

SELECCIONES

Conferencia

Regulación autocrina y paracrina del desarrollo folicular I: efecto de los esteroides*

Jorge Chedrese¹.

¹ Department of Obstetrics, Gynecology and Reproductive Sciences, Royal University Hospital, University of Saskatchewan, Saskatoon, SK, Canadá.
chedresj@duke.usask.ca**

(Recibido: 10 de abril, 2003; aceptado: 21 de junio, 2003)

Introducción

El ovario es el órgano fundamental del sistema reproductivo. Cumple dos importantes funciones, sintetiza hormonas y genera la gameta femenina. Ambas funciones son reguladas por las gonadotropinas hipofisarias, folículoestimulante (FSH) y luteinizante (LH), y están coordinadas con las propias secreciones del ovario para producir una gameta madura, adecuada para su fertilización.

La estructura funcional del ovario es muy dinámica; en el término de pocos días desarrolla un grupo de folículos, selecciona uno destinado a ovular, y genera un nuevo órgano endocrino, el cuerpo lúteo. Estos fenómenos han sido intensamente estudiados en los últimos años. Sin embargo, los mecanismos que inician el crecimiento folicular y que determinan la selección del folículo ovulatorio son todavía poco conocidos. Es así que aún tiene vigencia la frase: «Uno de los más intrigantes misterios de la fisiología ovárica es qué factores determinan que un folículo permanezca quieto, otro comience a desarrollarse, pero luego se vuelva atrésico, mientras un tercero madura y ovula» (31).

Las funciones del ovario no son solamente reguladas por las gonadotropinas, sino también por factores endocrinos independientes de la hipófisis. Estos factores son las hormonas producidas en el mismo ovario, las que por actuar localmente se las denomina reguladores autocrinos y paracrinos; entendiéndose por autocrino al efecto de una hormona sobre el funcionamiento de la célula que la produce, y

paracrino al efecto de una hormona sobre el funcionamiento de una célula o grupo celular adyacente. Se especula que los reguladores autocrinos y paracrinos podrían tener un rol importante en el desarrollo y selección folicular, actuando directamente o modificando las funciones de la gonadotropinas.

Una de las mayores limitaciones para el estudio de los reguladores autocrinos y paracrinos es la falta de modelos experimentales adecuados cuyos resultados puedan ser extrapolados al humano. En el pasado, algunos conocimientos generados en modelos de roedores también se han considerado válidos para humanos. Sin embargo, ahora se conoce que existen numerosas diferencias en las funciones endocrino/reproductivas entre las especies, por lo que algunos de esos conceptos necesitan ser revisados. En el presente trabajo se hace una descripción de los conocimientos clásicos sobre regulación de la foliculogénesis y se describen las recientes evidencias experimentales que sostienen el concepto de regulación autocrina y paracrina del crecimiento y selección folicular, con énfasis en la función que cumplen los esteroides ováricos. En una segunda parte se describirán los efectos de los factores de crecimiento y la regulación local de la actividad de las gonadotropinas.

Foliculogénesis

El folículo, que podría definirse como la unidad funcional del ovario que contiene a la gameta femenina, es uno de los tejidos normales del organismo que

* Trabajo presentado en el Simposio sobre salud reproductiva del curso internacional de avances en salud reproductiva, Universidad Cayetano Heredia, Lima Perú, 21 de septiembre de 2001

**Dirección para solicitar el documento

experimenta una de las mayores tasas de crecimiento celular y diferenciación (1). En la mayoría de los mamíferos las gametas femeninas, denominadas ovogonias durante el desarrollo prenatal, culminan su proliferación antes o inmediatamente después del nacimiento. En ese momento las ovogonias detienen su crecimiento en la profase meiótica para transformarse en ovocitos primarios. Los ovocitos primarios se rodean de una capa simple de células granulosas planas, no diferenciadas, llamadas pregranulosas, y constituyen los folículos primordiales, que representan la estructura funcional más importante del ovario. En esa etapa los folículos primordiales no crecen en número; constituyen una reserva fija de gametas que se va consumiendo gradualmente en cada ciclo menstrual y cuando se agotan, la actividad ovárica cesa y sobreviene la menopausia.

El proceso de foliculogénesis se inicia cuando los folículos primordiales abandonan la reserva y se constituyen en folículos primarios en crecimiento. Alrededor del primero o segundo día de menstruación, un pequeño grupo de folículos primordiales comienza a desarrollarse en respuesta a la FSH. En ese momento las células pregranulosas planas se multiplican y transforman en células cuboidales, y aparecen las células tecaes. Ese estadio se conoce como folículo secundario, que se convierte en folículo terciario cuando se forma la cavidad antral. Al formarse la cavidad antral es posible identificar una nueva estructura, el cúmulo ooforo, que consiste en un aglomeramiento de células granulosas que rodean al ovocito. Las células granulosas también tapizan la cara interna de la membrana basal, que forma la cavidad que contiene al líquido folicular. Sobre la cara externa de la membrana basal se desarrollan las células tecaes productoras de andrógenos.

Comúnmente, en los primates, un sólo folículo ovula en cada ciclo. Alrededor de cinco o seis días después del comienzo de la menstruación el folículo seleccionado comienza a ser fisiológicamente dominante y adquiere los atributos necesarios para la ovulación. Los folículos que no alcanzan la madurez suficiente para ovular entran en un proceso de degeneración celular denominado atresia o regresión folicular. Puede decirse entonces que cuando un folículo abandona la reserva primaria tiene solamente dos posibles destinos: la ovulación, a la que solamente llegan menos del 1% de los folículos presentes en el momento del nacimiento, o la atresia que es el destino más probable.

En un ciclo menstrual normal el folículo dominante crece hasta llegar a un tamaño de aproximadamente 20 mm y tiene una elevada actividad citocromo-P450-aromatasa (P450arom), que es la enzima presente en las células granulosas que convierte los andrógenos tecaes en estrógenos, principalmente 17β -estradiol. Los estrógenos ejercen una función autocrina, estimulando la proliferación de las células granulosas y aumentando el número de receptores de FSH (R-FSH) y de LH (R-LH). Aproximadamente 14 días después del comienzo de la menstruación los estrógenos ováricos ejercen un efecto de retroalimentación positiva sobre la hipófisis y la hipófisis que resulta en la secreción súbita de LH, que es responsable de la ruptura del folículo dominante y de la consecuente liberación del ovocito.

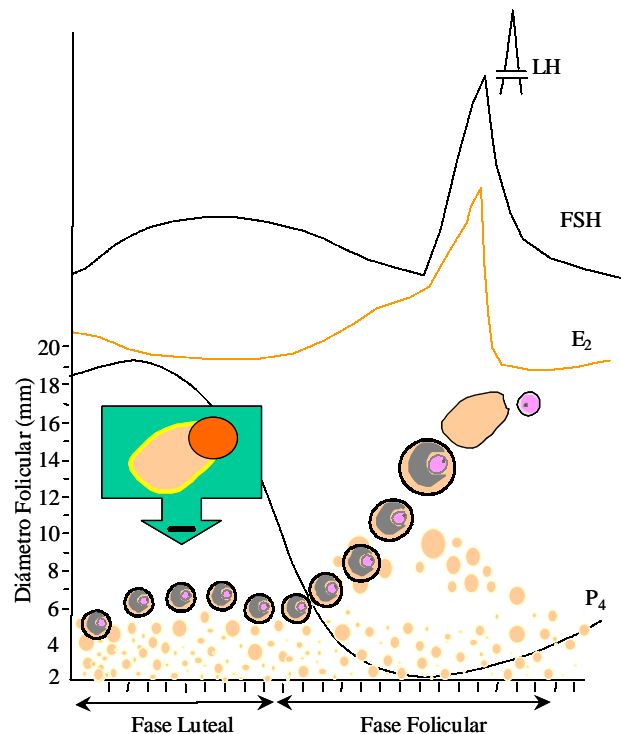


Figura 1. Representación esquemática de la evolución relativa en los niveles circulantes de FSH, 17β -estradiol (E_2) y progesterona (P_4) durante el desarrollo y selección folicular. Adaptado de Zeleznik, 2001 y Baerwald et al., 2002a.

Foliculogénesis durante la fase luteal

Durante el período periovulatorio comienza un proceso de diferenciación del tejido folicular, en particular de las células tecaes y granulosas, que deriva en la formación del cuerpo lúteo. El cuerpo lúteo es un órgano endocrino temporario capacitado bioquímicamente para producir gran cantidad de

esteroides, especialmente progesterona, que caracterizan a la fase luteal. En la fase luteal de los primates, a diferencia de otras especies, como bovinos, ovinos y equinos, el folículo no se desarrolla más allá del estadio de folículo terciario con una pequeña cavidad antral. Esta observación sugiere que directa y/o indirectamente el cuerpo lúteo inhibe el desarrollo folicular en los primates (véase Figura 1).

Las evidencias de que la presencia del cuerpo lúteo ejerce un efecto directo sobre el desarrollo folicular emergen de observaciones experimentales realizadas en primates sub-humanos, en los que la remoción del cuerpo lúteo en la mitad de la fase folicular induce la inmediata reiniciación del desarrollo folicular, sin modificaciones en los niveles circulantes de gonadotrofinas (30). Se concluye que la inhibición directa de la foliculogénesis estaría mediada por una señal autocrina/paracrina, probablemente progesterona, que es originada en el mismo cuerpo lúteo. El concepto de un efecto inhibitorio directo de la progesterona luteal es también sostenido por evidencias experimentales emergentes de estudios *in vitro*, que serán descritas en el subtítulo *andrógenos*.

La existencia de un efecto indirecto del cuerpo lúteo sobre el desarrollo folicular se basa en observaciones clínicas y quirúrgicas en humanos, donde la remoción del cuerpo lúteo en la mitad de la fase luteal causa una reanudación inmediata del crecimiento folicular, que es precedida por un incremento en la concentración de gonadotrofinas circulantes (4, 50). Esto indicaría que la inhibición indirecta estaría mediada por el efecto de retroalimentación negativa de las secreciones del cuerpo lúteo, probablemente progesterona y estrógenos, y de la hormona inhibina, un péptido producido en el folículo ovárico que influye sobre la secreción de gonadotrofinas hipofisarias. El efecto combinado de estas tres hormonas mantendrían bajos los niveles de FSH y LH durante la fase luteal. De esta forma el desarrollo folicular se iniciaría al final de la fase luteal, cuando las secreciones luteales declinan y comienza la nueva descarga gonadotrófica (74). También se ha observado que las células granulosas colectadas de pequeños folículos ováricos humanos responden a FSH con un incremento de la síntesis de estrógenos (47). Es muy posible que en las especies monovulares, incluidos los primates, la inhibición indirecta juegue un papel preponderante, ya que es difícil imaginar cómo el cuerpo lúteo puede controlar al ovario contralateral sin la existencia de una comunicación anatómica directa.

Esta información, tomada en conjunto, ha servido para especular que en los primates el cuerpo lúteo no afecta los estadios tempranos del desarrollo folicular. Sin embargo, existen sólidas evidencias experimentales para sostener que el cuerpo lúteo inhibiría la foliculogénesis en aquellos folículos que se encuentran en estadios avanzados de desarrollo (75).

Foliculogénesis durante la fase folicular

En la primera mitad de la fase folicular, durante la menstruación, el desarrollo folicular es altamente dependiente de los niveles circulantes de FSH. Se ha sugerido que se requiere un nivel umbral de incremento de FSH de aproximadamente 30-50%, para crear una onda de crecimiento folicular durante este período (9). Aunque estos incrementos parecieran insignificantes, debe tenerse en cuenta que en este estadio la hormona FSH no solamente incrementaría su masa circulante, sino también su actividad biológica; es decir que una misma cantidad de hormona tendría una mayor actividad estimulante gonadotrófica (68).

Durante la última mitad de la fase folicular se selecciona el folículo destinado a ovular. Para entender el mecanismo de selección del folículo ovárico es necesario explicar primero cómo el folículo maduro inhibe el crecimiento de los folículos menos maduros y luego cómo el folículo maduro escapa a su propia inhibición. Estas preguntas se podrían contestar analizando la evolución de los niveles circulantes de FSH y 17 β -estradiol durante el ciclo menstrual (véase Figura 1).

¿Cómo el folículo maduro inhibe el crecimiento de los folículos menos maduros? Coincidentemente con el período menstrual, que sigue a la caída del cuerpo lúteo, hay una elevación en los niveles de FSH que estimularían a las células granulosas. A partir de entonces existe una relación inversa entre las concentraciones circulantes de FSH y las de 17 β -estradiol. Las concentraciones circulantes de FSH son elevadas mientras que las de 17 β -estradiol son bajas. Aproximadamente cinco días antes de la descarga ovulatoria de gonadotrofinas los niveles circulantes de 17 β -estradiol suben como resultado de la actividad del folículo emergente. Asociado con este incremento gradual de 17 β -estradiol se produce una caída en las concentraciones circulantes de FSH, debido a la retroalimentación negativa ejercida por los estrógenos, y probablemente por la inhibina, sobre el hipotálamo y la hipófisis (5,40).

El efecto de retroalimentación negativa ejercido por las hormonas del ovario es el componente esencial del proceso de selección. El folículo con mayor actividad aromatasas es el que tiene mayor capacidad de suprimir la secreción de la FSH, dejando a los folículos menos maduros sin el soporte gonadotrófico para seguir creciendo. De esta forma, indirectamente, el folículo maduro inhibe el crecimiento de los otros folículos.

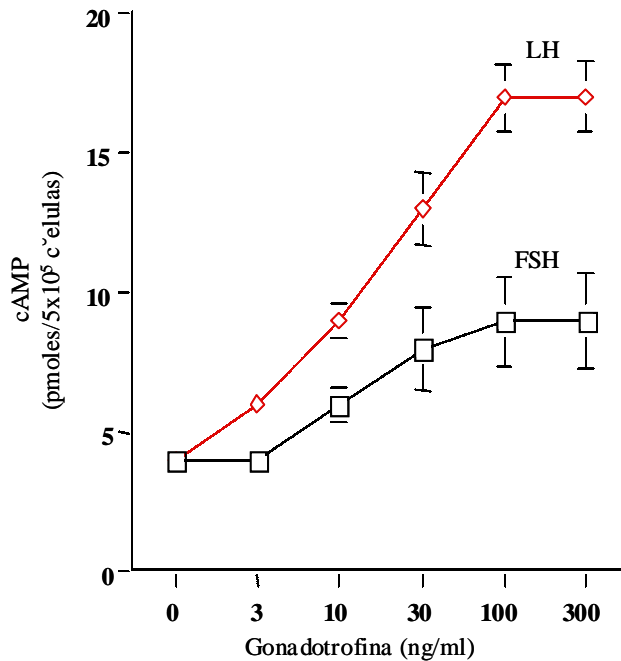


Figura 2. Efecto de la FSH y la LH sobre la síntesis del segundo mensajero cAMP en cultivo primario de células granulosas porcinas. Adaptado de Chedrese & Braileanu, 1996.

¿Cómo el folículo maduro escapa a su propia inhibición? Es decir, ¿porqué solamente un folículo crece en condiciones endocrinas en las que los demás regresan?. La única forma de explicar este fenómeno es que el folículo maduro sea menos dependiente de la FSH; que tenga la capacidad de continuar produciendo estrógenos en condiciones de bajos niveles de FSH, o que se regule en forma autónoma. Es también posible que las células granulosas del folículo seleccionado sean más sensibles a la FSH. Es sabido que en respuesta a la FSH y al efecto autocrino de los estrógenos aumenta el número de R-LH en las células granulosas del folículo seleccionado. La LH tiene un efecto tres a cinco veces superior al de la FSH para estimular la síntesis del segundo mensajero cAMP (véase Figura 2), por lo que es

posible que el folículo dominante reduzca su dependencia de la FSH adquiriendo más R-LH (16).

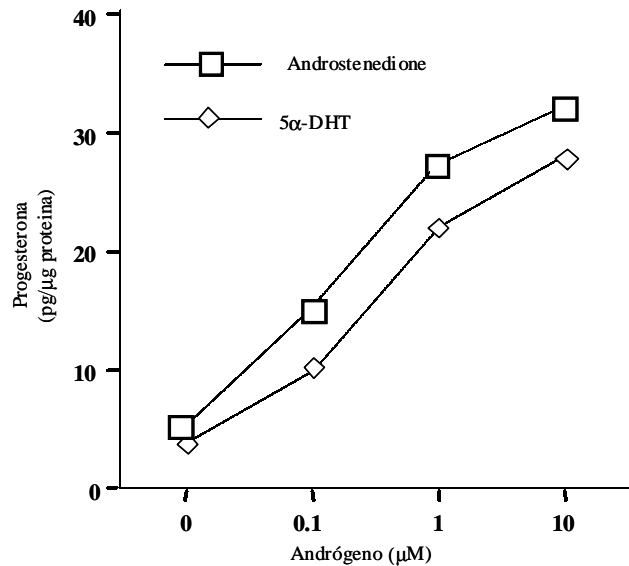


Figura 3. Efecto de los andrógenos sobre la síntesis de progesterona en cultivo de células granulosas estables. Adaptado de Rodway et al., 1999.

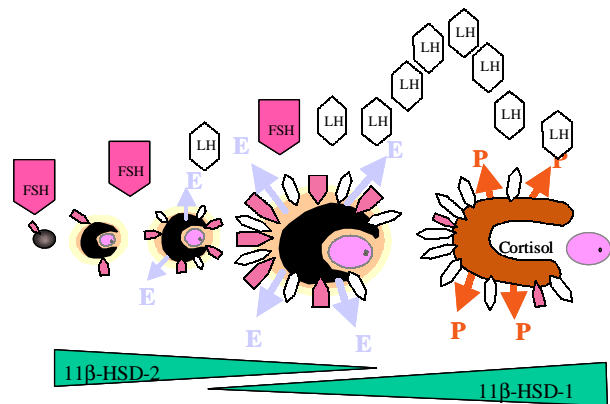


Figura 4. Representación esquemática de los efectos combinados de FSH y 17β-estradiol (E) sobre la expresión de receptores de LH, la síntesis de progesterona (P); y de los efectos de LH sobre la expresión de 11β-HSD. Adaptado de Baerwald et al., 2002b.

En base a estas observaciones se puede concluir que durante la fase luteal del ciclo menstrual el desarrollo folicular es inhibido, directa o indirectamente, por las secreciones del cuerpo lúteo, incluyendo los estrógenos, la inhibina y la progesterona. Estos factores inhiben el crecimiento de folículos terciarios, es decir aquellos que en su etapa de desarrollo se encuentran más allá del estadio de pequeños folículos antrales. Cuando el cuerpo lúteo regresa, las concentraciones

de la FSH se elevan y estimulan el crecimiento nuevos folículos. En respuesta a la FSH aumenta la proliferación de las células granulosas y se incrementa la actividad aromatasas, con el consiguiente aumento de la síntesis de estrógenos y el número de R-LH en las células granulosas. El aumento de los estrógenos circulantes inhibe el eje hipotálamo/hipófisis y suprime la secreción de la FSH, que declina por debajo del umbral de estimulación e impide la maduración de nuevos folículos. El incremento en número de los R-LH en las células granulosas, inducido por los estrógenos, provee al folículo dominante de un sólido soporte gonadotrófico adicional que le permite continuar creciendo en presencia de bajos niveles de la FSH. Si este modelo de regulación es el correcto, indicaría que los estrógenos operarían como los principales organizadores del momento ovulatorio.

Función de las Hormonas Esteroideas

La acción coordinada entre las gonadotropinas y los esteroides es crucial para el normal desarrollo de los folículos ováricos, la ovulación y la formación del cuerpo lúteo, como se describió previamente. Ahora veamos cómo los esteroides participan directamente en la regulación de la función ovárica.

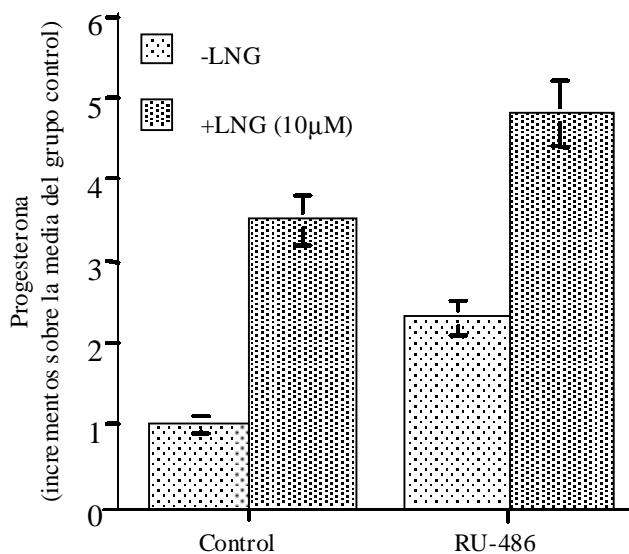


Figura 5. Efecto de levonorgestrel (LNG) y Mefipristone® (RU-486) sobre la síntesis de progesterona en células granulosas estables (Swan et al., 2001).

Andrógenos

Las células tecales producen andrógenos, principalmente androstenediona, y testosterona en menor proporción. Los andrógenos atraviesan la

membrana basal y ejercen efectos paracrinos sobre las células granulosas vecinas: afectan su crecimiento, estimulan la producción de progesterona, y además son el sustrato de la P450arom, que los convierte en estrógenos, principalmente 17β-estradiol. La FSH regula la actividad de la P450arom y por ende la síntesis de estrógenos.

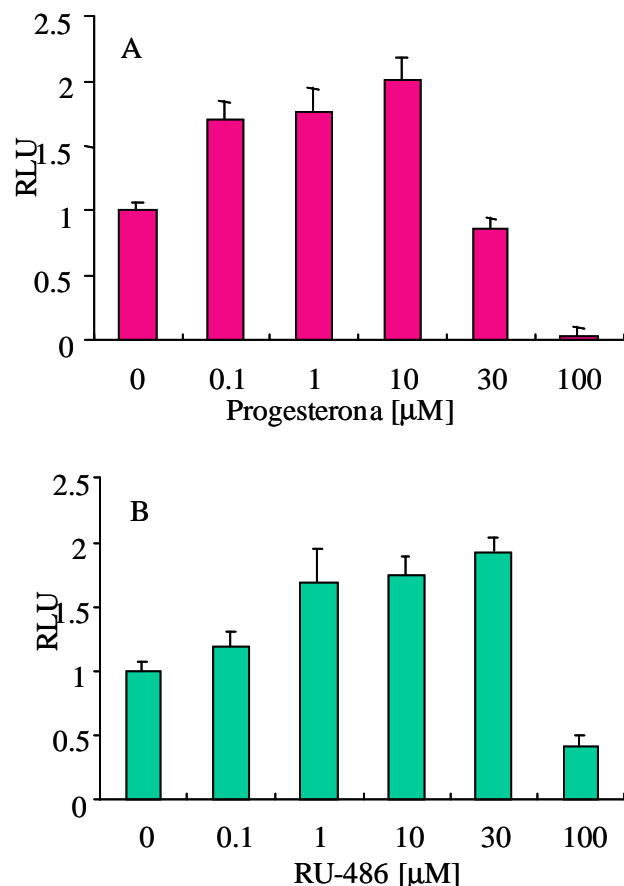


Figura 6. Efecto de la progesterona (A) y el RU-486 (B) sobre la actividad transcripcional del promotor de P450scc (2320-P450scc-LUC) en células granulosas estables. Tomado de Swan et al, 2001. (RLU: unidades relativas de luz).

Tradicionalmente se ha creído que los andrógenos inducen atresia folicular (35). Sin embargo, ahora se conoce que ese efecto sólo se observa en los roedores. Existen suficientes evidencias para creer que en humanos, y primates en general, y en otros mamíferos superiores, los andrógenos estimulan el crecimiento folicular (72). Las mujeres que padecen el síndrome de ovario policístico (PCOS) tienen hipertrofia ovárica con un mayor número de folículos que las mujeres normales (23,38). Además, las mujeres que padecen de tumores androgénicos, reciben terapia androgénica,

o padecen de hiperplasia adrenal congénita, tienen una morfología ovárica similar a la del PCOS (28,41,45). Similares características ováricas presentan las mujeres transexuales tratadas con andrógenos (53,64). Este caso es interesante porque los andrógenos producen una completa inhibición de la secreción de gonadotropinas hipofisarias. Aún así prevalece la hiperplasia ovárica similar a la del PCOS. Un aumento de la síntesis de andrógenos, producidos localmente por un exceso en la actividad de las enzimas androgénicas, sería una de las posibles causas del PCOS (22). Los ovarios de pacientes con PCOS responden a la estimulación con gonadotropinas hipofisarias (10,46,70). También existen evidencias que en los primates los andrógenos inhibirían, al menos en el corto plazo, la apoptosis o muerte celular programada, de las células granulosas (73). En cultivos de células granulosas los andrógenos estimulan la síntesis de progesterona a través de un mecanismo mediado específicamente por el receptor de andrógenos que no es dependiente de su transformación en estrógenos, ya que los andrógenos no aromatizables, como la 5α -dihidrotestosterona, también estimulan la síntesis de progesterona (59,60) (véase Figura 3). En general puede concluirse que los andrógenos inducen el desarrollo folicular y el crecimiento del tejido tecal e intersticial del ovario y estimulan síntesis de progesterona.

Estrógenos

En la mujer ingrávida los folículos ováricos en crecimiento constituyen la mayor fuente de estrógenos. Los estrógenos actúan en varios tejidos donde ejercen una función endocrina obligatoria en el normal funcionamiento del sistema reproductivo femenino. Además, ejercen una función autocrina, debido a que afectan a las células granulosas donde son sintetizados, estimulando su proliferación y aumentando el número de R-FSH y R-LH (véase Figura 4).

La acción de los estrógenos es mediada por dos distintos subtipos de receptores nucleares, el receptor α (ER α) y el receptor β (ER β). Estos receptores son factores de transcripción que median los efectos genómicos o transcripcionales de los estrógenos (39). Los genes que expresan ambos receptores han sido identificados en los ovarios de varios mamíferos, incluyendo los primates. El ER β parece ser la forma predominante en las células granulosas, por lo que se especula que media acciones autocrinas durante la foliculogénesis (11,17). La expresión de los receptores de estrógenos estaría regulada por las hormonas

gonadotróficas, en particular la LH, a través de un mecanismo dependiente del segundo mensajero cAMP (51). Aparentemente la LH disminuiría la expresión de ER β en las células granulosas, aunque en este caso también habría diferencias entre especies (61). Se ha especulado que un receptor presumiblemente ubicado en la membrana celular mediaría también los efectos de los estrógenos. Estos efectos serían no genómicos, o directos, que no requerirían la previa transcripción de otros genes (44). Los efectos no genómicos de los estrógenos involucrarían un rápido incremento en las concentraciones intracelulares de Ca⁺⁺ (49).

El efecto de los estrógenos en el ovario varía durante la foliculogénesis y es diferente según la especie y el modelo de estudio. En los roedores estimulan el desarrollo folicular y la proliferación de las células granulosas (7). En el cerdo forman parte del complejo de hormonas que sostienen el cuerpo lúteo (6). En cultivo de células granulosas porcinas, los estrógenos estimulan o inhiben la esteroidogénesis dependiendo de la concentración y el tiempo de tratamiento (71). En los primates son inactivos o ejercerían un leve efecto inhibitorio sobre el desarrollo folicular (20,42). Estas observaciones sugieren que los estrógenos ejercerían dos funciones opuestas en el ovario. Dependiendo de su concentración o tiempo en la circulación, podrían ser estimulatorios o inhibitorios de las funciones ováricas. También se podría suponer que estos dos efectos serían altamente dependiente de la expresión temporal y de la abundancia relativa de cada uno de sus receptores. A pesar de estos avances, la función de los estrógenos en el crecimiento folicular dista de estar definitivamente aclarada. Los experimentos realizados en ratones transgénicos deficientes en los receptores de estrógenos (ER α KO y ER β KO) o de la enzima aromataasa (ArKO) sugieren que existiría crecimiento folicular aún en ausencia de estrógenos o de sus receptores (8,43,61).

Un adecuado nivel de estrógenos en el líquido folicular está asociado con el crecimiento folicular. Se ha especulado que una disminución en el nivel de estrógenos en el líquido folicular sería una de las causas de la atresia folicular. Los estrógenos estimulan la síntesis y liberación de las gonadotropinas hipofisarias. De esta forma promueven el crecimiento folicular y estimulan la actividad aromataasa, que conduce a una mayor síntesis de estrógenos. Esto induce a pensar que la reducción en los niveles de estrógenos sería una de las consecuencias y no la causa de la atresia

folicular. Los efectos locales de estrógenos en la foliculogénesis han sido reseñados recientemente por Pelter *et al* (54). Estos autores sostienen que aunque algunos de los efectos de los estrógenos son todavía cuestionables, debe concluirse que tienen una participación activa en la regulación de la foliculogénesis en los primates.

Progestinas

En 1981 el Dr. Irwing Rothchild (57) postuló que la progesterona, que es la principal hormona esteroidea producida en el ovario durante la fase luteal, tendría importantes acciones autocrinas/paracrinas, estimulando su propia secreción y probablemente regulando otras funciones del ovario. Existen numerosas evidencias experimentales que soportan este concepto, aunque faltarían aún pruebas definitivas que lo confirmen debido a que es una hipótesis difícil de probar experimentalmente. Para ello hay que demostrar el efecto de una hormona sobre su propia secreción. En los modelos experimentales disponibles es técnicamente complicado discriminar entre una hormona que se inyecta a un animal, o se agrega a un cultivo de tejidos, y la misma hormona que se produce en respuesta al tratamiento. Es por esto que en algunos de esos estudios se han usados análogos y/o antagonistas de la progesterona, que cuando no son detectados por los sistemas analíticos para medir la progesterona generada, representan herramientas muy útiles para evaluar sus efectos. Los efectos de la progesterona también se han estudiados en modelos en los que se aplica progesterona, o sus análogos agonistas/antagonistas, en presencia de inhibidores de las enzimas esteroideogénicas. Estos últimos experimentos, aunque útiles, a veces generan resultados difíciles de interpretar debido a que los inhibidores enzimáticos son generalmente inespecíficos y ejercen otras acciones en las células.

La progesterona es también un potente inhibidor del crecimiento de las células granulosas e inhibe el efecto mitogénico del factor de crecimiento epidérmico (EGF) y modularía los procesos previos e inmediatamente posteriores a la ovulación y la luteogénesis, ya que la expresión de los receptores de progesterona (PRs) es necesaria para una ovulación normal (55). Basado en esa información, y en observaciones en el cuerpo lúteo de la rata reportadas por el laboratorio del Dr. Ricardo Deis (67), el Dr. Rothchild revisó su teoría, y postuló que en determinadas condiciones la progesterona también podría inhibir su propia secreción (58).

En nuestro laboratorio hemos investigado los mecanismos moleculares por el cual la progesterona modula su propia secreción, utilizando el modelo de cultivo de células granulosas immortalizadas (15,59). Estas células tienen la ventaja de que en el proceso de immortalización han conservado las enzimas esteroideogénicas, pero producen menos progesterona que las células normales. Es por esto que los cambios en la producción de progesterona pueden ser fácilmente detectados por los sistemas analíticos corrientes (60). En este modelo, la progesterona y las progestinas, tienen efectos que son dependientes de la concentración y el tipo de compuesto usado. Las progestinas análogas de la progesterona como el levonorgestrel, un compuesto comunmente usado en la formulación de anticonceptivos, estimulan la síntesis de progesterona (60) (véase Figura 5). Los análogos antagonistas, como el RU-486 (Mifepristone®) que bloquea el receptor de progesterona en el útero, a bajas concentraciones estimulan la síntesis de progesterona (66) (véase Figura 5). Este efecto estimulador, inesperado, soportaría el concepto de que en determinadas condiciones el RU-486 actuaría como una progestina, a pesar de ser un poderoso antagonista de la progesterona. El mecanismo por el cual las progestinas/ antiprogestinas estimulan la secreción de progesterona estaría mediado por un incremento en la expresión del citocromo P450-scc (66). P450scc es la enzima que cataliza la conversión del colesterol en pregnenolona (previamente denominada desmolasa, por su capacidad de cortar la cadena lateral del colesterol). La expresión del gene de P450scc es uno de los pasos limitantes y altamente regulados en la síntesis de todos los esteroides ováricos (56). Es así que la pregnenolona producida es inmediatamente convertida en progesterona por la enzima 3 β -hidroxi-esteroide-deshidrogenasa (3 β -HSD) (14).

En la figura 6, se ilustra el efecto de la progesterona y el RU-486 sobre la transcripción del gene de la P450scc, expresado en forma transitoria en células granulosas. Cuando estos compuestos son aplicados en bajas concentraciones (1-10 μ M), estimulan levemente la transcripción del gene de P450scc en las células granulosas. Sin embargo, en concentraciones elevadas (por encima de 10 μ M), las progestinas/antiprogestinas ejercen un efecto inhibitorio sobre la transcripción del gene de P450 scc, sin afectar la viabilidad celular (66).

Esta información, tomada en conjunto, le da soporte al concepto de autoregulación de la síntesis

de progesterona. A concentraciones bajas, como las que se producen durante la fase folicular, la progesterona contribuiría a estimular su propia secreción modulando los procesos previos e inmediatamente posteriores a la ovulación. Este efecto de la progesterona coincidiría con un aumento en la expresión de los PRs, que son esenciales para una ovulación normal tal como fue descrito por Park-Sarge and Mayo (55). A concentraciones elevadas, como las que se observan durante la fase luteal, la progesterona inhibiría la transcripción del gene de P450scc, y por ser esta una enzima limitante en la esteroidogénesis, se inhibiría la síntesis de todos los esteroides producidos por las células granulosas de los folículos en crecimiento. De esta forma la progesterona participaría de los mecanismos de inhibición directa del desarrollo folicular como se describió anteriormente en el subtítulo correspondiente a la *foliculogénesis durante la fase luteal*.

Es también posible que este efecto inhibitorio de la progesterona sea uno de los pasos, quizás el último, en la secuencias de eventos que conducen a la caída del cuerpo lúteo, tal como fue postulado por Rothchild (57,58). Si esto fuera correcto, el incremento en la síntesis de progesterona durante la fase luteal llegaría a un umbral inhibitorio, al cabo del cual causaría la regresión cuerpo lúteo (65).

Corticosteroides

La función de los corticosteroides adrenales en la respuesta fisiológica al stress está bien establecida, aunque los efectos observados en el ovario son aparentemente divergentes. Se ha propuesto que los corticosteroides mediarían los efectos adversos del stress sobre la fertilidad. Estos actuarían indirectamente, afectando el eje hipotálamo-hipófisis, y/o directamente sobre el ovario inhibiendo el crecimiento folicular, la producción de esteroides y la ovulación (18,33,37,48). Por otro lado, se han descrito efectos beneficiosos sobre la maduración de los oocitos y sobre la función de las células granulosas (20,26). La dexametasona, un análogo semisintético del cortisol, tiene efecto potenciadores sobre la expresión de P450scc e incrementaría la síntesis de progesterona en las células granulosas (69).

Evidencias clínicas soportan el concepto que los corticosteroides afectan directamente la función ovárica donde tendrían un efecto anti-inflamatorio local (36). Se sabe que los niveles de cortisol en el líquido folicular se incrementan luego de la descarga ovulatoria de LH (34) y que las células granulosas expresan los receptores para los glucocorticoides (GR) (13,63). Es

por esto que la hipótesis que los corticosteroides ejercen un efecto local en el ovario tiene mucho sentido si se considera que la ovulación es un proceso inflamatorio (25), por lo que los corticosteroides participarían en el proceso de reparación tisular luego de la ovulación. Un efecto autocrino/paracrino de los corticoides se descartó en un principio debido a que se encontró que la 21-hidroxilasa, enzima necesaria para la su biosíntesis, no se expresa en el ovario (52). Sin embargo, se demostró que las células granulosas y luteales expresan 11 β -hidroxiesteroide deshidrogenasas (11 β -HSD), las enzimas que participan en el metabolismo de los glucocorticoides (48). Existen dos isoformas de 11 β -HSD, tipo-1 (11 β -HSD-1) y tipo-2 (11 β -HSD-2). La 11 β -HSD-1, es una enzima bidireccional, con baja afinidad por el cortisol y la corticosterona, en la que prevalece la actividad reductasa; y que se expresa principalmente en el hígado, donde asegura que los GR estén expuestos a un adecuado nivel de cortisol. La 11 β -HSD-2, es una enzima monodireccional, con alta afinidad por el cortisol y la corticosterona y en la que prevalece la actividad deshidrogenasa. La 11 β -HSD-2, se expresa predominantemente en el riñón, donde convierte el cortisol en cortisona que es un metabolito menos activo.

En el ovario, se expresan ambas isoformas de la 11 β -HSD, por lo que se ha especulado que la expresión diferencial de cada una de ellas podría determinar el nivel de glucocorticoides en el foliculo (36). En las etapas tempranas del desarrollo folicular, se expresa preferentemente 11 β -HSD-2, que mantendría bajos los niveles de cortisol; mientras que en las células granulosas de folículos luteinizados colectadas al final de la fase folicular se expresa preferentemente 11 β -HSD-1, que elevaría los niveles de cortisol.

Si tomamos esta información en su conjunto podríamos explicar los efectos divergentes de los glucocorticoides observados en el ovario. En las etapas tempranas de desarrollo folicular la 11 β -HSD-2, aseguraría niveles bajos de corticosteroides. Es así que una elevada exposición a los glucocorticoides inhibiría el desarrollo folicular; que explicaría la etiología de las disfunciones ováricas y la baja fertilidad observadas en condiciones de stress. Es bien conocido que los glucocorticoides ejercen efectos anti-inflamatorios y que participan en los mecanismo de cicatrización. La ruptura del folículo ovárico durante la ovulación es un fenómeno regular durante la vida reproductiva, por lo tanto el ovario requiere de un mecanismo rápido de reparación tisular. Por lo tanto, cuando el folículo seleccionado alcanza madurez ovulatoria, la descarga de LH induciría un cambio de isoforma de 11 β -HSD,

privilegiando la expresión de 11 β -HSD-1 (véase Figura 4). Esto resulta en una elevación del cortisol en el líquido folicular que actuaría como anti-inflamatorio durante la ovulación, y contribuiría a la rápida reparación tisular. Además, participaría en el proceso de reorganización folicular, la luteogénesis, y estimularía la síntesis de progesterona.

Conclusiones

El uso de modelos experimentales alternativos al de los roedores, como así también los estudios *in vitro* y la aplicación de las técnicas moleculares, han permitido obtener detallada información sobre los mecanismos de regulación de la foliculogénesis y la selección del folículo ovulatorio más cercana a lo que ocurre en el humano. Estos mecanismos involucran un

complejo de componentes endocrinos, autocrinos y paracrinos que incluyen a las gonadotropinas de hipofisiarias y las hormonas esteroideas. Los estrógenos y progestinas que tradicionalmente fueron considerados únicamente factores endocrinos capaces de modular la secreción de gonadotropinas, son ahora considerados importantes reguladores directos del crecimiento folicular y la esteroidogénesis. Los andrógenos, conocidos previamente como factores de atresia folicular en los roedores, ahora se los asocia con la síntesis de progesterona en los mamíferos superiores. Los corticosteroides, que aunque no se sintetizan localmente se los considera reguladores autocrino/paracrinos, debido a que los productos de su metabolización son activos en el ovario, participando en los procesos de reparación tisular después de la ovulación.

Agradecimientos

Los trabajos llevados a cabo en el laboratorio del autor fueron financiados por las siguientes agencias: Canadian Institute of Health Research/Saskatchewan Health Regional Partnership, Canadian Network of Toxicology Centers, Natural Sciences and Engineering Research Council of Canada, Saskatchewan Agricultural Development Fund, J. Murray Research Grant, y Clinical Teaching and Research Grant, College of Medicine, University of Saskatchewan.

Referencias

1. Babu PS, Krishnamurthy H, Chedrese PJ and Sairam, R. 2000. Signalling Properties of the Novel Growth Factor Type I Receptor of Follicle Stimulating Hormone: Activation of Extracellular Regulated Kinase Pathways in Granulosa Cell Proliferation. *Journal of Biological Chemistry*, 275:27615-27626.
2. Baerwald AR, Adams GP and Pierson RA. 2002a. Folliculogenesis Revisited: Characteristics of Ovarian Follicular Waves during the Menstrual Cycle. *Fertility and Sterility*: 78(3) Supplement 1:S67.
3. Baerwald AR, Adams GP and Pierson RA. 2002b. Does the Corpus Luteum Influence the Development of Ovarian Follicular Waves in Women? *Proceedings of the 18th Annual Conference of the Canadian Fertility and Andrology Society*, Abstracts: 60.
4. Bairds DT, Bäckström T, McNeilly AS, Smith SK, Wathen CG. 1984. Effect of enucleation of the corpus luteum at different stages of the luteal phase of the human menstrual cycle on subsequent follicular development. *Journal of Reproduction and Fertility*, 70:615-624.
5. Bassett SG and Zeleznik AJ. 1990. Acute suppression of FSH secretion by oestradiol in the ovariectomized rhesus monkey. *Journal of Reproduction and Fertility*, 88:441-446.
6. Bazer FW and Thacher WW. 1977. Theory of maternal recognition of pregnancy in swine based on estrogen controlled endocrine versus exocrine secretion of prostaglandin F₂ α by the uterine endometrium. *Prostaglandins*, 14:397-401.
7. Bradbury JT. 1961. Direct action of estrogen on the ovary of the immature rat. *Endocrinology*, 68:115-120.
8. Britt KL, Drummond EE, Cox VA, Dyson M, Wresford NG, Jones ME, Simpson ER and Findlay JK. 2000. An age-related ovarian phenotype in mice with targeted disruption of the Cyp 19 (Aromatase) gene. *Endocrinology*, 141:2614-2623.
9. Brown JB. 1979. Pituitary control of ovarian function - concepts derived from gonadotrophin therapy. *Australian and New Zealand Journal of Obstetrics and Gynaecology*, 18:46-54.
10. Buyalos RP and Lee CT. 1996. Polycystic ovary syndrome: pathophysiology and outcome with *in vitro* fertilization. *Fertility and Sterility*, 65:1-10.
11. Byers M, Kuiper GG, JM Gustafsson, J-A. and Park-Sarge, O-K. 1997. Estrogen receptor- β mRNA

- expression in rat ovary: downregulation by gonadotropins. *Molecular Endocrinology* 11:172-182.
12. Cameron, M, Foster JS, Bukovsky A and Wimalasena J. 1996. Activation of mitogen-activated protein kinases by gonadotropins and cyclic adenosine 5'-monophosphates in porcine granulosa cells. *Biology of Reproduction*, 55:111-119;
 13. Cato AC and Wade E. 1996. Molecular mechanisms of anti-inflammatory action of glucocorticoids. *Bioessays*, 18:371-378.
 14. Chedrese PJ, Zhang D, Luu-The V, Labrie F, Juorio AV and Murphy, BD. 1990. Regulation of the Expression of 3 β -hydroxysteroid Dehydrogenase in Porcine Granulosa Cell. A Role for the Protein Kinase-C Pathway. *Molecular Endocrinology* 4:1532-1538.
 15. Chedrese PJ, Rodway MR, Swan CL and Gillio-Meina C. 1998. Establishment of a Stable Steroidogenic Porcine Granulosa Cell Line. *Journal of Molecular Endocrinology* 20:287-292.
 16. Chedrese PJ and Braileanu, GT. 1996. 3 β -hydroxysteroid dehydrogenase gene expression regulation in porcine granulosa cells. II: Differential Effect of FSH and LH on Gene Transcription. *Endocrine* 4:11-18.
 17. Couse JJ, Lindzey J, Grandien K, Gustafsson JA and Korach KS. 1997. Tissue distribution and quantitation analysis of estrogen receptor- α (ER α) and estrogen receptor- β (ER β) mRNA in wild-type and ER- α knockout mouse. *Endocrinology*, 138:4613-4621.
 18. Cunningham GR, Caperton EM Jr, Goldzeiher J W. 1975. Antiovarian activity of synthetic corticoids. *Journal of Clinical Endocrinology and Metabolism*, 40:265-2674.
 19. de Leo V, D Lanceta, D D'Antona, A la Maarca and G Morgante. 1998. Hormonal effects of flutamide in young women with polycystic ovary syndrome. *Journal of Clinical Endocrinology and Metabolism*, 83:99-102.
 20. Dierschke DJ, Chaffin CL and Hutz RJ. 1994. Role and site of estrogen action in follicular atresia. *Trends in Endocrinology and Metabolism*, 5:215-219.
 21. Donesky BW and Adashi EY. 1995. Surgical ovulation induction in PCOS: wedge resection revisited in the age of laparoscopy. *Fertility and Sterility*, 63:439-243.
 22. Dunaif A. 1995. Hyperandrogenic anovulation (PCOS): a unique disorder of insulin action associated with an increased risk of non-insulin-dependent diabetes mellitus. *American Journal of Medicine*, 98:33S-39S.
 23. Erickson GF and Yen SSC. 1984. New data on follicle cells in polycystic ovaries: a proposed mechanism for the genesis of cystic follicles. *Seminars in Reproductive Endocrinology*, 2:231-243.
 24. Erickson GF and Danforth DR. 1995. Ovarian control of follicle development. *American Journal of Obstetrics and Gynecology*, 172:736-747.
 25. Espey LL. 1980. Ovulation as an inflammatory reaction - a hypothesis. *Biology of Reproduction* 22,:63-106.
 26. Fateh M, Ben-Raphael Z, Benadiva CA, Mastroianni LJr and Flickinger GL. 1989. Cortisol levels in human follicular fluid. *Fertility and Sterility*, 109:11888-1894.
 27. Fitzpatrick SL, Funkhouser JM, Sindoni DM, Stevis PE, Deecher DD, Bapat AR, Merchenthaler I and Frail DE. 1999. Expression of estrogen receptor-beta protein in rodent ovary. *Endocrinology*, 140:2581-2591.
 28. Futterweit W and Deligdisch L. 1986. Histopathological effects of exogenously administered testosterone in 19 female to male transsexuals. *Journal of Endocrinology and Metabolism*, 62:16-21.
 29. Greeley MS Jr, Callder DR, Taylor MH, Hols H and Wallace RA. 1986. Oocyte maturation in mummichog (*Fundulus heteroclitus*): effects of steroids on germinal vesicle breakdown of intact follicles. *General and Comparative Endocrinology*, 62:281-289.
 30. Goodman AL and Hodgen GD. 1983. The ovarian triad of the primate menstrual cycle. *Recent Progress in Hormone Research*, 39:1-73.
 31. Greenwald GS. 1972. Of eggs and follicles [Editorial], *American Journal of Anatomy*, 135:1-4.
 32. Greenwald GS and Roy SK. Follicular development and its control. In *The Physiology of Reproduction*, Second Edition. Edited by E. Knobil and J. D. Neill, Raven Press, Ltd., New York, 1994.
 33. Harlow CR, Coombs RJ, Hodges JK and Jenkins N. 1987. Modulation of plasminogen activation by glucocorticoid hormones in the rat granulosa cells. *Journal of Endocrinology*, 114:207-212.
 34. Harlow CR, Jenkins JM and Winston RML. 1997. Increased follicular fluid total and free cortisol levels during the luteinizing hormone surge. *Fertility and Sterility*, 68:48-53.
 35. Hillier SG and Ross GT. 1979. Effects of exogenous testosterone on ovarian weight, follicular morphology and intraovarian progesterone concentration in estrone-primed hypophysectomized immature female rats. *Biology of Reproduction*, 20:261-268.
 36. Hillier SG and Tetxuka M. 1998. An anti-inflammatory role for glucocorticoids in the ovaries? *Journal of Reproductive Immunology*, 39:21-27.

37. Hsueh AJ and Erickson GF. 1978. Glucocorticoid inhibition of FSH-induced estrogen production in cultured granulosa cells. *Steroids*, 32:639-648.
38. Hughesdon PE. 1982. Morphology and morphogenesis of the Stein-Leventhal ovary and of so-called "hyperthecosis". *Obstetrics and Gynecology Survey*, 37:59-77.
39. Jensen EV and De Sombre ER. 1973. Estrogen-receptor interaction. *Science*, 182:126-134.
40. Karsch FJ, Weick RF, Hotchkiss J, Dierschke DJ and Knobil E. 1973. An analysis of the negative feedback control of gonadotropin secretion utilizing chronic implantation of ovarian steroids in ovariectomized rhesus monkeys. *Endocrinology*, 93:478-486.
41. Kase N, Kowal J, Perloff W and Soffer. 1963. In vitro production of androgens by a virilizing adrenal adenoma and associated polycystic ovaries. *Acta Endocrinologica*, 44:15-19.
42. Koering MJ, Danforth DR and Hodgen GD. 1994. Early follicle growth in the juvenile macaca monkey ovary: the effects of estrogen priming and follicle-stimulating hormone. *Biology of Reproduction*, 50:686-694.
43. Krege JH, Hodgin JB, Couse JF, Enmark E, Warner M, Mahler JF, Sar M, Korach KS, Gustafsson JA and Smithies O. 1998. Generation and reproductive phenotypes of mice lacking estrogen receptor- β . *Proceedings of the National Academy of Sciences, USA*, 95:15677-15682.
44. Levin ER. 1999. Cellular functions of the plasma membrane estrogen receptor. *Trends in Endocrinology and Metabolism*, 10:374-377.
45. Lobo RA. 1984. The role of the adrenal in polycystic ovarian syndrome. *Seminars of Reproductive Endocrinology*, 2:251-262.
46. McDougall JJ, Tan SL, Balen A and Jacobs HS. 1993. A controlled trial comparing patients with and without polycystic ovaries undergoing in vitro fertilization. *Human Reproduction (Oxford)* 2:233-237.
47. McNatty KP, Hillier SG, Van den Boogaard AM, Trimpos-Kemper TC, Reichert LE Jr and van Hall EV. 1983. Follicular development during the luteal phase of the human menstrual cycle. *Journal of Clinical Endocrinology and Metabolism*, 56:1022-1031.
48. Michael AE, Pester LA, Curtis P, Shaw RW, Edwards CR W and Cooke BA. 1993. Direct inhibition of ovarian steroidogenesis by cortisol and the modulatory role of 11β -hydroxysteroid dehydrogenase. *Clinical Endocrinology*, 38:641-644.
49. Morley P, Whitfield JF, Vanderhyden BC, Tsang BK and Schwartz JL. 1992. A new, nongenomic estrogen action: the rapid release of intracellular calcium. *Endocrinology*, 131:1305-1312.
50. Nilsson L, Wikland M, Hamberger L. 1982. Recruitment of an ovulatory follicle in the human following follicle-ectomy and lute-ectomy. *Fertility and Sterility*, 37:30-34.
51. O'Brien ML, Park K, In Y and Park-Sarge OK. 1999. Characterization of estrogen receptor- β (ER β) mRNA and protein expression in rat granulosa cells. *Endocrinology*, 140:4520-4541.
52. Omura T and Morohashi K. 1995. Gene regulation of steroidogenesis. *Journal of Steroid Biochemistry and Molecular Biology*, 53:19-25.
53. Pache TD, Chadua S, Goorens LJG, Hop WC, J, Jaarsma KW, Dommerholt HBR and Fauser BC. JM, 1991. Ovarian morphology in long term androge-treated female to male transsexuals. A human model for the study of polycystic ovarian syndrome. *Histopathology*, 19:445-452.
54. Palter SF, Tavares AB, Hourvitz A, Veldhuis JD and Adashi EY. Are estrogens of import to primate/human ovarian folliculogenesis? 2001. *Endocrine Reviews*, 22:389-424.
55. Park-Sarge OK, Mayo KE. Regulation of the progesterone receptor gene by gonadotropins and cyclic adenosine 3',5'-monophosphate in rat granulosa cells. *Endocrinology* 1993; 134: 709-718.
56. Richards, J. 1994. Hormonal control of gene expression in the ovary. *Endocrine Reviews*, 15:725-751.
57. Rothchild I. 1981. The regulation of mammalian corpus luteum. In: Greep RO (ed.) *Recent Progress in Hormone Research*, New York: Academic Press, 183-298.
58. Rothchild I. 1996. The corpus luteum revisited: Are the paradoxical effects of RU486 a clue to how progesterone stimulates its own secretion? *Biology of Reproduction*, 55: 1-4.
59. Rodway MR, Swan CL, Gillio-Meina C, Crellin N, Flood P and Chedrese PJ. 1999a. Regulation of Steroidogenesis in JC-410, a Stable Cell Line of Porcine Granulosa Origin. *Molecular and Cellular Endocrinology* 148:87-94.
60. Rodway MR, Swan CL, Crellin N, Gillio-Meina C and Chedrese PJ. 1999b. Steroid Regulation of Progesterone Synthesis in a Stable Porcine Granulosa Cell Line: A Role for Progestins. *Journal of Steroid Biochemistry and Molecular Biology* 68:173-180.
61. Rosenfeld CS, Murray AA, Simmer G, Hufford MG, Smith MF, Spears N and Lubahn, D. B. 2000. Gonadotropin induction of ovulation and corpus luteum formation in young estrogen receptor- ∞ knockout mice. *Biology of Reproduction*, 62:599-605.
62. Rosenfeld CS, Wagner JS, Roberts RM and Lubahn DB. 2001. Intraovarian actions of estrogens. *Reproduction*, 122:215-226.

63. Schreiber JR, Nakamura K and Erickson GF. 1982. Rat ovary glucocorticoid receptor: identification and characterization. *Steroids*, 39:569-584.
64. Spinder T, Spijkstara JJ, Van Den Tweel JG, Burger CW, Van Kessel H, Hompes PGA and Gooren LJG. 1989. The effects of long term testosterone administration on pulsatile luteinizing hormone secretion and on ovarian histology in eugonadal female to male transexual subjects. *Journal of Clinical Endocrinology and Metabolism*, 69:151-157.
65. Stocco C, Chedrese PJ and Deis R. 2001. Luteal Expression of StAR, P450scc, 3 β -hydroxysteroid dehydrogenase (3 β -HSD), 20 α -hydroxysteroid dehydrogenase (20 α -HSD) genes in rats in late pregnancy: Effect of LH and RU486. *Biology of Reproduction*, 65:1114-1119.
66. Swan C, Agostini C, Bartlweski PC, Feyles V, Urban R and Chedrese PJ. 2001. Effects of Progestins on Progesterone Synthesis in a Stable Porcine Granulosa Cell Line, JC 410: Control of the Transcriptional Activity of the Cytochrome-P450scc Gene. *Biology of Reproduction*, 66:959-965.
67. Telleria CM, Deis RP. Effect of RU486 on ovarian progesterone production at pro-estrus and during pregnancy: a possible dual regulation of the biosynthesis of progesterone. *Journal of Reproduction and Fertility* 1994; 102: 379-384.
68. Ulloa-Aguirre A, Timosi C, Damian-Matsumura P and Dias JA. 1999. Role of glycosylation in function of follicle-stimulating hormone. *Endocrine*, 11:205-215.
69. Urban RJ, Bodenbunrg YH, Nagamani M, Peirce J. 1997. Dexamethasone potentiates IGF-I actions in porcine granulosa cells. *American Journal of Physiology*, 267:E115-E123.
70. Van Der Meer M, Hompes PGA, De Boer JAM, Schats R and Sschoemaker J. 1998. Cohort size rather than follicle-stimulating hormone threshold level determines ovarian sensitivity in polycystic ovary syndrome. *Journal of Clinical Endocrinology and Metabolism*, 83:423-426.
71. Veldhuis JD, Klase PA and Hammond JM. 1981. Direct actions of 17 α -estradiol on progesterone production by highly differentiated porcine granulosa cells in vitro. II. Regulatory interactions of estradiol with LH and cyclic nucleotides. *Endocrinology*. 109:433-442.
72. Vendola KA, Shou J, Adesanya OO, Weil SJ and Bondy CA. 1998. Androgens stimulates early stages of follicular growth in the primate ovary. *The Journal of Clinical Investigation*. 101:2622-2629.
73. Weil SJ, Vendola K, Zhou OO, Adesanya J, Wang K, Okafor J and Bondy CA. 1998. Androgen receptor gene expression in the primate ovary: cellular localization. regulation and functional correlations. *Journal of Clinical Endocrinology and Metabolism*, 83:2479-2485.
74. Zeleznik AJ, Wildt L, Schuler HM. 1980. Characterization of ovarian folliculogenesis during the luteal phase of the menstrual cycle in rhesus monkeys using [H3]thymidine autoradiography. *Endocrinology*, 107:982-988.
75. Zeleznik AJ. 2001. Follicle selection in primates: "Many are called but few are chosen." *Biology of Reproduction*, 65:655-659.