

## **FASCÍCULO XII**

### **Función Reproductiva Femenina: Bases Fisiológicas. Fisiopatología y su Diagnóstico**

#### **Regulación del crecimiento y diferenciación del ovario**

*Marta Tesone, Griselda Irueta (IBYME, CONICET)*

#### **Regulación autocrina y paracrina del ovario**

*Marta Tesone, Dalhia Abramovich, Fernanda Parborell (IBYME, CONICET)*

#### **Regulación de la función ovárica: inhibina-activina**

*Stella Campo (CEDIE, CONICET)*

#### **Ciclo menstrual normal. Síndrome de ovario poliquístico e hirsutismo**

*Susana Haydée Belli (División Endocrinología, Hospital Carlos Durand)*

#### **Fisiopatología de las alteraciones del ciclo menstrual**

*Carlos Allami (Grupo de Reproducción Humana, Hospital Carlos Durand, UBA)*

### Regulación autocrina y paracrina del ovario

---

*Marta Tesone, Dalhia Abramovich, Fernanda Parborell*

#### Selección del folículo dominante

El reclutamiento cíclico y selección de los folículos representa un proceso continuo, que eventualmente llega a la formación de uno o más folículos preovulatorios, cuyo número varía en cada especie. En los primeros días del ciclo menstrual en la mujer, aumentan los niveles circulantes de FSH, como consecuencia, una cohorte de folículos antrales escapa de la apoptosis que los llevaría a la atresia folicular. Dentro de este grupo, alrededor de 10 folículos antrales crecen más rápido y producen altos niveles de estrógenos e inhibina, seleccionándose entre éstos el folículo dominante. A pesar de que no se conoce exactamente por qué un folículo emerge como dominante, se postula que éste posee una mayor sensibilidad a FSH, debido a una mayor expresión de receptores de FSH y/o LH. Asociado a este proceso, el estradiol y los factores de crecimiento locales ejercen un efecto permisivo, amplificando la acción de la FSH en los folículos que están madurando.

Sin embargo, el aumento de estradiol e inhibina, también ejerce una retroalimentación negativa sobre la liberación de FSH a nivel hipotálamo-hipófisis, lo cual evita que otros folículos sigan desarrollándose [1;2]. Además, la disminución de FSH provocaría un descenso en la actividad de la aromatasas dependiente de FSH lo que limita, como consecuencia, la disponibilidad de estrógenos en los folículos menos maduros.

Esto llevaría a una disminución en la proliferación de las células de la granulosa y un aumento en los andrógenos, provocando una atresia irreversible. El folículo dominante debe retener una sensibilidad única a la FSH y de esa manera aumentar la proliferación de sus células granulosas, logrando así tener una mayor cantidad de receptores para esta gonadotropina.

De esta manera, los folículos seleccionados tendrán un aumento en los estrógenos mayor que los folículos restantes. Además, estos folículos seleccionados tendrán un incremento en células de la granulosa y una mayor vasculatura tecal, permitiendo una entrada preferencial de la FSH. Por lo tanto, los folículos dominantes no sólo tienen la ventaja de tener mayor número de receptores para FSH, sino que además poseen una gran vasculatura que permite un fácil acceso para esta hormona.

En la rata, bajo el estímulo con FSH y en presencia de estrógenos, las células expresan receptores para LH y prolactina, los cuales van aumentando hasta llegar a valores máximos antes de la ovulación [3;4]. El aumento en los estrógenos provoca, por un mecanismo de retroalimentación positiva, la estimulación del pico preovulatorio de LH. Estos procesos, actuando en forma sincronizada, permitirían la selección de los folículos dominantes hasta llegar a la ovulación [1].

Por otro lado, se ha postulado que el folículo dominante produce factores atrésicos que inhiben el desarrollo de los folículos vecinos o subordinados [1;5].

## Función reproductiva femenina

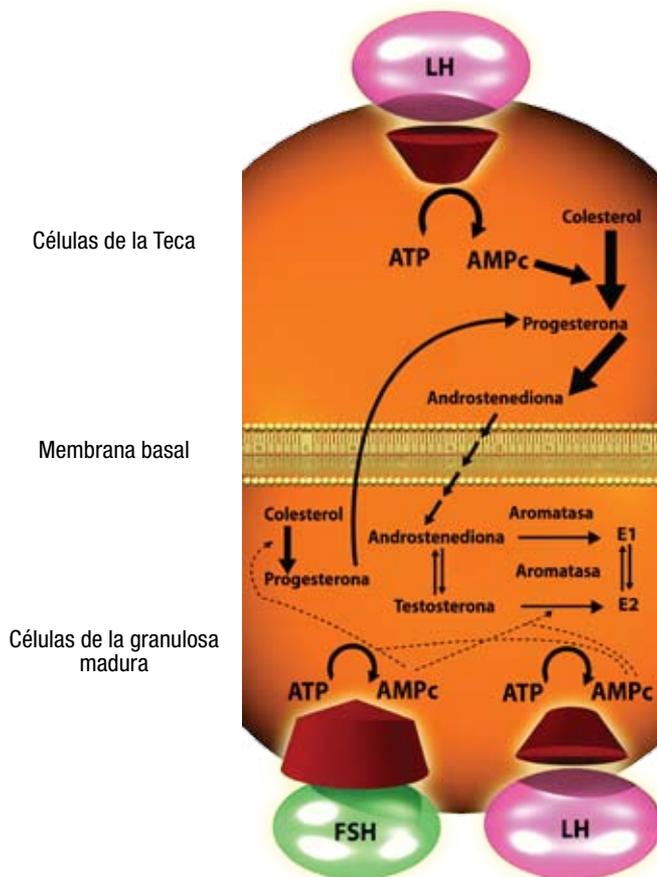
### **Rol de los esteroides. Teoría dos células- dos gonadotrofinas**

El microambiente dado por el antro permite el acceso de hormonas, como FSH y LH, hasta sus receptores celulares, permitiendo una amplificación de señales paracrinas o autocrinas. Por lo tanto, en el ovario, folículos contiguos pueden estar en diferentes estadios de crecimiento, pero todas las células de un folículo determinado están inmersas en el mismo ambiente. Como se mencionó, la presencia de estrógenos y FSH en el fluido antral es esencial para la proliferación de las células de la granulosa y para el crecimiento folicular continuo [6]. Los folículos antrales, que tienen mayor proliferación celular, poseen altas concentraciones de estrógenos y menor relación andrógenos/estrógenos, por lo que la probabilidad de mantener un ovocito viable es mayor. El ambiente androgénico, en cambio, promueve la degeneración del ovocito [7].

La síntesis de hormonas esteroideas parece estar compartimentalizada dentro del folículo. Si bien en humanos cada compartimento retiene la capacidad de producir andrógenos, estrógenos y progestágenos, la actividad de la aromatasa de las células de la granulosa excede en gran medida a la observada en las células tecales [6;8], carentes de receptores para FSH. Entonces, las células de la granulosa muestran una producción preferencial de estrógenos, mientras que la síntesis de andrógenos predomina en las células tecales [9]. La biosíntesis diferencial de esteroides, dada por ambos tipos de células, dio origen a la hipótesis “dos células, dos gonadotrofinas” [10] (Figura 1). La LH estimula la síntesis de andrógenos a partir del colesterol en las células tecales. Los andrógenos difunden a través de la lámina basal a través de una red de capilares y se convierten en estrógenos en función de la enzima aromatasa, inducida por FSH en las células de la granulosa [11]. Además, la progesterona liberada por las células de la granulosa en respuesta a las gonadotrofinas, puede difundir hacia las células tecales convirtiéndose en sustrato para la síntesis de andrógenos. Aunque la actividad de la aromatasa es principalmente estimulada por FSH, estudios “in vitro” en células de la granulosa provenientes de ratas inyectadas con FSH mostraron que LH también estimula directamente la producción de estrógenos (Figura 1).

## Bases fisiológicas - fisiopatológicas y su diagnóstico

Figura 1. Esquema que describe la hipótesis de dos células-dos gonadotrofinas.  
(Modificado de Fortune y Armstrong, 1977) [10].



### Reguladores intraováricos

Aunque el rol de las gonadotrofinas y de los esteroides gonadales es indiscutible en la foliculogénesis ovárica, los diferentes destinos de los folículos sugieren la existencia de sistemas moduladores intraováricos. Entre los reguladores intraováricos potenciales que han sido estudiados, se encuentran los factores de crecimiento, citoquinas y neuropéptidos. Estos agentes no ejercen su acción a nivel endocrino tradicional sino que actuarían como reguladores intraováricos putativos que participan en la modulación “in situ” del crecimiento y en la función de los compartimentos celulares ováricos. Por ejemplo, los moduladores de las células de la granulosa pueden regular el funcionamiento de las células tecales y así coordinar el desarrollo folicular.

## Función reproductiva femenina

### Sistema EGF/TGF- $\alpha$

El EGF (factor de crecimiento epidérmico) maduro comprende una cadena polipeptídica única de 53 aminoácidos que presenta tres uniones disulfuro internas. El EGF es capaz de inducir una gran variedad de respuestas celulares y fisiológicas [12;13]. En cultivos de células, estimula la proliferación de diferentes tipos celulares como epidermales, fibroblastos, cristalino, gliales y del endotelio vascular. El receptor para este factor es una glicoproteína intrínseca de membrana, monomérica, que une EGF con alta afinidad y especificidad. La unión de EGF con su receptor induce su autofosforilación, así como la fosforilación de otros sustratos celulares, siendo el sitio de autofosforilación una tirosina. Trabajos realizados con genisteína, un inhibidor de la actividad de la tirosin quinasa, demostraron el bloqueo de la supresión por EGF de la apoptosis en células de la granulosa de folículos ováricos. [14].

El TGF- $\alpha$  (factor de crecimiento transformante  $\alpha$ ) es un análogo estructural del EGF y está formado por 50 aminoácidos. Es capaz de unirse a un receptor común de EGF/TGF- $\alpha$  [15]. El TGF- $\alpha$  fue aislado, por primera vez, de sobrenadantes de cultivos de células tumorales pero luego se vio que también se expresaba en hipófisis, cerebro, ovario y en macrófagos. Además, el receptor está presente en células de la teca, células de la granulosa y cuerpo lúteo [16]. Los niveles del ARN mensajero (ARNm) de EGF y TGF- $\alpha$  son regulados "in vivo" positivamente por estimulación con FSH [17;18]. Aunque estudios inmunohistoquímicos localizan al TGF- $\alpha$  en las células tecales de los folículos, tanto en rata [18] como en bovino [19], se ha detectado la presencia de receptores de alta afinidad para EGF/TGF- $\alpha$  en células de la granulosa de folículos ováricos de rata [14]. Es posible que la apoptosis de las células de la granulosa de folículos seleccionados para ovular sea impedida por acciones paracrinas de EGF/TGF- $\alpha$  secretados por las células tecales intersticiales o por acciones autocrinas de FGF- $\beta$  (factor de crecimiento fibroblástico) sintetizado por las células de la granulosa [14].

### Familia de factores de crecimiento similares a insulina

El IGF-I es un polipéptido de 70 aminoácidos que es ubicuo porque tiene diversas funciones en distintos tejidos. El IGF-II es un polipéptido de 67 aminoácidos con un 62% de homología con el IGF-I. El IGF-II se expresa en tejidos fetales y adultos. En el ovario de rata, el ARNm de IGF-I se localiza en las células de la granulosa de folículos en desarrollo [20]. Estas células poseen receptores para IGF-I, los cuales unen IGF-I con alta afinidad en comparación con IGF-II o insulina [21]. El IGF-I actúa en forma sinérgica con las gonadotropinas en la estimulación de la producción de estradiol y progesterona, así como en la síntesis de receptores para LH/hCG [21]. Estos resultados indicarían un papel importante del IGF-I en la selección de los folículos preovulatorios mediante la amplificación de la acción de las gonadotropinas. El IGF-II se localiza tanto en folículos antrales como en folículos dominantes [22;23] y actúa en forma autocrina en las células de la teca y en forma paracrina en las células de la granulosa de folículos antrales tempranos; mientras que en los folículos dominantes, el IGF-II es un agente paracrino. Estas observaciones llevarían a pensar que los IGF participarían en las comunicaciones intercompartimentales favoreciendo el desarrollo folicular.

La acción hormonal de los IGF está modulada por proteínas de bajo peso molecular que se unen

en forma específica a estos factores. Existen 6 proteínas (IGFBP, IGF binding proteins) que regulan los efectos de los IGF sobre el ovario por medio de la unión a proteínas o por efecto directo sobre la esteroidogénesis. La regulación de la expresión de las IGFBP que unen IGF depende de FSH y de cada IGF [24]. En células de la granulosa de rata, se ha descrito IGFBP-4 y -5, y el tratamiento con FSH disminuye la secreción de estas proteínas [21]. El análisis "in situ" demostró la presencia de IGFBPs en folículos atrésicos pero no en los sanos [25]. También, Chun y col. [26] demostraron que el tratamiento con IGF-I, o bien con FSH y hCG, inhibían la apoptosis espontánea en el folículo preovulatorio de rata. Estos resultados sugieren que IGF-I actuaría como un factor de supervivencia en las células foliculares.

### Familia de factores de crecimiento transformantes

La superfamilia TGF- $\beta$  comprende un grupo de proteínas con al menos 35 miembros en vertebrados. Estas proteínas son ubicuas y están involucradas en numerosos procesos fisiológicos. En el ovario, están implicadas en la comunicación bi-direccional entre las células de la granulosa y las células tecales así como entre las células de la granulosa y el ovocito (Figura 2). Los miembros de esta superfamilia han sido clasificados a su vez en diferentes subfamilias de acuerdo a sus características estructurales. Entre éstas se encuentran la subfamilias de TGF- $\beta$  la denominada BMP (bone morphogenetic protein), la subfamilia de factores de crecimiento y diferenciación (GDF), la subfamilia de inhibinas y activinas, la subfamilia de factores neurotróficos derivados de células gliales (GDNF), así como otros tal como la hormona anti Mulleriana (AMH).

### TGF- $\beta$

La subfamilia de los factores de crecimiento transformadores (TGF- $\beta$ ) está conformada por polipéptidos de 25 kDa constituidos a su vez por dos cadenas homodiméricas. Se han identificado tres isoformas (TGF- $\beta$ 1, TGF- $\beta$ 2 y TGF- $\beta$ 3). Además, el TGF- $\beta$  se une a receptores de tipo 1 y tipo II.

El TGF- $\beta$  es sintetizado como una forma latente inactiva que no se une a su receptor y la principal regulación está dada por la conversión enzimática a su forma activa [27].

Estos factores ejercen acciones regulatorias sobre una variedad de tejidos. Entre las funciones de la familia de TGF $\beta$ , se pueden mencionar: 1) la respuesta antiproliferativa que involucra el control de la expresión del gen myc, 2) la estimulación de la quimiotaxis de los fibroblastos y de otros tipos celulares; 3) la estimulación de la reparación tisular y la formación de hueso y 4) el incremento en la sobrevivencia de las neuronas. En el ovario, actúan en forma sinérgica con las gonadotropinas en el control de la diferenciación de las células foliculares. Se ha demostrado la presencia de ARNm de TGF- $\beta$ 1 y TGF- $\beta$ 2 en ovocitos, células de la granulosa y de la teca [28-30]. El TGF- $\beta$ 1 altera la proliferación y la diferenciación de las células de la granulosa en ratas [31;32].

# Función reproductiva femenina

## Inhibina

La inhibina es una glicoproteína de 32 kDa formada por dos subunidades llamadas  $\alpha$  (18kDa) y  $\beta$  (12 kDa), ligadas por uniones disulfuro. La inhibina es un heterodímero constituido por una subunidad  $\alpha$  común pero con diferentes subunidades  $\beta$ , conocidas como  $\beta A$  y  $\beta B$ , respectivamente. Las formas de  $\alpha\beta A$  y  $\alpha\beta B$  se llaman A y B respectivamente. La mayor parte de la inhibina es sintetizada por las gónadas. En el ovario, la fuente de inhibina son las células de la granulosa. Su función es inhibir la síntesis de FSH en la hipófisis. La síntesis de las isoformas parece estar regulada de forma distinta durante la fase folicular y luteínica.

La inhibina B es secretada durante la fase folicular temprana y luego decrece. Los niveles de inhibina A son bajos en la fase folicular pero aumentan en la fase luteínica. [33] (Ver Capítulo de Inhibinas de este Fascículo).

## Activina

Está compuesta por dímeros de la subunidad  $\beta$  de la inhibina ( $\beta A\beta B$ ,  $\beta A\beta A$  o  $\beta B\beta B$ ). A diferencia de la inhibina, es posible que la activina no desempeñe un rol endocrino en el eje hipófiso-gonadal dado que en los seres humanos la mayor cantidad de activina sérica se encuentra unida a proteínas (folistatina principalmente). Durante el ciclo menstrual se observan menos variaciones de la activina A que de la inhibina [34]. Se detectaron niveles altos en la mitad del ciclo y al final de la fase lútea. Además, los niveles séricos de activina son altos durante el embarazo. La activina derivada de células de la granulosa estimula la expresión de receptores de LH en dichas células e inhibe la síntesis de andrógenos inducida por LH en células teca. Por último, las activinas poseen un rol importante en el desarrollo del ovocito y se ha descrito que las células del cúmulus expresan subunidades de inhibina/activina ( $\alpha$ ,  $\beta A$ ,  $\beta B$ ) y de folistatina [35].

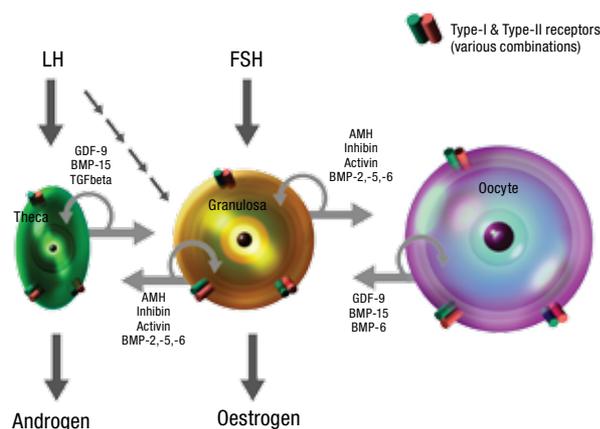


Figura 2: Los miembros de la superfamilia TGF- $\beta$  se encuentran entre los principales ligandos extracelulares involucrados en la comunicación bi-direccional entre células de la teca y de la granulosa y entre células de la granulosa y el ovocito. Participan tanto mediante señales autocrinas (flechas grises) como paracrina (flechas negras) dependiendo de la expresión de los receptores adecuados en la superficie celular.

### Familia del factor de crecimiento fibroblástico (FGF)

El FGF es un polipéptido de 146 aminoácidos y posee un rol mitogénico en varias células derivadas del mesodermo y neuroectodermo. Existen varios homólogos del FGF, como por ejemplo, el FGF $\beta$  que es una forma trunca que carece de los primeros 15 residuos y fue identificado en el cuerpo lúteo ovárico [36]. El ARNm del FGF $\beta$  y el de su receptor han sido identificados en células de granulosa humanas [37]. Se ha sugerido que este polipéptido modula la angiogénesis, proliferación, síntesis de progesterona y apoptosis en ovario [38-40]. Al igual que EGF y TGF- $\alpha$ , FGF actúa mediante un receptor que posee actividad tirosina quinasa. Estudios realizados en cultivos de células de la granulosa y en folículos preovulatorios de ratas demostraron que FGF $\beta$ , EGF y TGF- $\alpha$  son capaces de inhibir la fragmentación apoptótica de ADN [14]. Estos resultados sugerirían importantes funciones para estos factores de crecimiento en la modulación de la muerte celular programada en folículos ováricos.

### Factores neurales

A pesar de que diversos neurotransmisores llegan al ovario a través de la inervación extrínseca, se ha demostrado que algunos neurotransmisores son producidos en forma intrínseca en células neuronales y no neuronales en el ovario. Se ha propuesto que los ovocitos y las células de la granulosa están conectados a través de un sistema neuroendocrino que consiste en la síntesis de noradrenalina en el ovocito a partir de dopamina sintetizada por las células de la granulosa y transportada en forma activa hasta el mismo [41]. Recientemente, se ha demostrado que las células de la granulosa producen acetilcolina [42]. Esta acetilcolina actúa sobre las células de la granulosa estimulando su proliferación [43] y la síntesis de StAR [44], lo que permite una mayor respuesta de estas células a la LH. Ha sido descrito además que el ovario produce otros neurotransmisores como GABA [45], somatostatina [46] y colecistoquinina [47] entre otros. La función de estos factores no está aún dilucidada.

El ovario además, contiene cuatro de las cinco neurotrofinas conocidas (nerve growth factor o NGF, brain-derived neurotrophic factor o BDNF, neurotrophin 4/5 o NT-4/5 y neurotrophin 6 o NT-6) y receptores para cada una de ellas [48]. Estas neurotrofinas promueven la proliferación de las células de la granulosa y de esta manera regulan el desarrollo folicular temprano [49]. El NGF actuaría también en el momento de la ovulación emitiendo una señal para la pérdida de la adhesión intercelular en la pared folicular [50].

### Péptidos GnRH ováricos

Dadas las numerosas evidencias sobre la existencia de ARNm de péptidos similares a GnRH y receptores de GnRH en el ovario [51], se ha propuesto que estos péptidos se sintetizarían localmente y cumplirían una función autocrina o paracrina sobre la función gonadal. Los análogos de GnRH se utilizan en técnicas de reproducción asistida, en ciclos de hiperestimulación ovárica. A nivel hipofisario, reducen la secreción endógena de gonadotropinas a través de un mecanismo de desen-

## Función reproductiva femenina

sibilización provocando un descenso de los esteroides ováricos. En pacientes que se encuentran bajo tratamientos de fertilización asistida, los agonistas de GnRH (GnRH-a) se administran junto a las gonadotropinas con el fin de inhibir el pico endógeno de LH y favorecer el reclutamiento folicular. Sin embargo, cuando se administran estos análogos, se requieren mayores dosis de gonadotropinas para la hiperestimulación ovárica. Esta disminución en la respuesta a gonadotropinas, estaría relacionada con un efecto inhibitorio sobre el ovario. La acción antigonal de GnRH-a ha sido descrita en células de la granulosa y del cuerpo lúteo de rata y humano [51-55]. En nuestro laboratorio se ha observado una acción inhibitoria del GnRH-a (acetato de leuprolide, LA) sobre el desarrollo folicular, mediado por un aumento en la apoptosis folicular. Este factor produce un aumento en la fragmentación del ADN folicular y su administración se correlaciona con un desbalance en la relación de proteínas antiapoptóticas/proapoptóticas de la familia de bcl-2, observándose un aumento en la expresión de Bclx-s, proteína proapoptótica [56-58]. Por otro lado, hemos demostrado que la administración de un agonista de GnRH a ratas superovuladas produce un efecto inhibitorio sobre los niveles de andrógenos y estradiol, mediado por cambios en la expresión de la proteína StAR (proteína reguladora de la producción aguda de esteroides) [59] y disminución en la expresión de la enzima CYP 17 hidroxilasa. Estos hallazgos, sugieren que el GnRH actúa como un factor intraovárico capaz de interferir con el desarrollo folicular inducido por gonadotropinas, mecanismo mediado por un aumento en la apoptosis ovárica y por cambios en la expresión y actividad de las proteínas y enzimas esteroideogénicas.

### Factores angiogénicos

En el adulto, la angiogénesis es infrecuente en condiciones fisiológicas y el endotelio de la mayoría de los tejidos es una población estable y de baja tasa mitótica [60]. Se observa angiogénesis principalmente en procesos de reparación de tejidos, como cicatrización de heridas y fracturas.

Los tejidos del sistema reproductor femenino adulto, incluyendo el ovario, útero y placenta, presentan una alta tasa mitogénica sólo comparable al crecimiento tumoral [61]. Sin embargo, a diferencia de los procesos tumorales, el crecimiento de estos tejidos ocurre en forma limitada y altamente ordenada. Esta alta tasa de crecimiento es sostenida por el rápido desarrollo de una red vascular, de modo que los tejidos con mayor grado de desarrollo se caracterizan por estar altamente irrigados [61].

Debido a que el ovario es uno de los pocos órganos del adulto que presenta un alto grado de angiogénesis a intervalos regulares, se ha propuesto a dicho órgano como modelo para el estudio no sólo de la función reproductiva sino también de la angiogénesis en general.

Los folículos ováricos preantrales no poseen vascularización propia sino que dependen del aporte sanguíneo del estroma [62]. Durante la formación del anro se produce el desarrollo de capilares en las células tecales formando dos redes vasculares que se localizan en la teca interna y en la teca externa respectivamente. Esto garantiza el aporte de gonadotropinas, factores de crecimiento, oxígeno, precursores de esteroides y otras sustancias al folículo en desarrollo. La adquisición de un adecuado aporte sanguíneo es posiblemente un paso limitante en la selección y maduración del folículo dominante [62]. Por otro lado, la degeneración del lecho capilar en folículos que no lograron

## Bases fisiológicas - fisiopatológicas y su diagnóstico

desarrollarse es un factor relevante causante de atresia [2]. Tanto el folículo ovárico como el cuerpo lúteo producen diversos factores angiogénicos. Sin embargo, se cree que el factor de crecimiento del endotelio vascular (VEGFA o VEGF) juega un rol primordial en la angiogénesis ovárica [63]. Se ha descrito la existencia de VEGF y de sus receptores en células de la granulosa y en células tecales tanto a nivel de ARNm como de su proteína [64;65]. La expresión de VEGF depende del tamaño folicular. En folículos bovinos y porcinos el VEGF se expresa débilmente durante el desarrollo folicular temprano mientras que dicha expresión aumenta durante el desarrollo del folículo dominante [66;67]. En ovario de rata se han encontrado resultados similares y además se observó una alta expresión de VEGF en la zona pelúcida [68].

El VEGF es un potente factor mitogénico y estimulante de la migración de células endoteliales. También juega un rol en el mantenimiento estructural de los vasos sanguíneos ya formados y aumenta la permeabilidad capilar [69]. Ejerce su acción a través de la unión a dos receptores de tipo tirosina quinasa, VEGFR1 y VEGFR2 expresados principalmente en células endoteliales [70] (Figura 3).

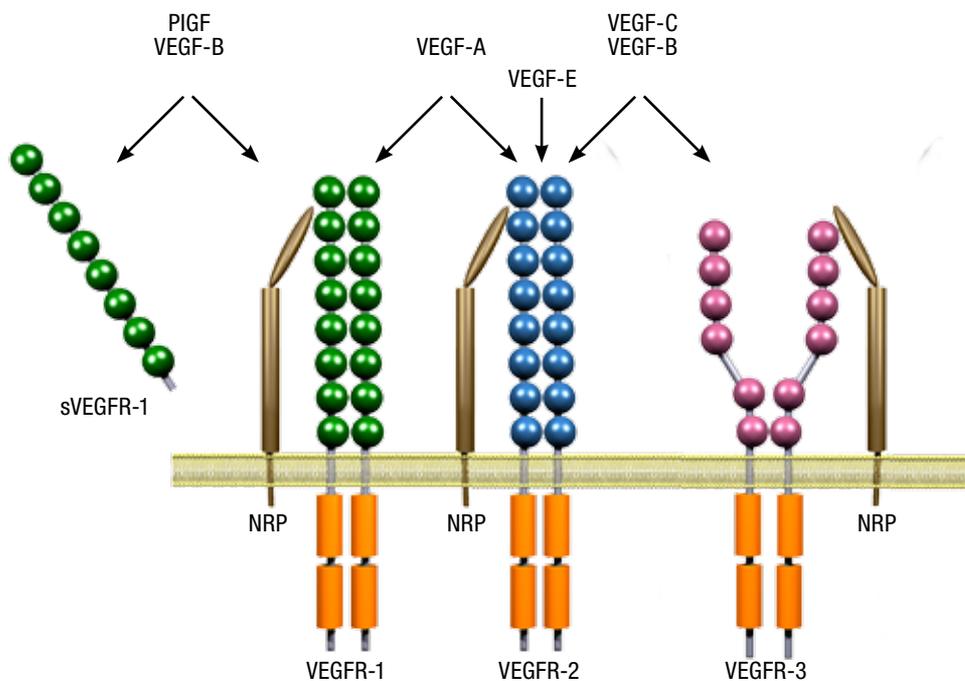


Figura 3: Receptores y ligandos de VEGF.

## Función reproductiva femenina

Mientras que el VEGF es el principal iniciador de la angiogénesis, la formación y diferenciación de una red vascular madura y funcional requiere de la acción coordinada de varios factores. Entre estos se encuentran la angiopoyetina 1 y 2 (ANPT1 y ANPT2) las cuales actúan a través de sus receptores tirosina quinasa Tie1 y Tie2 [71] (Figura 4). Contrariamente al VEGF, la ANPT1 es incapaz de estimular la proliferación de células endoteliales [72] pero es indispensable en el reclutamiento de células perivasculares, lo que permite la maduración y estabilización de los vasos recién formados [71;73]. La ANPT2 es un antagonista natural de la ANPT1 y promueve el mantenimiento de un estado menos estable del endotelio capilar, lo que permite la migración de células endoteliales y la neovascularización [71]. Por lo tanto, se cree que la ANPT2, en presencia de VEGF, podría promover la ramificación de los vasos mediante el bloqueo de la señal de ANPT1 mientras que, en ausencia de VEGF, la inhibición de la señal de ANPT1 producida por ANPT2 induciría la regresión de los vasos [74;75]. Estudios de hibridación "in situ" sobre ovarios de rata muestran que el ARNm de ANPT2 no es detectable en células foliculares hasta el estadio preovulatorio, mientras que el ARNm de ANPT1 se expresa en células tecales uniformemente durante todo el desarrollo folicular [71].

La ANPT3 ha sido identificada en ratón y actuaría como un agonista del receptor Tie2, mientras que la ANPT4 ha sido identificada en humanos y actuaría como antagonista natural del receptor [76].

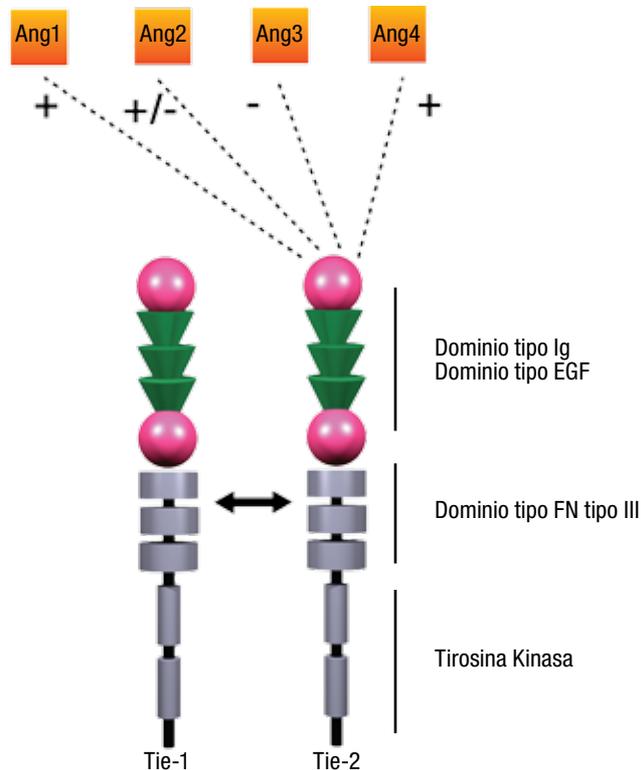


Figura 4: Receptores y ligandos de ANPT.

## Bases fisiológicas - fisiopatológicas y su diagnóstico

Se han realizado diversos estudios para inhibir "in vivo" estos factores angiogénicos. La administración de un anticuerpo contra el receptor 2 de VEGF (Flk-1/KDR o VEGFR2) inhibe la angiogénesis folicular dependiente de gonadotrofinas en ratón lo cual a su vez, bloquea el desarrollo de folículos antrales maduros [77]. Por otra parte, la inhibición de VEGF con un antagonista denominado Trap, produce una disminución en la angiogénesis folicular y en la expresión de los receptores 1 y 2 de VEGF (VEGFR1 o Flt-1 y VEGFR2) en primates no humanos [78]. La inyección intrafolicular de un antagonista de VEGF en el mono rhesus impide la ovulación y el consecuente desarrollo y funcionalidad del cuerpo lúteo [79]. En nuestro laboratorio se ha demostrado que la inyección intrafolicular de un antagonista de VEGF en la rata, retrasa el desarrollo folicular y aumenta la apoptosis de las células de la granulosa [80]. Con respecto a la ANPT1, hasta el momento sólo existe una publicación en la cual se demuestra que la administración local de ANPT1 o ANPT2 dentro del folículo preovulatorio de mona rhesus, altera el balance entre los factores angiogénicos (VEGF, ANPT1) y angiolífticos (ANPT2) previniendo la ovulación y la formación del cuerpo lúteo [81].

Los defectos en la angiogénesis ovárica pueden contribuir a una variedad de desórdenes como la anovulación e infertilidad, pérdida de embarazo, síndrome de hiperestimulación ovárica, síndrome de poliquistosis ovárica y la presencia de neoplasias ováricas.

### Conclusión general

En el humano es alta la incidencia de parejas infértiles y en el 20% de los casos su etiología es desconocida. En la clínica se han descrito fallas a distintos niveles del eje hipotalámico-hipófiso-ovárico. En el folículo ovárico se producen las hormonas sexuales femeninas y el ovocito, si éste es fecundado su implantación y desarrollo se realiza en el endometrio uterino. Las fallas en el desarrollo folicular, ovulación y formación del cuerpo lúteo llevan a distintas enfermedades que en algunos casos producen esterilidad, como ovario poliquístico, menopausia o pubertad precoz, hirsutismo, endometriosis, etc. El estudio de los factores que actúan en forma autocrina o paracrina modulando la función ovárica contribuirá no sólo a esclarecer el funcionamiento normal y patológico del ovario, sino que también aspira a contribuir al desarrollo de nuevas estrategias terapéuticas que ayuden en el tratamiento de enfermedades reproductivas. Asimismo, estos conocimientos serán aportes para el diseño de nuevos anticonceptivos femeninos.

# Función reproductiva femenina

## Referencias

- [1] McGee EA, Hsueh AJ. Initial and cyclic recruitment of ovarian follicles. *Endocr. Rev.* 21: 200-214, 2000.
- [2] Zeleznik AJ, Schuler HM, Reichert LE, Jr. Gonadotropin-binding sites in the rhesus monkey ovary: role of the vasculature in the selective distribution of human chorionic gonadotropin to the preovulatory follicle. *Endocrinology* 109: 356-362, 1981.
- [3] Zeleznik AJ, Midgley AR, Jr., Reichert LE, Jr. Granulosa cell maturation in the rat: increased binding of human chorionic gonadotropin following treatment with follicle-stimulating hormone in vivo. *Endocrinology* 95: 818-825, 1974.
- [4] Wang XN, Greenwald GS. Synergistic effects of steroids with FSH on folliculogenesis, steroidogenesis and FSH- and hCG-receptors in hypophysectomized mice. *J Reprod. Fertil.* 99: 403-413, 1993.
- [5] Vitale AM, González OM, Parborell F, Irusta G, Campo S, Tesone M. Inhibin A increases apoptosis in early ovarian antral follicles of diethylstilbestrol-treated rats. *Biol. Reprod.* 67: 1989-1995, 2002.
- [6] McNatty KP, Makris A, DeGrazia C, Osathanondh R, Ryan KJ. The production of progesterone, androgens, and estrogens by granulosa cells, thecal tissue, and stromal tissue from human ovaries in vitro. *J Clin. Endocrinol. Metab.* 49: 687-699, 1979.
- [7] McGee EA. The regulation of apoptosis in preantral ovarian follicles. *Biol Signals Recept.* 9: 81-86, 2000.
- [8] Hillier SG, van den Boogaard AM, Reichert LE, Jr., van Hall EV. Alterations in granulosa cell aromatase activity accompanying preovulatory follicular development in the rat ovary with evidence that 5 $\alpha$ -reduced C19 steroids inhibit the aromatase reaction in vitro. *J. Endocrinol.* 84: 409-419, 1980.
- [9] McNatty KP. Regulation of follicle maturation in the human ovary: a role for 5-reduced androgens. In: Cumming IA FJMF (ed.), *Endocrinology*. Canberra: Australian Academy of Sciences 1-51, 1980.
- [10] Fortune JE, Armstrong DT. Androgen production by theca and granulosa isolated from proestrous rat follicles. *Endocrinology* 100: 1341-1347, 1977.
- [11] Moon YS, Tsang BK, Simpson C, Armstrong DT. 17 beta-Estradiol biosynthesis in cultured granulosa and thecal cells of human ovarian follicles: stimulation by follicle-stimulating hormone. *J Clin. Endocrinol. Metab* 47: 263-267, 1978.
- [12] Ashkenazi H, Cao X, Motola S, Popliker M, Conti M, Tsafiriri A. Epidermal growth factor family members: endogenous mediators of the ovulatory response. *Endocrinology* 146: 77-84, 2005.
- [13] De Celis JF, Mari-Beffa M, García-Bellido A. Cell-autonomous role of Notch, an epidermal growth factor homologue, in sensory organ differentiation in *Drosophila*. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A* 88: 632-636, 1991.
- [14] Tilly JL, Billig H, Kowalski KI, Hsueh AJ. 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: 1942-1950, 1992.
- [15] Yeh J, Yeh YC. Transforming growth factor-alpha and human cancer. *Biomed. Pharmacother.* 43: 651-659, 1989.
- [16] Maruo T, Ladines-Llave CA, Samoto T, Matsuo H, Manalo AS, Ito H, Mochizuki M. Expression of epidermal growth factor and its receptor in the human ovary during follicular growth and regression. *Endocrinology* 132: 924-931, 1993.

## Bases fisiológicas - fisiopatológicas y su diagnóstico

- [17] Tsafirri A, Adashi EY. Local nonsteroidal regulators of ovarian function. En: Knovil E y Neill J. (ed.), *The Physiology of Reproduction*. New York: Raven Press, Ltd. 817-843, 1994.
- [18] Kudlow JE, Kobrin MS, Purchio AF, Twardzik DR, Hernández ER, Asa SL, Adashi EY. Ovarian transforming growth factor-alpha gene expression: immunohistochemical localization to the theca-interstitial cells. *Endocrinology* 121: 1577-1579, 1987.
- [19] Lobb DK, Kobrin MS, Kudlow JE, Dorrington JH. Transforming growth factor-alpha in the adult bovine ovary: identification in growing ovarian follicles. *Biol Reprod.* 40: 1087-1093, 1989.
- [20] Oliver JE, Aitman TJ, Powell JF, Wilson CA, Clayton RN. Insulin-like growth factor I gene expression in the rat ovary is confined to the granulosa cells of developing follicles. *Endocrinology* 124: 2671-2679, 1989.
- [21] Hsueh AJ, Billig H, Tsafirri A. Ovarian follicle atresia: a hormonally controlled apoptotic process. *Endocr. Rev.* 15: 707-724, 1994.
- [22] El Roeiy A, Chen X, Roberts VJ, Shimasakai S, Ling N, LeRoith D, Roberts CT, Jr., Yen SS. Expression of the genes encoding the insulin-like growth factors (IGF-I and II), the IGF and insulin receptors, and IGF-binding proteins-1-6 and the localization of their gene products in normal and polycystic ovary syndrome ovaries. *J Clin. Endocrinol. Metab.* 78: 1488-1496, 1994.
- [23] Geisthovel F, Moretti-Rojas I, Asch RH, Rojas FJ. Expression of insulin-like growth factor-II (IGF-II) messenger ribonucleic acid (mRNA), but not IGF-I mRNA, in human preovulatory granulosa cells. *Hum. Reprod.* 4: 899-902, 1989.
- [24] Iwashita M, Kudo Y, Yoshimura Y, Adachi T, Katayama E, Takeda Y. Physiological role of insulin-like-growth-factor-binding protein-4 in human folliculogenesis. *Horm. Res.* 1996; 46 Suppl 1: 31-36.
- [25] Erickson GF, Nakatani A, Ling N, Shimasaki S. Localization of insulin-like growth factor-binding protein-5 messenger ribonucleic acid in rat ovaries during the estrous cycle. *Endocrinology* 130: 1867-1878, 1992.
- [26] Chun SY, Billig H, Tilly JL, Furuta I, Tsafirri A, Hsueh AJ. Gonadotropin suppression of apoptosis in cultured preovulatory follicles: mediatory role of endogenous insulin-like growth factor I. *Endocrinology* 135: 1845-1853, 1994.
- [27] Armstrong DG, Webb R. Ovarian follicular dominance: the role of intraovarian growth factors and novel proteins. *Rev. Reprod.* 2: 139-146, 1997.
- [28] Chegini N, Williams RS. Immunocytochemical localization of transforming growth factors (TGFs) TGF-alpha and TGF-beta in human ovarian tissues. *J Clin. Endocrinol. Metab* 74: 973-980, 1992.
- [29] Li S, Maruo T, Ladines-Llave CA, Samoto T, Kondo H, Mochizuki M. Expression of transforming growth factor-alpha in the human ovary during follicular growth, regression and atresia. *Endocr. J* 41: 693-701, 1994.
- [30] Drummond AE. TGFbeta signalling in the development of ovarian function. *Cell Tissue Res.* 322: 107-115, 2005.
- [31] Magoffin DA, Gancedo B, Erickson GF. Transforming growth factor-beta promotes differentiation of ovarian thecal-interstitial cells but inhibits androgen production. *Endocrinology* 125: 1951-1958, 1989.
- [32] Knight PG, Gliister C. TGF-beta superfamily members and ovarian follicle development. *Reproduction.* 132: 191-206, 2006.
- [33] Cook RW, Thompson TB, Jardetzky TS, Woodruff TK. Molecular biology of inhibin action. *Semin. Reprod. Med.* 22: 269-276, 2004.
- [34] Drummond AE, Le MT, Ethier JF, Dyson M, Findlay JK. Expression and localization of activin receptors,

## Función reproductiva femenina

- Smads, and beta glycan to the postnatal rat ovary. *Endocrinology* 143: 1423-1433, 2002.
- [35] Silva CC, Groome NP, Knight PG. Immunohistochemical localization of inhibin/activin alpha, betaA and betaB subunits and follistatin in bovine oocytes during in vitro maturation and fertilization. *Reproduction*. 125: 33-42, 2003.
- [36] Dodson WC, Schomberg DW. The effect of transforming growth factor-beta on follicle-stimulating hormone-induced differentiation of cultured rat granulosa cells. *Endocrinology* 120: 512-516, 1987.
- [37] Di Blasio AM, Viganò P, Cremonesi L, Carniti C, Ferrari M, Ferrari A. Expression of the genes encoding basic fibroblast growth factor and its receptor in human granulosa cells. *Mol. Cell Endocrinol.* 96: R7-11, 1993.
- [38] Tapanainen J, Leinonen PJ, Tapanainen P, Yamamoto M, Jaffe RB. Regulation of human granulosa-luteal cell progesterone production and proliferation by gonadotropins and growth factors. *Fertil. Steril.* 48: 576-580, 1987.
- [39] Chun SY, Eisenhauer KM, Minami S, Hsueh AJ. Growth factors in ovarian follicle atresia. *Semin. Reprod. Endocrinol.* 14: 197-202, 1996.
- [40] Berisha B, Schams D. Ovarian function in ruminants. *Domest. Anim Endocrinol.* 29: 305-317, 2005.
- [41] Mayerhofer A, Smith GD, Danilchik M, Levine JE, Wolf DP, Dissen GA, Ojeda SR. Oocytes are a source of catecholamines in the primate ovary: evidence for a cell-cell regulatory loop. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A* 95: 10990-10995, 1998.
- [42] Fritz S, Wessler I, Breitling R, Rossmannith W, Ojeda SR, Dissen GA, Amsterdam A, Mayerhofer A. Expression of muscarinic receptor types in the primate ovary and evidence for nonneuronal acetylcholine synthesis. *J Clin. Endocrinol. Metab* 86: 349-354, 2001.
- [43] Fritz S, Fohr KJ, Boddien S, Berg U, Brucker C, Mayerhofer A. Functional and molecular characterization of a muscarinic receptor type and evidence for expression of choline-acetyltransferase and vesicular acetylcholine transporter in human granulosa-luteal cells. *J Clin. Endocrinol. Metab* 84: 1744-1750, 1999.
- [44] Fritz S, Grunert R, Stocco DM, Hales DB, Mayerhofer A. StAR protein is increased by muscarinic receptor activation in human luteinized granulosa cells. *Mol. Cell Endocrinol.* 171: 49-51, 2001.
- [45] Erdo S, Varga B, Horvath E. Effect of local GABA administration on rat ovarian blood flow, and on progesterone and estradiol secretion. *Eur. J Pharmacol.* 111: 397-400, 1985.
- [46] McNeill DL, Burden HW. Neuropeptide Y and somatostatin immunoreactive perikarya in preaortic ganglia projecting to the rat ovary. *J Reprod. Fertil.* 78: 727-732, 1986.
- [47] McNeill DL, Burden HW. Peripheral pathways for neuropeptide Y- and cholecystokinin-8-immunoreactive nerves innervating the rat ovary. *Neurosci. Lett.* 80: 27-32, 1987.
- [48] Dissen GA, Hirshfield AN, Malamed S, Ojeda SR. Expression of neurotrophins and their receptors in the mammalian ovary is developmentally regulated: changes at the time of folliculogenesis. *Endocrinology* 136: 4681-4692, 1995.
- [49] Matzuk MM, Burns KH, Viveiros MM, Eppig JJ. Intercellular communication in the mammalian ovary: oocytes carry the conversation. *Science* 296: 2178-2180, 2002.
- [50] Mayerhofer A, Dissen GA, Parrott JA, Hill DF, Mayerhofer D, Garfield RE, Costa ME, Skinner MK, Ojeda SR. Involvement of nerve growth factor in the ovulatory cascade: trkA receptor activation inhibits gap junctional communication between thecal cells. *Endocrinology* 137: 5662-5670, 1996.
- [51] Hsueh AJ, Jones PB. Extrapituitary actions of gonadotropin-releasing hormone. *Endocr. Rev.* 2: 437-461, 1981.
- [52] Guerrero HE, Stein P, Asch RH, de Fried EP, Tesone M. Effect of a gonadotropin-releasing hormone

## Bases fisiológicas - fisiopatológicas y su diagnóstico

- agonist on luteinizing hormone receptors and steroidogenesis in ovarian cells. *Fertil. Steril.* 1993; 59: 803-808.
- [53] Kang SK, Tai CJ, Nathwani PS, Leung PC. Differential regulation of two forms of gonadotropin-releasing hormone messenger ribonucleic acid in human granulosa-luteal cells. *Endocrinology* 142: 182-192, 2001.
- [54] Andreu C, Parborell F, Vanzulli S, Chemes H, Tesone M. Regulation of follicular luteinization by a gonadotropin-releasing hormone agonist: relationship between steroidogenesis and apoptosis. *Mol. Reprod. Dev.* 51: 287-294, 1998.
- [55] Sridaran R, Philip GH, Li H, Culty M, Liu Z, Stocco DM, Papadopoulos V. GnRH agonist treatment decreases progesterone synthesis, luteal peripheral benzodiazepine receptor mRNA, ligand binding and steroidogenic acute regulatory protein expression during pregnancy. *J. Mol. Endocrinol.* 22: 45-54, 1999.
- [56] Parborell F, Dain L, Tesone M. Gonadotropin-releasing hormone agonist affects rat ovarian follicle development by interfering with FSH and growth factors on the prevention of apoptosis. *Mol. Reprod. Dev.* 60: 241-247, 2001.
- [57] Parborell F, Irusta G, Vitale AM, González O, Pecci A, Tesone M. GnRH antagonist Antide inhibits apoptosis of preovulatory follicle cells in rat ovary. *Biol Repr* 72: 659-666, 2005.
- [58] Parborell F, Pecci A, González O, Vitale A, Tesone M. Effects of a gonadotropin-releasing hormone agonist on rat ovarian follicle apoptosis: Regulation by EGF and the expression of Bcl-2-related genes. *Biol. Reprod.* 67: 481-486, 2002.
- [59] Irusta G, Parborell F, Peluffo M, Manna PR, González-Calvar SI, Calandra R, Stocco DM, Tesone M. Steroidogenic acute regulatory protein in ovarian follicles of gonadotropin-stimulated rats is regulated by a gonadotropin-releasing hormone agonist. *Biol. Reprod.* 68: 1577-1583, 2003.
- [60] Klagsbrun M, D'Amore PA. Vascular endothelial growth factor and its receptors. *Cytokine Growth Factor Rev.* 7: 259-270, 1996.
- [61] Reynolds LP, Grazul-Bilska AT, Killilea SD, Redmer DA. Mitogenic factors of corpora lutea. *Prog. Growth Factor Res.* 5: 159-175, 1994.
- [62] Stouffer RL, Martínez-Chequer JC, Molskness TA, Xu F, Hazzard TM. Regulation and action of angiogenic factors in the primate ovary. *Arch. Med. Res.* 32: 567-575, 2001.
- [63] Tamanini C, De Ambrogi M. Angiogenesis in developing follicle and corpus luteum. *Reprod. Domest. Anim* 39: 206-216, 2004.
- [64] Geva E, Jaffe RB. Role of vascular endothelial growth factor in ovarian physiology and pathology. *Fertil. Steril.* 74: 429-438, 2000.
- [65] Berisha B, Schams D, Kosmann M, Amselgruber W, Einspanier R. Expression and localisation of vascular endothelial growth factor and basic fibroblast growth factor during the final growth of bovine ovarian follicles. *J. Endocrinol.* 167: 371-382, 2000.
- [66] Barboni B, Turriani M, Galeati G, Spinaci M, Bacci ML, Forni M, Mattioli M. Vascular endothelial growth factor production in growing pig antral follicles. *Biol Reprod.* 63: 858-864, 2000
- [67] Greenaway J, Connor K, Pedersen HG, Coomber BL, LaMarre J, Petrik J. Vascular endothelial growth factor and its receptor, Flk-1/KDR, are cytoprotective in the extravascular compartment of the ovarian follicle. *Endocrinology* 145: 2896-2905, 2004.
- [68] Celik-Ozenci C, Akkoyunlu G, Kayisli UA, Arici A, Demir R. Localization of vascular endothelial growth factor in the zona pellucida of developing ovarian follicles in the rat: a possible role in destiny of follicles. *Histochem. Cell Biol* 120: 383-390, 2003.

## Función reproductiva femenina

- [69] Redmer DA, Doraiswamy V, Bortnem BJ, Fisher K, Jablonka-Shariff A, Grazul-Bilska AT, Reynolds LP. Evidence for a role of capillary pericytes in vascular growth of the developing ovine corpus luteum. *Biol Reprod.* 65: 879-889, 2001.
- [70] Jakeman LB, Winer J, Bennett GL, Altar CA, Ferrara N. Binding sites for vascular endothelial growth factor are localized on endothelial cells in adult rat tissues. *J Clin. Invest* 89: 244-253, 1992.
- [71] Maisonpierre PC, Suri C, Jones PF, Bartunkova S, Wiegand SJ, Radziejewski C, Compton D, McClain J, Aldrich TH, Papadopoulos N, Daly TJ, Davis S, Sato TN, Yancopoulos GD. Angiopoietin-2, a natural antagonist for Tie2 that disrupts in vivo angiogenesis. *Science* 277: 55-60, 1997.
- [72] Davis S, Aldrich TH, Jones PF, Acheson A, Compton DL, Jain V, Ryan TE, Bruno J, Radziejewski C, Maisonpierre PC, Yancopoulos GD. Isolation of angiopoietin-1, a ligand for the TIE2 receptor, by secretion-trap expression cloning. *Cell* 87: 1161-1169, 1996.
- [73] Suri C, Jones PF, Patan S, Bartunkova S, Maisonpierre PC, Davis S, Sato TN, Yancopoulos GD. Requisite role of angiopoietin-1, a ligand for the TIE2 receptor, during embryonic angiogenesis. *Cell* 87: 1171-1180, 1996.
- [74] Hanahan D. Signaling vascular morphogenesis and maintenance. *Science* 277: 48-50, 1997.
- [75] Yancopoulos GD, Davis S, Gale NW, Rudge JS, Wiegand SJ, Holash J. Vascular-specific growth factors and blood vessel formation. *Nature* 407: 242-248, 2000.
- [76] Valenzuela DM, Griffiths JA, Rojas J, Aldrich TH, Jones PF, Zhou H, McClain J, Copeland NG, Gilbert DJ, Jenkins NA, Huang T, Papadopoulos N, Maisonpierre PC, Davis S, Yancopoulos GD. Angiopoietins 3 and 4: diverging gene counterparts in mice and humans. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A* 96: 1904-1909, 1999.
- [77] Zimmermann RC, Hartman T, Kavic S, Pauli SA, Bohlen P, Sauer MV, Kitajewski J. Vascular endothelial growth factor receptor 2-mediated angiogenesis is essential for gonadotropin-dependent follicle development. *J. Clin. Invest* 112: 659-669, 2003.
- [78] Wulff C, Wilson H, Wiegand SJ, Rudge JS, Fraser HM. Prevention of thecal angiogenesis, antral follicular growth, and ovulation in the primate by treatment with vascular endothelial growth factor Trap R1R2. *Endocrinology* 143: 2797-2807, 2002.
- [79] Hazzard TM, Xu F, Stouffer RL. Injection of soluble vascular endothelial growth factor receptor 1 into the preovulatory follicle disrupts ovulation and subsequent luteal function in rhesus monkeys. *Biol Reprod.* 67: 1305-1312, 2002.
- [80] Abramovich D, Parborell F, Tesone M. Effect of a vascular endothelial growth factor (VEGF) inhibitory treatment on the folliculogenesis and ovarian apoptosis in gonadotropin-treated prepubertal rats. *Biol. Reprod.* 75: 434-441, 2006.
- [81] Xu F, Hazzard TM, Evans A, Charnock-Jones S, Smith S, Stouffer RL. Intraovarian actions of anti-angiogenic agents disrupt periovulatory events during the menstrual cycle in monkeys. *Contraception* 71: 239-248, 2005.