C E R T I F I C A** ; Que D<sup>a</sup> Angela Palumbo ha realizado bajo mi dirección los trabajos de investigación que se incluyen en la memoria titulada "*Regulación intrínseca del ovario por el sistema renina-angiotensina y apoptosis*", y que se presentan para la obtención del grado de Doctora en Medicina.

Revisada la presente memoria estimo que corresponde con los objetivos propuestos y resultados obtenidos y en consecuencia autorizo su presentación como tesis doctoral para defensa pública ante el tribunal que sea designado al efecto.

Y para que así conste, expido la presente verificación en La Laguna a seis de mayo de mil novecientos noventa y nueve.

Fdo.: Carlos Hernández Calzadilla

*A Pablo*

## AGRADECIMIENTOS

Al Profesor Carlos Hernández Calzadilla que, desde el principio y siempre con ilusión y paciencia, accedió a dirigir, ordenar y corregir esta tesis.

Al Profesor Frederick Naftolin, de Yale University, por haberme enseñado el método científico y haberme transmitido su enorme entusiasmo por la investigación.

A la Profesora María Luisa Carcangiu, de Yale University, por su ayuda en la selección de los ovarios humanos y en la interpretación de los experimentos de inmunohistoquímica.

Al Profesor Antonio Pellicer, de la Universidad de Valencia, al Dr. Avi Lightman, del Rambam Medical Center, Israel, y a la Dra. Carla Jones Williams por su colaboración, codo con codo, en varios experimentos de este trabajo.

Al Dr. Julio Avila Marrero por su ayuda incansable y continua asistencia.

Al Dr. Javier Garcia Pérez, nefrólogo y experto estadístico por su colaboración para validar con números los resultados que se presentan a continuación.

Siendo esta la página más leída de todas las tesis, será en la que más se noten omisiones imperdonables. Para evitarlas, quiero, en general, agradecer a todas las personas que directa o indirectamente han hecho posible los experimentos, interpretación y edición de esta tesis.

## ABREVIATURAS

ABC	Avidin-Biotin-Peroxidase Complex
ACE	Angiotensin Converling Enzyme
AngI	Angiotensina I
AngII	Angiotensina II
AngIII	Angiotensina III
CSF	Colony-stimulating factor
FIV	Fertilización in vitro
FSH	Follicle Stimulating Hormone
GnRH	gonadotrophin-releasing hormone
GVBD	Geminal Vesicle Breakdown
hCG	Human Chorionic Gonadotrophin
hMG	Human Menopausal Gonadotrophin
LH	Luteinizing Hormone
MEM	Minimal Essential Media
mRNA	RNA mensajero
OVRAS	Sistema Renina-Angiotensina Ovarico
PA	Activador del Plasminógeno
PBS	Phosphate Buffer Saline
PG	Prostaglandinas
PMSG	Pregnant Mare Serum Gonadotrophin
PRA	Plasma Renin Activity
RAS	Sistema Renina-Angiotensina
RIA	Radioinmunoassay
(RT)-PCR	Reverse Transcription PCR
Sar	Saralasin
SOP	Síndrome de ovarios poliquístico
SSC	Tampón citrato sódico
VG	Vesícula Germinal

## INDICE

### Capítulo 1

INTRODUCCION .....	2
EL SISTEMA RENINA-ANGIOTENSINA .....	6
LOS SISTEMAS RENINA-ANGIOTENSINA ULTRABARBS .....	8
EL SISTEMA RENINA-ANGIOTENSINA OVARICO .....	10
APOPTOSIS .....	11
APOPTOSIS: CONCEPTOS GENERALES .....	16
APOPTOSIS EN EL OVARIO .....	17
RELACION ENTRE EL SISTEMA RENINA-ANGIOTENSINA Y APOPTOSIS .....	17

### Capítulo 2

PLANTAMIENTO EXPERIMENTAL .....	20
---------------------------------	----

### Capítulo 3

MATERIAL Y METODOS .....	23
MATERIALES .....	28
METODOS .....	28
INMUNODIFUSIÓN .....	28
ESTUDIO DEL EFECTO DE LA ANGIOTENSINA II SOBRE LA SECRECIÓN DE HORMONAS ESTEROIDEAS POR CÉLULAS DE LA GRANULOSA-LUTEINIZADAS HUMANAS EN CULTIVO .....	31
ESTUDIO DEL EFECTO DE LA ANGIOTENSINA II SOBRE LA OVULACION Y LA MADURACION DE LOS OVOCITOS .....	33
ESTUDIO DE LA APOPTOSIS EN LA ATRENSA FOLICULAR EN VARIOS ESTADIOS FUNCIONALES .....	35
ESTUDIO DE LA APOPTOSIS DURANTE LA FORMACION Y REGRESIÓN DEL CUERPO LUTEO .....	39
ESTUDIO DE LA APOPTOSIS EN UN MODELO EXPERIMENTAL DE OVARIOS POLIQUÍSTICOS DE RATA .....	40

## Capítulo 4

### RESUMEN

#### SISTEMA RENINA-ANGIOTENSINA OVÁRICO

LOCALIZACIÓN INMUNOHISTOQUÍMICA DE LA RENINA Y DE LA ANGIOTENSINA II EN OVARIOS DE RATA .....	43
LOCALIZACIÓN INMUNOHISTOQUÍMICA DE LA RENINA Y DE LA ANGIOTENSINA II EN OVARIOS HUMANOS NORMALES Y BAJO ESTIMULO GONADOTROPINICO .....	46
LOCALIZACIÓN INMUNOHISTOQUÍMICA DE LA RENINA Y DE LA ANGIOTENSINA II EN OVARIOS DE MUJERES CON SINDROME DE OVARIOS POLIQUÍSTICOS .....	57
Efecto de la Ansele In Vitro sobre la Producción de Hormonas Esteroides por Células de la Granulosa de Tejido Humano .....	60
Efecto de la Ovitulacón Mediante Saralasin en Ratas Inmaduras Estimuladas con Gonadotropinas .....	63
Efecto de la Maduración Ovocitaria Mediante Saralasin en Ratas Inmaduras Estimuladas con Gonadotropinas .....	65
Apoptosis	
LA APOPTOSIS COMO MECANISMO DE LA ATRÉSIA FOLICULAR EN LA RATA .....	68
PARTEICIPACIÓN DE LA APOPTOSIS EN LA FORMACIÓN Y REGRESIÓN DEL CUERPO LÚTEO .....	74
EL PAPEL DE LA APOPTOSIS EN EL MECANISMO DE CISTOGÉNESIS EN UN MODELO ANIMAL DE SINDROME DE OVARIOS POLIQUÍSTICOS .....	78

## Capítulo 5

### DISCUSIÓN

DISCUSIÓN GENERAL DE MATERIALES Y MÉTODOS .....	85
DISCUSIÓN DE LOS RESULTADOS OBTENIDOS EN CADA GRUPO DE EXPERIMENTOS .....	92
CONCLUSIONES .....	113
BIBLIOGRAFÍA .....	117

# **Capítulo I**

## **Introducción**

## EL SISTEMA RENINA-ANGIOTENSINA

El sistema renina-angiotensina (RAS) es un sistema enzimático-hormonal que tiene un importante papel en la regulación de la tensión arterial y en el mantenimiento del equilibrio hidro-electrolítico. La renina es una aspartil-proteasa clásicamente sintetizada y secretada por el aparato yuxtaglomerular renal. La síntesis de renina ocurre a partir de un precursor inactivo de alto peso molecular (60.000 Da), la prorenina, que es convertida intracelularmente en renina activa por parte de varias enzimas, entre ellas el activador del plasminógeno. La cadena enzimática clásica es ilustrada en la Figura 1. La renina de origen renal actúa sobre su sustrato plasmático, el angiotensinógeno, una  $\alpha_2$ -globulina de síntesis hepática, a nivel de la unión Leu<sup>10</sup>-Leu<sup>11</sup> formando angiotensina I (AngI), el decapeptido N-terminal; durante su paso por el sistema circulatorio pulmonar el enzima convertidor ("angiotensin converting enzyme", ACE) corta el dipéptido carboxi-terminal y, así, transforma la AngI en el octapeptido angiotensina II (AngII), clásicamente conocido como el péptido activo del RAS. La AngII tiene una vida media muy corta (T/2= 1 minuto) y rápidamente da origen a la AngIII mediante corte del aminoácido N-terminal. El heptapeptido AngIII mantiene parte de la actividad de la AngII y da origen a fragmentos inactivos por acción de las angiotensinasas circulantes (Haber y Carlson, 1983). El RAS representa una excepción respecto a los demás sistemas endocrinos en que el enzima responsable de la conversión de pro-hormona a hormona activa se segrega por el riñón directamente a la sangre y el péptido activo AngII se produce extracelularmente, facilitando así el transporte a los órganos diana, el músculo liso de la pared arterial y la corteza de la glándula suprarrenal.

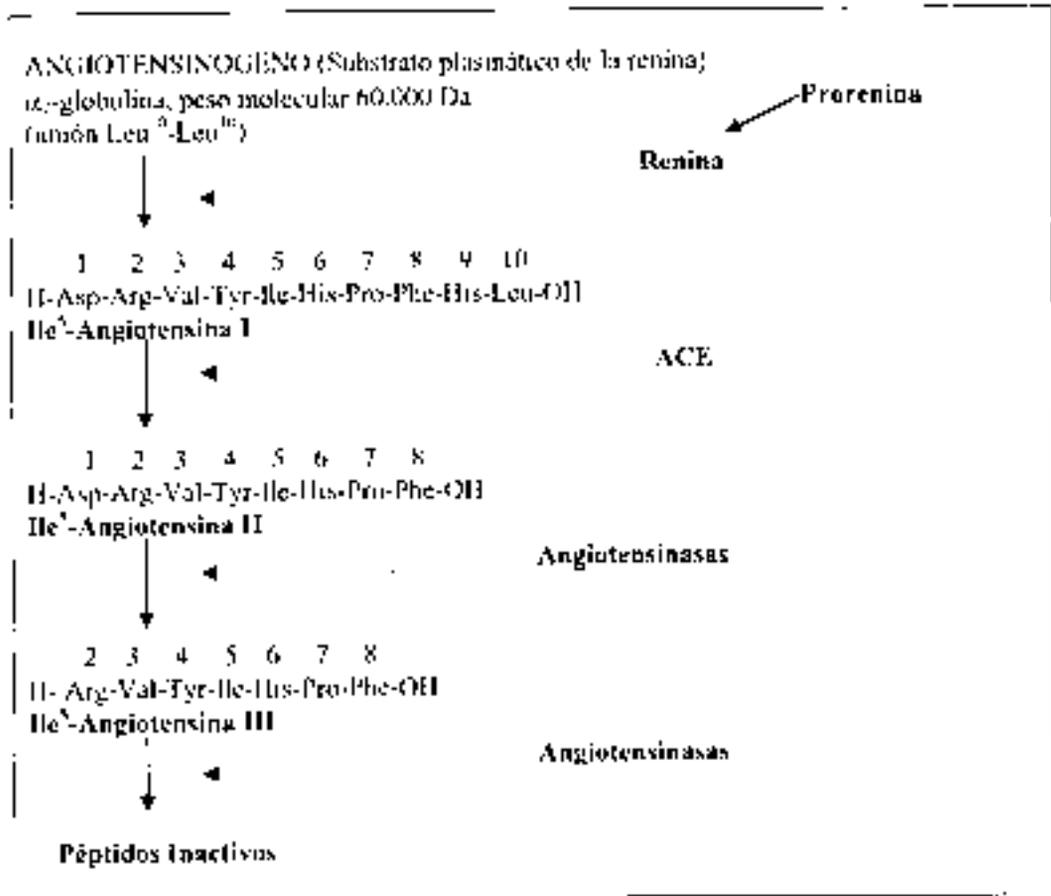


Figura 1. Concepto clásico del sistema renina-angiotensina.

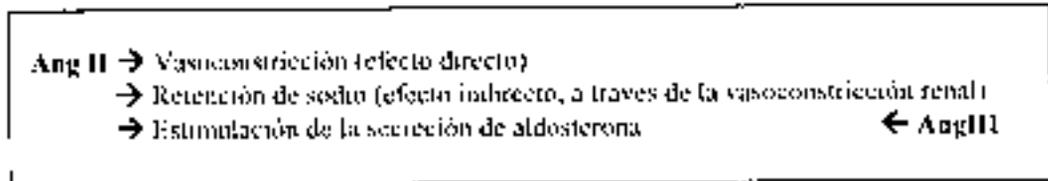


Figura 2. Efectos "clásicos" de la AngII y de la AngIII.

A través de su acción estimuladora de la secreción de aldosterona y vasoconstrictora, la AngII actúa como regulador de la tensión arterial y de la homeostasis de volumen (Figura 2).

La AngIII no tiene actividad vasoconstrictora importante, pero es capaz de estimular la producción de aldosterona, ejerciendo así un papel más tónico en el control de la homeostasis hidroelectrolítica. La presión de perfusión renal, la concentración de sodio y/o potasio a nivel de la mácula densa y de la nefrona distal, el sistema nervioso simpático y varios factores circulantes como las prostaglandinas, el potasio, el factor natriurético atrial y la AngII regulan la secreción de renina (Haber y Carlson, 1983). La secreción de prorenina parece estar regulada por los mismos factores. El mecanismo preciso de la conversión de la prorenina a renina activa en el riñón y en el plasma todavía no ha sido elucidado completamente. La prorenina circula en el plasma en concentraciones 10 veces superiores a las de la renina activa (Sealey y Atlas, 1984). Es todavía objeto de estudio el significado biológico de la heterogeneidad de la molécula de la renina y el posible papel de la interconversión entre renina activa e inactiva en el control y la regulación de la actividad del sistema renina-angiotensina en respuesta a los distintos estímulos fisiológicos, farmacológicos y patológicos. Otro argumento controvertido es la existencia de vías alternativas de formación de la AngII, eludiendo al enzima convertidor, y la formación de péptidos activos distintos de la AngII como por ejemplo la Ang 1-7 (Figura 3) (Ferrario e Iyer, 1998). Estas consideraciones son de particular actualidad en relación con la fisiología de los "sistemas renina-angiotensina tisulares".

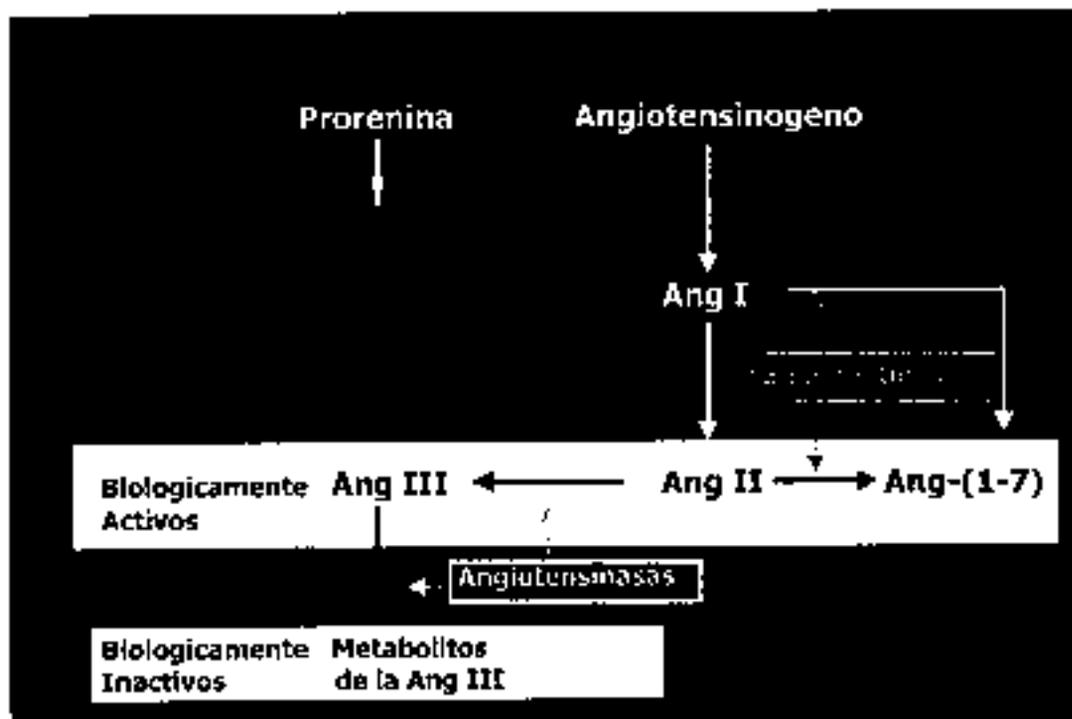


Figura 3. Nuevo esquema del RAS, que incluye la formación del péptido activo Ang 1-7.

Estudios recientes han confirmado que la angiotensina-(1-7) es un importante componente del RAS, que se produce a partir de la Ang I eludiendo la formación de AngII (Ferrario e Iyer, 1998). La formación de Ang-(1-7) está controlada por al menos 3 endopeptidasas, dependiendo del compartimento tisular: la neprilisina, la thimet oligopeptidasa y la propyl oligopeptidasa. La neprilisina y la thimet oligopeptidasa están también implicadas en el metabolismo de la bradikinina y del péptido natriurético atrial. Junto con la AngI y la bradikinina, la Ang-(1-7) es un substrato endógeno para el ACE. Esto sugiere que existe una interrelación compleja entre las vías enzimáticas que forman AngII y otros varios péptidos vasodilatadores que pertenecen al mismo RAS o a otros sistemas peptidérgicos. Las acciones de la Ang-(1-7) son opuestas a las acciones descritas

para la AngII. Sus propiedades básicas, vasodilatadora y antihipertensiva, son mediadas por un receptor distinto a los receptores AT1 y AT2 que hasta ahora han sido caracterizados farmacológicamente. Esta acción es en parte directa y en parte mediada por un aumento de las prostaglandinas, y del óxido nítrico (Ferraro e Iyer, 1998).

## LOS SISTEMAS RENINA-ANGIOTENSINA TISULARES

El concepto clásico de sistema renina-angiotensina circulante ha sido revisado en la última década, habiéndose postulado y demostrado la existencia de sistemas renina-angiotensina tisulares locales. El enzima clave del sistema, la renina, ha sido descubierta en muchos órganos y tejidos, incluido el cerebro (Ganten et al, 1971; Hirose et al, 1978), la adenohipófisis (Naruse et al, 1981; Naruse et al, 1985), las glándulas salivares (Cohen et al, 1972; Panthier et al, 1982), la pared vascular (Swales, 1979), el miocardio (Kobori et al, 1999), el aparato genital masculino (Parmentier et al, 1983; Pandey et al, 1984) y femenino (Poisner et al, 1981; Johnson et al, 1984; Dzau et al, 1987), la suprarrenal (Naruse et al, 1985) y varias glándulas endocrinas (Naruse et al, 1985). Los estudios posteriores de biología molecular que han evidenciado en varios tejidos la presencia de mRNA de la renina (Pandey et al, 1984; Dzau et al, 1988; Deschepper et al, 1986), junto a la demostración *in vitro* de la síntesis de renina por parte de varios tipos celulares (Symmonds et al, 1968; Warren et al, 1982; Re et al, 1982), y a la demostración de renina en los tejidos mediante inmunohistoquímica (Deschepper et al, 1986), representan una indicación clara de que la renina *in vivo* es sintetizada a nivel local. Otros componentes del

sistema renina-angiotensina, el enzima convertidor (Van Sande et al, 1985), el sustrato angiotensinógeno (Ohkubo et al, 1986) y el péptido activo AngII (Deschepper et al, 1985), han sido identificados en muchos tejidos extrarrenales, sugiriendo la posibilidad de una síntesis local, presumiblemente intracelular, de AngII. El significado biológico de esta angiotensina tisular, con funciones distintas de la regulación de la tensión arterial y del volumen plasmático, es actualmente objeto de estudio.

Campbell postuló que es posible una interacción a varios niveles entre los sistemas renina-angiotensina locales y el sistema renina-angiotensina circulante (Campbell, 1987). Según su modelo, la formación de AngII en un tejido puede ser intra o extracelular. La formación intracelular de AngII puede derivar de la rotura del angiotensinógeno sintetizado localmente o de la recaptación y rotura del sustrato plasmático. Alternativamente, el angiotensinógeno de origen tisular y el plasmático pueden coexistir en el intersticio y ser metabolizados por parte de enzimas locales o plasmáticos. Si la formación local de AngII puede derivar, como hemos dicho, de la interacción de la renina y angiotensinógeno de origen plasmático y/o local, una cuestión todavía no solucionada es la contribución relativa de cada uno de estos mecanismos a la producción de AngII en los distintos órganos y tejidos donde ha sido postulada la existencia de un sistema renina-angiotensina local. No podemos excluir que la producción local de los componentes del RAS contribuya a las concentraciones plasmáticas de estas sustancias y, en definitiva, al RAS circulante. En particular, parece ser importante el papel de los RAS locales en la producción de prorenina circulante: aunque el riñón produce prorenina, la presencia de niveles de prorenina plasmática casi normales en pacientes nefrectomizados, en ausencia de renina activa circulante,

indica que la síntesis extrarenal de prorenina es al menos igual, si no superior, a la renal (Sealey et al, 1977). Es probable que la activación local de la prorenina tenga un papel importante en la fisiología de los RAS locales, y los mecanismos implicados en esta activación son actualmente objeto de estudio.

Resumiendo, los datos de la literatura científica indican que los RAS tisulares pueden asumir un significado funcional sin que haya modificaciones del RAS circulante. Por lo tanto, mientras el RAS circulante y en particular la secreción de renina por parte del aparato yuxtaglomerular da una respuesta hemostática rápida y eficaz a las modificaciones agudas de la tensión arterial y del equilibrio hidro-electrolítico, parece evidente que los RAS tisulares tienen en los tejidos en los cuales existen una función más tónica y sobre todo local.

Otro concepto importante a tener en cuenta a propósito de los RAS circulantes es la existencia en estos tejidos de vías alternativas de formación de la AngII que eluden la actividad del ACE. En condiciones normales estas vías contribuyen a aproximadamente un 40% de la transformación de AngI a AngII, pero en estados patológicos las vías que no dependen del ACE representarían la mayoría (Hollenberg et al, 1998). Una importante implicación de estos resultados es que para fines terapéuticos son mucho más eficaces los antagonistas de la AngII que los inhibidores del ACE.

### **EL SISTEMA RENINA-ANGIOTENSINA OVÁRICO.**

En 1972 se demostró que la Ang II causa un aumento de la permeabilidad vascular (Robertson and Khairallah, 1972) y en 1985 Fernández y colaboradores demostraron que la angiotensina II estimula la angiogénesis (Fernández et al,

1985). Estos autores aplicaron unos implantes de Ang II en la córnea de conejos y observaron abundante neoangiogénesis en comparación con animales control a los que se aplicaron implantes del mismo material, pero sin Ang II. Estos elegantes experimentos abrieron el camino al estudio del sistema renina-angiotensina ovárico (OVRAS). La demostración del papel del RAS en la angiogénesis indujo a Fernández y colaboradores a medir los niveles de renina en el fluido folicular de pacientes estimuladas con gonadotropinas, que se sometían a punción folicular para fertilización *in vitro* (FIV). Los niveles eran elevadísimos, significativamente más altos que los niveles encontrados en plasma obtenido simultáneamente de las mismas pacientes, lo que sugería de una parte el origen ovárico de la actividad renínica encontrada en el fluido folicular ("Renin-like activity", RLA) , y de la otra un posible papel de las gonadotropinas en la estimulación de la producción de renina ovárica (Fernandez et al, 1985) .

Poco después, el grupo de Sealey publicó otro trabajo demostrando elevados niveles de prorenina en el fluido folicular de pacientes estimuladas con gonadotropinas para FIV (Glorioso et al, 1986). Este estudio confirmaba los resultados de Fernández y sugería que la forma principal de renina producida en el ovario es la forma inactiva, la prorenina. En 1986 Cullen y colaboradores encontraron también elevados niveles de Ang II en el fluido folicular de pacientes sometidas a FIV (Cullen et al, 1986). En 1987 Lightman y colaboradores compararon los niveles de Ang II y RLA encontrados en pacientes sometidas a FIV con los niveles presentes en los folículos ováricos durante los ciclos normales (Lightman et al, 1987) demostrando:

- a). Que durante los ciclos normales los niveles permanecen muy bajos hasta los días 9-12 del ciclo, aumentando en la fase preovulatoria (días 13-14).
- b). Que en los ciclos estimulados los niveles foliculares son mucho más elevados que en los ciclos naturales.
- c). Que los niveles foliculares de Ang II y renina son, en todo caso, superiores a los niveles plasmáticos.

El estudio de Lightman y colaboradores sugiere claramente no solo el origen ovárico de la RLA y Ang II foliculares, sino también que este hipotético sistema renina-angiotensina ovárico (OVRAS) responde a las modificaciones cíclicas de las gonadotropinas hipofisarias; específicamente el pico preovulatorio de LH, así como la administración de hCG para desencadenar la ovulación, causan un aumento dramático de la producción de Ang II y RLA ováricas.

Esta tesis se propuso como primer objetivo la ulterior caracterización del OVRAS y el estudio de su papel en la fisiopatología ovárica.

## APOPTOSIS

En 1991 Hughes y Gorospe (Hughes y Gorospe, 1991) y Tilly y colaboradores (Tilly et al. 1991) demostraron por primera vez la existencia de apoptosis en ovarios de varias especies animales y la relacionaron con la atresia folicular y la regresión del cuerpo lúteo. El hecho fundamental que nos sugiere que puede existir una relación entre el OVRAS y la apoptosis es que tanto la apoptosis como el OVRAS se localizan en las células de la granulosa de los

folículos atrésicos. Además, la apoptosis parece ocurrir durante la regresión del cuerpo lúteo, y también en el cuerpo lúteo se localizan los componentes del OVRAS. A raíz de estas observaciones decidimos estudiar primero la relación entre apoptosis y atresia folicular y después la evolución de la apoptosis durante la formación y regresión del cuerpo lúteo. A continuación, nos decidimos a estudiar un modelo experimental de ovarios poliquísticos para investigar el posible papel de la apoptosis en el proceso de la oostogénesis en el síndrome de ovarios poliquísticos.

## **APOPTOSIS: CONCEPTOS GENERALES**

En 1972 Kerr y colaboradores (Kerr et al, 1972) introdujeron el concepto de apoptosis, o muerte celular programada, como un tipo de muerte celular "fisiológica" con un importante papel, complementario a la mitosis, en la homeostasis tisular. Aunque parezca lógico que la muerte celular, junto con la proliferación y la diferenciación represente una parte esencial del ciclo celular, la existencia de una muerte celular fisiológica en los tejidos ha sido ignorada hasta hoy. Al contrario de la necrosis, que destruye completamente la arquitectura y funcionalidad del órgano afectado, la apoptosis es un tipo de muerte celular no tóxico, que afecta a células aisladas en medio de tejido vivo y no causa ninguna reacción inflamatoria. Las células que mueren por apoptosis están caracterizadas por una típica fragmentación internucleosómica del DNA en polinucleotidos que son múltiplos de 180-200 bp. Cuando el DNA de las células apoptóticas es analizado mediante electroforesis en gel se observa un típico patrón en escalera. A la fragmentación nuclear sigue la fragmentación del citoplasma y la rápida

fagocitosis por parte de células blancas residentes: así se mantiene la integridad tisular. La típica fragmentación del DNA de las células apoptóticas parece ser debida a la activación de una endonucleasa dependiente de  $Ca^{++}$  y  $Mg^{++}$  (Peitsch et al, 1993).

La apoptosis es un proceso activo, programado genéticamente, y se han identificado varios genes que la modulan en tejidos específicos (Williams y Smith, 1993). Finalmente, la apoptosis está regulada por factores de crecimiento que, en ciertos casos, tienen un papel de "factores de supervivencia", bien bloqueándola o induciéndola en otros casos (Collins y Lopez-Rivas, 1993).

Inicialmente la apoptosis fue estudiada durante la embriogénesis y la metamorfosis (Clarke, 1990) y sólo más recientemente se ha reconocido que la apoptosis es un proceso más generalizado que también participa en la remodelación de los tejidos adultos (Schwartzman y Cidlowski, 1993).

La tabla 1 muestra algunos ejemplos de apoptosis en tejidos adultos. La apoptosis ocurre durante el normal "turnover" tisular: por ejemplo, en el hígado (Kerr, 1971) y en el intestino delgado (Potten, 1982). La atrofia de los tejidos hormono-dependientes que ocurre como consecuencia de la deprivación hormonal implica un extenso proceso de delección celular mediante apoptosis (Tabla 2). Ejemplos típicos son la corteza suprarrenal tras deprivación de ACTH (Wyllie et al, 1973), la próstata ventral de ratón tras orquidectomía (Kerr y Searle, 1973), el endometrio tras deprivación estro-progestinica (Hopwood y Levison, 1976), y la glándula mamaria tras deprivación de prolactina (Strange et al, 1992).

<b>MODALIDAD/TEJIDO</b>	<b>REFERENCIA</b>
"Turnover" normal. Hígado Intestino delgado	Kerr, 1971 Potten, 1982
Atrofia de los tejidos hormono-dependientes después de deprivación hormonal	Tenniswood et al, 1992
Atrofia de otro tipo: Isquemia leve del hígado Riñón tras ligadura del uréter	Kerr, 1971 Globe, 1987
Regresión de la hiperplasia parenquimal: Hígado Riñón Páncreas	Columbano, 1985 Lodda-Columbano, 1989 Oates, 1986
Neoplasias Apoptosis espontánea Apoptosis tras tratamiento	Wyllie, 1992 Uckun, 1992; Dive, 1991
Sistema inmune: Inmunidad celular Delección de linfocitos B y durante la selección negativa	Schmal, 1986 McCarthy, 1992

Tabla 1. Ejemplos de apoptosis en tejidos adultos.

<b>Factor</b>	<b>Órgano/Tipo celular</b>	<b>Referencia</b>
ACTH	Cortical suprarrenal	Wyllie et al, 1973
Andrógenos	Próstata ventral	Kerr y Searle, 1973
Prolactina	Glándula mamaria durante la lactancia	Strange et al, 1992
Diethylstilbestrol	Tumor renal estrógeno-dependiente	Bursch et al, 1991
NGF (Nerve growth factor)	Neuronas	Martin et al, 1988
Platelet-derived growth factor	Oligodendroцитos	Barres et al, 1992
Insulin-like growth factor	Oligodendroцитos	Barres et al, 1992
CSF (Colony-stimulating factors)	Células hemopoyéticas	Williams et al, 1990

Tabla 2. Ejemplos de apoptosis tras remoción de hormonas: factores de crecimiento.

Otros tipos de atrofia, como la inducida en el hígado por la isquemia leve (Kerr, 1971) o en el riñón por la ligadura ureteral (Gobé et al, 1987), también implican un proceso de apoptosis. La regresión de la hiperplasia parenquimal en varios órganos incluidos el hígado (Columbano, 1985), el riñón (Ladda-Columbano 1989), y el páncreas (Oates, 1986), también ocurre por apoptosis. Los agentes antineoplásicos, como las radiaciones ionizantes y los fármacos citotóxicos causan muerte celular por apoptosis (Uckun, 1992; Dive and Hickman, 1991). La apoptosis ocurre espontáneamente en las neoplasias y el equilibrio entre apoptosis y mitosis que, en última instancia, determina la velocidad de crecimiento del tumor, está genéticamente determinado (Wyllie, 1992). Por último, la apoptosis ocurre extensamente en el sistema inmune (McCarthy et al, 1992). La deleción de los linfocitos B y T durante la selección negativa en la respuesta inmune ocurre mediante apoptosis (Schmid, 1986).

Agente	Órgano	Referencia
TGF- $\beta$ (Transforming growth factor- $\beta$ )	Línea celular de hepatoma humano Células de carcinoma gástrico humano Hepatocitos de rata en cultivo Leucemia mielóide M1	Lan y Chou, 1992 Yanagihara, 1992 Oberhammer, 1991 Lotem y Sachs, 1992
Glucocorticoides	Timocitos	Wyllie, 1980
Activina	Hepatocitos de rata en cultivo	Schwall et al, 1993
TNF (Tumor necrosis factor)	Timocitos de ratón	Tartaglia et al, 1993
Antígeno Fas/Apo1	Linfoma de ratón a células T	Itoh et al, 1991
Ácido retinoico	Extremidades embrionarias	Alles y Sulik, 1989

Tabla 3. Ejemplos de hormonas, factores de crecimiento y citoquinas que causan apoptosis

Las hormonas y factores de crecimiento que regulan la apoptosis lo hacen a través de la modulación de la expresión génica. La primera evidencia directa de que la apoptosis está programada genéticamente proviene de estudios en el nematodo *Caenorhabditis elegans*, en el cual han sido identificados varios genes que promueven o previenen la muerte celular (Ellis et al, 1991). Por ejemplo, a los efectos pro-apoptosis de los genes *ced-3* y *ced-4* se opone el efecto supresor del *ced-9* (Hengartner et al, 1992). De forma similar, los proto-oncogenes *bcl-2* y *c-myc* respectivamente inhiben y promueven la apoptosis (Bissonette et al, 1992). El gen supresor *p53* induce apoptosis en varios sistemas. Por ejemplo, agentes que dañan el DNA, como las radiaciones ionizantes requieren *p53* para inducir apoptosis (Clarke et al, 1993). La tabla 4 contiene información sobre algunos de los genes implicados en la apoptosis y las respectivas proteínas codificadas.

Gen	Proteínas codificadas	Órgano o tipo celular	Efecto	Referencias
<i>ced-9</i>		<i>C. Elegans</i>	-	Hengartner et al, 1992
<i>ced-4</i> , <i>ced-3</i>		<i>C. Elegans</i>	+	Hengartner et al, 1992
<i>bcl-2</i>	Bcl-2 $\alpha$ Bcl-2 $\beta$	<i>C. Elegans</i> y otros sistemas	- -	Bissonette et al, 1992 Hockenbery et al, 1993
<i>c-myc</i>	Myc	Fibroblastos de embrión de rata	+	Evan et al, 1992
<i>p53</i>	<i>p53</i>	Timocitos	+	Clarke et al, 1993 Lowe et al, 1993
<i>c-fos</i>	Fos	Hueso, piel, folículos pilíferos, embrión	-	Smeyne et al, 1993
TRPM-2	SGP-2	Próstata ventral en regresión	+	Burtyan et al, 1989
Mot-1 cDNA	Mot-1	Células NIH3T3	+	Wadhwa et al, 1993
Mot-2 cDNA	Mot-2	Células NIH3T3	-	Wadhwa et al, 1993

Fas	Antígeno Fas	Linfoma de células T	+	Watanabe-Fukunaga et al, 1992
-----	--------------	----------------------	---	-------------------------------

Tabla 4. Ejemplos de genes implicados en la regulación de la apoptosis

## APOPTOSIS EN EL OVARIO.

El ovario es un tejido dinámico, caracterizado por la continua remodelación de sus componentes, lo que le hace un modelo ideal para el estudio de la apoptosis. A lo largo de la vida fetal y adulta, la mayoría de los folículos ováricos, por razones todavía desconocidas, mueren en el proceso de la atresia folicular. El proceso de la selección folicular termina con la formación de uno o más folículos dominantes destinados a ovular y la concomitante atresia de otros numerosos folículos que eventualmente mueren y desaparecen. La apoptosis, - un proceso de muerte celular fisiológica - parece un método eficiente para la eliminación de estos folículos sin afectar la funcionalidad ovárica. A pesar de su frecuente ocurrencia y su fundamental importancia en la fisiología ovárica, los mecanismos moleculares de la atresia folicular han sido desconocidos hasta hace pocos años. En 1991 Tilly y colaboradores identificaron la típica degradación en escalera del DNA que caracteriza la apoptosis en folículos atrésicos de aves y cerdos (Tilly et al, 1991). Hughes y Gorospe, en el mismo año, observaron que la atresia folicular inducida por PMSG (deprivación hormonal) en la rata se asocia a fragmentación apoptótica del DNA (Hughes y Gorospe, 1991). Estos estudios abrieron el camino a muchas otras investigaciones sobre la apoptosis y el fenómeno de la atresia. Tilly y cols. demostraron que la apoptosis ocurre en células de la granulosa de rata en cultivo y que el tratamiento de las célula con factores de crecimiento específicos la previene (Tilly et al, 1992). Nuestro grupo estudió células de la

granulosa de rata mantenidas en cultivo durante 2-7 días demostrando que el tratamiento con DHEAS aumenta la apoptosis y el tratamiento con FSH la reduce (Palumbo y Yeh, Society for Gynecologic Investigation, 1993). Todos estos estudios estaban basados en el análisis del DNA extraído de homogenados de tejido o de células sin permitir la identificación de los tipos celulares implicados. Con este proyecto nos propusimos obtener datos sobre la precisa localización de la apoptosis en las células los folículos de rata en distintos estadios funcionales, mediante una técnica *in situ*. Las observaciones iniciales de Tilly y colaboradores indicaban también la presencia de apoptosis durante la regresión del cuerpo lúteo. Para valorar la incidencia de apoptosis en relación con la fisiología del cuerpo lúteo decidimos emplear el modelo de la rata superovulada, que permite datar perfectamente el cuerpo lúteo. Por último, tras observar que "in vitro" el tratamiento con DHEA causa apoptosis en cultivos de células de la granulosa de rata, decidimos estudiar el modelo de síndrome de ovarios poliquísticos de la rata inmadura tratada con DHEA.

## **RELACIÓN ENTRE EL SISTEMA RENINA-ANGIOTENSINA Y APOPTOSIS**

Numerosos estudios recientes han demostrado que existe una relación entre el sistema renina-angiotensina y la apoptosis en varios tejidos. Como comentamos anteriormente, han sido clonados dos clases de receptores de la AngII, llamados respectivamente AT1 y AT2 (Inagami, 1999). Principalmente, es el receptor AT2 que está implicado en la activación del proceso de la apoptosis (Yamada et al. 1996).

Horiuchi y colaboradores han clonado el receptor AT2 y han demostrado que este receptor actúa de forma opuesta al receptor AT1 (Horiuchi et al, 1998). Mientras el receptor AT1 media los efectos que promueven el crecimiento, el receptor AT2 tiene efectos inhibitorios y pro-apoptóticos, antagonizando los efectos del receptor AT1 y de los factores de crecimiento en varias líneas celulares, incluidas las células musculares lisas de la pared vascular, los cardiomiocitos, células neuronales (PC12W) y fibroblastos (R3T3). El receptor AT2 activa tirosin fosfatasas como la MKP-1 [mitogen-activated protein (MAP) kinase-phosphatase-1], e inactiva la MAP quinasa [extracellular signal-regulated kinase (ERK1 y ERK2)], resultando en defosforilación de Bcl-2 y elevación en la síntesis (up-regulation) de Bax (Horiuchi et al. , 1998).

En las células neuronales PC12W la estimulación del receptor AT2 induce apoptosis mediante un aumento de la síntesis de ceramida, dependiente de la dosis y del tiempo. Este efecto de la AngII es completamente bloqueado por la co-incubación con el antagonista receptorial anti-AT2, PD123177 y no por el losartán, un antagonista específico del receptor AT1 (Gallinat et al, 1999).

En la glándula suprarrenal AngII causa apoptosis, antagonizando así el efecto del ACTH (Carsia et al, 1997). En la pared vascular, la AngII puede contribuir a la patogenia de la arteriosclerosis mediante apoptosis de las células endoteliales, un efecto que se previene con el bloqueo simultáneo de ambos receptores AT1 y AT2 y no con el bloqueo de cada receptor individualmente (Dimmeler et al, 1997). La estimulación selectiva de los receptores AT2 también causa apoptosis de las células endoteliales. Tanto la apoptosis mediada por AngII, como la apoptosis mediada por la estimulación del receptor AT2 se asocian en este modelo a la activación de la caspasa-3. El óxido nítrico (NO) bloquea

completamente la apoptosis inducida por AngII interfiriendo con la activación de la cascada de la caspasa

En el ovario, varios estudios realizados en los últimos años sugieren que el receptor AT2 media la progresión de la atresia folicular mediante apoptosis de las células de la granulosa (Tanaka et al, 1995; Kotani et al. 1999).

Tanaka y colaboradores estudiando células de la granulosa en cultivo demostraron que los receptores AT2 no son modificados por FSH, pero aumentan marcadamente en ausencia de FSH. Las células de la granulosa cultivada en ausencia de FSH muestran la fragmentación del DNA típica de la apoptosis que ocurre durante la atresia folicular (Palumbo and Yeh, 1993; Tanaka et al, 1995). En el estudio de Tanaka, la AngII incrementó la elevación de los receptores AT2 observado en ausencia de FSH, un efecto que fue bloqueado por un antagonista selectivo de los receptores AT2 y no por un antagonista de los receptores AT1. Estos datos sugieren que la AngII incrementa la expresión de los receptores AT2 a través del mismo receptor AT2 y sostienen la hipótesis de que el receptor AT2 pueda modular el inicio y la progresión de la atresia folicular que ocurre mediante apoptosis de las células de la granulosa.

Más recientemente Kotani y colaboradores han estudiado la expresión de los receptores AT2 durante la progresión de la atresia folicular en ratas inmaduras tratadas con PMSG, en las cuales los folículos que empiezan a madurar bajo el estímulo hormonal, sucesivamente se convierten en atrésicos como consecuencia de la privación hormonal. La concentración de los receptores AT2 en este modelo aumenta paralelamente a la progresión de la atresia/apoptosis folicular, tanto la cantidad de receptores (medida mediante autoradiografía), como la abundancia de mRNA (medido mediante (RT)-PCR). Los mismos autores en cultivos de células de la granulosa de rata inmadura han demostrado que la AngII.

a través de la estimulación de los receptores AT2, inhibe la capacidad de la FSH de prevenir la apoptosis.

## **Capítulo II**

### **Planteamiento experimental**

- Demostración de la expresión de renina y Ang II en los distintos compartimentos del ovario de rata y humano, en distintos estados fisiológicos y bajo estimulación gonodotrópica.
- Estudio del posible papel del OVRAS en la regulación de la esteroidogénesis ovárica.
- Estudio de la posible implicación del OVRAS en los procesos de maduración del ovocito y ovulación.
- Estudio del posible papel patológico del OVRAS en el síndrome de ovarios poliquísticos.
- Demostración de apoptosis en el proceso de la atresia folicular.
- Evolución del proceso de la apoptosis en el curso de la formación y regresión del cuerpo lúteo de rata.
- Demostración de la apoptosis en un modelo experimental de síndrome de ovarios poliquísticos de rata.

## **Capítulo III**

### **Material y Métodos**

## MATERIALES

**Ratas adultas e inmaduras.** Ratas Sprague-Dawley mantenidas en condiciones constantes de luz y temperatura, con agua y comida *ad libitum*, adultas (250 gr.) o inmaduras (25 días). Las ratas inmaduras se sometieron a distintos tipos de tratamiento en los varios grupos de experimentos, como explicaremos en cada sección. En todos los experimentos realizados se hicieron todos los esfuerzos posibles para minimizar el sufrimiento de los animales utilizados y siempre se siguieron los consejos del Convenio de Helsinki. Las ratas se sacrificaron utilizando CO<sub>2</sub>. Para los experimentos sobre el OVRAS se utilizaron ratas mantenidas en el animalario de la Universidad de Yale, (Charles River Farms, Wilmington, USA). Para el estudio de la apoptosis en la atresia folicular y en el cuerpo lúteo las ratas provenían del animalario de la Universidad de La Laguna. Para el estudio del síndrome de ovarios poliquísticos las ratas provenían del animalario de la Universidad de Harvard (Taconic, Germantown, NY, USA).

**Mujeres normales.** Se estudiaron tejidos ováricos de 12 mujeres en edad reproductiva entre 30 y 48 años de edad, con ciclos menstruales regulares sin patología endocrina, operadas por patología ginecológica benigna en el Departamento de Ginecología y Obstetricia del Yale New Haven Hospital, New Haven, Connecticut. Además, se estudió el cuerpo lúteo de una mujer con embarazo ectópico en la semana 9ª de gestación. Antes de la intervención las pacientes dieron el consentimiento informado para la participación en el estudio.

**Mujeres sometidas a inducción de la ovulación.** Se obtuvieron células de la granulosa-luteínicas por aspiración transvaginal de los folículos ováricos de 20 pacientes sometidas a inducción de la ovulación con hMG (human menopausal gonadotropin) y hCG (human chorionic gonadotropin) y fertilización *in vitro* en el Departamento de Ginecología y Obstetricia del Yale New Haven Hospital, New Haven, Connecticut, USA. Se estudió también una biopsia de un folículo preovulatorio de una paciente que se sometió a inducción de la ovulación y recuperación de ovocitos laparoscópica para fertilización *in vitro*. Antes de la intervención las pacientes dieron el consentimiento informado para la participación en el estudio.

**Mujeres con síndrome de ovarios poliquísticos.** Utilizando el diagnóstico histológico de las muestras quirúrgicas del Departamento de Anatomía Patológica del Yale New Haven Hospital, se seleccionaron 7 pacientes con síndrome de ovarios poliquístico. Tres de estas mujeres se sometieron a histerectomía abdominal total y doble anexectomía por un carcinoma de endometrio bien o moderadamente diferenciado. Las otras 4 se sometieron a resección en cuña bilateral para el tratamiento de la infertilidad. Todas presentaban una historia de hirsutismo, ciclos menstruales irregulares (oligo-amenorrea), y esterilidad. Las características clínicas de estas pacientes están resumidas en la tabla 5. Los criterios histológicos para el diagnóstico de SOP incluyen la presencia de una cápsula ovárica engrosada con vasos superficiales prominentes, la presencia de múltiple folículos quísticos subcapsulares, hiperplasia estromal y luteinización. Como controles para estos experimentos se utilizaron 6 mujeres normales, de las

cuales 2 fueron en fase folicular, 2 en fase periovulatoria y 2 en fase lútea. Puesto que no se realizaron medidas de LH es imposible solo histológicamente establecer la relación exacta con la ovulación (pre o post).

Paciente	Edad	Gravida/Para	Historia
1	25	0/0	Esterilidad, Hirsutismo
2	27	0/0	Esterilidad, Hirsutismo, Dolor pélvico crónico
3	27	0/0	Esterilidad, Hirsutismo
4	29	0/0	Esterilidad, Amenorrea, Hirsutismo
5	30	0/0	Retraso mental, poliposis adenomatosa de colon, Carcinoma endometrial bien diferenciado
6	36	0/0	Esterilidad, Irregularidades menstruales, Hirsutismo, Carcinoma endometrial moderadamente diferenciado
7	39	0/0	Esterilidad, Irregularidades menstruales, Hirsutismo, Carcinoma endometrial bien diferenciado

Tabla 5. Características clínicas de las pacientes con SOP

#### FÁRMACOS Y PRODUCTOS QUÍMICOS:

Angiotensina II [Ile5-Angiotensina II sintética], saralasin [Sar1, Ile5, Val8-angiotensina II], 3,3'-diaminobenzidina, penicilina, estreptomina, hialuronidasa y albúmina sérica bovina (BSA, fraction V), extra-avidina peroxidasa, solución no-enzimática de disociación celular se adquirieron de Sigma Chemicals Co., St Louis, Missouri, USA.

La renina humana se obtuvo de U.S. Biochemicals, Cleveland, Ohio. La renina de ratón, que se extrajo de la glándula submaxilar de ratón fue una donación del Dr. Chris Deshepper.

Gonadotropina de yegua preñada (Pregnant Mare Serum Gonadotropin, PMSG, Gestyl) y la gonadotropina coriónica humana (hCG, Pregnyl) se adquirieron de Organon Pharmaceuticals, West Orange, New Jersey, USA. La hormona folículo estimulante (FSH) y la hormona luteinizante (LH) se adquirieron de Serono, Randolph, Massachusetts, USA.

Los medios de cultivo Ham F-10 y mínimo (minimal essential medium, MEM) se obtuvieron de Grand Island Biological Co. (GIBCO), Grand Island, New York. El kit Vectastain ABC se compró a los Vector Laboratories Inc., Burlingame, California.

Los radioinmunoensayos que se utilizaron para medir los esteroides fueron Maia Estradiol [<sup>125</sup>I] Kit, Maia Progesterone [<sup>125</sup>I] Kit y Maia Testosterona [<sup>125</sup>I] Kit de Serono (Randolph, Massachusetts).

La deoxinucleotidil transferasa terminal se obtuvo de la USB (Cleveland, Ohio). El deoxiuridin trifosfato biotinilado (dUTP) se obtuvo de Clontech (Palo Alto, California, USA). La DNasa I se obtuvo de Boehringer-Mannheim Biochemicals (Indianapolis, Indiana, USA).

Los demás productos químicos utilizados, de empleo habitual en el laboratorio, adquirieron de Fisher Scientific Chemical Corporation (Fair Lawn, New Jersey).

## ANTISUEROS

Los anticuerpos utilizados en los experimentos de inmunohistoquímica se obtuvieron de varias fuentes. El antisuero de conejo contra la renina humana fue una donación del Dr. Victor Dzau, Brigham and Women's Hospital, Boston, Massachusetts. Los antisueros de conejo contra la renina de la glándula submaxilar de ratón (indicados con las siglas LAR y TAD), fueron una donación del Dr. Chris Deshepper, University of California, San Francisco. Los antisueros de conejo contra la angiotensina II fueron donados respectivamente por el Dr. A. Negro-Vilar (antisuero NV) y por el Dr. D. Ganten (antisuero DE).

## INSTRUMENTOS:

Además del material de uso común en laboratorio se utilizaron los siguientes: Tubos de ensayo Vacutainer y placas Multiwell™ para cultivos de tejido de Becton-Dickinson, Rutherford, New Jersey. Tubos estériles de Corning Glass Works, Corning, New York.

Se utilizaron también una centrifuga RT6000, Sorvall (Newton, Connecticut) y uno estereomicroscopio WILD (Heerbrugg, Switzerland).

## PROGRAMAS ESTADÍSTICOS

El software Stats Plus (Human Systems Dynamics, Northridge, California) y el software Statworks (Data Metrics, Inc., Philadelphia, Pennsylvania) se utilizaron en un PC.

## MÉTODOS

### INMUNOHISTOQUÍMICA.

**Procesamiento y sección de los tejidos.** Los tejidos de ratón y humanos utilizados para los experimentos de inmunohistoquímica se fijaron inmediatamente después de su obtención en paraformaldeído al 4% durante 6-24 horas a 4°C, se deshidrataron y se incluyeron en parafina. Se obtuvieron cortes de 4  $\mu$  que se montaron en portas tratados con poli-L-lisina y se pusieron en un horno a 60°C durante 30 minutos. Los cortes se desparafinaron en xileno y rehidrataron en soluciones de alcohol progresivas. Dos cortes de cada bloque se procesaron con hematoxilina-eosina para el estudio histológico.

**Anticuerpos utilizados.** Los antisueros de conejo contra la AngII, DE y NV, ya fueron descritos previamente (Brownfield et al, 1983). Son altamente específicos, pero tienen reacción cruzada completa con la AngIII (des-asp angiotensin II). El anticuerpo NV se utilizó a una dilución entre 1:1000 y 1:2000; el anticuerpo DE se utilizó a una dilución entre 1:700 y 1:800. Empleamos dos anticuerpos de conejo contra la renina: un anticuerpo contra la renina humana, que se utilizó a una concentración de 1:10.000 (donación del Dr. Dzau); y un anticuerpo contra la renina de la glándula submaxilar de ratón, utilizado a una dilución entre 1:500 y 1:1000 (donación del Dr. Chris Deshepper). No está documentado si estos anticuerpos pueden diferenciar entre la renina activa y la prorenina. Cuando se utilizaron en riñón de ratón y humano con el método de la avidina-biotina-peroxidasa, todos los anticuerpos tiñeron exclusivamente las células yuxtglomerulares (Figura 4.) y la tinción desaparecía con la preabsorción

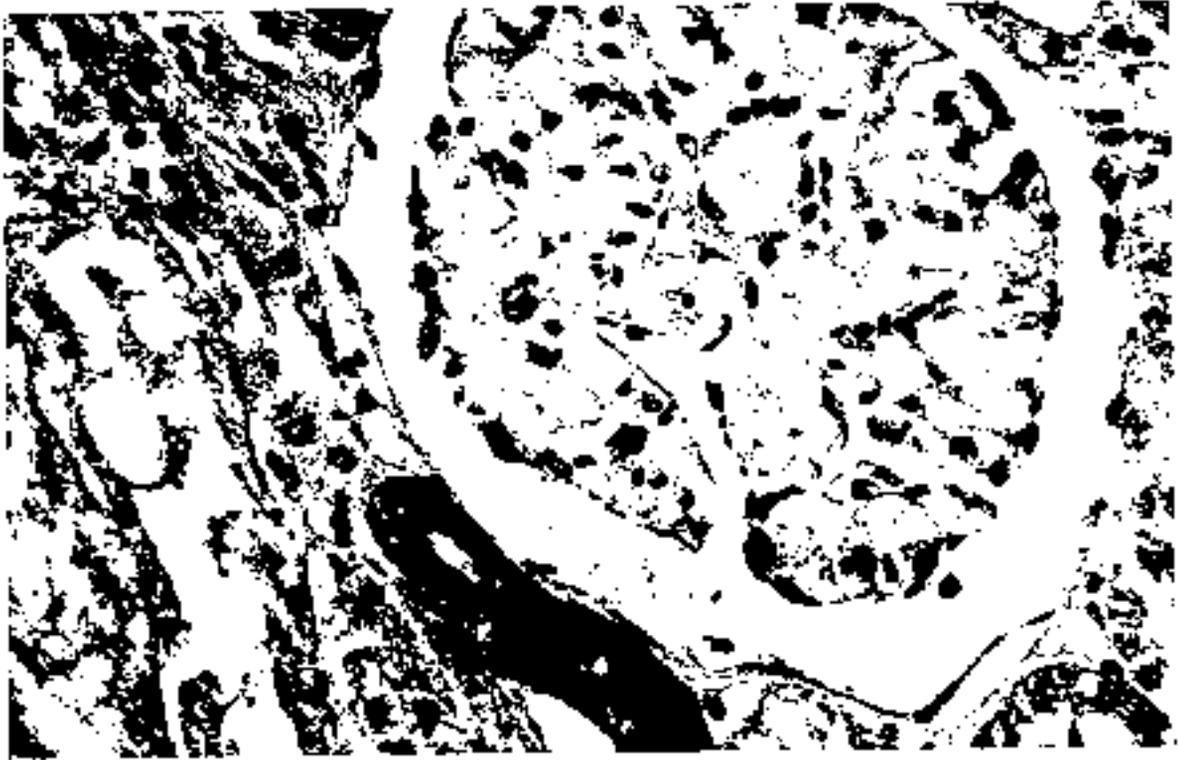


Figura 4. Riñón humano. Obsérvese la positividad selectiva del aparato yuxtaglomerular con un anticuerpo antirrenina (antisuero TAD 1:1000).

de los anticuerpos con el antígeno específico contra el cual habían sido obtenidos.

**Tinción inmunohistoquímica.** Para la tinción inmunohistoquímica se utilizó el protocolo de Hsu y colaboradores, según el método de la avidina-biotina-peroxidasa, utilizando el kit comercial Vectastain ABC y la diaminobenzidina como sustrato de la peroxidasa (Hsu et al, 1981). La actividad de la peroxidasa endógena se bloqueó con peróxido de hidrógeno al 0.3% en metanol durante 30 minutos. Tras lavado en tampón PBS con 1% BSA durante 30 minutos e incubación durante 30 minutos con suero normal de cabra al 20% para reducir el fondo no específico, las muestras fueron incubadas durante 16 horas a 4°C con

los anticuerpos primarios. Tras lavado en PBS, se realizó una incubación de 30 minutos con IgG biotiniladas de conejo y después otra incubación con el complejo avidina-horseradish peroxidasa biotinilada. Tras el lavado, las muestras se incubaron durante 5 minutos con diaminobenzidina al 0.1% en PBS con peróxido de hidrógeno al 0.03%. A continuación, los portas se lavaron en PBS, coloraron con hematoxilina, deshidrataron en alcohol, limpiaron en xileno, y se montaron.

**Controles.** Para confirmar la especificidad de la coloración inmunohistoquímica los siguientes sueros de control se substituyeron por el anticuerpo primario, suero de conejo normal, anticuerpo anti-AngII pre-absorbido con AngII, anticuerpo anti-renina humana preabsorbido con renina humana purificada y anticuerpo anti-renina de ratón preadsorbido con renina humana. Todas las preincubaciones se hicieron con un exceso del respectivo antígeno durante 24 horas a 4° C en presencia de albúmina humana al 0.1%.

**Selección y preparación de los tejidos para los experimentos de inmunohistoquímica en la rata.** Se estudiaron 4 grupos de ratas. En el primer grupo de 10 ratas inmaduras, 5 recibieron 10 UI de PMSG s.c con 25 días de edad (p25) y 2 UI de hCG s.c 48 horas después (p27), y otras 5 ratas recibieron 4 UI de PMSG y 1.2 UI de hCG a las 48 horas. Para asegurar la formación de cuerpos lúteos funcionales (pseudoembarazo), 12-14 horas después de la administración de hCG se practicó también una estimulación cervical con un cilindro de cristal. En el segundo grupo de 10 ratas inmaduras, 5 recibieron 10 UI de PMSG s.c y 5 recibieron 4 UI con 25 días de edad (p25). Todas las ratas de estos dos primeros grupos fueron sacrificadas 12 días después de la administración de PMSG (p37) y los ovarios se extrajeron y fijaron como se

describió anteriormente. El tercer grupo de 5 ratas inmaduras no recibió ningún tratamiento; estas ratas fueron sacrificadas con 25 días de edad (p 25). En el cuarto grupo se incluyeron ratas adultas con ciclos regulares en las cuales se realizó estimulación cervical la mañana del estro, para inducir un estado de pseudoembarazo. Los ovarios se obtuvieron 10 días después de la estimulación cervical. El estado de pseudoembarazo se comprobó mediante citología vaginal, que muestra células epiteliales y leucocitos. El riñón de las ratas inmaduras y adultas se utilizó como control positivo para los anticuerpos anti-angiotensina II. Como ulterior control se utilizó la eminencia media de dos ratas adultas tras perfusión intracardiaca con solución de Bouin.

## **ESTUDIO DEL EFECTO DE LA ANGIOTENSINA II SOBRE LA PRODUCCIÓN DE HORMONAS ESTEROIDEAS POR CÉLULAS DE LA GRANULOSA-LUTEINICA HUMANAS EN CULTIVO.**

**Aislamiento de las células.** Las células de la granulosa se aislaron como describieron Polan y colaboradores de 9 pacientes sometidas a fertilización in vitro en el Departamento de Ginecología y Obstetricia del Yale New Haven Hospital (Polan et al., 1984). El desarrollo folicular se indujo con hMG/hCG (Laufer et al., 1983). Todos los folículos ováricos visibles se aspiraron por vía transvaginal, bajo visualización ecográfica. Tras centrifugación y aislamiento de los ovocitos, el fluido folicular se centrifugó a 1000 x g durante 15 minutos. Decantado el fluido folicular, las células de la granulosa obtenidas de todos los folículos que contenían ovocitos de cada paciente se unificaron. A continuación, las células se lavaron dos veces en 2 ml de Ham F-10 con BSA al 1% y se

centrifugaron a 1500 x g durante 10 minutos. Sucesivamente, las células se estratificaron sobre columnas de percoll (50%, 5 ml) y se centrifugaron a 500 x g durante 30 minutos para separar los glóbulos rojos. Esta preparación purificada de células de la granulosa-luteínicas se aspiró de la interfaces percoll/líquido, se lavó y resuspendió en Ham F-10. Las células se contaron con hemocilometro: la vitalidad celular se determinó mediante coloración vital con trypan Blu.

**Cultivos celulares.** Las células se mantuvieron en cultivo durante 24 horas a 37°C, a una densidad de 50.000 células por pocillo (well), en replicas de 3 o 4 en 1 ml de Ham-F-10 con 1% BSA en una atmósfera de 5% CO<sub>2</sub> - 95% aire. Las células se estimularon con dosis progresivas de Ang II desde 10<sup>-11</sup> hasta 10<sup>-7</sup> en presencia y ausencia de una concentración de 10<sup>-5</sup> de saralasin. Parte de las células se incubaron con dosis progresivas de saralasin, desde 10<sup>-4</sup> hasta 10<sup>-10</sup>. Al final de las 24 horas de cultivo, el medio de cultivo de cada pocillo se aspiró y conservó a menos 20°C hasta el momento de las mediciones hormonales.

**Radioinmunoensayos (RIA).** El medio de cultivo obtenido de cada pocillo se analizó en duplicado mediante RIA para la medición de progesterona, testosterona y estradiol.

La progesterona se midió utilizando el kit comercial Maia Progesterone [<sup>125</sup>I] (Serono Diagnostics, Norwell, MA). Se hizo en cada ensayo una curva estándar completa, que se comparó con las otras. La sensibilidad del método es 0.08 ng/mg, y los coeficientes de variación intra- y inter-ensayo fueron 11% y 8.4% respectivamente. El antisuero tiene una reactividad cruzada de lo 0.05% con la 17-hidroxi-progesterona y del 0.14% con la testosterona.

Para medir la testosterona se empleó el kit comercial Testosterone [<sup>125</sup>I] (Serono Diagnostics, Norwell, MA), repitiendo en cada ensayo una curva estándar completa. La sensibilidad del método es 0.04 ng/mg, y los coeficientes de variación intra- y inter-ensayo fueron 9% y 6.7%, respectivamente. La reactividad cruzada con la dihidrotestosterona es del 22.5%.

El 17 beta-estradiol se midió mediante el kit comercial Maia Estradiol [<sup>125</sup>I](Serono Diagnostics, Norwell, MA), utilizando en cada ensayo una curva estándar completa, que se comparó con las otras. La sensibilidad del método es 1.5 pg/ml y los coeficientes de variación intra- e inter-ensayo fueron 4.5% y 7.6% respectivamente. El antisuero tiene una reactividad cruzada del 0.4% con el estríol, mientras la reactividad cruzada con otros esteroides es inferior al 0.007%..

**Análisis estadístico.** Los resultados se expresan como media más/menos desviación estándar. El efecto de los distintos tratamientos sobre la secreción esteroidea se valoró mediante análisis de la varianza de 3 vías, el test de Dunnett y el test de Neuman-Keuls.

## **ESTUDIO DEL EFECTO DE LA ANGIOTENSINA II SOBRE LA OVULACIÓN Y LA MADURACIÓN DE LOS OVOCITOS.**

### **A). BLOQUEO FARMACOLÓGICO DE LA OVULACIÓN MEDIANTE SARALASINA INTRAPERITONEAL.**

Para estos experimentos utilizamos ratas inmaduras (25 días) tratadas con 10 mg de PMSG s.c. para inducir el desarrollo folicular; 48 horas después se administró hCG para inducir la ovulación. A varios intervalos de la administración

de la hCG (1 hora antes ó 1, 3 ó 5 horas después) se administraron inyecciones intraperitoneales de Saralasin, 100 µl de una solución 1 mM. Como control se utilizaron ratas tratadas con 100 µl de solución salina. Un tercer grupo de ratas recibieron al mismo tiempo saralasin y angiotensina II, a igual concentración y volumen. Todas las ratas fueron sacrificadas 17-20 horas después de la administración de hCG. Se extirparon los ovarios y trompas y observaron al microscopio. En la fase inmediatamente preovulatoria, la ampolla de la trompa de Falopio en la rata es claramente visible. Al puncionar con un aguja fina dicha ampolla, los ovocitos pegajosos salen, generalmente todos juntos, al medio de cultivo. Los ovocitos contenidos en la ampolla tubárica se transfirieron a pocillos que contienen HamF-10 y hialuronidasa (100ug/ml) para facilitar la dispersión de las células del *cumulus* y se contaron a los 10 minutos.

#### B). BLOQUEO FARMACOLÓGICO DE LA MADURACIÓN FOLICULAR.

Para el estudio de la maduración folicular se utilizaron dos modelos, uno "*in vivo*" y otro "*in vitro*".

Para los experimentos "*in vivo*" las ratas inmaduras se estimularon con PMSG y hCG como para el estudio de la ovulación. Una hora después de la administración de hCG se administró una inyección intraperitoneal de saralasin, 100 µl de una solución 1 µM ó 1 mM. Ocho horas después de la inyección de hCG se sacrificaron todas las ratas, se extirparon los ovarios, se observaron en un estereomicroscopio y se liberaron de la grasa y de la bolsa ovárica (una bolsa de tejido conectivo que reviste el ovario de la rata). Se pudieron así exponer y visualizar los folículos preovulatorios, que se puncionaron para que salieran los ovocitos. Inmediatamente los ovocitos se observaron al microscopio para valorar

la presencia de degradación de la vesícula germinal (GVBD, germinal vesicle breakdown) como índice de maduración.

Para los experimentos *in vitro*, se utilizaron ratas inmaduras tratadas con PMSG (10 mg s.c.) para inducir el desarrollo folicular. Las ratas se sacrificaron 48 horas después, se extirparon los ovarios y se aislaron los folículos, que se pusieron en cultivo en 250ul de MEM con 1% glutamina. Los folículos se incubaron durante 5 horas a 37°C en presencia de los siguientes tratamientos:

1. HCG 20 UI/ml
2. HCG 20 UI/ml y Saralasin 10nM, 100 nM o 1 µM
3. HCG 20 UI/ml, Saralasin 1µM y AngII 10 nM, 100 nM, 1 µM ó 10 µM.
4. Se incluyó también un grupo control sin tratamiento.

### C). ANÁLISIS ESTADÍSTICO.

Los resultados se analizaron mediante ANOVA 3 vías y test de comparación múltiple de Duncan.

## **ESTUDIO DE LA APOPTOSIS EN LA ATRESIA FOLICULAR EN VARIOS ESTADIOS FUNCIONALES**

### A). DETECCIÓN "IN SITU" DE LA APOPTOSIS.

**Selección de los tejidos y preparación para los experimentos *in situ*.** Se obtuvieron ovarios de varios grupos de ratas:

- 1.- Ratas inmaduras de 26 días (n=5)

- 2.- Ratas de 26 días tratadas con 10 UI de PMSG y sacrificadas 48 horas después de la administración de PMSG (n=2);
- 3.- Ratas de 26 días estimuladas con 10UI de PMSG y sacrificadas 5 días después de la administración de PMSG (n=2);
- 4.- Ratas adultas de 60 días con ciclos regulares valorados mediante citología vaginal, sacrificados en cada fase del ciclo estral (n=8, 2 ratas por cada día del ciclo).

Los ovarios se fijaron en paraformaldehído al 4%, deshidrataron e incluyeron en parafina. Se utilizaron cortes seriados de 4-6  $\mu\text{m}$  montados en portaobjetos gelatinizados y puestos en horno a 60°C durante 30 minutos. Las muestras se desparafinaron en xileno y rehidrataron en alcoholes seriados. Dos cortes de cada ovario se coloraron con hematoxilina-eosina para la identificación histológica de los compartimentos ováricos.

**Criterios histológicos de atresia.** Los folículos atrésicos se reconocieron por varias características histológicas: distorsión, picnosis y reducción (thinning) del estrato de células de la granulosa con cierto grado de hipertrofia de la teca.

**Técnica "in situ".** El método de detección *in situ* de la apoptosis, descrito por Gavrieli y cols., consiste en una reacción enzimática y colorimétrica que se realiza directamente sobre los cortes histológicos, para identificar los núcleos de las células apoptóticas cuyo DNA está cortado en fragmentos (Gavrieli et al, 1992). Las secciones se incubaron con proteinasa K (20 $\mu\text{g/ml}$ ) durante 15 minutos a temperatura ambiente para exponer los terminales 3'-hydroxi (3'-OH) de DNA, se lavaron en agua bidestilada y se trataron con H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> al 2% en methanol

durante 20 minutos para bloquear la actividad de la peroxidasa endógena. A continuación, los cortes se preincubaron con solución tampón (tampón TdT) durante 5 minutos antes de la incubación con desoxinucleótido biotinilado (Biotin-dUTP, 20 $\mu$ M) y desoxinucleotidil-transferasa (TdT 0.3 eu/ $\mu$ l) en tampón TdT durante 1 hora a 37°C en una cámara humidificada. Para bloquear la reacción, los cortes se pusieron en tampón citrato sódico (SSC) durante 15 minutos a temperatura ambiente. Tras lavado durante 10 minutos a temperatura ambiente en PBS con BSA al 2% y después con PBS durante 5 minutos a temperatura ambiente, las muestras se incubaron con extra-avidina-peroxidasa (1:30) durante 30 minutos a 37°C. Las muestras se lavaron de nuevo en PBS y después se incubaron en una solución de 3,3'-diaminobenzidina (0.1% in PBS) y 0.002% H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> durante 2-3 minutos. Se lavaron en agua corriente, se deshidrataron en soluciones de alcohol seriadas, se aclararon con xileno y se montaron.

**Controles.** Se incluyeron controles positivos y negativos en cada experimento. Los controles positivos se obtuvieron pre-tratando los tejidos con DNasa I (1-8  $\mu$ g/ml) en tampón DNasa durante 10 minutos antes de la reacción de la TdT. Como controles negativos se realizaron incubaciones omitiendo o el enzima TdT o el sustrato, dUTP biotinilado.

## B). EXTRACCIÓN Y ANÁLISIS DEL DNA OBTENIDO DE CÉLULAS DE LA GRANULOSA PURIFICADAS DE OVARIOS DE RATAS INMADURAS

**Selección de las ratas y preparación de las células de la granulosa.** Para estos experimentos se utilizaron 30 ratas de 25 días, como descrito por Anderson y coautores (Anderson et al, 1988; Yeh et al, 1993). Los animales se

sacrificaron con CO<sub>2</sub> y los ovarios se extrajeron rápidamente y se pusieron en medio de cultivo McCoy's en hielo. Los ovarios se puncionaron aproximadamente 30 veces con agujas de insecto estériles #00 y se pusieron en una solución no enzimática de disociación celular a 37°C durante 10 minutos y después se incubaron en una solución de sacarosa hipertónica en medio McCoy a temperatura ambiente durante 5 minutos. Para recolectar las células de la granulosa los ovarios se pusieron en un tubo de polipropileno de 15 ml en 1 ml de medio de cultivo McCoy con gentamicina y BSA al 1%. Los ovarios se prensaron suavemente con un pistón de teflon y filtraron a través de una malla de nylon de 50µm. A continuación, las células se centrifugaron a 4°C a 1000-1500 rpm (200-500 x g) durante 3-4 minutos y el pellet se resuspendió en 5 ml de medio McCoy. Las células se contaron y la viabilidad se determinó mediante la técnica de exclusión con trypan blue. La suspensión celular se centrifugó nuevamente a 4°C, el pellet se lavó en PBS, se congeló en nitrógeno líquido y se conservó a -70°C hasta el momento de la extracción de DNA. El rendimiento fue de 22 millones de células procedentes de 30 ratas, con una viabilidad del 36%.

**Extracción y análisis del DNA** El pellet de células de la granulosa se resuspendió en 50 µl de PBS en hielo, se añadieron 350 µl de yoduro de sodio 6M y se mezclaron suavemente con la suspensión de células. Después de una extracción con fenol y cloroformo, el DNA se incubó con RNasa A libre de Dnasa (10µg/ml) durante 30 minutos a 37°C. Se repitió la extracción con fenol y el DNA se precipitó con etanol y resuspendió en tampón TRIS-EDTA. La concentración se determinó mediante espectrofotometría a 260 y 280 nm.

El DNA se analizó mediante gel de agarosa al 1.5% con bromuro de etidio, cargando de 10 a 30  $\mu\text{g}$  de DNA. Como marcador de peso molecular se utilizó una ladder de 100bp.

## **ESTUDIO DE LA APOPTOSIS DURANTE LA FORMACIÓN Y REGRESIÓN DEL CUERPO LÚTEO.**

**Preparación de ratas superovuladas.** Para el estudio del cuerpo lúteo se eligió el modelo de la rata superovulada. Ratas inmaduras de 25 días recibieron 50 IU de PMSG y 56 horas después 25 IU de HCG para inducir la formación de cuerpos lúteos múltiples. Las ratas, 4 en cada grupo, se sacrificaron en días alternos desde el día 0 al día 17 de tratamiento. Los ovarios se extirparon, limpiaron y congelaron en nitrógeno líquido y conservaron a  $-70^{\circ}\text{C}$  hasta el momento del análisis.

**Extracción y análisis del DNA.** Para la extracción del DNA se utilizaron 2 métodos. La principal diferencia entre los dos métodos está en la composición del tampón de extracción: para inhibir las DNasas el método 1 utiliza 100mM EDTA y el método 2 utiliza tiocianato de guanidina 4M; el método 1 utiliza RNasa en el tampón de extracción, mientras el método 2 elimina el RNA en un paso sucesivo. En ambos casos el tejido congelado se pulverizó en nitrógeno líquido. El tejido pulverizado se añadió lentamente a 10 volúmenes de tampón de extracción en un recipiente. Cuando todo el material pasó a la solución, esta se transfirió a un tubo de centrifuga de 50 ml.

**Método 1.** Después de una incubación de una hora a 37°C, se añadió proteinasa K (100µg/ml) y la solución se incubó a 50°C durante 3 horas. A continuación, se realizó una extracción con fenol y cloroformo y una precipitación con etanol. El precipitado de DNA se diluyó en tampón TE.

**Método 2.** Se realizó una extracción con fenol y cloroformo. A continuación se añadió un volumen de cloruro de litio 5M y la solución se incubó durante 1 hora en hielo. Este paso es necesario para precipitar el RNA. Después de una centrifugación a 10.000 r.p.m. a 4°C durante 10-15 minutos, el sobrenatante se transfirió a otro tubo. El DNA se precipitó con etanol y resuspendió en tampón TE.

Para determinar la concentración y la pureza de la muestra se midió la absorbancia a 260 y 280 nm en ambos casos. Después de la lectura espectrofotométrica, el DNA se separó mediante electroforesis en gel de agarosa al 2% con bromuro de etidio cargando 30 µg de cada muestra.

## **ESTUDIO DE LA APOPTOSIS EN UN MODELO DE OVARIO POLIQUÍSTICO DE RATA.**

Ratas de 26 días (p26) recibieron diariamente por vía subcutánea con dehidroepiandrosterona (6mg/100g peso corpóreo) en 0.2 ml de aceite de sésamo durante 10 o 28 días, como había sido descrito previamente (Roy et al, 1962; Ward et al, 1978; Lee et al, 1991). Diez ratas fueron sacrificadas el décimo día (p35) y 10 el día 28 de tratamiento (p53). Los controles (4 en cada grupo) recibieron 0.2 ml de aceite de sésamo durante el mismo periodo de tiempo. Los

ovarios se extrajeron, se fijaron inmediatamente en paraformaldeida al 4% y se incluyeron en parafina. Se obtuvieron cortes de 4  $\mu\text{m}$ , que se montaron en portaobjetos gelatinizados y se pusieron en un horno a 60° C. A continuación, los cortes se procesaron con una técnica *in situ*, como se ha descrito en la sección anterior.

### CRITERIOS PARA LA VALORACIÓN DE LOS QUISTES Y DE LOS FOLÍCULOS ATRÉSICOS.

Los quistes se clasificaron en pequeños, medianos y grandes. Los folículos atrésicos se clasificaron en preantrales y antrales, idénticos estos últimos a los quistes pequeños. Como tamaño, los quistes pequeños tienen un diámetro inferior a 300  $\mu\text{m}$ , los quistes medianos miden entre 300  $\mu\text{m}$  y 750  $\mu\text{m}$ , y los quistes grandes son mayores de 750  $\mu\text{m}$  y pueden llegar a un diámetro de 1 mm, siendo visibles macroscópicamente. Los ovarios fueron valorados al microscopio óptico para la presencia de núcleos apoptóticos en los folículos atrésicos y en los quistes de todos los tamaños.

## **Capítulo IV**

### **Resultados**

## SISTEMA RENINA-ANGIOTENSINA OVÁRICO

### LOCALIZACIÓN INMUNOHISTOQUÍMICA DE LA RENINA Y DE LA ANGIOTENSINA II EN OVARIOS DE RATA.

Se estudiaron un total de 30 ratas. Todas las ratas tratadas con PMSG/hCG/estimulación cervical contenían de 5 a 10 cuerpos lúteos y numerosos folículos en varios estadios, así como las ratas adultas que recibieron estimulación cervical. Las células luteínicas presentaron una tinción intensa, granular, para la angiotensina II (Figura 5 y 6) y la renina.

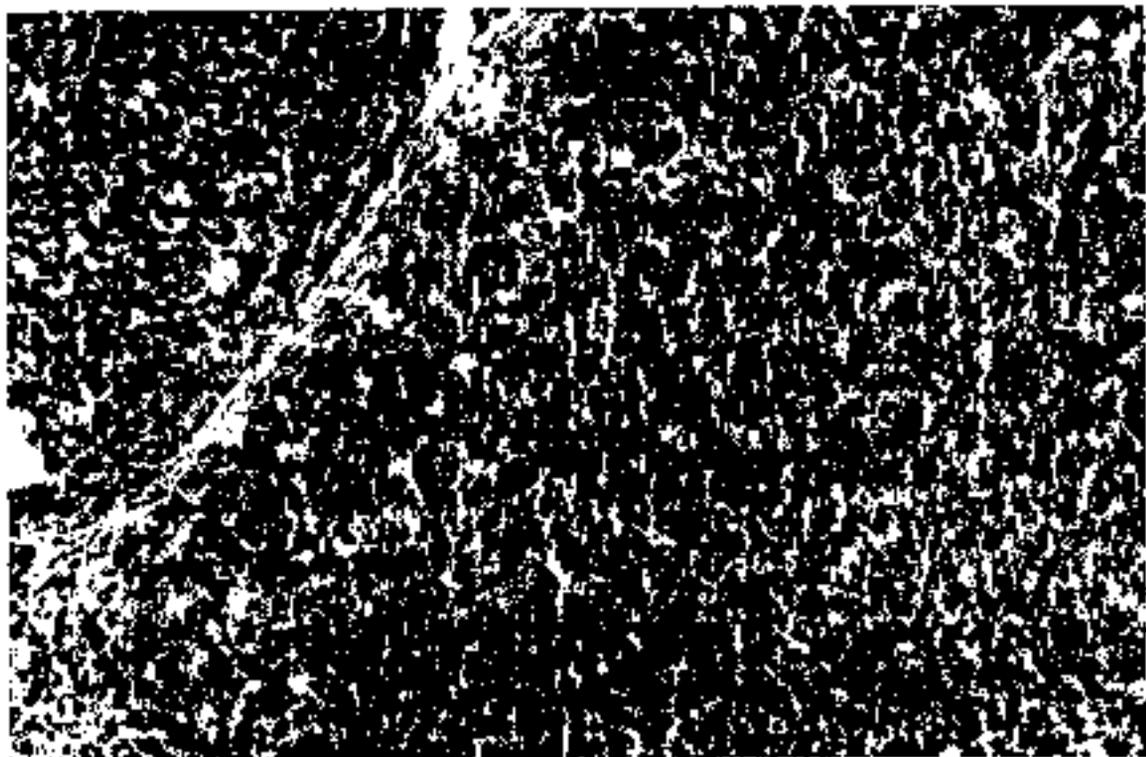


Figura 5. Ovario de rata inmadura estimulada con PMSG/hCG: tinción inmunohistoquímica con antisuero anti-angiotensina II. Obsérvese la intensa tinción de las células luteínicas y la negatividad de las células de la granulosa. (Antisuero DE, 1:800).

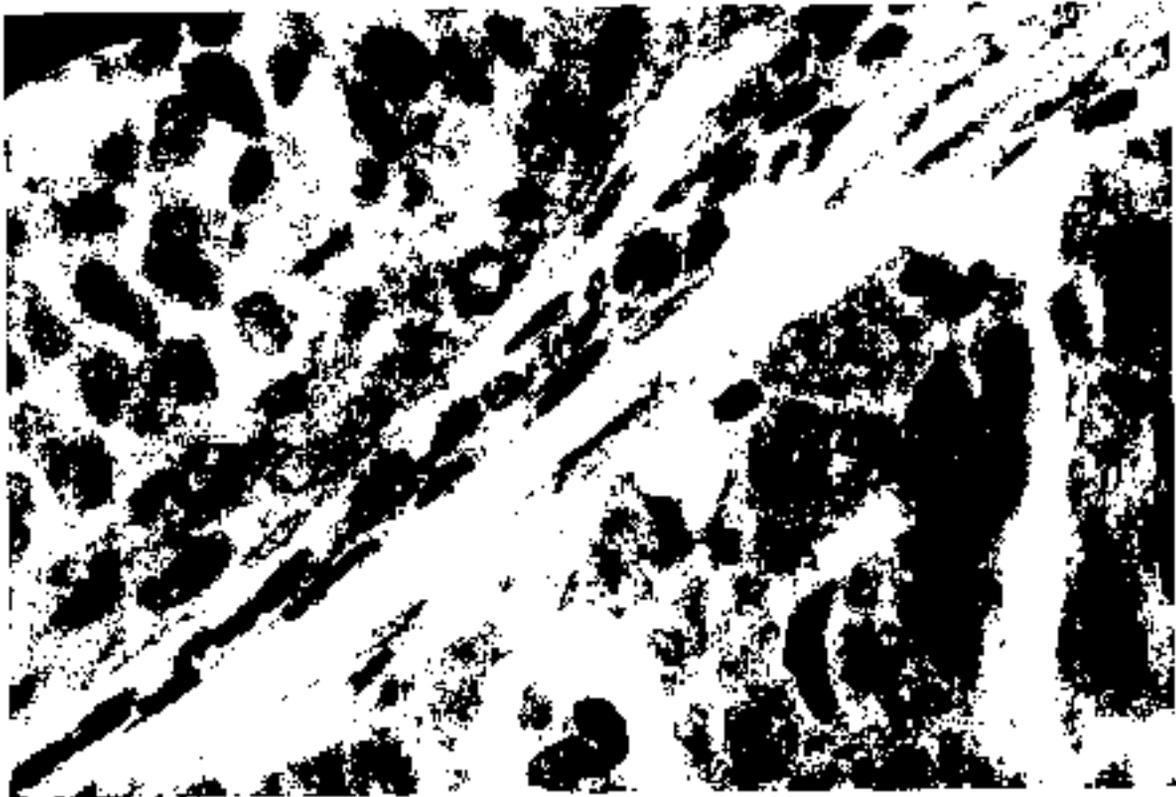


Figura 6. Detalle a mayor aumento del mismo ovario de rata inmadura mostrado en la figura 5. Obsérvese no solo la intensa tinción de las células luteínicas, sino también la tinción de las células tecales. (Antisuero DE, 1:800).

La mayoría de las células luteínicas eran positivas, pero con intensidad variable de célula a célula. Se observó también positividad en algunas de las células estromales y tecales alrededor de los cuerpos lúteos y de los folículos (Figura 6). Las células de la granulosa de los folículos preantrales y antrales fueron consistentemente negativas, tanto para la renina, como para la AngII. Obsérvese, por ejemplo, en la figura 7 un folículo preovulatorio de una rata tratada con PMSG/hCG; utilizando un antisuero anti-renina (TAD, 1:1000), se obtuvo una intensa reacción inmunohistoquímica a nivel de las células estromales y tecales, mientras las células de la granulosa permanecieron negativas. No se observó diferencia entre las dos dosis de PMSG/hCG utilizadas.

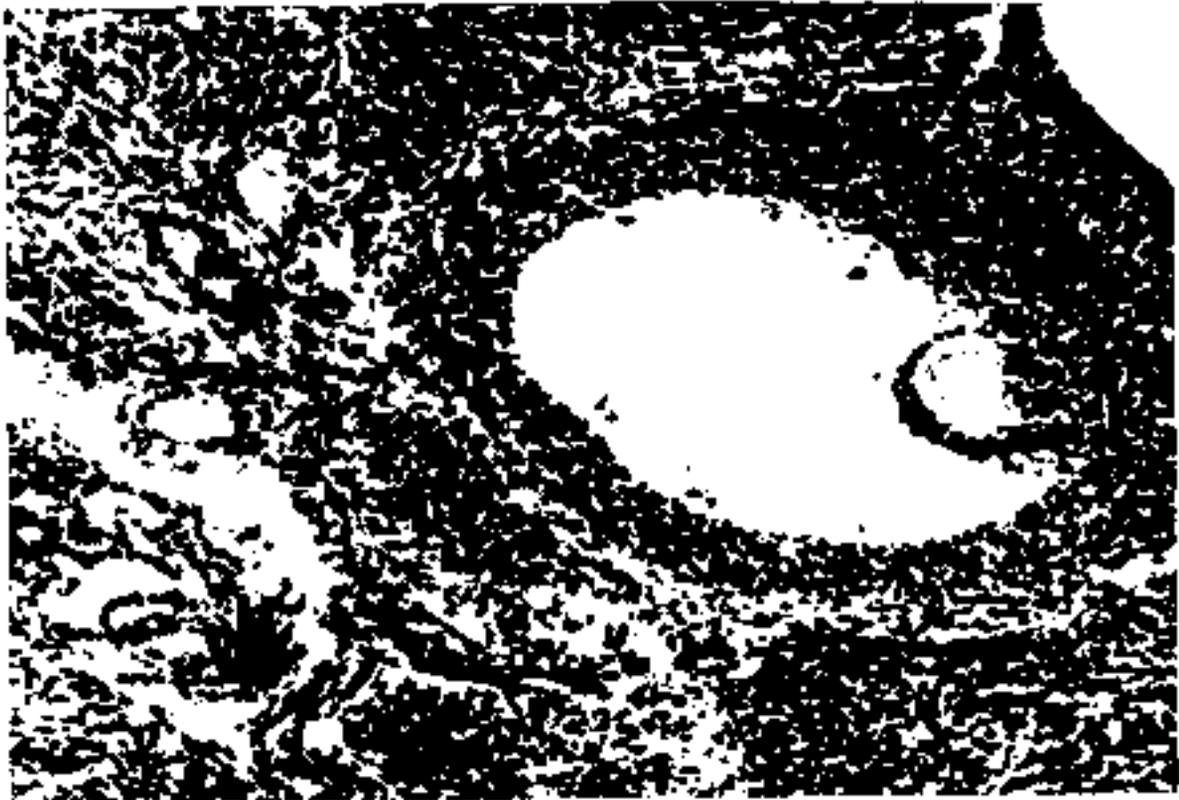


Figura 7. Ovario de rata inmadura estimulada con PMSG/hCG: tinción inmunohistoquímica con antisuero anti-renina. Obsérvese la intensa positividad de las células estromales y tecales y la negatividad de las células de la granulosa. (Antisuero TAD, 1:1000).

Los ovarios de ratas inmadura tratadas solo con PMSG contenían folículos en varios estadios y generalmente ningún cuerpo lúteo. No hubo tinción de las células de la granulosa, como en las ratas con pseudoembarazo. Se observó positividad de algunas células tecales y estromales situadas alrededor de los grandes folículos antrales. Las ratas inmaduras no contenían ni folículos activados ni cuerpos lúteos y eran totalmente negativas.

## LOCALIZACIÓN INMUNOHISTOQUÍMICA DE LA RENINA Y DE LA ANGIOTENSINA II EN OVARIOS HUMANOS NORMALES Y BAJO ESTÍMULO GONADOTROPÍNICO.

### A). OVARIOS DE MUJERES CON CICLOS MENSTRUALES REGULARES.

Foliculos: Las células tecales de todos los foliculos en fase de desarrollo mostraron intensa tinción granular para ambos antígenos: la renina y la angiotensina II (Figuras 8-10). Las células de la granulosa fueron negativas en la mayoría de los foliculos, con dos excepciones: los grandes foliculos preovulatorios (Figuras 11 y 12) y los foliculos atrésicos (Figura 13).

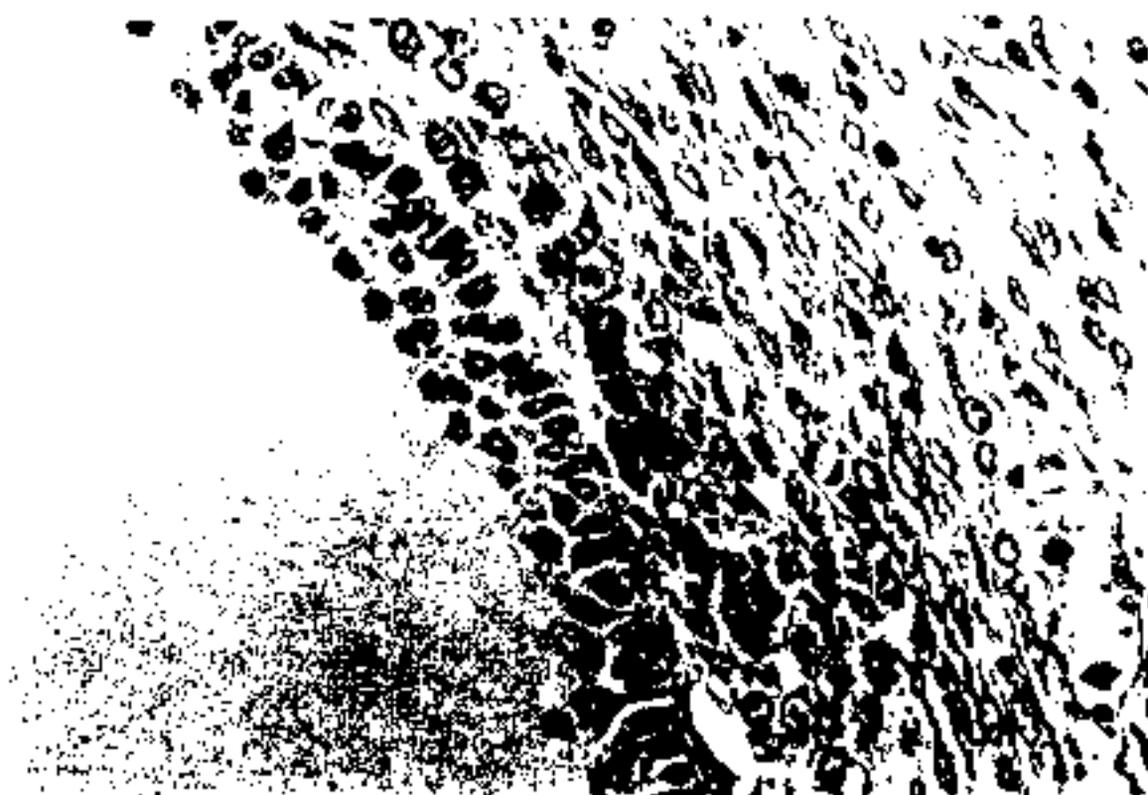


Figura 8. Foliculo de ovario humano durante la fase folicular media: tinción inmunohistoquímica de las células tecales con antisuero anti-renina. (Antisuero TAD, 1:1000).

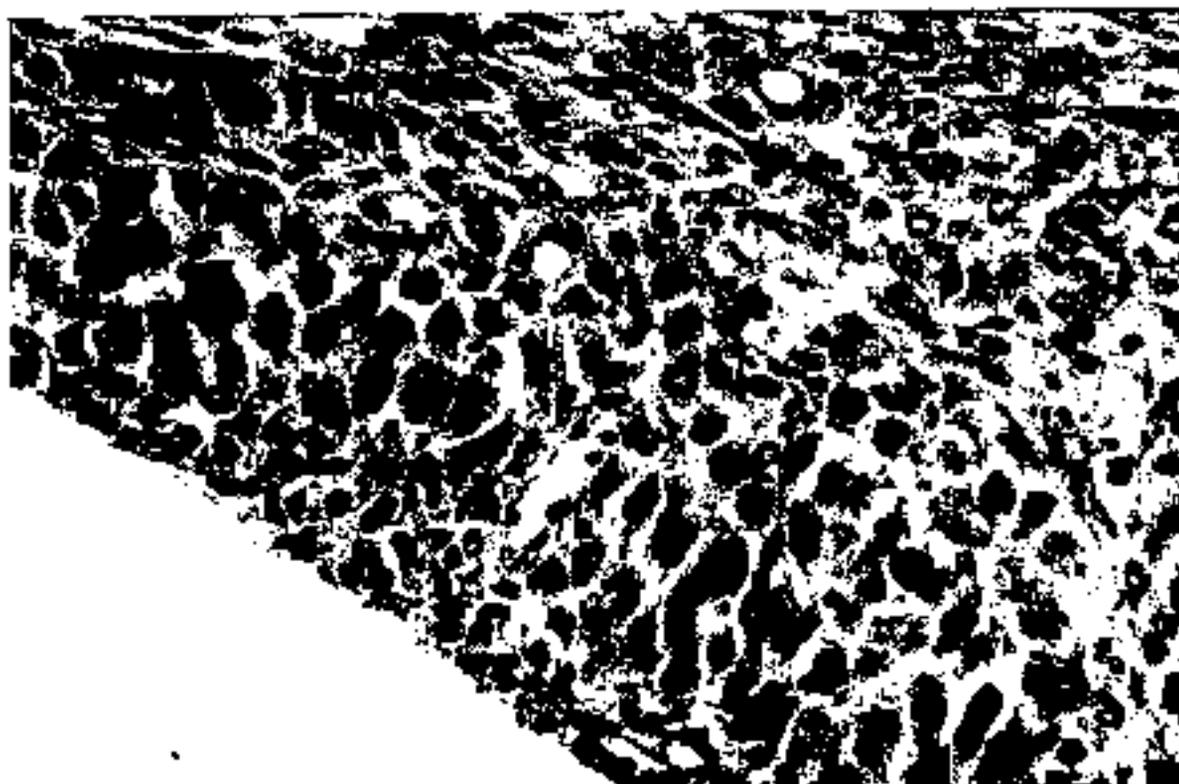


Figura 9. Folículo de ovario humano durante la fase folicular media: tinción inmunohistoquímica de las células tecales con antisero anti-angiotensina II. (Antisero DE, 1:800).

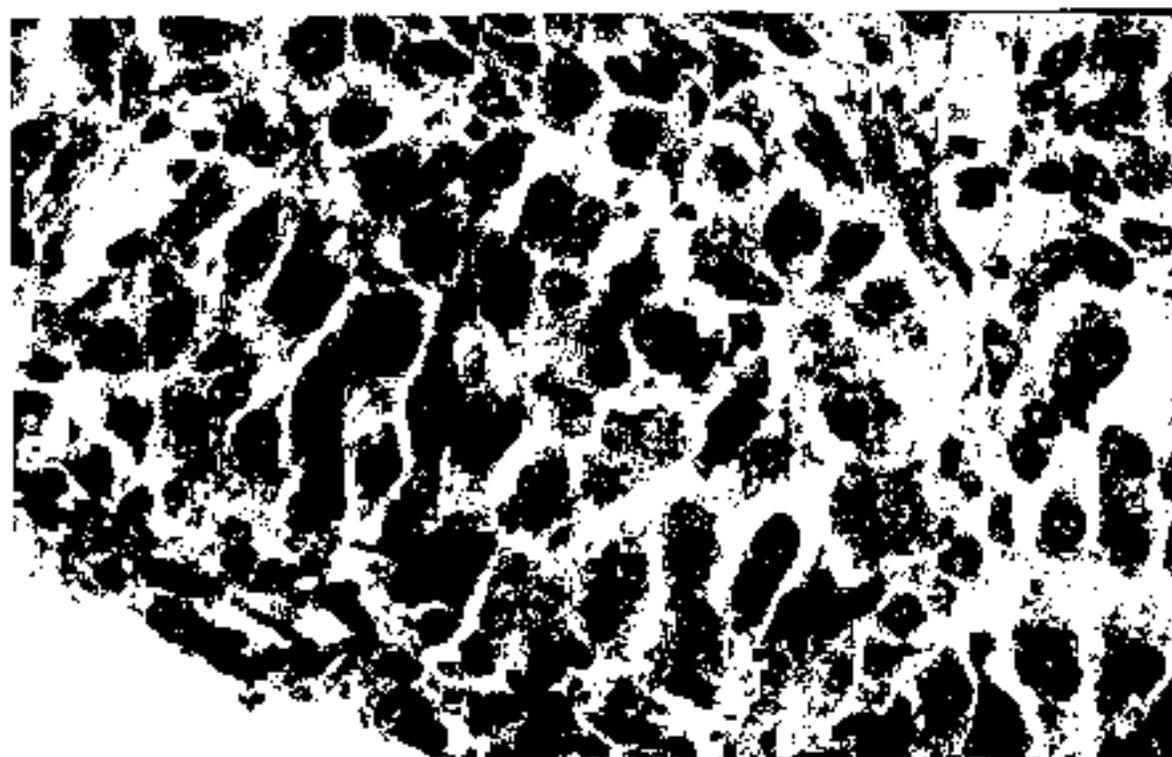


Figura 10. El mismo folículo, a mayor aumento.

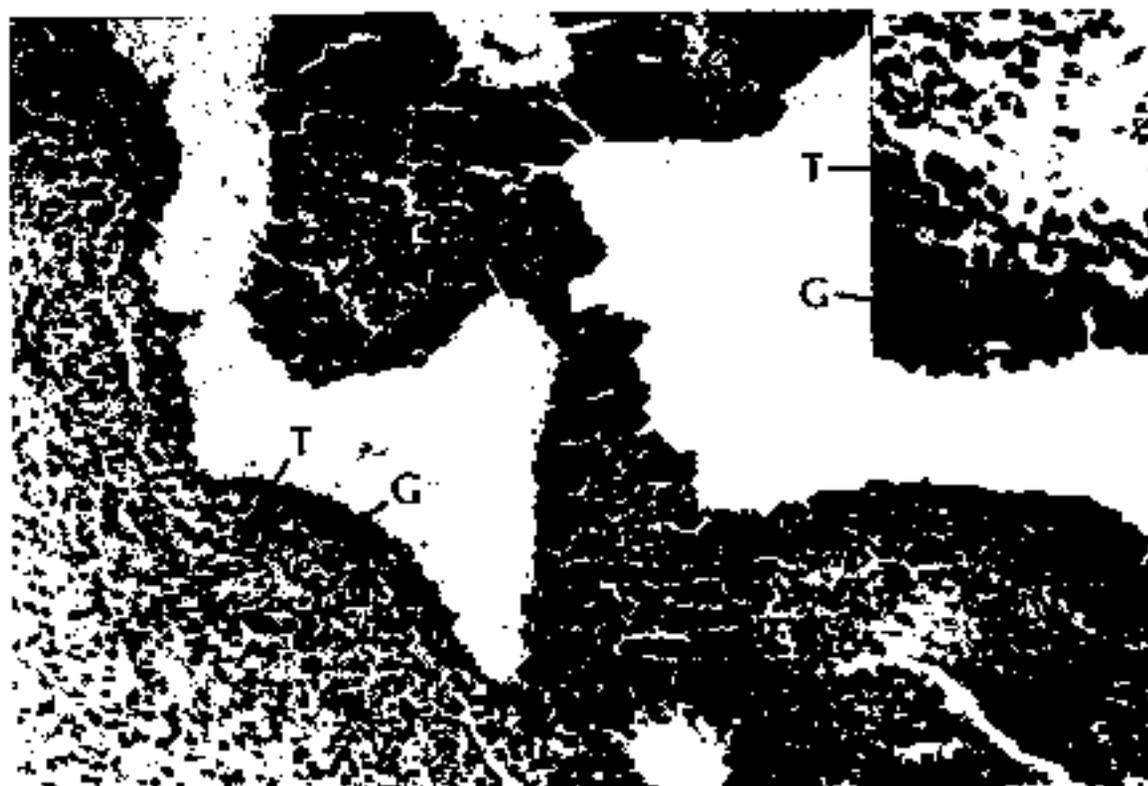


Figura 11. Folículo de ovario humano durante la fase peri-ovulatoria: tinción inmunohistoquímica de las células de la granulosa con antisuero anti-renina. (Antisuero TAD, 1:1000)

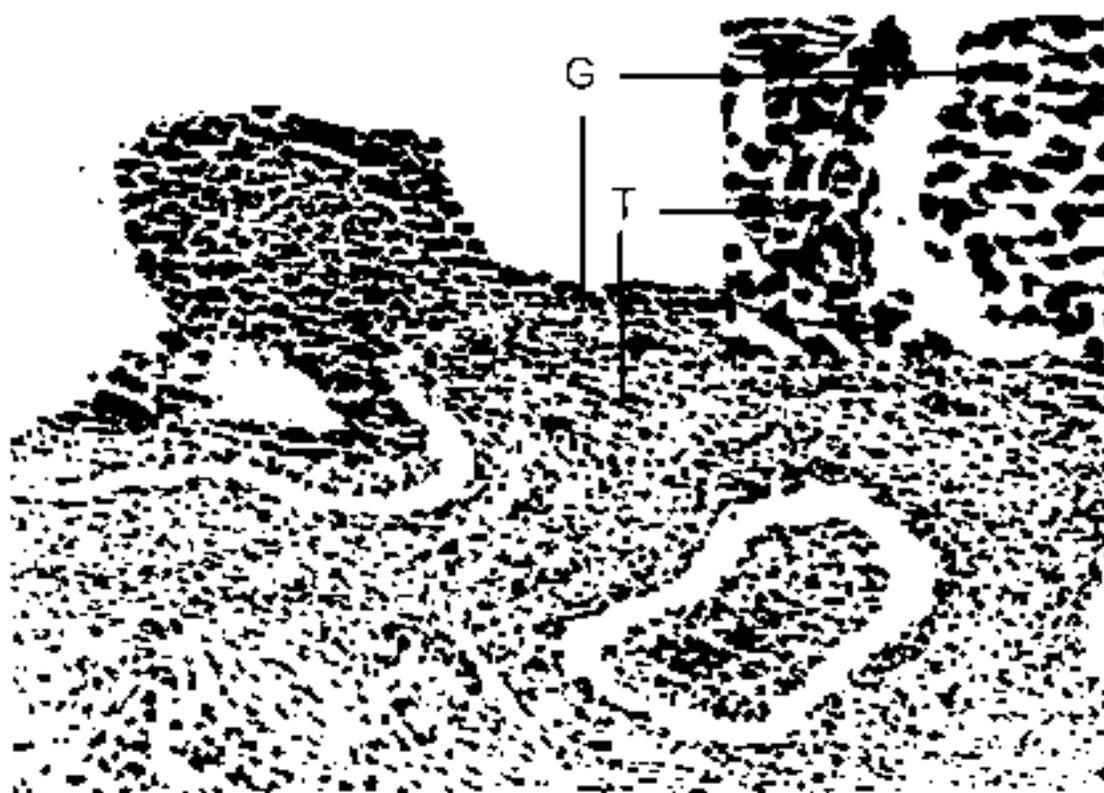


Figura 12. Folículo de ovario humano durante la fase peri-ovulatoria: tinción inmunohistoquímica de las células de la granulosa con antisuero anti-AngII (Antisuero DE, 1:700).



Figura 13. Folículo atrésico de ovario humano: tinción inmunohistoquímica de las células de la granulosa con antisuero anti-angiotensina II. (Antisuero DE, 1:1700).



Figura 14. Estroma de ovario humano: intensa tinción inmunohistoquímica de un grupo de células hilares perineurales con antisuero anti-angiotensina II. (Antisuero DE, 1:800).

Estroma: Las células estromales también mostraban intensa inmunopositividad. En un caso fue posible identificar claramente células hiliares perineurales y perivasculares específicamente positivas para la renina y la AngII (Figura 14)

Corpora lutea: Los corpora lutea presentaban intensa tinción de tanto de las grandes como de las pequeñas células luteínicas (Figuras 15 y 16). La tinción de cortes contiguos con los anticuerpos específicos muestra que la renina y la AngII se localizan en las mismas células.

Vasos: Las arterias de medio calibre fueron consistentemente positivas para la AngII, se tiñeron la muscularis y el endotelio (Figura 17). Esta positividad no se observó con los anticuerpos anti-renina.

En todos los casos la positividad desapareció con la preabsorción de los anticuerpos con el antígeno específico.

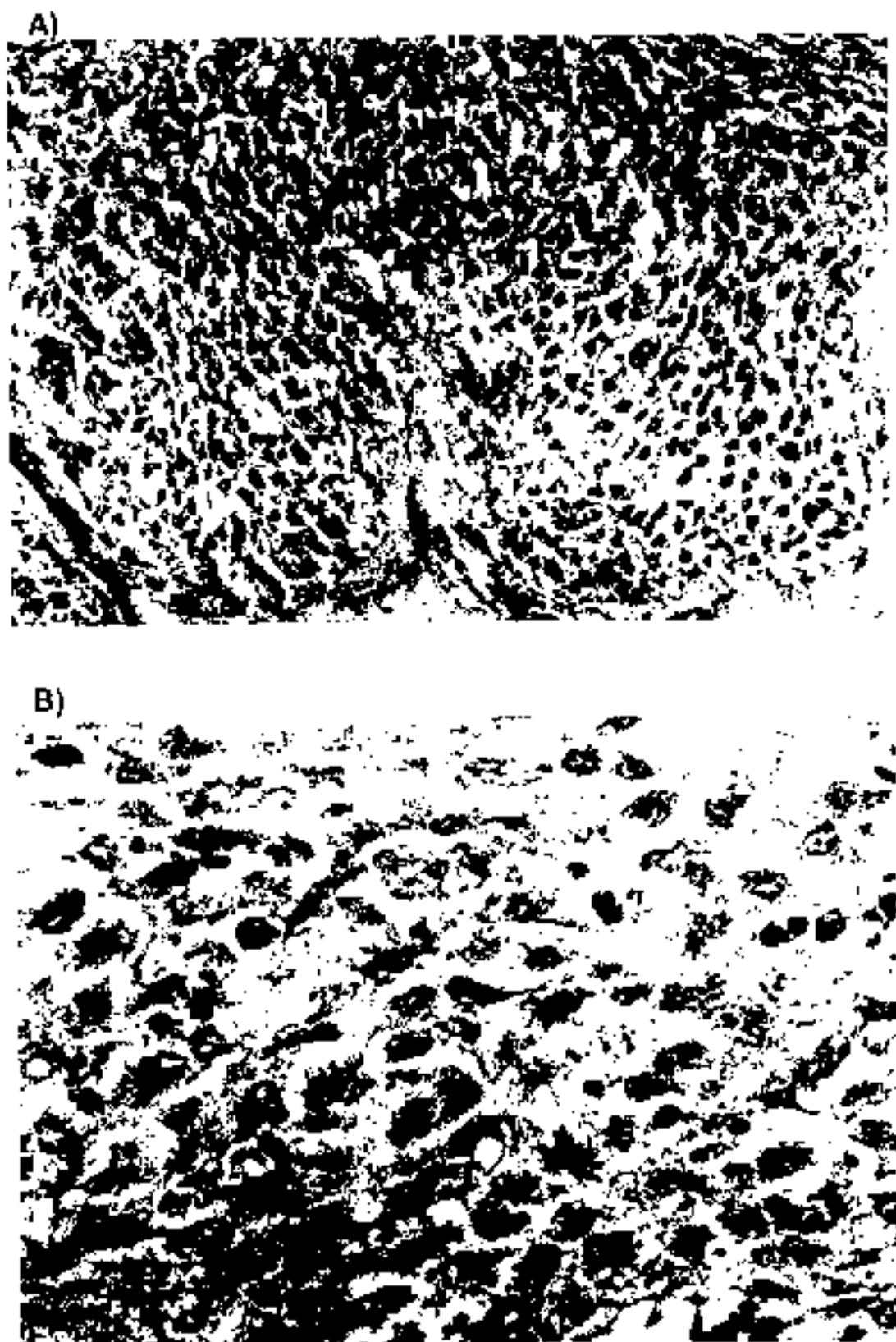


Figura 15. A) Cuerpo lúteo menstrual: intensa tinción inmunohistoquímica con antisuero anti-eritina. (Antisuero TAD, 1:1000). B) El mismo cuerpo lúteo a mayor aumento.

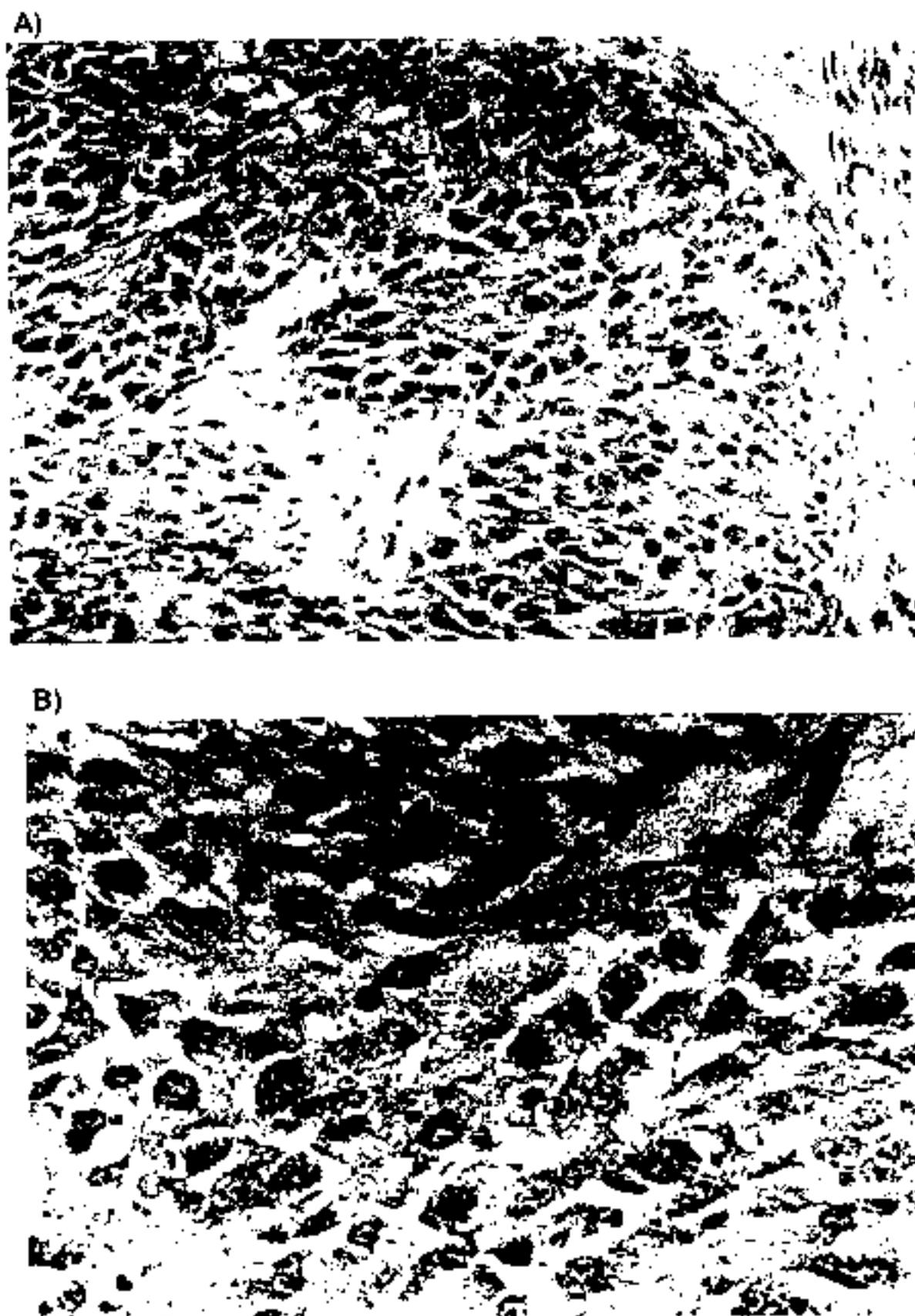


Figura 16. A) Cuerpo lúteo menstrual: intensa tinción inmunohistoquímica con antisuero anti-AngII. (Antisuero DE 1:800). B) El mismo cuerpo lúteo a mayor aumento.

**B). CUERPO LÚTEO GRAVÍDICO.**

Todas las células luteínicas, grandes y pequeñas, se tiñeron positivamente para la renina y la angiotensina. La tinción no fue uniforme, sino de intensidad variable de célula a célula (Figuras 17 y 18.).

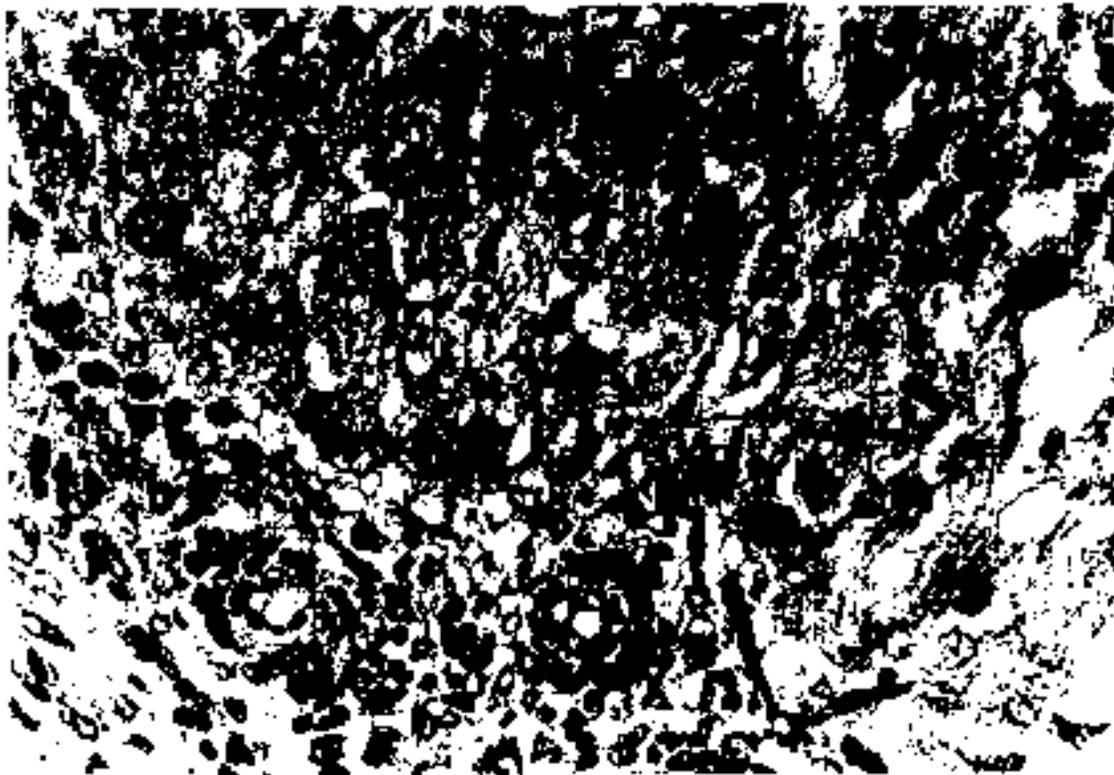


Figura 17. Cuerpo lúteo gravídico: intensa tinción inmunohistoquímica con antisuero anti-AngII. Obsérvese en este caso la positividad de los vasos. (Antisuero DE 1:800).

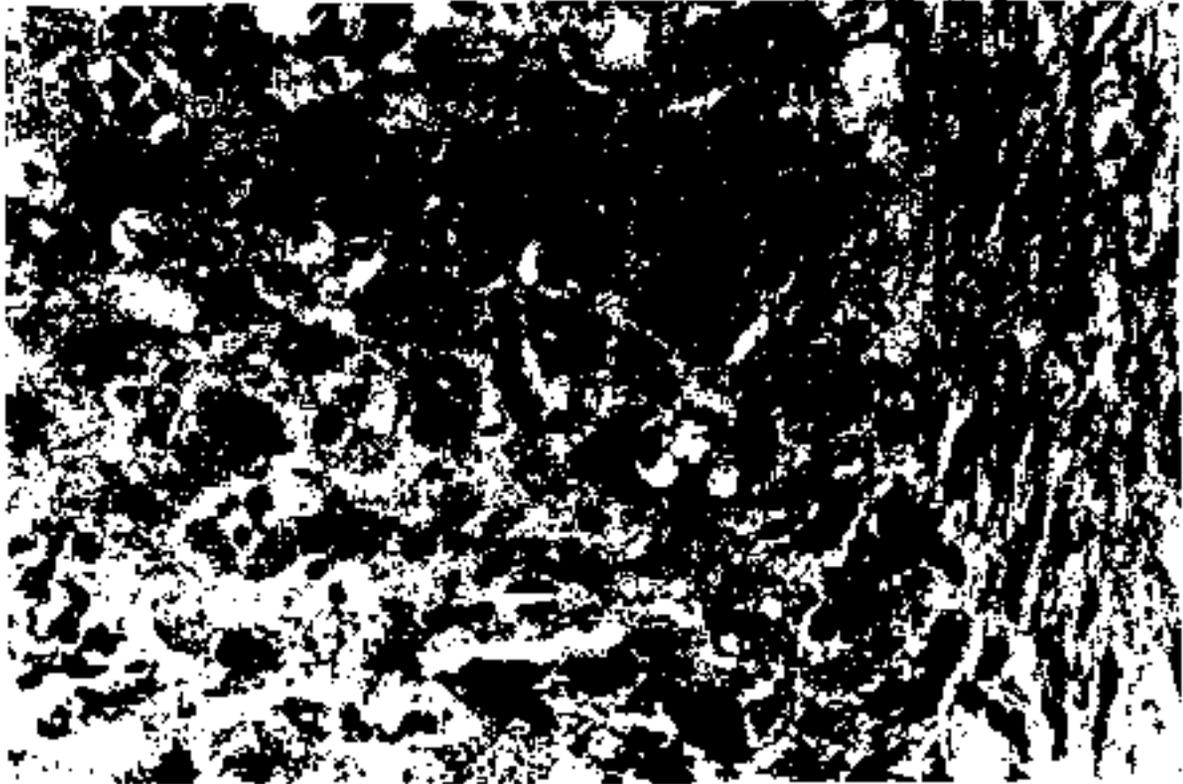


Figura 18. Cuerpo lúteo grávidico: intensa tinción inmunohistoquímica con antisuero anti-renina. (Antisuero TAD, 1:1000).

### C). BIOPSIA

La biopsia del folículo preovulatorio mostró intensa tinción granular de las células de la granulosa luteinizadas y de las células de la teca interna (Figuras 19 y 20). Se observó también tinción de algunas células estromales localizadas cerca de la teca.

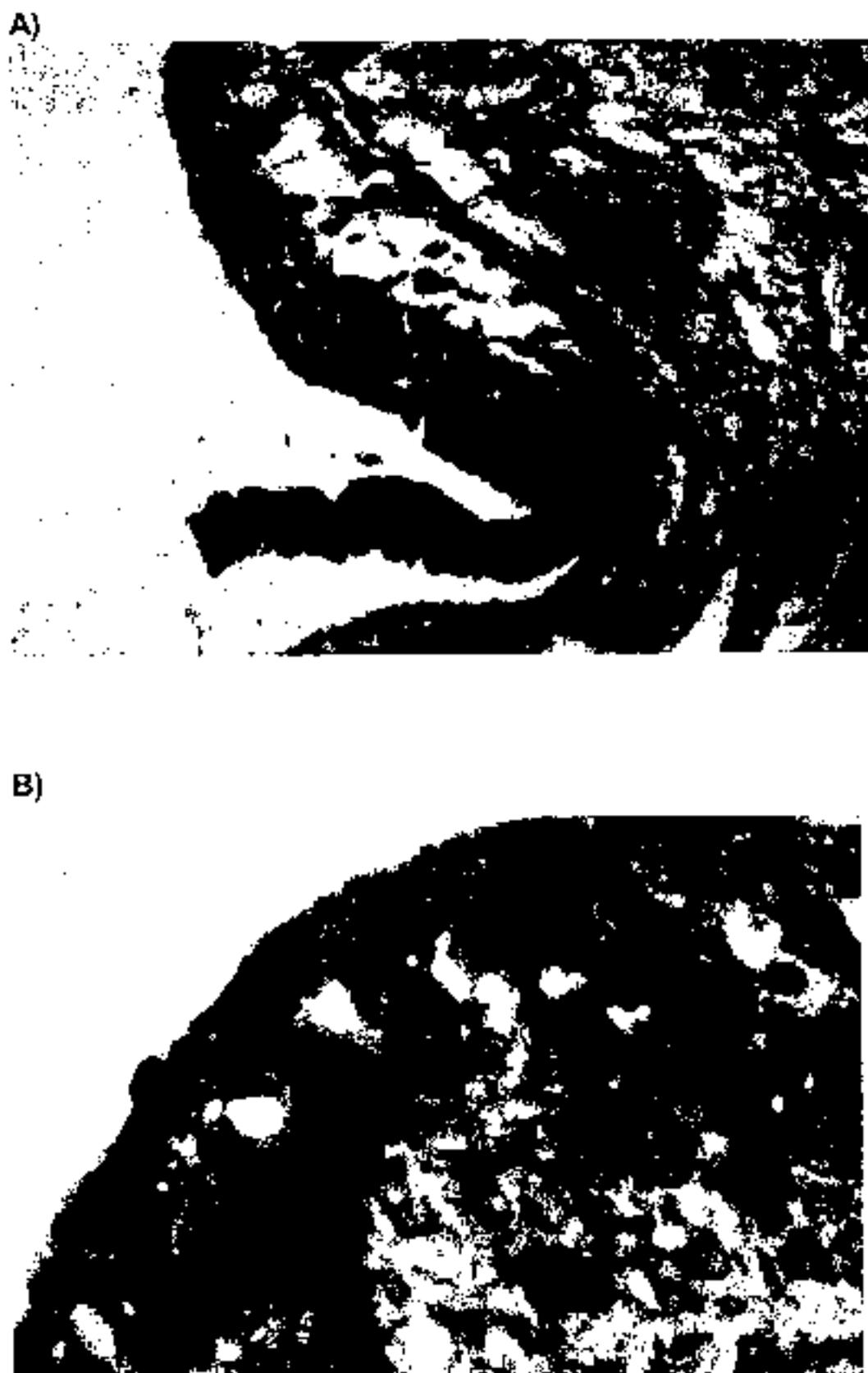


Figura 19. A) Biopsia de folículo preovulatorio obtenida por vía laparoscópica en una paciente estimulada con gonadotropinas para FIV; intensa tinción inmunohistoquímica con antisuero anti-angiotensina II; 10X. B) La misma biopsia a mayor aumento; 40X. (Antisuero NV 1:1500).

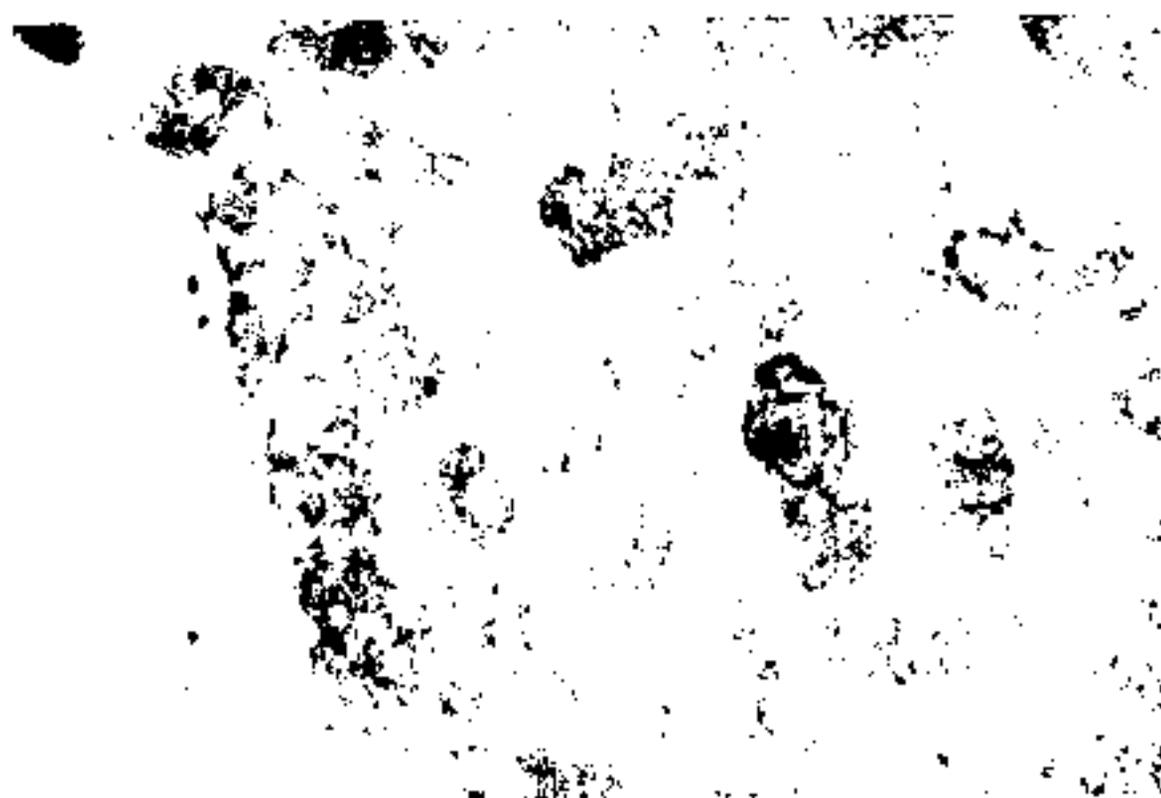


Figura 20. Biopsia de folículo preovulatorio obtenida por vía laparoscópica de una paciente estimulada con gonadotropinas para FIV. Obsérvese la intensa tinción inmunohistoquímica con antisuero anti-angiotensina II de las células de la granulosa luteinizadas y de las células de la teca interna. (Antisuero NV 1:1600; 100X).

## **LOCALIZACIÓN INMUNOHISTOQUÍMICA DE LA RENINA Y DE LA ANGIOTENSINA II EN OVARIOS DE MUJERES CON SÍNDROME DE OVARIOS POLIQUÍSTICOS.**

Los folículos y el estroma de los ovarios de las mujeres con síndrome de ovarios poliquísticos mostraron intensa inmunopositividad para la renina y la angiotensina II. En los folículos, tanto las células de la granulosa como las células tecales fueron positivas. Este patrón es similar al observado en los folículos atrésicos de las mujeres normales exceptuando que, mientras en los ovarios normales contienen un número limitado de folículos atrésicos positivos, en los ovarios poliquísticos se observan múltiples folículos quísticos que simultáneamente presentan intensa positividad para la renina y la angiotensina. Como observamos anteriormente, en los folículos en fase de desarrollo preantrales y antrales de los ovarios normales empleados como controles la tinción se limita a la capa de células tecales (Figura 21).

Grupos de células estromales en los ovarios poliquístico presentaron inmunopositividad para ambos antígenos. Los ovarios poliquísticos presentaban una imagen histológica de un cierto grado de hiperplasia y luteinización de las células estromales y, consecuentemente, una tinción estromal más difusa e intensa que los ovarios normales (Figura 22).



Figura 21. Arriba: Ovario normal en la fase folicular inicial: tinción de las células tecaes con antisuero anti- angiotensina II. Las células de la granulosa son negativas; en la esquina derecha en alto una porción del mismo folículo a mayor aumento. Abajo: Ovario de mujer con síndrome de ovarios poliquísticos: intensa tinción de ambos tipos celulares, granulosa y teca, con antisuero anti-renina inmunohistoquímica con antisuero anti-renina. (G, células de la granulosa; T, células tecaes).

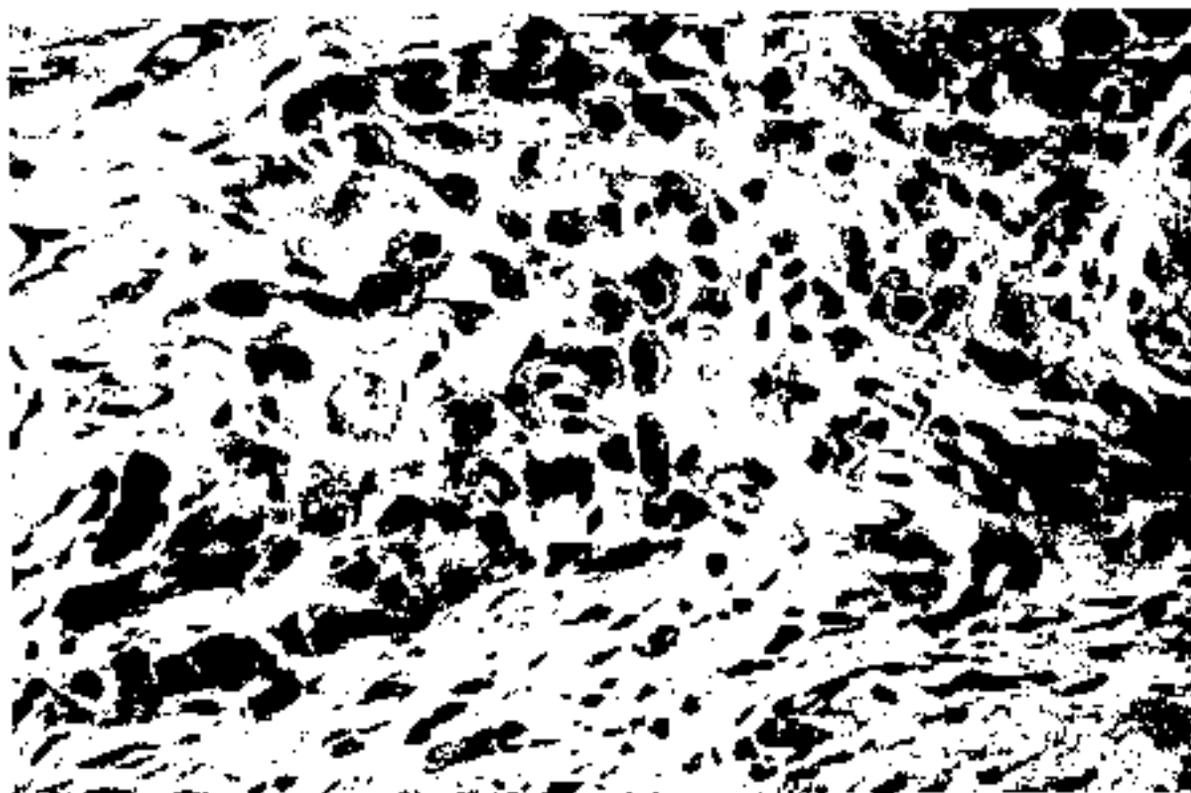


Figura 22. Ovario poliquístico: intensa tinción inmunohistoquímica de un grupo de células estromales hiperplásicas con antisuero anti-renina. (Antisuero TAO, 1:1000).

## EFFECTO DE LA ANGI IN VITRO SOBRE LA PRODUCCIÓN DE HORMONAS ESTEROIDEAS DE PARTE DE CÉLULAS DE LA GRANULOSA-LUTEÍNICA HUMANAS.

La figura 23 a-c muestra el efecto de la AngII ( $10^{-11}$  to  $10^{-7}$  M) sobre la secreción esteroidea por parte de células de la granulosa-luteínica humanas aisladas de 3 mujeres sometidas a inducción de la ovulación para fertilización *in vitro*. Tras 24 horas de incubación, en presencia de todas las dosis de AngII utilizadas, las concentraciones de progesterona, testosterona y estradiol en el medio de cultivo aumentaron significativamente en comparación con las células control no tratadas incubadas al mismo tiempo ( $P \leq 0.05$ , test de Dunnett para comparaciones múltiples). La adición de saralasin a una concentración de  $10^{-5}$  M al comienzo de la incubación inhibió el efecto de la AngII. El ANOVA de tres vías mostró efectos altamente significativos con respecto a la dosis de AngII, la co-incubación con la saralasin y la interacción entre la dosis de AngII y el bloqueo por la saralasin .

Como se muestra en las figuras 23a y 23b, las concentraciones de progesterona y testosterona en el medio de cultivo aumentó en manera dependiente de la dosis. Las curvas dosis - respuesta fueron analizadas utilizando en test de Newman-Keuls. En el caso de la progesterona, la saralasin ( $10^{-5}$  M) bloqueó completamente el efecto de la AngII (Fig 23a). En el caso de la testosterona el bloqueo causado por la saralasin fue incompleto a las concentraciones de AngII de  $10^{-9}$  y  $10^{-8}$  (Fig 23b). En general, la saralasin mostró escasa capacidad de suprimir la testosterona, especialmente si

comparamos su efecto en los controles sobre la testosterona con el efecto sobre la progesterona y el estradiol. En comparación con las células control incubadas con medio de cultivo en ausencia de tratamiento, la adición de saralasin sola al medio de cultivo causó una reducción significativa de progesterona y estradiol en todos los casos. En el caso de la testosterona, de 3 incubaciones, la testosterona permaneció inmutada en una y aumentó en dos.

Como se muestra en la figura 23c, la respuesta del estradiol a la adición de AngII fue bifásica, con un pico a la concentración de  $10^{-12}$  M de AngII y un progresivo declive con dosis más elevadas. Las dosis más bajas de AngII ( $10^{-11}$  y  $10^{-10}$  M) aumentaron la concentración de estradiol. Desde  $10^{-9}$  M a  $10^{-7}$  M la concentración de estradiol en el medio de cultivo mostró una disminución en manera dependiente de la dosis; pero, hasta a la concentración de  $10^{-7}$  M de AngII la concentración de estradiol en el medio de cultivo era superior a la de las células control. El medio de cultivo de las células de la granulosa-luteínica incubadas en presencia de AngII y saralasin contenían menos estradiol que las células tratadas con angiotensina solo, pero la inhibición por parte de la saralasin no fue completa.

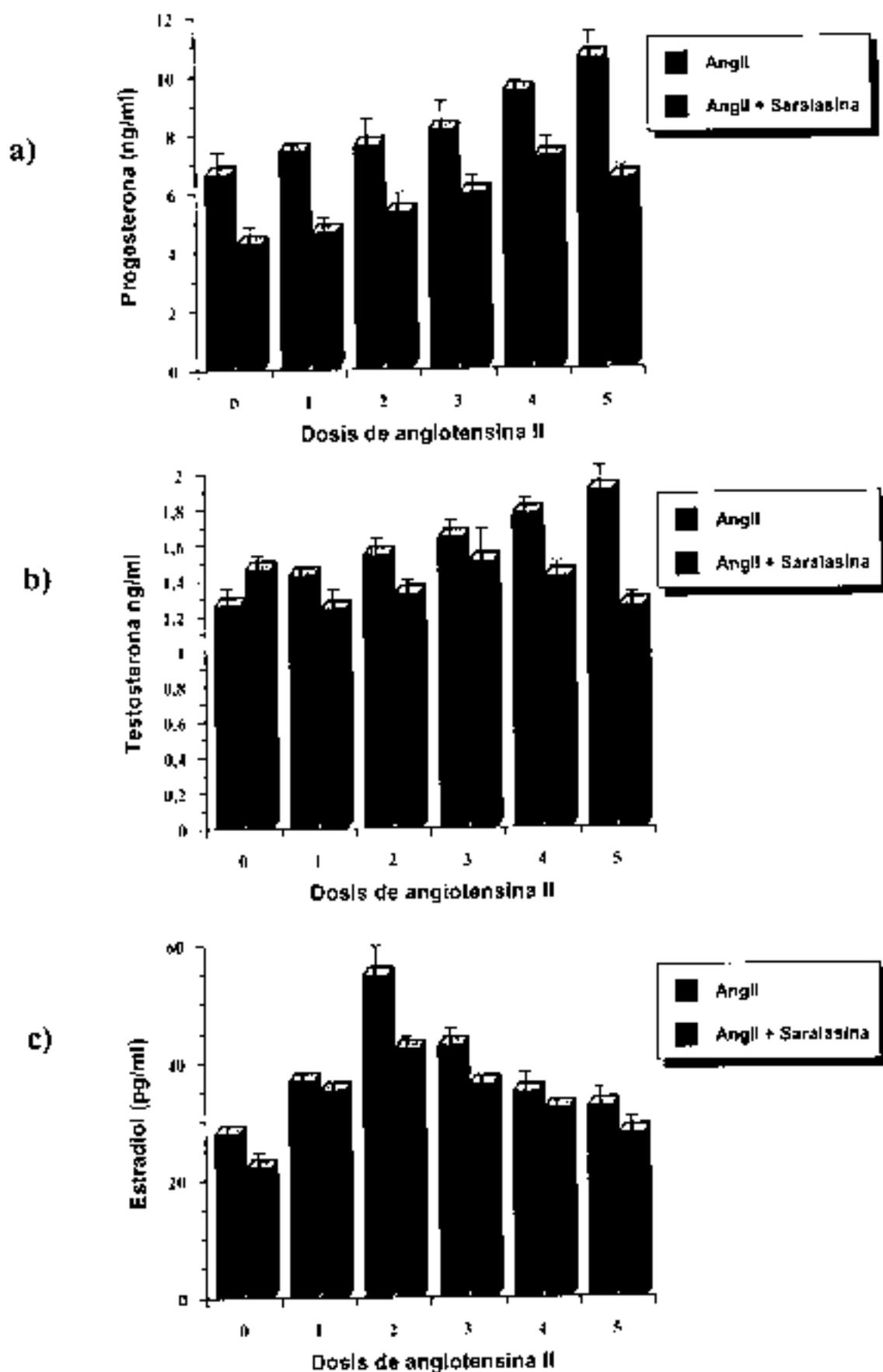


Figura 23. Efecto de distintas dosis de Angiotensina II sobre la concentración de progesterona, testosterona y estradiol en el medio de cultivo obtenido de células de la granulosa-luteínicas humanas tras 24 horas de cultivo en presencia o ausencia del antagonista receptorial saralasin.

## **BLOQUEO DE LA OVULACIÓN MEDIANTE SARALASINA EN RATAS INMADURAS ESTIMULADAS CON GONADOTROPINAS.**

Los resultados de estos experimentos se muestran en la tabla 6. El análisis de varianza de tres vías mostró un efecto significativo con respecto al tratamiento con saralasin (  $F = 17.98$ ;  $df = 2,48$ ;  $p < 0.001$ ). La administración de saralasin (100  $\mu$ l de una solución 1 mM) 1 hora antes o 1 o 3 horas después de la inyección de hCG causó una reducción del 50% del número de ovocitos encontrados en la trompa en comparación con los controles ( $p < 0.05$ , tabla 6). Los animales que recibieron saralasin 5 horas después de la hCG también liberaron menos ovocitos respecto a los controles, pero la diferencia no llegó a ser significativa estadísticamente. No se obtuvo ningún efecto cuando se administró una dosis inferior de saralasin (100  $\mu$ l, 1 $\mu$ M) 1 hora antes o después de la hCG.

Para valorar más directamente el papel de la angiotensina en la ovulación se estudiaron dos ulteriores grupos de ratas que recibieron saralasin intraperitoneal (100  $\mu$ l, 1mM) 1 ó 3 horas después de la hCG e inmediatamente después una inyección intraperitoneal de AngII a la misma dosis y volumen. La administración "tandem" de AngII intraperitoneal bloqueó completamente el efecto de la saralasin: no se observó ninguna diferencia entre los controles y las ratas tratadas con saralasin más AngII (Tabla 6).

Momento de la administración	Controles	Saralasin 1mM	Saralasin 1 mM + AngII 1 mM
1 hora antes de la hCG	25.8 ± 5 (n=5)	13.8 ± 3.5 * (n=6)	
1 hora después de la hCG	28.7 ± 9.1 (n=10)	14.4 ± 6.3 * (n=12)	28.6 ± 9.8 † (n=11)
3 horas después de la hCG	25.6 ± 7.9 (n=7)	10.7 ± 6.1 * (n=9)	25 ± 7.8 † (n=5)
5 horas después de la hCG	19.8 ± 2.7 (n=4)	17.8 ± 2.9 † (n=5)	

Tabla 6. Número de ovocitos presentes en las trompas tras administración intraperitoneal de 100µl de solución fisiológica (controles), saralasin o saralasin + angiotensina II. Los resultados están indicados como media ± desviación estándar.

n = número de ratas (en cada una se valoraron ambas trompas)

Test de Duncan: \* =  $p < 0.05$  y † =  $p > 0.05$  en comparación con los controles.

## BLOQUEO DE LA MADURACIÓN OVOCITARIA MEDIANTE SARALASINA EN RATAS INMADURAS ESTIMULADAS CON GONADOTROPINAS.

### IN VIVO.

Los folículos preovulatorios se puncionaron 8 horas después de la administración de hCG para aislar los ovocitos. Se comprobó la desaparición de la vesícula germinal (germinal vesicle breakdown, GVBD) como indicador de la resumpción de la meiosis. Se observó GVBD en el 84% de los ovocitos control y la saralasinu indujo una reducción del 20% del proceso de GVBD ( $p < 0.01$ ) (Tabla 7).

Tratamiento (1 hora después de la hCG)	Número de ovocitos	% GVBD
Solución fisiológica (100 $\mu$ l)	50	84
Saralasinu (100 $\mu$ l, 1 $\mu$ M)	72	62.5*
Saralasinu (100 $\mu$ l, 1mM)	51	60.8*

Tabla 7. Efecto de la saralasinu intraperitoneal sobre la maduración de los ovocitos (GVBD). \*  $p < 0.05$  respecto a los ovocitos control.

*In vitro.* Los folículos preovulatorios obtenidos 48 horas después de la administración de PMSG se aislaron y se pusieron en cultivo en presencia de hCG y de concentraciones crecientes de saralasinina durante 5 horas. La saralasinina causó una reducción dependiente de la dosis de la GVBD inducida por la hCG. Este efecto fue bloqueado por la presencia de AngII (Tablas 8 y 9).

Tratamiento	Número de ovocitos examinados	% GVBD
Controles	71	7
hCG 20 IU/ml	127	72.4
hCG + Saralasinina, 10 nM	101	66.3
hCG + Saralasinina, 100 nM	79	58.2*
hCG + Saralasinina, 1µM	144	51.4*

Tabla 8. Porcentaje de GVBD observado después de incubación *in vitro* de los folículos preovulatorios en presencia de hCG y dosis crecientes de saralasinina. \*  $p < 0.05$  respecto a los folículos incubados con hCG sola.

Tratamiento	Numero de ovocitos examinados	% GVBD
Controles	71	7
hCG 20 UI/ml	127	72.4
hCG + Saralasin, 1 $\mu$ M	144	51.4*
hCG + Saralasin, 1 $\mu$ M + AngII 10 nM	67	53.7*
hCG + Saralasin, 1 $\mu$ M - AngII 100 nM	65	70.8†
hCG + Saralasin, 1 $\mu$ M + AngII 1 $\mu$ M	63	69.8 $\ddagger$
hCG + Saralasin, 1 $\mu$ M + AngII 10 $\mu$ M	56	69.6†

Tabla 9. Porcentaje de GVBD observado después de incubación *in vitro* de los folículos preovulatorios en presencia de hCG (20UI/ml) y saralasin (1 $\mu$ M) en presencia y ausencia de dosis crecientes de AngII. \* =  $p < 0.05$  y † =  $p > 0.05$  respecto a los folículos incubados con hCG sola.

## APOPTOSIS

### LA APOPTOSIS COMO MECANISMO DE LA ATRESIA FOLICULAR EN LA RATA.

El DNA extraído de las células de la granulosa de ratas inmaduras y analizado mediante electroforesis en gel de agarosa, muestra la típica degradación en escalera, indicando la presencia de células apoptóticas (Figura 24).



Figura 24. Análisis del DNA total celular obtenido de las células de la granulosa de ovarios de rata inmadura (B) mediante electroforesis en gel de agarosa al 1.5% con bromuro de etidio. Se utilizaron 14  $\mu$ g de DNA. La columna A representa un marcador de peso molecular (100 bp ladder).

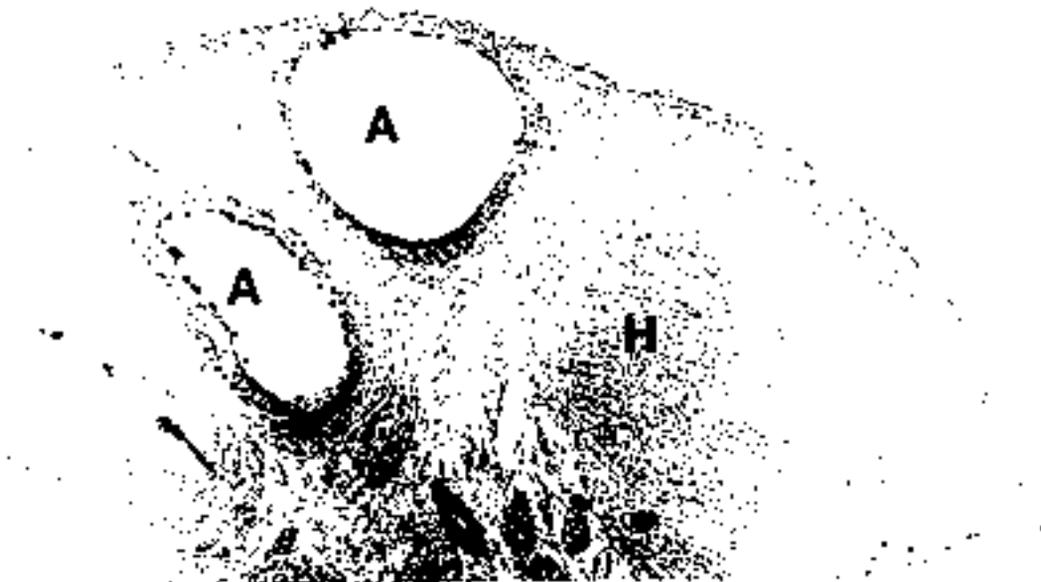


Figura 25a. Tinción de los folículos atrésicos (A) de un ovario de rata inmadura. A la derecha, destaca un folículo sano (H), que es completamente negativo. x 100

Los ovarios de ratas inmaduras que se emplearon para la detección de la apoptosis *in situ*, mostraron tinción selectiva de los núcleos de los folículos atrésicos preantrales y antrales (Figura 25a), confirmando con distinta técnica que en los ovarios de rata inmadura hay apoptosis y localizando este fenómeno en los folículos atrésicos. A diferencia de los folículos atrésicos, los folículos en fase de desarrollo, preantrales y antrales, fueron siempre negativos para apoptosis (Figura 25a). Los controles positivos demostraron en todos los casos tinción uniforme de todos los núcleos (Figura 25b). La omisión del sustrato biotinilado o de la TdT conllevó consistentemente resultados negativos (Figura 25c).



Figura 25b. El mismo ovario de la figura 25a. Control positivo, obtenido añadiendo DNasa. x 100.

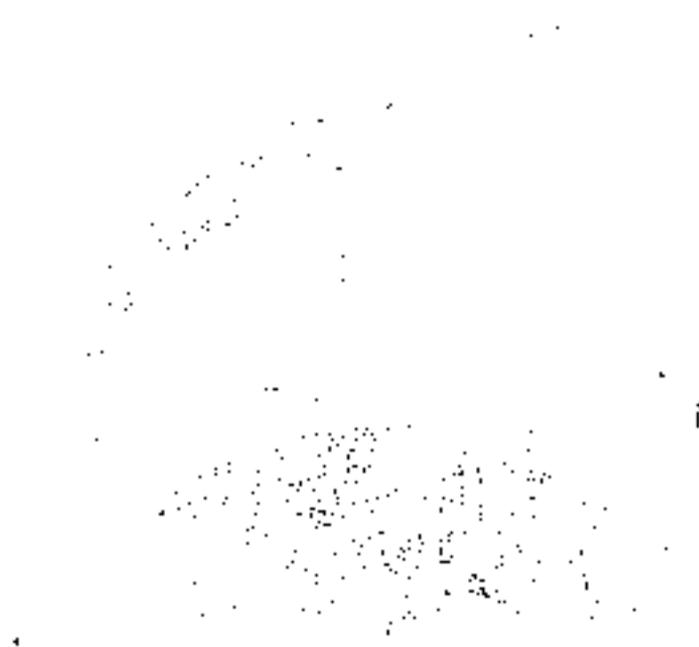


Figura 25c. El mismo ovario de la figura 25a. Control negativo, obtenido omitiendo el enzima TDT. (x 100).

La apoptosis se produce principalmente en las células de la granulosa, pero algunas células tecales también muestran tinción de los núcleos (Figura 26).

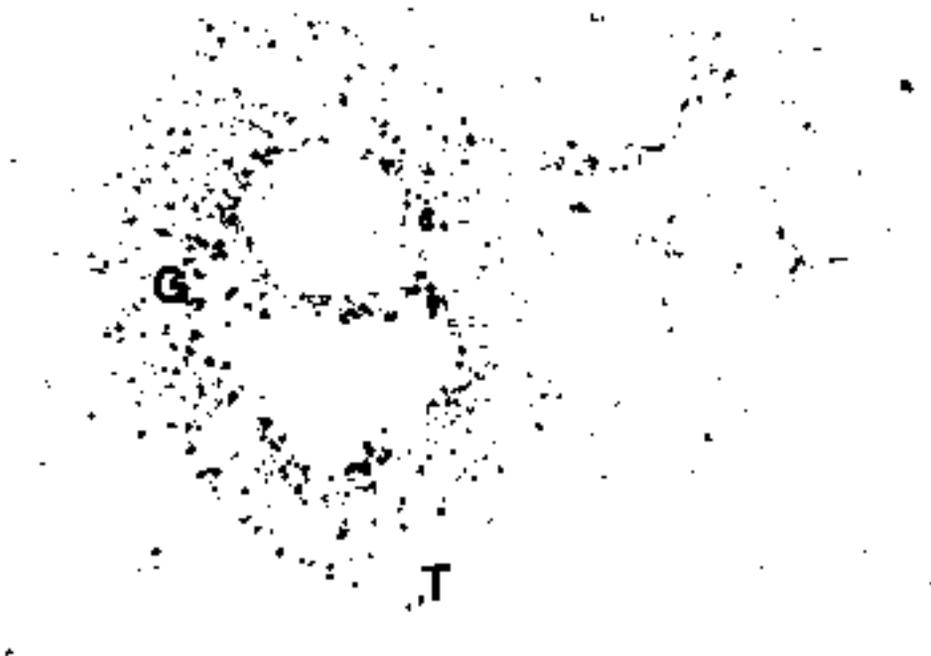


Figura 26. Detalle de un folículo atrésico de un ovario de rata inmadura, que demuestra la tinción de algunas células tecales aisladas, además de las células de la granulosa.

Los ovarios de rata estimuladas con PMSG y sacrificadas a las 48 horas presentan escasos folículos atrésicos positivos (Figura 27). Cinco días después de la inyección de PMSG, la mayoría de los folículos contienen células apoptóticas, como efecto de la privación hormonal (Figura 28).



Figura 27. Tinción de un folículo atrésico en un ovario estimulado con PMSG, 48 horas después del tratamiento. x 200.

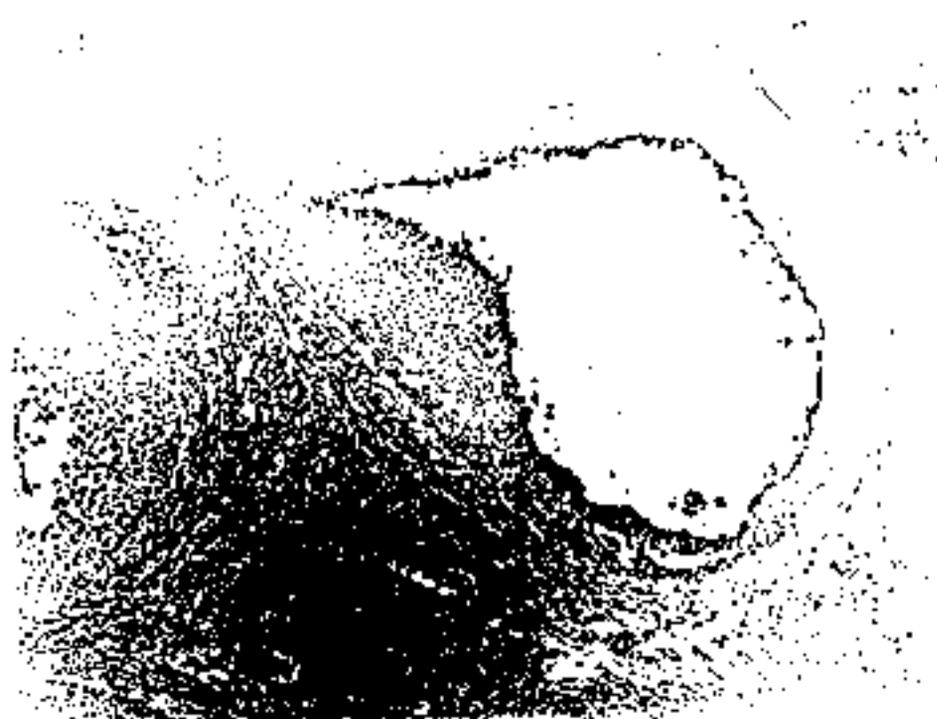


Figura 28. Tinción de un folículo atrésico en un ovario estimulado con PMSG, 5 días después del tratamiento. x 200. Obsérvese la presencia de núcleos positivos en varios folículos atrésicos adyacentes.

Los ovarios de ratas adultas también muestran tinción en los folículos atrésicos a lo largo de todo el ciclo (Figura 29). Como en el caso de las ratas inmaduras hay apoptosis en la granulosa y también en células tecales aisladas.



Figura 29. Tinción de un folículo atrésico (A) en un ovario de rata adulta. Obsérvese el folículo sano a la izquierda, que es negativo. x 200.

## PARTICIPACIÓN LA APOPTOSIS EN LA FORMACIÓN Y REGRESIÓN DEL CUERPO LÚTEO.

Cuando utilizamos el método 1 de extracción del DNA, todos los ovarios examinados presentaron degradación en escalera del DNA, desde el día 0 (ratas inmaduras no tratadas) hasta el día 17 post-HCG. La fragmentación era más intensa los días 7 y 13 post-HCG. (Figura 30).

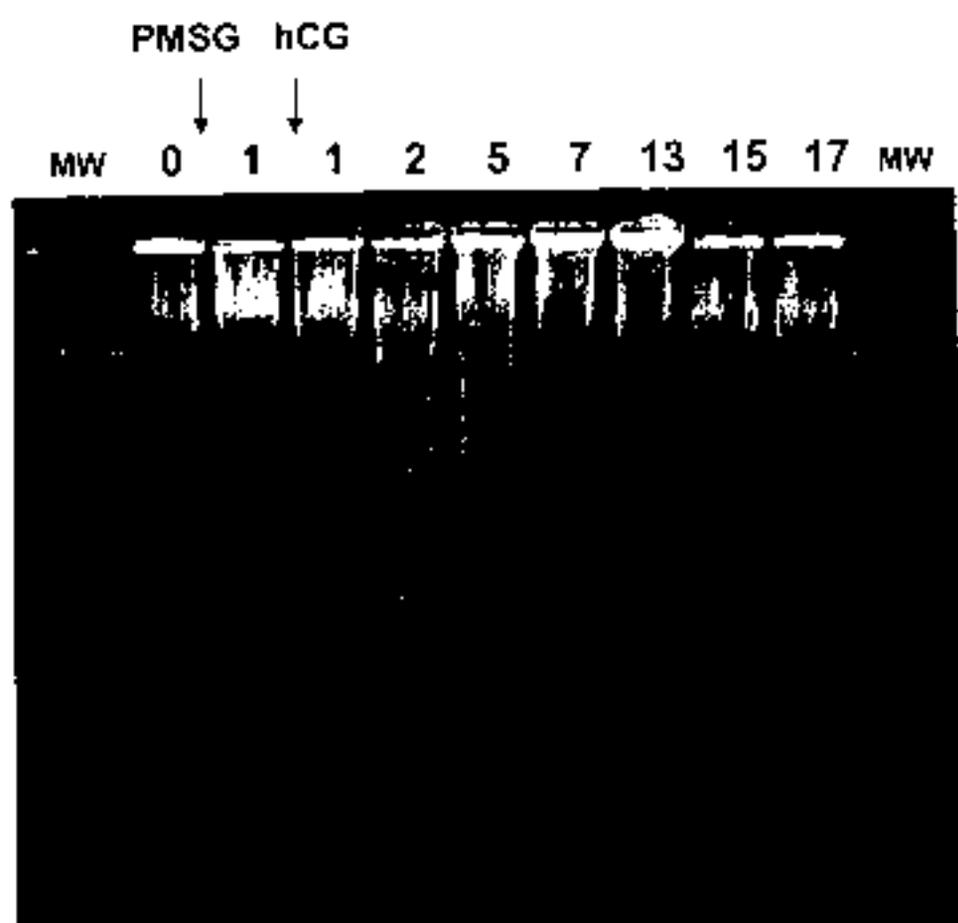


Figura 30. Electroforesis en gel de agarosa al 2% que muestra la presencia de degradación en escalera del DNA extraído por el método 1 de ovarios de rata inmadura antes, durante y después de la inducción de la ovulación con PMSG (50 UI) y hCG (25 UI). MW = marcador de peso molecular (fago lambda digerido con BstEII). 0 = ovarios de rata inmadura antes del tratamiento. Los números indican la cantidad de días después de la inyección de PMSG y hCG, como señalan las flechas.

Al procesar con este método, el riñón de rata normal (en el cual no debería haber apoptosis), también exhibió fragmentación del DNA. (Figura 31), indicando que se produce un cierto grado de fragmentación artefactual del DNA al utilizar este método de extracción.



Figura 31. Gel de electroforesis en agarosa al 2% que muestra la presencia de fragmentación en escalera del DNA en ovarios de ratas adultas (O) y riñón de rata normal (K) utilizando el método 1.

Al contrario, cuando se utilizó el método 2, el DNA de riñón de rata normal no presentó nunca degradación en escalera del DNA (Figura 32). En los ovarios de rata se pudo observar una evolución específica en función del tiempo en respuesta al tratamiento con gonadotropinas (curso temporal). La degradación en

escadera del DNA estaba presente en los ovarios de rata inmadura no tratada, disminuía y desaparecía después del tratamiento con PMSG y HCG, para reaparecer al 7º día después de la administración de HCG (Figuras 32 y 33). La intensidad de la apoptosis fue máxima el día 7 y 9, disminuyendo progresivamente después.

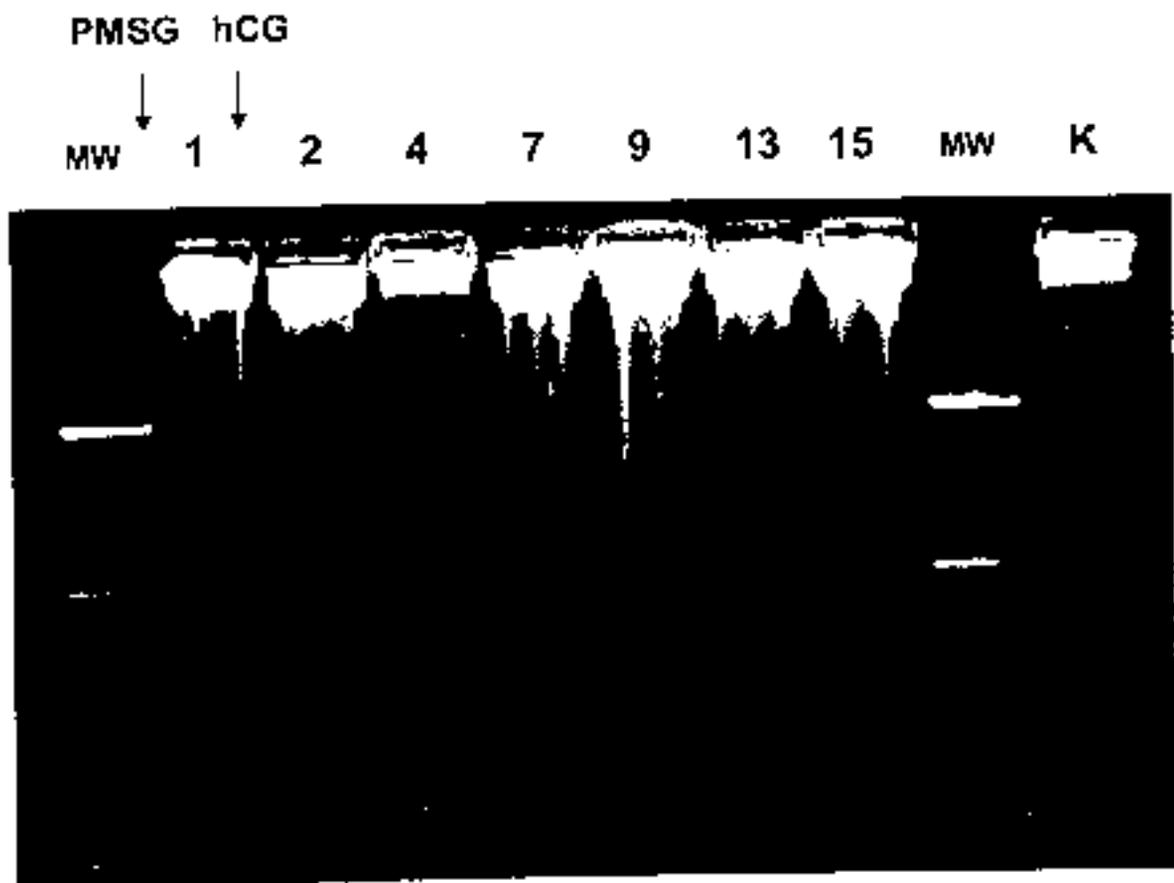


Figura 32. Gel de electroforesis en agarosa al 2% del DNA de riñón normal de rata (K) y de ovarios de ratas inmaduras extraído con el método 2. Las flechas señalan el momento de la administración de PMSG y HCG y los números indican la cantidad de días después del tratamiento. MW = marcador de peso molecular.



## EL PAPEL DE LA APOPTOSIS EN EL MECANISMO DE CISTOGÉNESIS EN UN MODELO ANIMAL DE SÍNDROME DE OVARIOS POLIQUÍSTICOS.

El 90 % de las ratas tratadas con DHEA durante 28 días (9 de 10) y el 70% (7 de 10) de las ratas tratadas durante 15 días desarrollaron ovarios con quistes múltiples. Las ratas control tenían ovarios normales con folículos en varios estadio de desarrollo y cuerpos amarillos.

Los ovarios poliquísticos contenían un número variable de folículos atrésicos y quistes de tamaño variado. Varios ejemplos están ilustrados en la figura 34.

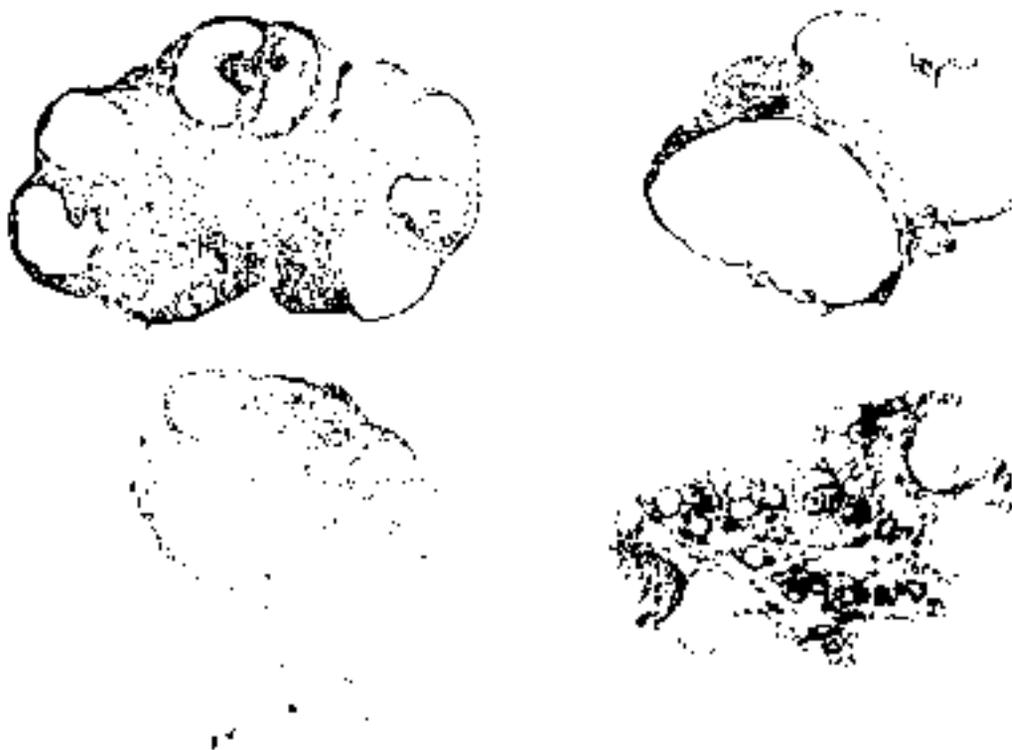


Figura 34 . Cuatro ejemplos de ovarios poliquísticos de rata, obtenidos mediante administración de DHEAS.

Todos los folículos atrésicos, preantrales y antrales contenían muchos núcleos apoptóticos en la capa de células de la granulosa y ocasionalmente en la teca. La figura 35 muestra dos folículos atrésicos positivos, uno al lado del otro: a la izquierda un folículo preantral y a la derecha un folículo antral. La mayoría de la apoptosis ocurre en las células de la granulosa, encontrándose escasas células apoptóticas en la teca. En la esquina superior izquierda se observa una porción de la pared de un quiste de tamaño mediano. Hay núcleos apoptóticos, aunque ligeramente menos numerosos que en los folículos atrésicos.

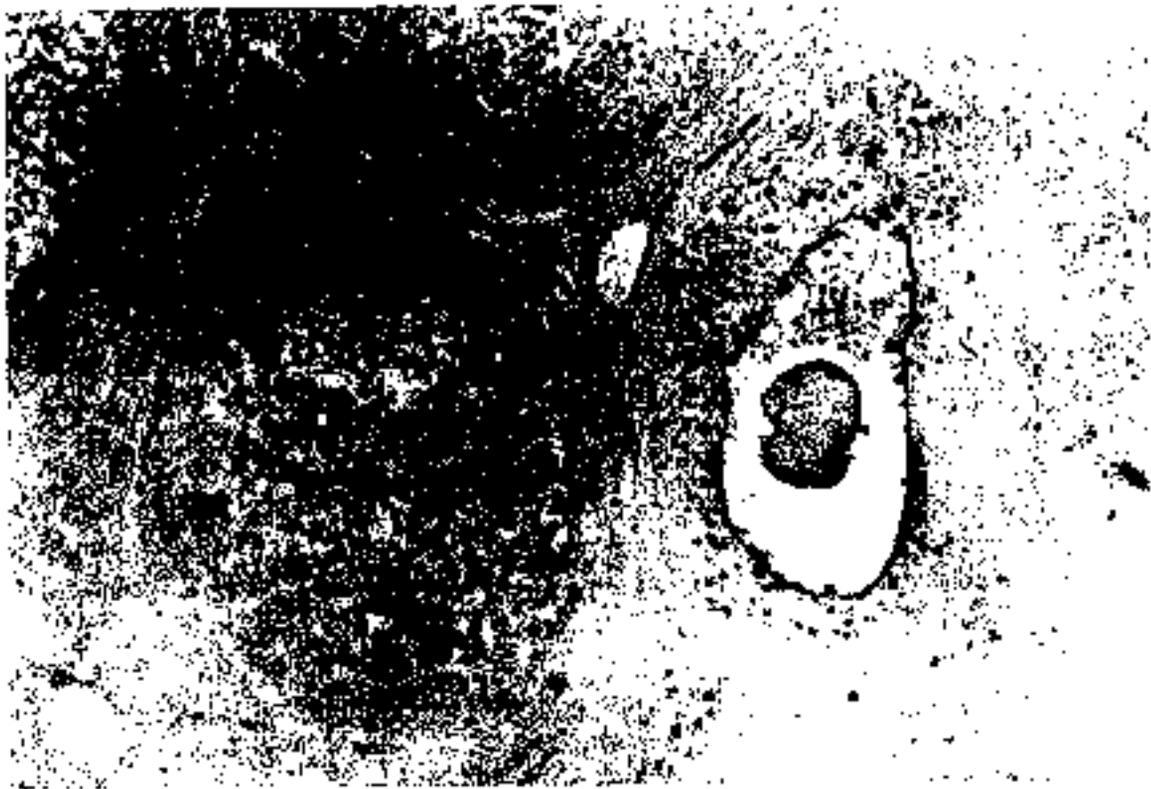


Figura 35. Se observan dos folículos atrésicos positivos, uno antral a la derecha y uno preantral a la izquierda. Ambos presentan numerosos núcleos positivos en la granulosa y algunos núcleos positivos aislados en la teca. En la esquina superior izquierda se observa una porción de la pared de un quiste de tamaño mediano. Obsérvese cómo los núcleos apoptóticos son ligeramente menos numerosos que en los folículos atrésicos.

En general, los folículos quísticos muestran menor número de núcleos positivos que los folículos atrésicos. A medida que aumenta el diámetro de los quistes, la pared quística disminuye de grosor, hasta llegar a una única capa de células de la granulosa en los quistes mayores. El porcentaje de núcleos apoptóticos disminuye con el aumento del diámetro de los quistes, así que los quistes mayores solo muestran algunos núcleos positivos en cada sección. La figura 36 incluye un quiste pequeño con abundantes células apoptóticas y un fragmento de la pared de un quiste grande con células apoptóticas aisladas. Los quistes de tamaño intermedio tienen menos núcleos apoptóticos que los pequeños y más que los grandes (Figura 37).



Figura 36. A la izquierda se observa un quiste pequeño con abundantes células apoptóticas y a la derecha un fragmento de la pared de un quiste grande con células apoptóticas aisladas.

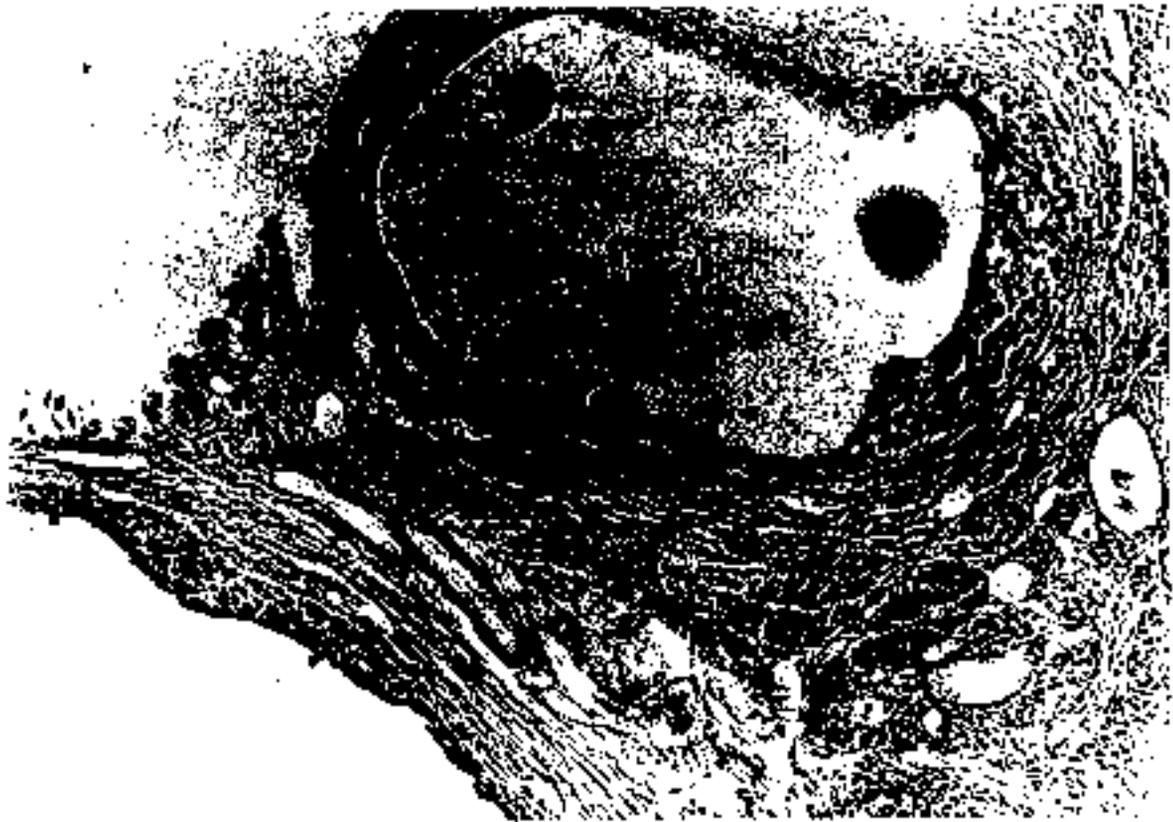


Figura 37. Esta figura muestra un quiste de tamaño intermedio: obsérvese cómo hay menos núcleos apoptóticos que en los quistes pequeños y más que en los grandes. Abajo a la izquierda está un fragmento de la pared de un quiste grande con células apoptóticas aisladas.

Los ovarios de control presentaban apoptosis de los folículos atrésicos, mientras los folículos en fase de desarrollo eran todos negativos.

Los controles negativos fueron completamente negativos y los controles positivos apropiadamente positivos. Un ejemplo de una muestra con sus correspondientes controles negativos y positivos se muestra en las figuras 38a, 38b y 38c.



Figura 38a. Detalle de la pared de un quiste grande con células apoptóticas aisladas.

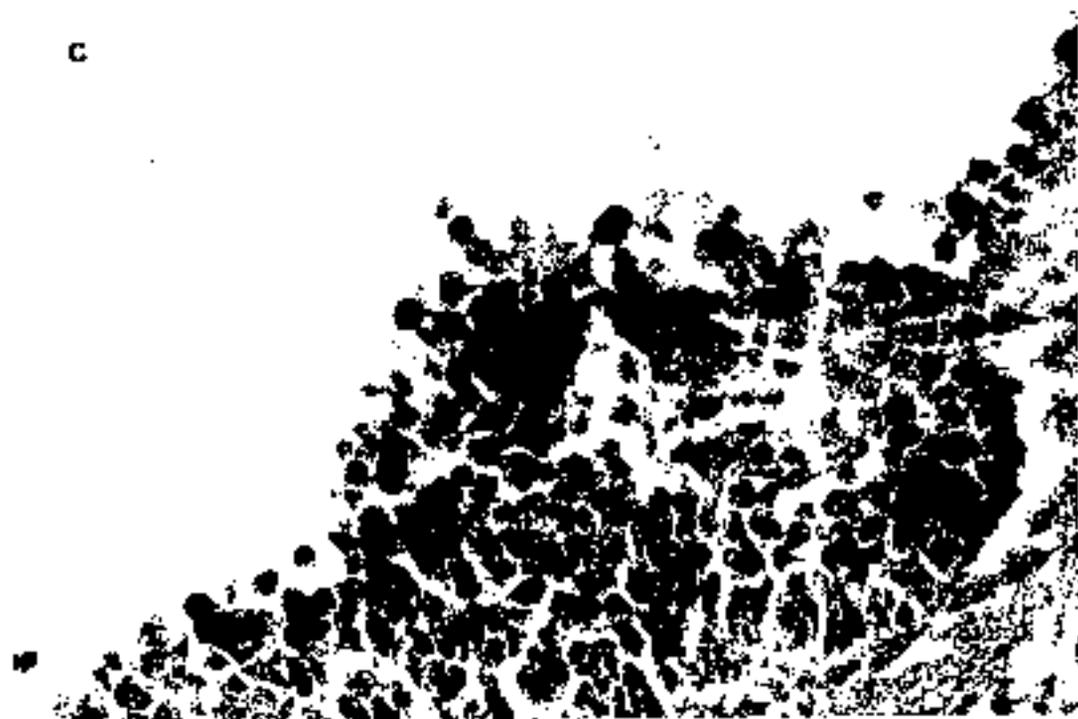
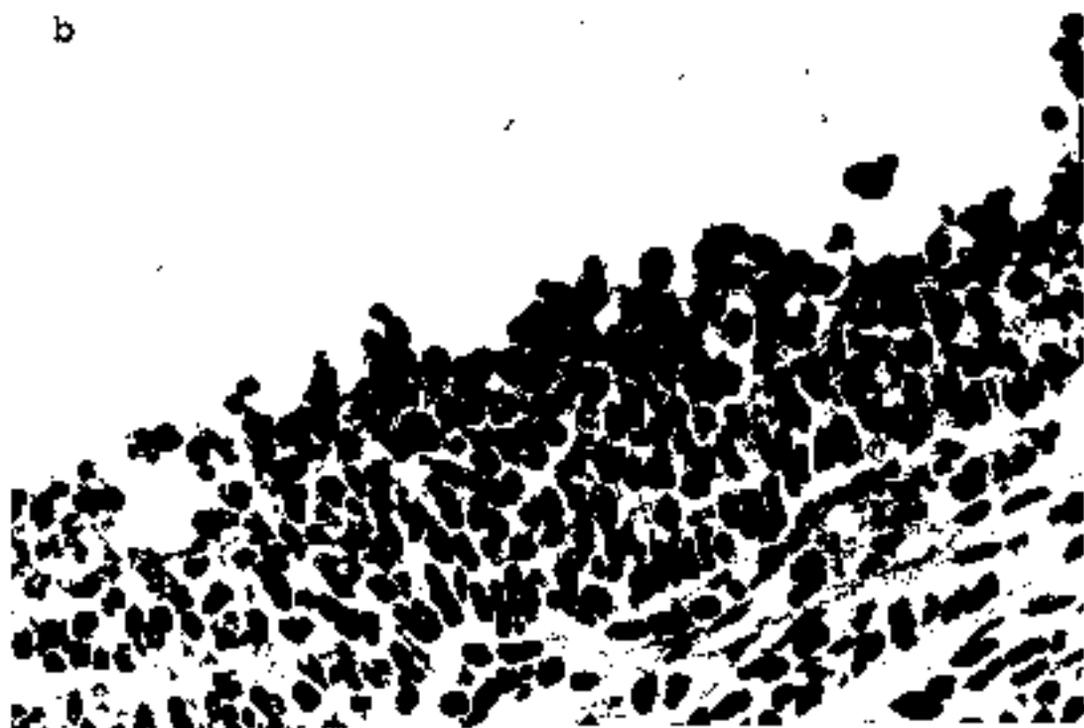


Figura 38 b y c. El mismo quiste de la figura 38a. Control positivo (b) y negativo (c).

## **Capítulo V**

### **Discusión**

## DISCUSIÓN GENERAL DE MATERIALES Y MÉTODOS.

### INMUNOHISTOQUÍMICA.

La inmunohistoquímica permite determinar la localización tisular y celular de antígenos a través de la unión de anticuerpos específicos con los antígenos que se están estudiando, poniendo en evidencia esta unión mediante un cromógeno. El método biotina-avidina-peroxidasa, utilizado en esta tesis, es muy específico y sensible permitiendo la identificación de cantidades muy pequeñas del antígeno estudiado. Esta técnica ha sido utilizada anteriormente para el estudio del RAS en el riñón (Taugner y Hackental, 1981; Inagami et al. 1986; Barajas et al, 1986) y en otros tejidos (Deschepper et al, 1985; Naruse et al, 1985), por lo que nos pareció adecuada su aplicación al RAS ovárico. Tanto la renina como la AngII son antígenos lo suficientemente estables como para resistir los tratamientos de fijación e inclusión de tejidos realizados antes de la reacción inmunohistoquímica. siempre que se tomen unas precauciones tan sencillas como el mantenimiento de los tejidos a 4°C durante la fijación y la limitación al mínimo del tiempo de fijación.

La disponibilidad de antisueros altamente específicos es condición indispensable para la fiabilidad de los resultados. Los antisueros utilizados para la localización de la AngII, el antisuero DE y el antisuero NV, no tienen reactividad cruzada con péptidos no pertenecientes a la familia de las angiotensinas, pero ambos tienen reactividad cruzada completa con la AngIII. La reactividad cruzada con la AngI es respectivamente del 4% para el antisuero NV e inferior al 1% para el antisuero DE. Ambos antisueros tienen una reactividad cruzada del 1% aproximadamente con el sustrato tetradecapeptídico de la renina (Brownfield et

al, 1982). Aunque la reacción haya sido bloqueada completamente por la preincubación de los anticuerpos con AngII sintética, no es posible establecer únicamente con la inmunohistoquímica si la inmuno-reactividad observada representa AngII/III, u otros componentes del RAS como la AngI, el angiotensinógeno u otras angiotensinas como la Ang-(1-7). Teniendo en cuenta las características de la reacción cruzada de los antisueros, se puede asumir que la inmunoreactividad observada representa sobre todo AngII y/o AngIII. La especificidad de la reacción ha sido confirmada mediante controles positivos en el riñón de rata o humano y en la eminencia mediana de rata.

Para la inmunolocalización de la renina se utilizaron un antisuero contra la renina extraída de riñón humano, (donación del Dr. Dzau), y dos antisueros contra la renina extraída de la glándula submaxilar de ratón (TAD y LAR, donación del Dr. Chris Deshepper). La especificidad de estos antisueros está demostrada por la tinción selectiva del aparato yuxtaglomerular de riñón y por la completa desaparición de la inmunoreactividad tras preabsorción de los antisueros con renina purificada. Los antisueros contra la renina de la glándula submaxilar de ratón, TAD y LAR, tienen reacción cruzada con la renina humana, tanto a nivel del aparato yuxtaglomerular como a nivel del ovario y el patrón de inmunoreactividad que se observa en tejidos humanos con los antisueros TAD y LAR es idéntico al patrón que se obtiene con el antisuero anti-renina humana. La homología estructural entre la renina de la glándula submaxilar de ratón y la renina del ovario de rata ha sido demostrada por el Dr. Chris Deshepper a nivel del RNA mensajero mediante Northern Blotting (datos no publicados). La inmunohistoquímica no nos permite establecer si la inmunoreactividad representa

renina activa o prorenina, pero la presencia de prorenina en las células ováricas tendría las mismas implicaciones que la presencia de renina activa.

### CULTIVOS CELULARES

Las células de la granulosa-luteínica obtenidas de mujeres sometidas a fertilización *in vitro* representan una fuente de tejido óptima para el estudio de la fase luteínica inicial (Polan et al, 1984). Los folículos estimulados con hMG/hCG contienen abundantes células de la granulosa luteínicas que se aspiran en el momento de la recuperación de los ovocitos y que pueden fácilmente aislarse y cultivarse. Tenemos que tener en cuenta que estas células presentan una amplia variabilidad de la potencialidad esteroideogénica. Polan y coautores observaron que las células de la granulosa obtenidas de tres pacientes con niveles de estradiol similares en el momento de la laparoscopia presentaban una diferencia de 40 veces en la actividad de la aromatasa y una diferencia de 14 veces en la producción de progesterona (Polan et al, 1984). Una posible explicación de esta discrepancia es la existencia de una variabilidad individual en la respuesta folicular a la inducción de la ovulación con hMG/hCG. Probablemente, el nivel plasmático de estradiol no refleja esta variabilidad porque los estrógenos circulantes representan la suma de la secreción de todos los folículos, mientras que las células de la granulosa aisladas para el cultivo *in vitro* provienen solo de los folículos mayores que contienen ovocitos. En este estudio la producción de estradiol por parte de las distintas pacientes ha sido análoga, mientras que en el caso de la progesterona y la testosterona se ha observado una variabilidad individual significativa.

En general, de cada folículo se aíslan  $10^4$ - $10^5$  células, de modo que, utilizando para cada paciente un pool de 6-12 folículos, se obtiene un número adecuado de células para valorar el efecto de los distintos tratamientos.

El empleo de estas células para el estudio del OVRAS nos pareció apropiado por varios motivos:

Primero, con técnicas inmunohistoquímicas habíamos demostrado previamente que estas mismas células contienen AngII y renina.

Segundo, el fluido folicular que *in vivo* circunda estas células contiene elevadas concentraciones de renina y angiotensina II, como ha sido demostrado por el grupo del Dr. Naftolin (Fernandez et al, 1985; Cullen et al, 1986; Lightman et al, 1987).

Según estos datos, las células de la granulosa-luteínica están expuestas a elevados niveles de renina y angiotensina II y probablemente son el origen de estas sustancias. Por lo tanto, la valoración del efecto de la AngII sobre la capacidad esteroidogénica de estas células *in vitro* nos permite verificar la hipótesis de que la AngII tiene un efecto autocrino-paracrino sobre los folículos ováricos en el momento de la activación máxima del OVRAS.

#### ESTUDIO DE LA MADURACIÓN OVOCITARIA Y OVULACIÓN.

Para la valoración del papel de la AngII sobre la maduración de los ovocitos y la ovulación elegimos el modelo de las ratas inmaduras estimuladas con PMSG y hCG, porque ofrece la posibilidad de establecer con alta precisión el momento exacto en que ocurren los distintos eventos fisiológicos que se están

estudiando. Teniendo en cuenta que la ovulación ocurre aproximadamente 12 horas después de la administración de hCG, para el estudio de la maduración de los ovocitos las ratas se sacrificaron 8 horas después de la administración de la hCG, momento en el que los folículos ya están maduros, pero todavía no ha ocurrido la ovulación. Por el contrario, 17-20 horas después de la administración de la hCG, es fácil estudiar y cuantificar el fenómeno de la ovulación, ya que los ovocitos son fácilmente identificables en la ampolla tubárica dilatada, reunidos en el complejo cúmulo-ocito.

#### ESTUDIO DE LA APOPTOSIS EN LA ATRESIA FOLICULAR.

El método utilizado en este estudio para aislar las células de la granulosa de ratas inmaduras, permite la obtención de una preparación de células al 95% pura (Anderson et al, 1988). De acuerdo con otros estudios (Hughes y Gorospe, 1991; Tilly et al, 1992), la presencia de la típica degradación en escalera en el DNA extraído de estas células indica la presencia de apoptosis en el ovario de rata inmadura. Aunque la localización más probable de estas células apoptóticas es en los folículos atrésicos, esta presunción necesitaba ser confirmada. Por otra parte, el método convencional de análisis del DNA no permitía establecer si otros tipos celulares, a parte las células de la granulosa, estaban implicados en el proceso de la apoptosis. El método utilizado en esta tesis para la detección *in situ* de la apoptosis, descrito inicialmente por Gavrieli y coautores (Gavrieli et al, 1992), presenta la doble ventaja de detectar la apoptosis *in situ* en los cortes histológicos sin destruir la arquitectura tisular y a nivel de las células individuales.

Para caracterizar mejor la relación entre apoptosis y atresia folicular se amplió el estudio usando varias condiciones fisiológicas e iatrogénicas. Primero, se estudiaron ratas adultas normales en distintas fases del ciclo estral, para demostrar que en condiciones perfectamente fisiológicas la apoptosis ocurre en los folículos atrésicos. Segundo se estudió el modelo de rata estimulada con PMSG, 2 y 5 días después de la estimulación. A las 48 horas de la administración de PMSG los ovarios de rata inmadura presentan una población uniforme de folículos preovulatorios. Las células de la granulosa obtenidas de estos ovarios no muestran degradación en escalera del DNA (Hughes and Gorospe, 1991), pero la técnica *in situ* nos permite detectar células apoptóticas en folículos atrésicos aislados, demostrando que este método es extremadamente sensible.

Los ovarios examinados 5 días después de la administración de PMSG representan un perfecto ejemplo de apoptosis tras deprivación hormonal: la mayoría de los folículos están atrésicos. El DNA extraído de las células de la granulosa de estos ovarios presentaba degradación en escalera del DNA (Hughes and Gorospe, 1991).

Técnicamente el método de la detección *in situ* de la apoptosis es sencillo y fácilmente reproducible. Los controles positivos, en los cuales el DNA se corta con el enzima DNasa I, evidencian que los fragmentos de DNA son uniformemente accesibles a la transferasa terminal – i.e. que el tratamiento proteolítico ha sido eficaz – y se deben incluir en todos los experimentos. Los controles negativos eliminan la posibilidad de una tinción no específica. Son particularmente importantes los controles negativos obtenidos incubando los cortes con el substrato biotinilado en ausencia del enzima, porque la biotina notoriamente puede producir tinción artefactual no específica.

**ESTUDIO DE LA APOPTOSIS EN EL CUERPO LÚTEO.**

Para el estudio de la apoptosis durante la formación y degradación del cuerpo lúteo se ha empleado el modelo de la rata superovulada por dos motivos fundamentales. Primero, nos permite establecer con precisión la edad del cuerpo lúteo. Segundo, nos proporciona cantidades relativamente grandes de células luteínicas para la obtención de DNA.

La comparación de los dos métodos utilizados ha mostrado que para el estudio de la apoptosis la elección del método de extracción del DNA es de fundamental importancia, puesto que durante la extracción puede ocurrir la degradación artefactual del DNA. El empleo de agentes desnaturizantes potentes, que previene completamente la acción de las DNasas elimina el problema de la degradación artefactual del DNA.

**ESTUDIO DE LA APOPTOSIS EN EL OVARIO POLIQUÍSTICO**

La rata tratada con DHEA se eligió como modelo de ovario poliquístico porque es bien conocido, fácilmente reproducible y permite la valoración sistemática de un gran número de ovarios con quistes en varios estadios de desarrollo ((Roy et al, 1962; Lee et al, 1991).

**DISCUSIÓN DE LOS RESULTADOS OBTENIDOS EN CADA GRUPO DE EXPERIMENTOS.****LOCALIZACIÓN INMUNOHISTOQUÍMICA DE LA RENINA Y DE LA ANGIOTENSINA EN EL OVARIO**

Estudios anteriores demostraron mediante técnicas de hibridación *in situ* y northern blotting que el ovario de rata contiene el RNA mensajero de la renina (Lightman et al, 1987). La identificación de la renina en el ovario mediante inmunohistoquímica confirma definitivamente la síntesis de renina en el ovario. La presencia en las mismas células de la renina y del principal péptido efector del RAS, la AngII, sugiere la síntesis local, intracelular de AngII. Tanto los estudios en la rata como los estudios en ovarios humanos, indican que la inmunoreactividad para la renina y la AngII en el ovario es fuertemente dependiente de las modificaciones cíclicas hormonales a las cuales está constantemente sometido el ovario. La activación del OVRAS por las gonadotropinas está demostrada por la aparición de inmunoreactividad para la renina y la AngII en las células tecales, estromales y luteínicas de ovarios de ratas inmaduras tras administración de gonadotropinas. En ausencia de estimulación gonadotropínica estos mismos ovarios prepuberales no presentan inmunoreactividad alguna. La dependencia del OVRAS de las gonadotropinas se refleja también en los cambios cíclicos observados en las ratas adultas: las células tecales y estromales se tiñen con mayor intensidad en la fase de proestro (folículos preovulatorios) y estro (fase inmediatamente post-ovulatoria), presumiblemente en respuesta al pico preovulatorio de LH. Los ovarios de ratas en estado de pseudoembarazo se tiñen intensamente en el cuerpo lúteo, lo que refleja probablemente las elevadas concentraciones de hCG.

Los ovarios humanos normales muestran modificaciones cíclicas de la expresión inmunohistoquímica de la renina y la AngII a lo largo del ciclo ovárico, que son similares a las variaciones de las concentraciones de RLA y AngII

observadas en el fluido folicular. En la fase folicular inicial los folículos primordiales y preantrales son siempre negativos. Con la formación del antro, los folículos empiezan a mostrar positividad para la renina y la angiotensina a nivel de la teca, mientras las células de la granulosa permanecen negativas. Al mismo tiempo aparecen células inmunopositivas en el estroma perifolicular. En la fase periovulatoria, presumiblemente después del pico de LH, las células de la granulosa, que comienzan el proceso de luteinización, también empiezan a manifestar intensa positividad para la renina y la AngII. Lo mismo ocurre con las células de la granulosa-luteínicas de pacientes estimuladas con gonadotropinas en el momento de la punción folicular para la recuperación de ovocitos; estas células, que han sido expuestas a altas dosis de hCG, son intensamente positivas. La capacidad de sintetizar renina y AngII persiste en las grandes y pequeñas células luteínicas, tanto en el cuerpo lúteo menstrual como en el cuerpo lúteo gravídico, bajo el efecto de la LH/hCG.

En todos estos casos, las células que muestran positividad para la renina y la AngII, son LH dependientes (teca, estroma, granulosa del folículo preovulatorio y células luteínicas). También hemos observado la positividad de las células de la granulosa de los folículos atrésicos.

El papel del OVRAS en el ovario está todavía poco claro. El gran aumento de la inmunoreactividad observado en las células de la granulosa del folículo preovulatorio, junto a la presencia de elevadas concentraciones de AngII y renina en el fluido folicular de los mismos folículos, nos hace postular un papel de la AngII en los fenómenos que conducen a la rotura del folículo (ovulación), posiblemente como mediador obligado de la LH/hCG. Nuestros estudios

funcionales, así como los de otros autores, confirman esta hipótesis. La presencia de concentraciones elevadas de AngII también en los folículos atresicos, aparentemente contradictoria, puede en realidad explicarse fácilmente por la existencia de distintos tipos de receptores para la AngII, con funciones opuestas. Los folículos atresicos contienen receptores AT2 que, entre otras acciones, promueven la apoptosis. Parece lógico postular que la AngII sea responsable de la atresia de los folículos que expresan los receptores AT2, a través de la inducción de la apoptosis. Por el contrario, el folículo dominante expresaría receptores AT1 y, a través de estos receptores, la AngII facilitaría los procesos que culminan con la ovulación.

Es probable que la AngII tenga una acción autocrina sobre las células luteínicas estimulando la secreción hormonal y la angiogénesis, aunque todavía se carezca de la demostración definitiva de este hecho *in vivo*. Las células luteínicas de rata en cultivo producen renina y la secreción de renina está en relación directa con la secreción de progesterona (Lightman et al, 1987). Los experimentos de Fernandez y colaboradores demostraron que la AngII estimula la angiogénesis en la córnea de conejo (Fernandez et al, 1985). Los vasos contienen receptores específicos para la AngII y la AngII está presente en la pared vascular (Gunhild et al, 1982; Goodfriend, 1983). Estos hechos, junto con la comprobación de la presencia de AngII en la pared de los vasos del mismo cuerpo lúteo (Figura 17) apoyan la hipótesis que la AngII participa en los procesos de neovascularización que intervienen en la formación del cuerpo lúteo. Mas adelante, en el apartado sobre apoptosis, hablaremos del posible papel de la AngII en la inducción de la apoptosis en el cuerpo lúteo.

## POSIBLE PAPEL DEL OVRAS EN LA PATOGÉNESIS DEL SÍNDROME DE OVARIOS POLIQUÍSTICOS

El síndrome de ovarios poliquísticos (SOP) incluye un grupo heterogéneo de condiciones que clínicamente se presentan con anovulación crónica e hiperandrogenismo aunque a veces son silentes (Adams et al, 1985). Generalmente, los ovarios presentan un gran número de quistes foliculares subcapsulares, una cápsula engrosada y capilares prominentes en la superficie; estos cambios son similares a los descritos originariamente por Stein y Leventhal en 1935 (Stein y Leventhal, 1935). La mayoría de las pacientes con SOP tienen elevados niveles plasmáticos de LH y un elevado cociente LH/FSH (Rebar et al, 1976). El aumento de la LH puede derivar de una sensibilidad hipofisaria al GnRH aumentada, posiblemente secundaria al hiperestrogenismo consecuente de la conversión periférica de los andrógenos ( Lobo et al, 1981), y/o de un aumento de la secreción pulsátil de GnRH (Cumming et al, 1984). Aunque se hayan hecho varios estudios para intentar determinar el patrón de la secreción pulsátil de LH en el SOP, existen todavía discrepancias entre los investigadores, probablemente consecuencia de la heterogeneidad de las pacientes estudiadas. Es tema de controversia si la anomalía primaria en el SOP está a nivel hipotálamo-hipofisario o en los tejidos periféricos, resultando en un exceso de andrógenos de origen ovárico o suprarrenal. Dado que la administración de andrógenos exógenos produce un cuadro histológico idéntico al del SOP y que eliminando el aumento de LH se observa la corrección de la alteración histológica (Cheung y Chang, 1990), es probable que más de un mecanismo sea responsable de los distintos subtipos clínicos de este síndrome. La función ovárica normal depende

de mecanismos de feedback que implican al eje hipotálamo-hipofisario y al ovario, así como a los sitios extraováricos de producción hormonal, por lo tanto es razonable postular que un error en cada uno de estos niveles pueda ser responsable de una función ovárica anormal/anovulación y así desencadene la secuencia de eventos que conducen al cuadro clínico y anatomopatológico del SOP. En esta tesis proponemos que la angiotensina II intraovárica puede tener un papel en la interrupción de la maduración folicular y en la formación de quistes en las pacientes con SOP; sin embargo, todavía queda por determinar si la disfunción primaria está relacionada con la producción de LH o con la síntesis ovárica de AngII.

En vista de que nuestros experimentos iniciales de inmunohistoquímica habían mostrado una relación clara entre el OVRAS y las células LH-dependientes y productoras de andrógenos del ovario, decidimos utilizar la misma técnica para el estudio de las pacientes con hiperandrogenismo ovárico (SOP).

Este trabajo demuestra los siguientes puntos:

- 1).- Que en los ovarios poliquísticos existe inmunoreactividad para la renina y la AngII.
- 2).- Que esta expresión de la renina y angiotensina II en los múltiples folículos, típicos de este síndrome, es constante, y no cíclica como en los ovarios normales.
- 3).- Que la inmunoreactividad en el SOP interesa tanto la granulosa como la teca.

Así, las células de la granulosa de los ovarios poliquísticos se parecen a las células de la granulosa de los folículos atrésicos en que ambas expresan de manera constante la renina y la angiotensina II, a diferencia de la granulosa de los folículos en vía de desarrollo de los ovarios normales, que solo expresan renina y angiotensina en un momento específico y fugaz: coincidiendo con el pico preovulatorio de LH. Esta observación nos sugiere que los mecanismos básicos que conducen a la interrupción de la maduración folicular en el SOP pueden ser similares a los que causan la atresia folicular. Existen otras similitudes entre folículos atrésicos y folículos quísticos del SOP que apoyan esta hipótesis:

- 1).- El cociente estrógenos/andrógenos en el fluido folicular es bajo tanto en los folículos atrésicos como en el SOP (Tanabe et al, 1983).
- 2).- Tanto la atresia folicular en los ovarios normales como la cistogénesis en el SOP ocurren a través de un proceso de apoptosis (Palumbo y Yeh, 1995).

Otro aspecto importante de los ovarios poliquísticos es la intensa tinción del estroma. Esta es similar a la que observamos en el estroma luteinizado de los ovarios con hipertecosis (Palumbo y Naftolin, observaciones no publicadas). En ambos casos, se trata de células LH dependientes y productoras de elevadas cantidades de andrógenos: la expresión de renina y AngII en estas células apoya la hipótesis de un papel patogénico del OVRAS en los síndromes ováricos hiperandrogénicos.

En síntesis, los resultados de nuestros experimentos de inmunohistoquímica indican que la síntesis ovárica de prorenina/renina y angiotensina II en los

foliculos del SOP difiere de los foliculos normales en que se pierden las modificaciones cíclicas y existe una elevada producción "tónica" de renina y angiotensina que implica simultáneamente a la granulosa y a la teca de los múltiples foliculos, así como al estroma hipertrófico. Este exceso de AngII local podría dar como resultado la estimulación autócrina/paracrina de la síntesis de andrógenos por parte de la teca y del estroma, probablemente en concierto con la LH y otros reguladores intraováricos como la insulina y las IGF (Insulin Like Growth Factors) (Burghen et al, 1980), y así modificar el programa de desarrollo de los foliculos bloqueando la maduración normal. Esta hipótesis está apoyada por nuestros experimentos *in vitro* que muestran un aumento dosis-dependiente de la secreción de progesterona y testosterona en el medio de cultivo de células de la granulosa-luteínicas humanas expuestas a AngII. Las células de la granulosa en el SOP poseen una reducida actividad aromatasa (Erickson et al, 1979), y por eso tienen una limitada capacidad de formación de estrógenos a pesar de la gran disponibilidad de precursores. Se necesitan ulteriores estudios para verificar la hipótesis de que las elevadas concentraciones de AngII puedan al menos contribuir a la reducida actividad aromatásica observada en el SOP.

Los datos presentados de inmunohistoquímica, que indican un aumento crónico de la expresión del OVRAS en los ovarios poliquísticos, son acordes con la observación de que la renina total (Jaatinen et al, 1995) y la prorenina (Morris et al, 1995) son elevadas en las mujeres con SOP.

El sistema renina-angiotensina ovárico ha sido implicado en la patogenia del síndrome de hiperestimulación ovárica, una complicación grave de la inducción de la ovulación, desencadenada por la hCG (Palumbo et al, 1999). Dado que las

pacientes con SOP presentan un aumento del riesgo del síndrome de hiperestimulación ovárica, podríamos postular que la excesiva expresión del OVRAS en estas pacientes sea uno de los factores que predisponen al desarrollo de este síndrome.

### LA ANGIOTENSINA II COMO MODULADOR DE LA ESTEROIDOGÉNESIS OVÁRICA.

La función exacta del OVRAS no ha sido todavía demostrada. Debido a que la AngII estimula la secreción de aldosterona en la corteza suprarrenal, hemos postulado un papel de la AngII en la regulación de la secreción ovárica de hormonas esteroideas. Tanto las células de la granulosa, como las células tecaes y luteínicas contienen receptores para la AngII. Pucell y colaboradores demostraron que en ovarios de rata en cultivo de tejido la AngII es capaz de estimular la secreción de estrógenos (Pucell et al, 1987). En esta tesis se ha utilizado el modelo de las células de la granulosa-luteínicas de mujeres sometidas a FIV. Estas células habían estado expuestas *in vivo* a las concentraciones elevadas (preovulatorias) de AngII que se encuentran en el fluido folicular. *In vitro*, sometimos estas células a estimulación con AngII en concentraciones en el mismo rango que las observadas *in vivo* y observamos su efecto sobre la secreción de los tres esteroides medidos: progesterona, testosterona y estradiol.

Nuestros resultados sugieren que la AngII puede modular el desarrollo folicular y la función del cuerpo lúteo a través de su efecto sobre la secreción esteroidea. La especificidad de la acción de la AngII, se confirma por el bloqueo de este efecto por parte del antagonista receptorial específico de la AngII, la

saralasinina. Además, cuando incubamos las células con la saralasinina solo, sin añadir AngII, se obtuvo también un efecto sobre la secreción esteroidea, indicando que en el folículo preovulatorio, *in vivo*, la angiotensina endógena estaba regulando la secreción esteroidea. Esta interpretación está de acuerdo con las concentraciones elevadas de AngII que existen en el fluido folicular preovulatorio y a la intensa positividad inmunohistoquímica para la AngII en la pared folicular biopsiada en el momento de la recuperación de ovocitos.

Morris y Paulson, estudiaron un modelo similar al nuestro de células de la granulosa-luteínicas estimuladas con AngII en presencia de hCG (Morris y Paulson, 1994). De acuerdo con nuestros resultados, estos autores observaron un aumento dependiente a la dosis de la progesterona, que fue bloqueado por la adición de saralasinina. Con respecto al estradiol, Morris y Paulson no observaron ninguna estimulación por parte de la AngII, pero sí un aumento en respuesta a la saralasinina, y postularon que la AngII *in vivo* pueda inhibir tónicamente la producción de estradiol. Este dato es solo aparentemente discrepante del nuestro y puede depender de diferencias en el diseño del estudio (por ejemplo, la coincubación con hCG) y en el protocolo de inducción de la ovulación (por ejemplo, la utilización o no de análogo del GnRH). En cuanto a lo que a la testosterona se refiere, estos autores no encontraron ningún efecto consistente mientras que nosotros observamos una elevación significativa en respuesta a la angiotensina II.

La modulación de la esteroidogénesis ovárica por parte de la AngII indica la presencia de receptores cuya demostración directa en humanos aún no se ha realizado. Han sido clonados dos tipos de receptores para la AngII. Según sus

propiedades farmacológicas y bioquímicas estos receptores han sido designados tipo 1 (AT1) y tipo 2 (AT2) (Inagami, 1999). Los receptores AT1 son bloqueados selectivamente por difenilimidazoles como el losartán, mientras que los receptores AT2 son bloqueados por tetrahidroimidazopiridines como el PD123177 y el PD123319 (Bumpus et al, 1991). Los datos sobre la distribución y función de estos dos tipos de receptores en los distintos compartimentos ováricos son todavía en gran parte contradictorios. Parte de esta dificultad está en las diferencias que existen entre las distintas especies. En la rata los receptores AT2 están localizados prevalentemente en la granulosa de los folículos atrésicos (Pucell et al, 1991) y los receptores AT1 son más concentrados en la teca, en el estroma y en el cuerpo lúteo (Nemeth et al, 1993). Al contrario, en el conejo los receptores AT2 se localizan en los folículos preovulatorios (Yoshimura et al, 1996). En cualquier caso, la existencia de dos tipos de receptores con funciones distintas, activados por distintas concentraciones de AngII, podría explicar algunos de los efectos diferenciales de la AngII sobre la secreción hormonal observados en nuestros experimentos. Estudios de inhibición con los fármacos que bloquean específicamente uno u otro tipo de receptor podrían aclarar este punto.

La secreción de progesterona y testosterona aumentó de manera dependiente a la dosis, en respuesta a concentraciones escalares de AngII. La saralasinina no solo bloqueó el aumento de progesterona inducido por la AngII exógena, si no que también inhibió la secreción de progesterona en las células incubadas en ausencia de AngII, lo que sugiere que en las condiciones presentes, en los folículos preovulatorios, la AngII endógena estimula la secreción de

progesterona. Al contrario, la incubación de las células con saralasin sola, resultó en un aumento de la secreción de testosterona, sugiriendo un posible efecto agonista de la saralasin.

La respuesta del estradiol a la AngII fue más compleja. El estradiol aumentó con las dosis bajas de AngII y después disminuyó hasta los niveles de los controles con las dosis mayores de AngII, a pesar de la mayor disponibilidad de sustratos (progesterona y testosterona). Este resultado sugiere un posible efecto inhibitor sobre la aromatasa ovárica por las elevadas concentraciones de AngII o de progestínicos y andrógenos inducidos por la AngII. La interpretación de este efecto bifásico de la AngII es complicada por la potente estimulación gonadotropínica a la que fueron expuestas estas células antes de su aislamiento y cultivo: la adición de saralasin, resulta en una disminución de la secreción de estradiol, indicando que las células estaban ya bajo una importante estimulación por parte de la AngII.

El estradiol tiene un papel fundamental en el desarrollo folicular y en el mantenimiento de un ambiente favorable para el ovocito. El estradiol es también el principal regulador de la secreción gonadotropínica durante la fase preovulatoria. El aumento del estradiol en respuesta a la AngII era esperado, no así este efecto bifásico. En el momento actual solo podemos hipotizar sobre la posible explicación de estos datos. Después del pico preovulatorio de estrógenos, a pesar del persistente aumento de LH, hay una caída de la secreción de estrógenos, todavía inexplicada, que, claramente, precede la ovulación y que ha sido asociada a la expansión del cúmulo/maduración del ovocito. La AngII es capaz de inducir la maduración del ovocito y esta acción podría ser mediada por

su efecto sobre el estradiol. Es posible, por lo tanto, que estos resultados expliquen algunos de los importantes cambios hormonales de la fase preovulatoria, siendo el sistema renina-angiotensina ovárico la unión entre el pico de LH y el pico bifásico de estradiol.

En conclusión, en la fase folicular tardía, justo antes de la ovulación y paralelamente al pico de LH/FSH y estradiol, ocurre un aumento importante de AngII en el fluido folicular. Este aumento de la AngII folicular en la mitad del ciclo podría tener un papel doble. En una fase inicial, el aumento de la AngII podría contribuir al aumento de estrógenos que desencadena el pico de LH. El aumento ulterior de AngII causado por el aumento de LH/FSH podría ser responsable de la caída de estradiol que ocurre durante el pico de LH, que se acompaña al final de los eventos preovulatorios. Estudios futuros aclararán estos conceptos.

#### POSIBLE PAPEL DEL OVRAS EN LA MADURACIÓN DE LOS OVOCITOS Y EN LA OVULACIÓN.

La demostración inicial de receptores para la angiotensina II en los folículos ováricos y de sus variaciones cíclicas mediante autoradiografía por parte de nuestro grupo (Lightman et al, 1988), sostenía la hipótesis de que la AngII tiene un papel funcional en el ciclo ovárico. Tanto los experimentos de inmunohistoquímica descritos, como los estudios del OVRAS en el fluido folicular, demuestran un gran aumento de los componentes del OVRAS en la fase preovulatoria, lo que nos indujo a postular un papel de la AngII en los fenómenos de la maduración del ovocito y de la ovulación.

*In vivo* e *in vitro*, hemos demostrado que la saralasinina, un potente antagonista receptorial de la AngII, es capaz de bloquear la reanudación de la meiosis inducida por hCG en una forma dependiente de la dosis, un efecto que es revertido por la AngII. Estos resultados indican que la angiotensina II tiene un papel en la maduración de los ovocitos, acordes con la presencia de receptores específicos para la AngII en los folículos preovulatorios. La concentración de estos receptores es máxima durante la fase de maduración folicular, lo que, una vez más, apoya la hipótesis de que la AngII contribuye a la maduración del ovocito.

En experimentos *in vivo* hemos observado que la saralasinina inhibe la ovulación, y que esta inhibición es revertida por la AngII, lo que apoya la hipótesis de un papel directo de la AngII en la ovulación, posiblemente como mediador de la LH. Estudios de perfusión *in vitro* en ratas (Peterson et al, 1993) y en conejas (Kuo T-D et al, 1991; Yoshimura et al, 1992) han confirmado que la AngII funciona como intermediario en el proceso de la ovulación. La AngII induce la ovulación *in vitro* en ausencia de gonadotropinas (Peterson et al, 1993; Yoshimura et al, 1992) y la adición de saralasinina reduce en manera significativa la ovulación inducida por hCG y LH (Kuo T-D et al, 1991; Yoshimura et al, 1992). Sin embargo los inhibidores del ACE *in vitro* no alteran la ovulación ni la esteroidogénesis en ovarios de rata (Peterson et al, 1993), indicando la existencia en el ovario de vías alternativas de formación de AngII y otros péptidos activos del RAS (Figura 3). Además, en experimentos *in vitro* las gonadotropinas estimulan la producción de renina y angiotensina II en ovarios de conejo (Yoshimura et al, 1994).

Estos resultados, juntos a la demostración de receptores para la AngII en los folículos preovulatorios (Lightman et al, 1988; Yoshimura et al, 1996), nos permiten postular que el OVRAS regula de forma paracrina o autocrina el proceso de la ovulación. En contraste con estos datos, un grupo de investigadores realizó un estudio autoradiográfico mostrando ausencia de receptores para la AngII en los folículos preovulatorios que poseen receptores para la LH (Daud et al, 1988). Los mismos autores, acorde con los resultados de la autoradiografía, no observaron ninguna inhibición de la ovulación por parte de la saralasin en la rata inmadura estimulada con gonadotropinas. Esta aparente discrepancia con nuestros resultados puede en parte ser debida a diferencias en el peso de los animales y/o a variaciones en la actividad biológica de la hCG utilizada para desencadenar la ovulación. Además, la ausencia de receptores para la AngII descrita por Daud y colaboradores no excluye un papel de la AngII en la ovulación, porque los folículos preovulatorios contienen niveles de AngII tan elevados que pueden causar disminución de los receptores endógenos para la AngII por mecanismo de "downregulation" y reducir enormemente la unión de la AngII radioactiva exógena en los estudios de receptores.

Steele y coautores estudiaron el papel de la AngII sobre la secreción hormonal hipofisaria en ratas adultas, utilizando inyecciones intraventriculares de saralasin y observaron que la saralasin intraventricular produce un bloqueo del pico de LH del proestro, inhibiendo secundariamente la ovulación (Steele et al, 1983). En nuestros experimentos, la saralasin tiene que haber actuado directamente en el ámbito ovárico, porque la ovulación no depende del pico endógeno de LH, sino de la administración de hCG exógena.

El mecanismo de este efecto de la AngII sobre la ovulación no está del todo claro. Experimentos preliminares en nuestro laboratorio han mostrado que la adición de AngII a folículos preovulatorios de rata en cultivo, aumenta la producción de  $\text{PGF}_{2\alpha}$  y del activador del plasminógeno, ambos implicados en el fenómeno de la ovulación. Posteriormente, otros autores han confirmado el efecto de la AngII sobre la ovulación en el conejo y han postulado que las prostaglandinas pueden mediar la acción de la AngII (Yoshimura et al, 1993).

Es importante subrayar que el fármaco utilizado en todos estos experimentos, así como para el estudio de la esteroidogénesis *in vitro*, la saralasin, es un inhibidor de ambos receptores AT1 y AT2. Posteriormente a la realización de nuestros experimentos, los receptores AT1 y AT2 han sido identificados y clonados (Inagami, 1999) y actualmente se dispone de varios inhibidores específicos de los distintos tipos de receptores. Recientemente, antagonistas específicos han sido utilizados para investigar el papel de la AngII en la ovulación (Kuji et al, 1996; Yoshimura et al, 1996). En el conejo, el bloqueo de los receptores AT2 mediante PD123319 inhibe *in vitro* la ovulación inducida por hCG o por AngII, mientras el bloqueo de los receptores AT1 mediante CV-11974 no tiene ningún efecto. En los mismos experimentos, la síntesis de prostaglandinas inducida por la hCG fue inhibida por el PD123319 y no por el CV-11974. Estos datos sugieren que la elevación de la AngII inducida por la hCG desencadena la ovulación estimulando la producción ovárica de prostaglandinas a

través de los receptores AT2. Este dato discrepa con la observación de que los receptores AT2 están asociados a atresia folicular. Una posible explicación es

que existen diferencias entre las distintas especies. Alternativamente, distintas dosis de AngII podrían explicar una acción diferente.

### LA APOPTOSIS COMO MECANISMO DE LA ATRESIA FOLICULAR

El aspecto más característico de la apoptosis es la presencia de una típica fragmentación internucleosomal del DNA que se identifica por la aparición de un patrón en escalera en la electroforesis (Schwartzman y Cidlowski, 1993). La identificación de la degradación en escalera del DNA, sin embargo, requiere grandes cantidades de DNA (15-30 µg) para un gel de agarosa y tinción con bromuro de etidio y 15 ng para geles realizados después de marcar el DNA con fósforo radioactivo u otros marcadores (Tilly et al, 1993). Además, la extracción del DNA se realiza a partir de homogenados de tejidos o de células y esto no permite la identificación de los distintos compartimentos celulares (por ejemplo, folículos antrales *versus* preantrales, sanos *versus* atrésicos) o tipos celulares (por ejemplo, granulosa *versus* teca). La ventaja de la técnica *in situ* utilizada en esta tesis es la posibilidad de identificar la apoptosis en secciones histológicas convencionales, manteniéndose la arquitectura normal del tejido y siendo, por tanto, posible identificar histológicamente las distintas clases de folículos y los distintos tipos celulares. De esta forma la apoptosis es identificada en células individuales, siendo el método muy sensible.

Demostramos que la apoptosis ocurre en los folículos atrésicos, preantrales y antrales y que implica preeminente a las células de la granulosa y también a células tecales aisladas. Este dato es compatible con el hecho de que durante el proceso de la atresia folicular las células de la granulosa se hacen

picnóticas y mueren, mientras que la mayoría de las células tecales se reincorporan en el intersticio ovárico. En los folículos antrales las células apoptóticas presentaron una tendencia a localizarse cerca del fluido folicular, pero este dato no es consistente y, como hemos visto, también hay apoptosis entre las células tecales. Esta falta de un patrón uniforme puede explicarse por el hecho de que distintos folículos se encuentran en distintas fases del proceso apoptótico y que la apoptosis es un fenómeno transitorio. En general, la valoración de secciones múltiples de cada ovario, reveló que todos los folículos atrésicos contenían al menos alguna célula apoptótica.

En conclusión, este estudio ha demostrado que en ovarios de rata la apoptosis ocurre selectivamente en los folículos atrésicos (y no en los folículos sanos en curso de desarrollo) en varios estados fisiológicos y condiciones iatrogénicas, por lo tanto, la apoptosis puede ser el mecanismo de la atresia folicular.

#### LA APOPTOSIS COMO MECANISMO DE LA FORMACIÓN Y REGRESIÓN DEL CUERPO LÚTEO

Hemos demostrado que el fenómeno de la apoptosis ocurre en el cuerpo lúteo de rata, con un curso temporal específico: tras el comienzo es máxima en el día 7, se mantiene al mismo nivel con un *plateau* hasta el día 9, y después disminuye progresivamente hasta el día 13, persistiendo durante toda la fase de regresión del cuerpo lúteo.

Es interesante observar que el pico de apoptosis coincide con el momento de máxima actividad funcional del cuerpo lúteo, que se acompaña con la máxima

producción de progesterona: esto es lógico, porque la fase de mayor actividad funcional ocurre cuando el número de células del cuerpo lúteo es máximo.

Juengel y coautores han demostrado que la apoptosis ocurre en el cuerpo lúteo bovino durante la fase de regresión, y no durante la fase lútea media (cuerpo lúteo funcional) (Juengel et al, 1993).

Hasumoto y colaboradores, estudiando la luteolisis en ovarios de ratas pseudogravidas, demostraron la expresión selectiva del receptor para la prostaglandina F2 alfa (PGF2alfa) en las células luteínicas apoptóticas (Hasumoto et al, 1997).

#### LA APOPTOSIS COMO MECANISMO DE LA CISTOGÉNESIS EN EL SÍNDROME DE OVARIOS POLIQUÍSTICOS

Como hemos visto anteriormente, la patogénesis del SOP es uno de los temas más complicados de la endocrinología de la reproducción. Entre los varios mecanismos propuestos, la apoptosis puede jugar un papel importante, por el cual varios reguladores intraováricos, como los IGF y la AngII, podrían actuar mediante una modulación de la apoptosis.

Este trabajo se centra en un modelo animal de SOP y a nivel histológico identifica, describe y caracteriza con la técnica *in situ* ya utilizada en ovarios normales, la localización de las células apoptóticas a nivel de los quistes. La reducción del número de células apoptóticas que se observa a medida que aumenta el tamaño de los quistes sugiere una relación causa-efecto. Un proceso de apoptosis acelerada causado por el hiperandrogenismo, podría ser

responsable de una atresia acelerada y formación de folículos quísticos. A medida que ocurre la muerte de las células foliculares por apoptosis, se va formando el quiste.

Los resultados de estos experimentos complementan nuestros estudios anteriores que han utilizado un modelo *in vitro* de atresia: las células de la granulosa de ratón androgenizadas. Estas células, tratadas con dehidroepiandrosterona (DHEA), muestran un aumento de apoptosis en comparación con células control no tratadas o células tratadas con FSH. La FSH, al contrario, reduce la apoptosis en las mismas células. (Palumbo y Yeh, Society for Gynecologic Investigation, 1993, abstract no 513).

El efecto protector de las gonadotropinas (FSH y LH) ha sido también demostrado por Tilly y coautores utilizando folículos intactos *in vitro* (40th Annual Meeting of The Society for Gynecological Investigation, 1993, Absl # 518). Tilly y colaboradores han estudiado el efecto de varios factores de crecimiento sobre células de la granulosa y folículos intactos de ratón en cultivo. Estos autores han demostrado que tanto en las células de la granulosa, como en los folículos intactos en cultivo aparece apoptosis espontánea. Este proceso se previene añadiendo al medio de cultivo factores de crecimiento específicos tales como el EGF (Epidermal Growth Factor), el TGF-alfa (Transforming growth Factor -alfa), y el bFGF (basic Fibroblast Growth Factor) (Tilly et al, 1992)

Estos datos sugieren que, durante el desarrollo folicular normal, las gonadotropinas, junto con los estrógenos y con varios factores de crecimiento intraováricos (IGF-I, EGF/TGF-alfa, bFGF) y citokinas (interleukina-1 beta),

activan distintas vías intracelulares para rescatar los folículos de la muerte por apoptosis (atresia). Al contrario, el TNF-alfa, el ligando Fas y los andrógenos son factores atresiogénicos. Estas señales hormonales probablemente actúan convergiendo en vías intracelulares selectivas (que incluyen genes de la familia del bcl-2 e I $\kappa$ B) para la regulación de la apoptosis.

Al contrario, se puede postular la hipótesis de que en las pacientes con ovarios poliquísticos, a causa de una alteración de la secreción de las gonadotropinas y/o de varios factores de crecimiento, y/o del hiperandrogenismo, existe una alteración del proceso de la apoptosis con la consecuente interrupción del desarrollo folicular y formación de folículos quísticos. Los resultados descritos se limitan al modelo animal. Experimentos preliminares realizados en nuestro laboratorio sugieren que también hay apoptosis en ovarios poliquísticos humanos.

Cuando realizamos una inducción de la ovulación con gonadotropinas exógenas, sea en pacientes normales, sea en pacientes con SOP, actuamos probablemente sobre los mismos mecanismos para rescatar del proceso de la apoptosis el mayor número posible de folículos. A este propósito, varios autores han demostrado la presencia de apoptosis en células de la granulosa-luteínicas de folículos de pacientes sometidas a inducción de la ovulación para fertilización in vitro (Seifer et al, 1997; Nakahara et al, 1997). Seifer y colaboradores han encontrado un aumento del porcentaje de células apoptóticas en pacientes con FSH elevado comparado con pacientes con FSH normal (Seifer et al, 1997). En el estudio de Nakahara y colaboradores la incidencia de apoptosis es mayor en las células de la granulosa de pacientes con menos de 6 ovocitos que en pacientes con más de 6 ovocitos y en pacientes no embarazadas que en pacientes embarazadas. Ambos estudios valoran en cada paciente células de la

granulosa obtenidas de varios folículos. Sería interesante estudiar si existe una relación entre la incidencia de apoptosis en las células de la granulosa y las características ovocitarias en el mismo folículo (madurez, fertilización, calidad embrionaria, etc.).

## DISCUSIÓN INTEGRADA DE LOS RESULTADOS

Hemos expuesto paralelamente los experimentos relacionados con el estudio del sistema renina angiotensina ovárico y los experimentos relacionados con la identificación de la apoptosis en el ovario. Aunque no hemos realizado ningún experimento directo para establecer una relación entre el OVRAS y la apoptosis, muchos de los datos presentados sugieren que dicha relación existe.

Demostramos que la atresia folicular ocurre mediante un proceso de apoptosis. También demostramos mediante inmunohistoquímica que las células de la granulosa de los folículos atrésicos contienen angiotensina II. Los folículos atrésicos contienen receptores para la AngII de tipo AT2 y la estimulación de los receptores AT2 causa apoptosis. Por lo tanto, es razonable postular que la AngII, actuando sobre los receptores AT2, es responsable de la atresia folicular mediante un proceso de apoptosis.

De manera análoga, si los quistes del SOP se forman mediante un proceso de apoptosis, y si los mismos quistes expresan AngII y renina de forma excesiva respecto a los folículos normales, la AngII podría ser responsable de la formación de los quistes mediante estimulación de la apoptosis. Asimismo, la apoptosis que ocurre en el cuerpo lúteo podría ser causada por la AngII sintetizada localmente. Estudios ulteriores son necesarios para clarificar estos puntos.

## **Conclusiones**

1. Hemos demostrado que el ovario de rata y humano contiene un sistema renina-angiotensina intrínseco (OVRAS), localizado en la teca, el estroma y las células luteínicas, es decir, en compartimentos ováricos dependientes de LH.
2. El OVRAS está controlado por las gonadotropinas hipofisarias y presenta modificaciones cíclicas con un pico de actividad en la fase periovulatoria.
3. En los estados de hiperandrogenismo ovárico, como el SOP, en los cuales es frecuente un aumento crónico de la LH, la expresión del OVRAS está incrementada y acíclica, localizándose no sólo en el estroma y en la teca, sino también en la granulosa de los múltiples folículos quísticos. Esto sugiere que un aumento crónico de la actividad del OVRAS puede participar en la patogénesis del SOP.
4. Los folículos atrésicos, de forma similar a los folículos quísticos del SOP, expresan angiotensina II y renina en las células de la granulosa.
5. La AngII explica varias acciones autocrinas y paracrinas en el ovario y puede regular la esteroidogénesis ovárica tanto a nivel de los folículos como a nivel del cuerpo lúteo.
6. *In vivo* e *in vitro*, la saralasinina, un potente antagonista receptorial de la AngII, es capaz de bloquear la reanudación de la meiosis inducida por hCG en una forma dependiente de la dosis. Este efecto es revertido por la AngII. Esto sugiere un papel de la AngII en los procesos que conducen a la maduración de los ovocitos.

7. La administración intraperitoneal de saralasin a ratas inmaduras inhibe la ovulación, y esta inhibición es revertida por la AngII. Este resultado sugiere un papel directo de la AngII en la ovulación, posiblemente como mediador de la LH.
8. La AngII tiene un probable papel en los procesos de neovascularización asociados al crecimiento folicular y a la formación del cuerpo lúteo.
9. La apoptosis es el mecanismo básico de la atresia folicular.
10. La apoptosis participa en los fenómenos de formación y regresión del cuerpo lúteo.
11. La apoptosis interviene en el proceso de oostogénesis en el SOP.

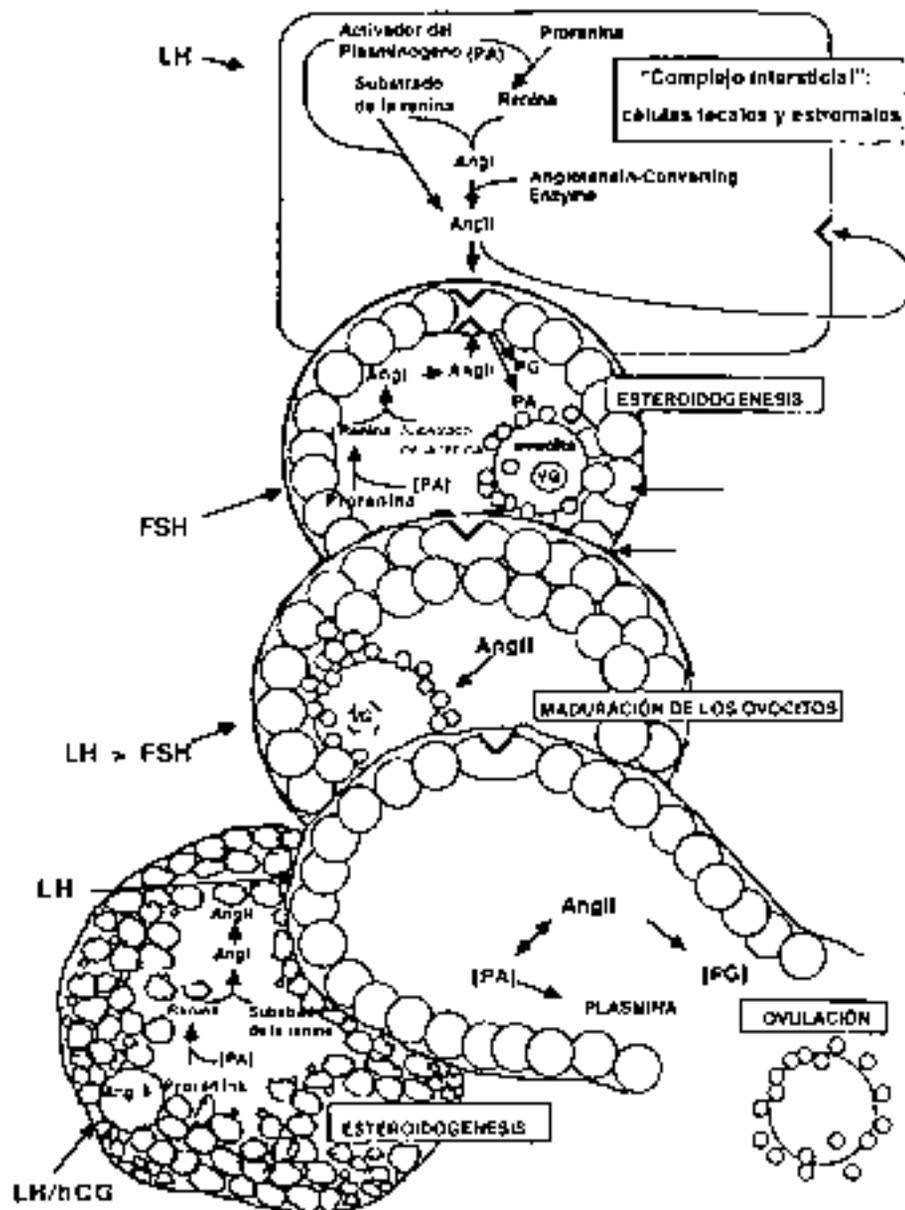


Figura 39. Posible papel del OVRAS en el ovario.

## **Bibliografia**

- Adams J, Franks S, Polson DW, Mason HD, Abdulwahid N, Tugker M, Morris DV, Price J, Jacobs H. Multifollicular ovaries: clinical and endocrine features and response to pulsatile gonadotropin releasing hormone. *Lancet* 2:1375, 1985.
- Alles AJ, Sulik KK. Retinoic acid-induced limb reduction defects: Perturbation of zones of programmed cell death as a pathogenetic mechanism. *Teratol* 40:163-171, 1989.
- Anderson E, Selig M, Lee GY, Little B. An *in vitro* study of the effects of androgens on the cytoskeleton of ovarian granulosa cells with special reference to actin. *Tissue and Cell* 20:855-874, 1988.
- Barajas L, Powers K, Carretero O, Scicli G, Inagami T. Immunocytochemical localization of renin and kallikrein in the rat renal cortex. *Kidney International* 29:965, 1986.
- Barres BA, Hart IK, Coles HSR, Burne JF, Voyvodic JT, Richardson WD and Raff MC. Cell death and control of cell survival in the oligodendrocyte lineage. *Cell* 70:31-46, 1992.
- Bissonnette RP, Echeverri F, Mahboubi A, Green DR. Apoptotic cell death induced by c-myc is inhibited by bcl-2. *Nature* 359:552-554, 1992.
- Brownfield MS, Reid IA, Ganten D, Ganong WF. Differential distribution of immunoreactive angiotensin and angiotensin-converting enzyme in the rat brain. *Neurosci* 7:1759, 1983.
- Bumpus FM, Catt KJ, Shiu AT, de Gasparo M, Goodfriend T, Husain A, Peach MJ, Taylor DG Jr, Timmermans PBMWM. Nomenclature for angiotensin II receptors: A report of the Nomenclature Committee of the Council for High Blood Pressure Research. *Hypertension* 17:720-21, 1991.
- Burghen GA, Givens JR, Kitabchi AE. Correlation of hyperandrogenism with hyperinsulinism in polycystic ovarian disease. *J Clin Endocrinol Metab* 50:113-116, 1980
- Bursch W, Liehr JG, Sirbasku DA, Putz B, Taper H, Shulte-Hermann R. Control of cell death (apoptosis) by diethylstilbestrol in an estrogen-dependent kidney tumor. *Carcinogenesis* 12:855-860, 1991.
- Buttyan R, Olsson CA, Pintar J, Chang C, Bandyk M, NG P-Y and Sawczuk IS. Induction of the TRPM-2 gene in cells undergoing programmed death. *Mol Cell Biol* 9:3473-3481, 1989.
- Campbell DJ. Circulating and tissue renin-angiotensin systems. *J Clin Invest* 79:1, 1987.

- Carsia RV, Nagele RG, Morita Y, Tilly KI, Tilly JL. Models to elucidate the regulation of adrenal cell death. *Endocr Res* 24:899-908, 1998
- Clarke AR, Purdie CA, Harrison DJ. Thymocyte apoptosis induced by p53-dependent and independent pathways. *Nature* 362:849-852, 1993.
- Clarke PGH. Developmental cell death: morphological diversity and multiple mechanisms. *Anat Embryol* 181:195-213, 1990.
- Cohen S, Taylor JM, Murakami K, Michelakis AM, Inagami T. Isolation and characterization of renin-like enzymes from mouse submaxillary glands. *Biochemistry* 11:4286-4293, 1972.
- Columbano A, Ledda-Columbano GM, Coni PP, Faa G, Liguori C, Santa Cruz G, Pani P. Occurrence of cell death (apoptosis) during the involution of liver hyperplasia. *Lab Invest* 52:670-675, 1985.
- Collins MKL, Lopez Rivas A. The control of apoptosis in mammalian cells. *TIBS* 18:307-309, 1993.
- Cullen, MD, Tarlatzis BC, Lightman A, Fernandez LA, DeCherney AH, Negro-Vilar AF, Naftolin F. Angiotensin II-like immunoreactivity in human ovarian follicular fluid. *J Clin Endocrinol Metab* 62:613, 1986.
- Cumming DC, Reid RL, Quigley ME, Rebar RW, Yen SSC. Evidence for decreased endogenous dopamine and opioid inhibitory influences on LH secretion in polycystic ovary syndrome. *Clin Endocrinol* 20:643-8, 1984.
- Cheung AP, Chang RJ. Polycystic ovary syndrome. *Clin Obstet Gynecol* 33:655-67, 1990.
- Daud AI, Bumpus FM, Husain A. Angiotensin II: Does it have a direct obligate role in ovulation? *Science* 245:870-871, 1989.
- Deschepper CF, Mellon SH, Cumin F, Baxter JD, Ganong WF. Analysis by immunocytochemistry and in situ hybridization of renin and its mRNA in kidney, testis, adrenal and pituitary of the rat. *Proc Natl Acad Sci (USA)* 83:7552-7556, 1986.
- Deschepper CF, Seidler CD, Steele MK, Ganong WF. Further studies on the localization of angiotensin II-like immunoreactivity in the anterior pituitary gland of the male rat, comparing various antisera to pituitary hormones and their specificity. *Neuroendocrinology* 40:471, 1985.
- Dimmeler S, Rippmann V, Weiland U, Haendeler J, Zeiher AM. Angiotensin II induces apoptosis of human endothelial cells. Protective effect of nitric oxide. *Circ Res* 81:970-6, 1997.
- Divo C, Hickman JA. Drug-target interactions: only the first step in the commitment to a programmed cell death? *Br J Cancer* 64:192-196, 1991.

- Dzau VJ, Gonzalez D, Ellison K, Churchill S, Emmett N. Characterization of purified rabbit uterine renin: Influence of pregnancy on uterine inactive renin. *Endocrinology* 120:358, 1987.
- Dzau VJ, Ingelfinger J, Pratt RE, Ellison KE. Identification of renin and angiotensinogen mRNA sequences in mouse and rat brains. *Hypertension* 8:544, 1986.
- Ellis RE, Yuan J, Horvitz R. Mechanisms and functions of cell death. *Ann Rev Cell Biol* 7:663-98, 1991.
- Erickson GF, Hsueh AJW, Quigley ME, Rebar RW, Yen SSC. Functional studies of aromatase activity in human granulosa cells from normal and polycystic ovaries. *J Clin Endocrinol Metab* 49:514, 1979.
- Evan GI, Wyllie AH, Gilbert CS, Littlewood TD, Land H, Brooks M, Waters CM, Penn LZ, Hancock DC. Induction of apoptosis in fibroblasts by c-myc protein. *Cell* 69:119-128, 1992.
- Fernández LA, Twickler J, Mead A. Neovascularization produced by angiotensin II. *J Lab Clin Med* 105:141-145, 1985.
- Fernández, L.A., Tarlatzis BC, Rzasa PJ, Caride VJ, Laufer N, Negro-Vilar AF, DeCherney AH, Naftolin F. Renin-like activity in ovarian follicular fluid. *Fertil. Steril.* 44:219-223, 1985.
- Ferrario CM y Iyer SN. Angiotensin-(1-7): a bioactive fragment of the renin-angiotensin system. *Regulatory Peptides* 78:13-18, 1998.
- Gallinat S, Busche S, Schutze S, Kronke M, Unger T. AT2 receptor stimulation induces generation of ceramides in PC12W cells. *FEBS Lett* 443:75-9, 1999.
- Ganten D, Minnich JL, Granger P, Hauduk K, Brecht HM, Barbeau A, Boucher R, Genest J. Angiotensin-forming enzymes in brain tissue. *Science* 173:64, 1971.
- Gavrieli Y, Sherman Y, Ben-Sasson SA. Identification of programmed cell death *in situ* via specific labeling of nuclear DNA fragmentation. *J Cell Biol* 119:493-501, 1992.
- Glorioso, N., Atlas SA, Laragh JH, Jewelewicz E, Sealey JE. Prorenin in high concentration in human ovarian follicular fluid. *Science* 233:1422, 1986.
- Gobe' GC, Axelsen RA. Genesis of renal tubular atrophy in experimental hydronephrosis in the rat: Role of apoptosis. *Lab Invest* 56:273-281, 1987.
- Goodfriend TL. Angiotensin II receptors and specific functions of angiotensin I, II and III. In: *Hypertension*. Eds. Genest J, Kuchel O, Hamet P y Cantin M, McGraw-Hill, New York 1983 (p271).

- Gunhirl S, Alexander RW, Atkinson WJ, Gimbrone MA. Functional angiotensin II receptors in cultured vascular smooth muscle cells. *J Cell Biol* 92:289, 1982.
- Haber E y Carlson W. The biochemistry of the renin-angiotensin system. In: Hypertension. Eds. Genest J, Kuchel O, Hamet P y Cantin M, McGraw-Hill, New York 1983 (p171).
- Hasumoto K, Sugimoto Y, Yamasaki A, Morimoto K, Kakizuka A, Negishi M and Ichikawa A. Association of expression of mRNA encoding the PGF2 alpha receptor with luteal cell apoptosis in ovaries of pseudopregnant mice. *J Reprod Fertil* 109: 45-51, 1997.
- Hengartner MO, Ellis RE, Horvitz HR. *Caenorhabditis elegans* gene *ced-9* protects cells from programmed cell death. *Nature* 356:494-499, 1992.
- Hirose S, Yokosawa H, Inagami T. Immunochemical identification of renin in rat brain and distinction from acid proteases. *Nature* 274:362, 1978.
- Hockenbery DM, Oltvai ZN, Yin X-M, Milliman CL, Korsmeyer SJ. Bcl-2 functions in an antioxidant pathway to prevent apoptosis. *Cell* 75:421-251, 1993.
- Hollenberg NK, Fisher ND, Price DA. Pathways for angiotensin II generation in intact human tissue: evidence from comparative pharmacological interruption of the renin system. *Hypertension* 32:387-92, 1998.
- Hopwood D, Levison DA. Atrophy and apoptosis in the cyclical human endometrium. *J Pathol* 119:159-166, 1976.
- Horuchi M, Akishita M, Dzau VJ. Molecular and cellular mechanism of angiotensin II-mediated apoptosis. *Endocr Res* 24:307-14, 1998.
- Hsu S, Raine L, Fanger H. Use of avidin-biotin-peroxidase complex (ABC) in immunoperoxidase techniques. *J Histochem Cytochem* 29:577, 1981.
- Hughes FM, Gorospe WC. Biochemical identification of apoptosis (programmed cell death) in granulosa cells: Evidence for a potential mechanism underlying follicular atresia. *Endocrinol* 129:2415-2422, 1991.
- Inagami T, Kawamura M, Naruse K, Okamu T. Localization of components of the renin-angiotensin system within the kidney. *Federation Proc* 45:1414, 1986.
- Inagami T. Molecular biology and signaling of angiotensin receptors: an overview. *J Am Soc Nephrol* 10 Suppl 11:S2-7, 1999.
- Itih N, Yonehara S, Ishii A, Yonehara M, Mizushima S-I, Sameshima M, Hase A, Seto Y, Nagata S. The polypeptide encoded by the cDNA for human cell surface antigen Fas can mediate apoptosis. *Cell* 66:233-243, 1991.

- Jaatinen T-A, Matinlauri I, Anttila L, Koskinen P, Erkkola R, Irjala K. Serum total renin is elevated in women with polycystic ovarian syndrome. *Fertil. Steril.* 63: 1000-1004, 1995.
- Johnson J, Johnson IR, Ronan JE, Craven DJ. The site of renin in the human uterus. *Histopathol* 8:273, 1984.
- Juengel JL, Garverick AH, Johnson AL, Youngquist RS, Smith MF. Apoptosis during luteal regression in cattle. *Endocrinology* 132:249-254, 1993.
- Kerr JFR, Searle J. Deletion of cells by apoptosis during castration-induced involution of the rat prostate. *Virchows Arch* 13:87-102, 1973.
- Kerr JFR, Wyllie AH and Currie AR. Apoptosis: a basic biological phenomenon with wideranging implications in tissue kinetics. *Br J Cancer* 26:239-257, 1972.
- Kerr JFR. Shrinkage necrosis: A distinct mode of cellular death. *J Pathol* 105:13-20, 1971.
- Kim, S. J., et al. Identification of renin and renin messenger RNA sequence in rat ovary and uterus. *Biochem. Biophys. Res. Com.* 142:169, 1987.
- Kobori H, Ichihara A, Miyashita Y, Hayashi M, Saruta T. Local renin-angiotensin system contributes to hyperthyroidism-induced cardiac hypertrophy. *J Endocrinol* 160:43-7, 1999.
- Kotani E, Sugimoto M, Kamata H, Fujii N, Saitoh M, Usuki S, Kubo T, Song K, Miyazaki M, Murakami K, Miyazaki H. Biological roles of angiotensin II via its type 2 receptor during rat follicle atresia. *Am J Physiol* 276(1 Pt 1):E25-33, 1999.
- Kuji N, Sueoka K, Miyazaki T, Tanaka M, Oda T, Kobayashi T, Yoshimura Y. Involvement of angiotensin II in the process of gonadotropin-induced ovulation in rabbits. *Biol Reprod* 55:984-991, 1996.
- Kuo T-D, Endo K, Dharmarajan AM, Miyazaki T, Atlas SJ, Wallach EE. Direct effect of angiotensin II on in vitro perfused rabbit ovary. *J Reprod Fertil.* 92:469-474, 1991.
- Laufer N, DeCherney AH, Haseltine FP, Polan ML, Mezer HC, Dlugi AM, Sweeney D, Nero F, Naftolin F. The use of high dose human menopausal gonadotrophin (hMG) in an in vitro fertilization program. *Fertil Steril* 40:734, 1983.
- Ledda-Columbano GM, Columbano A, Coni P, Faa G and Pani P. Cell deletion by apoptosis during regression of renal hyperplasia. *Am J Pathol* 135:657-662, 1989.
- Lee M-T, Anderson E, Lee GY. Changes in ovarian morphology and serum hormones in the rat after treatment with dehydroepiandrosterone. *The anatomical record* 231:185-192, 1991.

- Lightman A, Jones C, McLusky NJ, Palumbo A and Naftolin F.. Immunocytochemical localization of angiotensin II-immunoreactivity and demonstration of angiotensin II binding in the rat ovary. *Am J Obstet Gynecol* 159:526-530, 1988.
- Lightman, A., Deschepper CF, Mellon SH, Ganong WF, Naftolin. *In situ* hybridization identifies renin mRNA in the rat corpus luteum. *Gynecol. Endocrinol.* 1:639, 1987.
- Lightman, A., Rzasz PJ, Jones C, Del Valle A, Ait-Auane A, Caride VJ, DeCherney AH, Naftolin F The ovarian renin-angiotensin system: secretion of renin-like activity by cultured luteal cells [abstract n° 823]. In: **Proceedings of the sixty-ninth annual meeting of The Endocrine society, Indianapolis, Indiana, 1987.**
- Lightman. A, Tarlatzis BC, Rzasz PJ, Cullen, MD, Caride VJ, Negro-Vilar AF, Lennard D, DeCherney AH, Naftolin F. **The ovarian renin-angiotensin system: Renin-like activity and angiotensin II/III immunoreactivity in gonadotrophin stimulated and unstimulated human follicular fluid.** *Am J Obstet Gynecol* 156:808, 1987.
- Lin J-K and Chou C-K. *In vitro* apoptosis in the human hepatoma cell line induced by transforming growth factor - $\beta$ . *Cancer Research* 52:385-388, 1992.
- Liu Y-X et al. Tissue-specific and time-coordinated hormone regulation of plasminogen activator-inhibitor type 1 and tissue plasminogen activator in the rat ovary during gonadotrophin-induced ovulation. *European J Biochem* 195:549-555, 1991.
- Lobo RA, Granger L, Goebelsmann U, Mishell Jr DR. Elevations in unbound serum estradiol as a possible mechanism for inappropriate gonadotropin secretion in women with PCO. *J Clin Endocrinol Metab* 52:156-8, 1981.
- Lotem J and Sachs L. Hematopoietic cytokines inhibit apoptosis induced by transforming growth factor- $\beta$  and cancer chemotherapy compounds in myeloid leukemic cells. *Blood* 80:1750-1757, 1992.
- Lowe SW, Ruley HE, Jacks T, Housman DE. p53-Dependent apoptosis modulates the cytotoxicity of anticancer agents. *Cell* 74:957-967, 1993.
- Martin DP, Schmidt RE, DiStefano PS, Lowry OH, Carter JG, Johnson EM Jr. Inhibitors of protein synthesis and RNA synthesis prevent neuronal death caused by nerve growth factor deprivation. *J Cell Biol* 106:829-844, 1988.
- McCarthy NJ, Smith CA, Williams GT. Apoptosis in the development of the immune system: Growth factors, clonal selection and bcl-2. *Cancer and Metastasis Reviews* 11:157-178, 1992.

- Morris R.S. and Paulson R.J. Ovarian derived prorenin-angiotensin cascade in human reproduction. *Fertil. Steril.* 62:1105-1114, 1994.
- Morris RS, Wong IL, Hatch IE, Gentschein E, Paulson RJ, Lobo RA. Prorenin is elevated in polycystic ovary syndrome and may reflect hyperandrogenism. *Fertil Steril.* 64:1099-1103, 1995.
- Nakahara K, Saito H, Saito T, Ito M, Ohta N, Sakai N, Tezuka N, Hiroi M and Watanabe H. Incidence of apoptotic bodies in membrana granulosa of the patients participating in an in vitro fertilization program. *Fertil Steril* 67:302-307, 1997.
- Naruse K, Murakoshi M, Yoshiyuki O, Naruse M, Toma H, Watanabe K, Demura H, Inagami T., Shizume K. Immunohistological evidence for renin in human endocrine tissues. *J Clin Endocrinol Metab* 61:172, 1985.
- Naruse K, Takii Y, Inagami T. Immunohistochemical localization of renin in luteinizing hormone-producing cells of rat pituitary. *Proc Natl Acad Sci (USA)* 78:7579, 1981.
- Nemeth G, Naftolin F, Pepparell JR. The type 1 angiotensin II receptor mediates intracellular calcium mobilization in rat luteal cells. *Endocrinology* 133:1678-1684, 1993.
- Oates PS, Morgan RGH and Light AM. Cell death (apoptosis) during pancreatic involution after raw soya flour feeding in the rat. *Am J Physiol* 250:G9-G14, 1986.
- Oberhammer F, Bursch W, Parzefall W, Breit P, Erber E, Stadler M, Shulte-Hermann R. Effect of transforming growth factor- $\beta$  on cell death of cultured rat hepatocytes. *Cancer Res* 51:2478-2485, 1991.
- Ohkubo, H. et al. Tissue distribution of rat angiotensinogen mRNA and structural analysis of its heterogeneity. *J. Biol. Chem.* 261:319, 1986.
- Palumbo A, Montes de Oca, MJG, Garcia LH, Martin Casañas FR, Naftolin F. The ovarian renin-angiotensin system (OVRAS): a possible role in the pathogenesis of the ovarian hyperstimulation syndrome. *Serono Fertility Series* 4:17-29, 1999.
- Palumbo A, Yeh J. Apoptosis as a basic mechanism in the ovarian cycle: follicular atresia and luteal regression. *J Soc Gynecol Invest* 2:565-73, 1995.
- Pandey KN, Melner NH, Parmentier M, Inagami T. Demonstration of renin activity in purified rat Leydig cells: evidence for the existence of an endogenous inactive (latent) form of the enzyme. *Endocrinology* 115: 1753, 1984.

- **Panthier JJ, Foote S, Chambrud B, Strossberg AD, Corvol P, Rougeon F.** Complete sequence and maturation of the submaxillary gland renin precursor. *Nature* 298:90, 1982.
- **Parmentier M, Inagami T, Pochet R, Desclin JC.** Pituitary-dependent renin-like immunoreactivity in the rat testis. *Endocrinology* 112:1318, 1983.
- **Peitsch MC, Polzar B, Stephan H, Crompton T, Robson MacDonald H, Mannherz HG, and J Tschopp.** Characterization of the endogenous deoxyribonuclease involved in nuclear DNA degradation during apoptosis (programmed cell death). *EMBO J* 12:371-377, 1993.
- **Pellicer A, Palumbo A, DeCherney AH and Naftolin F.** Blockade of ovulation by an angiotensin antagonist. *Science* 240:1660-1661, 1988.
- **Pepperell JR, Yamada Y, Nemeth G, Palumbo A, Naftolin F.** The ovarian renin-angiotensin system. A paracrine-intracrine regulator of ovarian function. *Adv Exp Med Biol* 377: 379-389, 1995.
- **Peterson CM, Morioka N, Zhu C, Ryan JW, LeMaire WJ.** Angiotensin converting enzyme inhibitors have no effect on ovulation and ovarian steroidogenesis in the perfused rat ovary. *Reprod Toxicol* 7:131-135, 1993.
- **Peterson CM, Zhu C, Mukaida T, Butler TA, Woessner JF Jr, LeMaire WJ.** The angiotensin II antagonist, saralasin, inhibits ovulation in the perfused rat ovary. *Am J Obstet Gynecol* 168:242-245, 1993.
- **Poisner AM, Wood GW, Poisner R, Inagami T.** Localization of renin in trophoblasts in human chorion laeve at term pregnancy. *Endocrinology* 109:1150, 1981.
- **Polan ML, Laufer N, Dlugi AM, Tarlatzis BC, Haseltine FP, DeCherney AH, Behrman HR.** Human chorionic gonadotrophin and prolactin modulation of early luteal function and luteinizing hormone receptor-binding activity in cultured human granulosa-luteal cells. *J Clin Endocrinol Metab* 59:773, 1984.
- **Polan ML, Laufer N, Ohkawa R, Botero-Ruiz W, Haseltine FP, DeCherney AH, Behrman HR.** The association between granulosa cell aromatase activity and oocyte-corona-cumulus-complex maturity from individual human follicles. *J Clin Endocrinol Metab* 59:170, 1984.
- **Potten CS.** The significance of spontaneous and induced apoptosis in the gastrointestinal tract of mice. *Cancer and Metastasis Reviews* 11:179-195, 1992.
- **Pucell AG, Bumpus FM, Husain A.** Rat ovarian angiotensin II receptors. Characterization and coupling to estrogen secretion. *J. Biol. Chem.* 262:7076-80, 1987.

- Pucell AG, Hodges JC, Sen I, Bumpus FM, Husain A. Biochemical properties of the ovarian granulosa cell type 2-angiotensin II receptor. *Endocrinology* 128:1947-1959, 1991.
- Re RN, Fallon JT, DzauVJ, Quay S, Haber E. Renin synthesis by canine aortic smooth muscle cells in culture. *Life Sci* 30:99, 1982.
- Rebar R, Judd HL, Yen SSC, Rakoff J, Vandenberg G, Naftolin F. Characterization of the inappropriate gonadotropin secretion in polycystic ovary syndrome. *J Clin Invest* 57:1320-29, 1976.
- Robertson A.L and Khairallah P A. Effects of angiotensin II and some analogues on vascular permeability in the rabbit. *Circ, Res.*, 31:923-931, 1972.
- Roy S, Mahesh VB, Greenblatt RB. Effect of dehydroepiandrosterone and delta  $\Delta$ 4-androstenedione on the reproductive organs of female rats: production of cystic changes in the ovary. *Nature*, 196:2-5, 1962.
- Schmid DS, Tite JP and Ruddle NH. DNA fragmentation: Manifestation of target cell destruction mediated by cytotoxic T-cell lines, lympholoxin-secreting helper T-cell clones and cell-free lymphotoxin-containing supernatant. *Proc Natl Acad Sci USA* 83:1881-1885, 1986.
- Schwall RH, Robbins K, Jardieu P, Chang L, Lai C, Terrell TG. Activin induces cell death in hepatocytes in vivo and in vitro. *Hepatology* 18:347-356, 1993.
- Schwartzman RA, Cidlowski JA. Apoptosis: The biochemistry and molecular biology of programmed cell death. *End Rev* 14:133-151, 1993.
- Sealey JE, Atlas SA. Inactive renin: speculations concerning its secretion and activation. *Journal of Hypertension* 2 (suppl 1):115-123, 1984.
- Sealey JE, White RP, Laragh JH, Rubin AL. Plasma prorenin and renin in anephric subjects. *Circ Res* 41 (suppl 2):17, 1977.
- Seifer DB, Gardiner AC, Ferreira KA and Peluso JJ. Apoptosis as a function of ovarian reserve in women undergoing in vitro fertilization. *Fertil Steril* 66:593-598, 1996.
- Smeyne RJ, Vendrell M, Hayward M, Baker SJ, Miao GG, Schilling K, Robertson LM, Currans T, Morgan JI. Continuous c-fos expression precedes programmed cell death in vivo. *Nature* 363:166-169, 1993.
- Steele MK, Gallo RV, Ganong WF. A possible role for the brain renin-angiotensin system in the regulation of LH secretion. *Am J Physiol* 14:R805, 1983.
- Stein IF, Leventhal ML. Amenorrhea associated with bilateral polycystic ovaries. *Am J Obstet Gynecol* 29:181-191, 1935.

- Strange R, Li F, Saurer S, Burkhardt A, Friis RR. Apoptotic cell death and tissue remodeling during mouse mammary gland involution. *Development* 115:49-58, 1992.
- Swales JD. Arterial wall or plasma renin in hypertension? *Clinical Science* 56:293, 1979.
- Symonds EM, Stantey MA, Skinner SL. Production of renin by *in vitro* cultures of human chorion and uterine muscle. *Nature (London)* 217:1152, 1968.
- Tanabe K, Gagliano P, Channing CP et al. Levels of inhibin-F activity and steroids in human follicular fluid from normal women and women with polycystic ovarian disease. *J Clin Endocrinol Metab* 57:24-31, 1983.
- Tanaka M, Ohnishi J, Ozawa Y, Sugimoto M, Usuki S, Naruse M, Murakami K, Miyazaki H. Characterization of angiotensin II receptor type 2 during differentiation and apoptosis of rat ovarian cultured granulosa cells. *Biochem Biophys Res Commun* 207:593-8, 1995.
- Tang SS, et al. Tissue plasminogen activator activates the renin-angiotensin system. *Hypertension* 10:355, 1987.
- Tartaglia LA, Ayres TM, Wong GHW, Goeddel DV. A novel domain within the 55kd TNF receptor signals cell death. *Cell* 74:845-853, 1993.
- Taugner E, Hackental E. Angiotensin II in epitheloid (renin containing) cells of rat kidney. *Histochem* 72:449, 1981.
- Tenniswood MP, Guenette RS, Lakins J, Mooibroek M, Wong P, Welsh J-E. Active cell death in hormone-dependent tissues. *Cancer and Metastasis Reviews* 11:197-220, 1992.
- Tilly JL, Billig H, Kowalski KI, Hsueh AJW. Epidermal growth factor and basic fibroblast growth factor suppress the spontaneous onset of apoptosis in cultured rat ovarian granulosa cells and follicles by a tyrosine kinase-dependent mechanism. *Mol. Endocrinol.* 6:1642-1950, 1992.
- Tilly JL, Hsueh AJW. Microscale autoradiographic method for the qualitative and quantitative analysis of apoptotic DNA fragmentation. *J Cell Physiol* 154:519-526, 1993.
- Tilly JL, Kowalski KI, Johnson AL and Hsueh AJW. Involvement of apoptosis in ovarian follicular atresia and postovulatory regression. *Endocrinol* 129:2799-2801, 1991.
- Uckun FM, Tuel-Ahlgren L, Song CW, Waddick K, Myers DE, Kirihara J, Ledbetter JA, Schieven G. Ionizing radiation stimulates unidentified tyrosine-specific protein kinase in human B-lymphocyte precursors, triggering apoptosis and clonogenic cell death. *Proc Natl Acad Sci USA* 89:9005-9009, 1992.

- Van Sande ME, Sharpe SL, Neels HM, Van Camp KO. Distribution of angiotensin converting enzyme in human tissues. *Clin Chim Acta* 147:255, 1985.
- Wadhwa R, Kaul SC, Sugimoto Y, Mitsui Y. Induction of cellular senescence by trasfection of cytosolic mortalin cDNA in NIH 3T3 Cells. *J Biol Chem* 268:22239-22242, 1993.
- Ward CW, Castoff A, Mahesh VB. The induction of polycystic ovaries in cycling rats by the administration of dehydroepiandrosterone (DHEA). *Biol Reprod* 18:614-623, 1978.
- Warren AY, Graven DJ, Symonds EM. Production of active renin by cultured explants from the human female genital tract. *Br J Obstet Gynaecol* 89:628, 1982.
- Watanabe-Fukunaga R, Brannan CI, Copeland NG, Jenkins NA, and Nagata S. Lymphoproliferation disorder in mice explained by defects in Fas antigen that mediates apoptosis. *Nature* 356:314-317, 1992.
- Watanabe-Fukunaga R, Brannan CI, Itoh N, Yonehara S, Copeland NG, Jenkins NA, and Nagata S. The cDNA structure, expression, and chromosomal assignment of the mouse Fas antigen. *J Immunol* 148:1274-1279, 1992.
- Williams GT, Smith CA, Spooncer E, Dexter TM, Taylor DR. Haemopoietic colony stimulating factors promote cell survival by suppressing apoptosis. *Nature* 343:76-79, 1990.
- Williams GT, Smith CA. Molecular regulation of apoptosis: Genetic controls on cell death. *Cell* 74:777-779, 1993.
- Wyllie AH, Kerr JFR, Macaskill IAM, Currie AR. Adrenocortical cell deletion: The role of ACTH. *J Pathol* 111:85, 1973.
- Wyllie AH. Apoptosis and the regulation of cell numbers in normal and neoplastic tissues: an overview. *Cancer and Metastasis Reviews* 11:95-103, 1992.
- Wyllie AH. Glucocorticoid-induced thymocyte apoptosis is associated with endogenous endonuclease activation. *Nature* 284:555-556, 1980.
- Yamada T, Honuchi M, Dzau VJ. AngII type 2 receptor mediates programmed cell death. *Proc Natl Acad Sci USA* 93:156-160, 1996.
- Yanagihara K, Tsumuraya M. Transforming growth factor- $\beta$  induces apoptotic cell death in cultured human gastric carcinoma cells. *Cancer Res* 52:4042-4045, 1992.
- Yeh J, Lee GY, Anderson E. Presence of transforming growth factor-alpha messenger ribonucleic acid (mRNA) and absence of epidermal growth factor

mRNA in rat ovarian granulosa cells, and the effects of these factors on steroidogenesis *in vitro*. Biol Reprod 48:1071-1081, 1993.

- Yoshimura Y, Karube M, Aoki H, Oda T, Koyama N, Nagai A, Akimoto Y, Hirano H, Nakamura Y. Locally produced angiotensin II induces ovulation by stimulating prostaglandin production in *in vitro* perfused rabbit ovaries. Endocrinology 133:1609-1615,1993.
- Yoshimura Y, Karube M, Koyama N, Shiokawa S, Nanno T, Nakamura Y. Angiotensin II directly induces follicle rupture and oocyte maturation in the rabbit. FEBS Lett 307:305-308, 1992.
- Yoshimura Y, Karube M, Oda T, Koyama N, Shiokawa S, Akiba M, Yoshinaga A, Nakamura Y. Angiotensin II induces ovulation and oocyte maturation in rabbit ovaries via the AT2 receptor subtype. Endocrinology 137:1204-1211, 1996.
- Yoshimura Y, Koyama N, Karube M, Oda T, Akiba M, Yoshinaga A, Shiokawa S, Jinno M, Nakamura Y. Gonadotropin stimulates ovarian renin-angiotensin system in the rabbit. J Clin Invest 93:180-187, 1994.