

# **NUEVOS ASPECTOS DE LA FOLICULOGENESIS EN LA MUJER Y LA HEMBRA DE RATA : POSIBILIDADES DIAGNOSTICAS Y TERAPEUTICAS**

JESÚS A. F. TRESGUERRES, L RANCAN, S PAREDES R NUÑEZ CALONJE, E VARA

DEPTOS DE FISIOLOGIA Y BIOQUIMICA Y BIOLOGIA MOLECULAR

FACULTAD DE MEDICINA

UNIVERSIDAD COMPLUTENSE MADRID

## **RESUMEN**

El desarrollo de los gametos femeninos tanto en la mujer como en otras hembras de mamíferos, presenta un primer periodo prenatal que comienza con la migración de células procedentes del saco vitelino a la cresta genital donde las oogonias inician su división en la 5ª semana de gestación y se rodean de una capa de células alargadas pregranulosas formando los folículos primordiales. Después se produce la multiplicación de estos hasta llegar en la mujer al 5ª o 6ª mes de vida embrionaria a un máximo de 6 millones de folículos ,que quedan reducidos a dos en el momento del nacimiento y a 400.000 en la pubertad. A partir de esta cada mes unas docenas de folículos son reclutados hasta que solo uno de los folículos que inician su desarrollo, el dominante , se mantiene y llega a alcanzar su máximo desarrollo y a salir el oocito con la ovulación mientras que los otros entran en apoptosis . Según el conocimiento general esto va a continuar ocurriendo hasta que llegados los 50 años se agotaba el pool de folículos primordiales que se habían generado en la etapa prenatal y llegaba la menopausia. Según los nuevos conocimientos a partir de la pubertad y procedentes de las células troncales ováricas de la falsa albugínea se reinstaura un nuevo periodo de foliculogénesis que dura hasta los 35 años que hace que el número de folículos se mantenga durante todo este tiempo y es solamente a partir de dicho periodo que las ovulaciones van a ocurrir solo en función de los folículos antiguos que quedan en el ovario con lo que se incrementan las enfermedades congénitas. El mantenimiento de esta segunda fase depende precisamente del envejecimiento ovárico que a su vez determina estrés oxidativo, inflamación y apoptosis en el mismo lo que supone que se

puede adelantar la interrupción del proceso si estos elementos se incrementan mucho y tenemos una menopausia precoz. El estrés oxidativo y sus consecuencias puede ser bloqueado por la administración de melatonina que es un potente antioxidante. De otra parte se puede también reactivar la foliculogénesis con algunos elementos del sistema inmunitario como son las células mononucleares y las células Th 8 o también con la autotransfusión de plasma rico en plaquetas En lo que respecta a la regulación ovárica se sabe que esta depende del eje hipotálamo hipofisario donde como novedad tenemos también la existencia en el núcleo arcuato hipotálamo de las neuronas Kiss productoras de Kisspeptinas que es donde se establece el feed back de los estrógenos ya que las neuronas productoras de GnRH no tiene receptores para estos ni tampoco para la leptina que es quien pone en marcha el sistema en la pubertad.

## SUMMARY

The development of the gametes both in the human or other mammalian females, shows a first prenatal period with the migration of cells coming from the yolk sac to the genital ridge where the initial oogonias start dividing at the 5th week of gestation and are surrounded by one layer of flattened pregranulosa cells forming the primordial follicles. Later those follicles multiply reaching between the 5<sup>th</sup> and 6<sup>th</sup> month of embryonic development a maximum of 6 million follicles, that are reduced to 2 million by the time of birth and to 400.000 at puberty. Starting after it every month several dozens of follicles are recruited. However only one follicle from those that start the development remains after a while and gets its full growth to get transformed in a mature follicle to later ovulate with the extrusion of the oocyte and its transformation in a corpus luteum whereas the others enter apoptosis. Following the general knowledge this should continue occurring until reaching the woman 50 years of age in which moment the primordial follicle pool that was generated in the prenatal age gets exhausted and menopause arrives. However if we follow the new findings, starting with the puberty a new period of folliculogenesis is instaurated in which ovarian stem cells coming from the false albuginea of the ovary are forming new follicles until reaching 35 years of age, thus maintaining the number of follicles in the ovary over this time. After this period ovulations should occur only deriving from the resting follicle pool that remains in the ovary and this situation is

related with an increase in congenital diseases. . Maintenance of this second production phase is depending of the ovarian aging process. Which in turn is increasing oxidative stress ,inflammation and apoptosis ,so that depending on those elements the phase could get shortened if the increase is high and we may have a precocious puberty. The increase of oxidative stress and its consequences can be blocked by the administration of melatonin. On the other hand folliculogenesis can be reactivated with some elements of the immune system like mononuclear cells and Th 8 cells The process can be stimulated also by the self administration of platelet rich plasma . With respect to ovarian regulation it depends from the hypothalamic pituitary axis .where we have also new data. Kiss neurones have been found in the arcuate nucleus of the hypothalamus that are responsible for the establishment of the estrogen feed back through its production of Kisspeptines since GnRH neurones are devoid of estrogen receptors and also have not leptin receptors that is the hormone responsible for the start of the functioning of the ovarian axis during puberty.

## EL OVARIO

Los ovarios tienen una doble misión. Por un lado serán los responsables de la secreción de las hormonas femeninas una vez transcurrida la pubertad y por el otro serán también los encargados de proporcionar los gametos femeninos, los óvulos para su potencial fecundación. ( Tresguerres 2020)

Las células germinales femeninas son los oocitos ,que derivan de las oogonias, procedentes de células progenitoras del saco vitelino y que aparecen alrededor de la 3ª semana de gestación. Estas células migran hacia la cresta genital, donde se dividen activamente y dan lugar a las oogonias.. Las divisiones de las oogonias empiezan alrededor de la 5ª semana de gestación y continúan hasta el 5º y 6º mes de embarazo, los ovarios llegan a contener en esos momentos hasta 6 millones de estas células. ( Tresguerres 2020)

En estos oocitos , el núcleo se bloquea en la profase de la meiosis y se forman los oocitos primarios hasta el momento en que después de la pubertad aparece la ovulación, en que se reasume la meiosis y se elimina el primer corpúsculo polar

formándose el oocito secundario. Una vez que el oocito ha completado su desarrollo, el folículo donde se encuentra sigue creciendo hasta alcanzar de 15 a 20 mm en el momento previo a la ovulación. Durante esta el folículo se rompe y el oocito secundario rodeado de una serie de células la denominada corona radiata ,sale del folículo y entra en las trompas de Falopio.( Adashi 1991)

El último paso de la maduración del oocito secundario, con extrusión del 2º corpúsculo polar y formación del óvulo maduro, ocurre solamente tras la fecundación por un espermatozoide .( Wang et al 2017)

. El folículo ovárico está formado por una o varias capas de células granulosas alargadas que rodean al oocito, y se denomina *folículo primordial*. En algunos folículos las células granulosas que los rodean pasa a ser cuboidales con lo que se transforman en folículos primarios.

A partir de la pubertad , en cada ciclo una serie de folículos comienza su desarrollo con lo que las células de la granulosa proliferan y además aparecen cambios en las células del estroma cortical por fuera de la lámina basal, que dan origen a una serie de capas concéntricas de células alargadas denominadas *células tecales que* se van después a separar en dos: una *teca interna*. y otra *teca externa*.

Al proliferar las células granulosas y tecales el folículo va creciendo notablemente , y cuando éste llega a alcanzar los 200  $\mu\text{m}$ , empiezan a aparecer acumulaciones de líquido entre las células de la granulosa, que van incrementando su tamaño hasta ir confluyendo con lo que dan lugar a una cavidad central llena de líquido denominada *antro*.

Esta formación acaba de transformar el folículo primario original en un *folículo de de Graaf maduro* en el que el oocito ocupa una posición excéntrica rodeado de dos o tres capas de células granulosas, denominadas "cúmulo oóforo", que está unido al resto de las células granulosas por uno de sus lados .Esta estructura sale con el oocito en la ovulación y se denomina corona radiata.( Wang 2017)

En los ovarios, en el el 6º mes de vida embrionaria aparece el máximo numero de folículos :6 millones. De todos estos folículos, en el momento del nacimiento, quedan aproximadamente solo dos millones . Entre la época del nacimiento y la pubertad, que

comienza aproximadamente a los 12 ó 13 años gran parte de dichos folículos primordiales sufren también un proceso de atresia de forma que solamente unos 400.000 folículos están presentes en el ovario de la mujer que comienza su vida fértil. De éstos, solamente alrededor de 400 van a tener la oportunidad de madurar completamente y de pasar a las trompas de Falopio y al útero, donde serán potencialmente fecundables, mientras que el resto también va a sufrir un proceso de apoptosis .

Solamente el folículo de de Graaf maduro será el que, al romperse, libere al oocito junto con la corona radiata, a la cavidad abdominal. A partir de los restos foliculares hemorrágicos que quedan en el ovario, se va a producir una transformación de las células granulosas en células luteínicas , formándose el *cuerpo lúteo* que será el responsable de la secreción hormonal en la segunda fase del ciclo. ( Botella 1995)

En la mujer adulta (entre la época puberal, alrededor de los 12-13 años, y la menopausia, entre los 45-50 años) todos estos cambios morfológicos dan lugar cada mes a una serie de cambios en las secreciones hormonales que constituye el ciclo menstrual ovulatorio normal.( Eppig et al 1996,Tresguerres 2008))

Durante muchos años todos los médicos involucrados en el estudio de la reproducción habíamos aceptado la teoría, que la producción de gametos en el ovario ocurría exclusivamente durante el periodo intrauterino. Que al final del 5º mes las células del saco vitelino que habían colonizado la cresta genital se habían dividido dando origen a oocitos que iniciaban la meiosis y quedaban bloqueados en la fase de leptotene de la profase en la cortical del ovario. Estos oocitos rodeados por una capa de células epiteliales planas daba origen a los folículos primordiales ováricos de los que podían contarse hasta 6 millones en el 6º mes de vida embrionaria. ( Tresguerres 2008, Rodrigues et al 2008) )

Una parte de estos folículos va a sufrir procesos de apoptosis de forma que en el momento del nacimiento solo quedan 2.000.000. De estos a su vez en la pubertad solo hay algo menos de medio millón que son los que van a iniciar los procesos de reclutamiento, desarrollo y dominancia dando lugar a los ciclos menstruales con las variaciones hormonales asociadas que suponen aumento de estrógenos en la primera

fase del ciclo y a partir de la ovulación de nuevo aumento de estrógenos y esta vez también con progesterona. Muy recientemente también se ha visto que la hormona Antimülleriana ( AMH) presente dentro del ovario es precisamente una de las principales responsables de mantener bloqueado el proceso de reactivación de los folículos primarios , de manera que si no hay AMH los folículos maduran casi de golpe de forma que en pocas semanas se produce el agotamiento de la reserva folicular ovárica.. Un tema interesante es precisamente la relación que pueda existir entre los niveles de AMH y el estrés oxidativo ovárico.( Garcia Alix et al 2012, Hayes et al 2016)

Al final del ciclo disminuyen todas las hormonas y comienza un nuevo ciclo con el reclutamiento de varias docenas de folículos que de nuevo van a seguir todo el proceso de nuevo.

De esta forma transcurridos 35 años de vida fértil, se agotaría la población de folículos y aparecería la menopausia.

El número de folículos que comienzan el crecimiento en cada ciclo depende, probablemente, del tamaño del "pool" residual de los folículos inactivos que a la luz de los conocimientos clásicos iba disminuyendo con el tiempo ,puesto que la génesis de los mismos había ocurrido en el ovario solamente en el periodo prenatal. Eso significaba que la población de folículos que llegaban a la pubertad era finita y que a lo largo de los ciclos ,los folículos que eran reclutados para su posible desarrollo y fecundación provenían todos de la población original de los 400.000 foliculos presentes en el momento de la pubertad .

Sin embargo Bukovski (2011 a ,b) y Bukovsky & Caudle (2012) , y luego en de nuevo Bukovski ( 2015) han conseguido demostrar de forma evidente que durante el periodo que va desde la menarquia hasta los 38 años mas o menos, lo que ellos denominan el "prime time" reproductivo, ocurre un nuevo periodo de producción de gametos femeninos a partir de células troncales ováricas que están presentes en la falsa túnica albugínea del ovario. Estos datos han sido también constatados por Gougeon (2015) que ha visto como se mantiene la población de folículos durante dicho periodo.( Findlay et al 2015)

Las células troncales ováricas van a seguir dos caminos paralelos en su evolución y desarrollo de forma que gracias a un proceso de migración directa hacia la cortical

ovárica, llevan a la aparición de las células granulosas que forman una especie de nidos a donde van a alojarse los oocitos con lo que estos quedan rodeados por dichas células . Y de otra forma por medio de una migración desde la falsa albugínea a través del sistema vascular intraovarico y mediante la colaboración de unos niveles hormonales adecuados y también de algunas células del sistema inmunitario a pleno funcionamiento , llevarán a la aparición de los propios oocitos que se irán a alojar en los nidos de células granulosas mencionados anteriormente. . De esta forma y al revés de lo que hemos venido explicando en las 3 ultimas décadas ,existe un nuevo periodo durante el cual se vuelve a reanudar la formación de folículos ováricos entre los 15 y los 38 años y que hace que la población de folículos se mantenga casi estable durante todo este periodo ( Bukovski y Caudle 2012) . Este proceso se interrumpe a los 38 años con lo que a partir de ese momento es cuando ya solo pueden reclutarse folículos “viejos” y por eso empieza a aumentar la incidencia de alteraciones congénitas como la trisomía del par 21.

Aunque en la falsa túnica albugínea de los ovarios de las mujeres menopáusicas siguen existiendo células troncales estas no son capaces de transformarse en oocitos y células granulosas es debido a que el sistema inmunitario ha disminuido ya mucho su función. Sin embargo si se cultivan las células troncales en presencia de células mononucleares y Th8 se puede conseguir restablecer la formación de folículos con posibilidad de fecundación. Incluso simplemente con la transfusión de una cantidad pequeña( 500 ml ) de sangre procedente de una mujer joven en la mitad de la fase folicular a una mujer menopáusica se puede conseguir de nuevo fertilidad.( Bukovski 2015) . Esto se puede conseguir también transplantando algunas células del sistema inmunitario como los monocitos y células asociadas. Estos datos se basan en otros previos de Kaiser (2014) y de Villeda et al ( 2014) que demostraron en otros modelos de envejecimiento el poder rejuvenecedor de las transfusiones de sangre de individuos jóvenes a viejos.Mas recientemente se han obtenido resultados similares autotransplantando plasma rico en plaquetas ( Pantos et al 2019, Sfakianoudis et al 2020 )

También si se transplantan células troncales ováricas ( OSC) procedentes de los ovarios de una ratona transfectada con proteína fibrilar verde a los ovarios de una ratona joven irradiada de forma que sus ovarios no tiene folículos de ninguna clase

los folículos se desarrollan y si esta hembra se cruza da lugar a crías con el marcaje correspondiente. Eso ocurre porque la rata irradiada mantiene sin embargo un sistema inmunitario activo y también secreciones hormonales adecuadas. ( Bukovski y Caudle2012)

Estos datos recientes aunque todavía no bien conocidos abren nuevas perspectivas a todo lo que significa por un lado la posibilidad de prolongar los años de fertilidad en fallo ovárico precoz e incluso en la menopausia normal propiamente tal. De igual forma podría extender el periodo fértil en animales de granja de alto valor económico como algunas yeguas.

## Ovulación

Una vez conseguida la maduración total del folículo de Graaf, se va a producir su ruptura con liberación del oocito contenido en su interior juntamente con el cúmulo ooforo que lo rodea. ( Botella 1995) La ruptura de la membrana folicular parece ocurrir por acción de un activador del plasminógeno presente en el líquido folicular, que catalizaría la conversión del plasminógeno en plasmina, enzima proteolítico capaz de romper la membrana basal,. Esta ruptura folicular podría estar mediada también por una especie de “reacción inflamatoria” local dependiente de histamina, por colagenasas o por la contractura folicular inducida por prostaglandinas.

## .Cuerpo lúteo

Tras la ruptura del folículo, tanto los capilares como los fibroblastos de la teca interna proliferan y penetran la lámina basal. Las células granulosas murales se someten a cambios morfológicos, que en su conjunto determinan el proceso de *luteinización*. Todas estas células granulosas transformadas, mas las células tecales y los vasos se entremezclan para dar lugar al *cuerpo lúteo*, que será el responsable de la secreción de las hormonas sexuales durante la fase postovulatoria del ciclo.( Hodgen 1987)

Normalmente el cuerpo lúteo (CL) de los primates dura alrededor de  $14 \pm 2$  días, transcurridos los cuales regresan espontáneamente, quedando reducido a una cicatriz



blanquecina denominada *corpus albicans*, a no ser que se produzca fecundación, en cuyo caso la rápida producción de hCG por el trofoblasto embrionario precursor de la placenta, transformaría el cuerpo luteo menstrual en un cuerpo luteo gravídico, prolongando y aumentando las secreciones hormonales, especialmente progesterona, necesaria para el mantenimiento del embarazo en sus fases más iniciales.

#### Biosíntesis de las hormonas sexuales en el ovario

Las hormonas sexuales femeninas producidas en el ovario son fundamentalmente el *estradiol* y la *progesterona*, aunque también se producen pequeñas cantidades de estrona, androstendiona, testosterona, 17- $\alpha$ -hidroxiprogesterona y varias hormonas no esteroideas, como la inhibina, la relaxina y algunos factores locales. Todos los esteroides ováricos se producen fundamentalmente en las estructuras foliculares y en el cuerpo lúteo y derivan del colesterol. (Tresguerres et al 2000)

Los lugares principales de producción esteroidea en el ovario son fundamentalmente la granulosa, la teca, y las células del cuerpo lúteo, que poseen el sistema enzimático complementario, completo requerido para la formación de hormonas esteroides. ( Hillensjö 1981)

A lo largo del proceso de maduración folicular y paralelamente al mismo se producen toda una serie de cambios hormonales. Por un lado se sintetiza el estradiol de forma creciente hasta el momento de la ovulación, disminuyendo sus niveles plasmáticos en el momento de la misma y volviendo a elevarse hasta niveles parecidos a los preovulatorios gracias a la contribución del cuerpo luteo en la segunda fase del ciclo. En esta segunda fase, dichos niveles de estradiol se acompañan de un incremento muy marcado de niveles plasmáticos de progesterona. Además se producen también unos ciertos niveles de andrógenos

La teoría más en boga actualmente indica la necesidad de interacción entre las células de la teca interna y las de la granulosa para conseguir la biosíntesis de estrógenos.( Hillensjö 1981) Las células tecales, con suficiente vascularización y dotación de receptores para colesterol LDL, disponen de los sistemas enzimáticos capaces de transformar la pregnenolona en andrógenos, pero no tienen sin embargo

los enzimas aromatizantes para llegar a la biosíntesis del estradiol. Por su parte las células de la granulosa, con poco acceso al LDL colesterol, lo que disminuye mucho su capacidad de biosintetizar pregnenolona y progesterona, son sin embargo capaces de sintetizar cantidades elevadas de estrógenos, si los andrógenos precursores les son proporcionados por las células teca. Es precisamente con la colaboración entre las células de la teca y las células de la granulosa la que permite el proceso de biosíntesis del estradiol tal y como ocurre en el ovario durante el crecimiento folicular

#### .Estrógenos

Los estrógenos naturales son compuestos de 18 átomos de carbono caracterizados por la presencia de un anillo A aromatizado con un grupo hidroxilo en el carbono 3 y además un grupo hidroxilo adicional o cetónico. El más importante y potente de los estrógenos secretados por el ovario es el *estradiol 17 β*.

La secreción del estradiol al plasma es variable a lo largo del ciclo menstrual, con unos valores de alrededor de 30 pg/ml en la fase folicular temprana que alcanzan los 300 pg/ml en fase periovulatoria disminuyendo marcadamente en los 2, 3 días siguientes a la ovulación y alcanzando de nuevo 200 pg/ml durante la fase lútea ( Tresguerres et al 2000)

#### .Progestágenos

La progesterona es un esteroide de 21 átomos de carbono que procede de la pregnenolona. Durante la fase folicular, los niveles plasmáticos con los que nos encontramos son de alrededor de 0.5 ng/ml y su procedencia, como hemos visto anteriormente, es tanto folicular como suprarrenal. A partir de la ovulación, el cuerpo lúteo es el principal productor, que determina un incremento marcado de sus concentraciones que llegan a alcanzar de 10 a 40 veces los valores previos hasta llegar a 20 ng/ml. ( Tresguerres et al 2000)

## REGULACIÓN DE LA FUNCIÓN OVÁRICA

### HORMONAS HIPOFISARIAS

El control de la función ovárica se lleva a cabo por las hormonas gonadotrópicas hipofisarias que incluyen a la LH, FSH . Estas se producen en las células basófilas de la adenohipófisis y tienen una estructura glucoproteica, con dos cadenas  $\alpha$  y  $\beta$ . La cadena  $\alpha$  es común a ambas, siendo la  $\beta$  específica de cada una de ellas, así como el componente glucídico. ( Eppig et al 1996)

Tanto LH como FSH se producen en el mismo tipo celular: la célula gonadotropa. . En condiciones normales, tanto la LH como la FSH presentan una secreción pulsátil en la mujer en dependencia directa de la secreción de un decapeptido hipotalámico, el LHRH. Además de su pulsatilidad ultradiana, ambas gonadotropinas presentan un perfil cíclico mensual con valores de FSH más elevados al final de la fase lútea y comienzo de la fase folicular y con un pico marcado durante la etapa ovulatoria. La LH presenta también valores ligeramente más altos al final de la fase folicular seguidos de un pico periovulatorio de mayor magnitud que el de FSH y disminución durante la fase lútea.

Si se elimina el funcionamiento ovárico, bien por la llegada del climaterio, o bien por castración, LH y FSH se incrementan de forma evidente, con un mayor predominio de la segunda y manteniendo su carácter de secreción pulsátil. (Tresguerres 2020)

Al llegar la pubertad, la FSH incrementada ejerce una acción estimulante del desarrollo folicular, a la vez que induce la aromatización de los estrogénos y la síntesis de inhibina. Inicialmente, la FSH interviene también en el proceso de reclutamiento , crecimiento folicular y desarrollo final del folículo dominante. Este folículo al tener mas sensibilidad a la FSH es capaz de continuar su desarrollo en presencia de niveles cada vez más bajos de esta que van a determinar la atresia del resto de los folículos inicialmente seleccionados pero que no son tan sensibles. La disminución de la FSH ocurre por el *feed-back* negativo que ejercen los estrógenos, conjuntamente con la inhibina, sobre la misma. ( Hodgen 1987)

La LH actúa a nivel del folículo ya maduro va a determinar la ovulación. Además, actuando sobre las células de la teca y también sobre las células granulosas maduras, las va a luteinizar transformando el folículo en cuerpo lúteo.

## CONTROL HIPOTALÁMICO DE LA SECRECIÓN DE GONADOTROPINAS: GnRH O LHRH.

La GnRH es el decapeptido hipotalámico que regula la secreción de LH y FSH. Si administramos GnRH de forma pulsátil, se mantienen los niveles de LH y FSH en una proporción similar a la normal en la mujer. Sin embargo, si se incrementa la frecuencia de pulsos o bien se administra de manera continua, ambas gonadotropinas disminuyen al cabo de varios días. Tiene lugar un fenómeno denominado de regulación negativa de receptores (*down regulation*) a nivel de las células gonadotropas hipofisarias, que las hace insensibles al estímulo con GnRH (Knobil y Wildt 1983)

Las neuronas productoras de GnRH están a su vez sometidas a control por parte de otras células denominadas KiSS que producen KISS peptinas. Se producen fundamentalmente en el núcleo arcuato y en las hembras también en el área preóptica actuando a través de un receptor de membrana unido a proteínas G denominado GPR 54. Por su parte estas KiSSpeptinas están moduladas por los niveles de leptina que procede de la grasa, y que supone en la pubertad la señal de puesta en marcha del eje reproductor cuando se alcanza una reserva grasa determinada (Roa et al 2008)

De esta forma se establece un circuito donde la mayoría de las señales periféricas incluyendo las hormonas sexuales y los reguladores metabólicos actuarían sobre las células Kiss productoras de Kisspeptinas del núcleo arcuato y del área preóptica que a su vez regularan las neuronas GnRH ergicas para poner en marcha el eje ovárico

La secreción fisiológicamente pulsátil de LHRH a nivel hipotalámico es capaz de desencadenar, en las células gonadotropas de la hipófisis, la liberación de LH y FSH. (Leyendecker y Wildt 1983) Sin embargo, la magnitud de la respuesta es proporcional al ambiente estrogénico: los estrógenos parecen ejercer un efecto inhibitor sobre la

liberación de gonadotropinas por la hipófisis, a la vez que, por otra parte, incrementan su biosíntesis. De esta manera, el incremento continuo de los niveles plasmáticos de estrógenos durante la maduración folicular daría lugar a una disminución de los niveles de LH y FSH circulantes, por un lado, pero por otro a un incremento de los niveles hipofisarios de ambas gonadotropinas. La reiteración del estímulo con GnRH en los animales con un pool de gonadotropinas incrementado, daría lugar, en un momento determinado, a una liberación máxima de dichas gonadotropinas que constituiría el pico ovulatorio de las mismas. (Ferin et al 1984)

Esto da lugar a un problema de interpretación, ya que, en la segunda fase del ciclo, de nuevo se incrementan los niveles estrogénicos, y sin embargo, al final de la segunda fase del ciclo, no vuelve a ocurrir un "pico ovulatorio" de LH y FSH.

¿Cuál es la explicación? Durante la segunda fase del ciclo, el incremento de estrógenos va acompañado de un incremento manifiesto en los niveles de progesterona, y esta última es capaz de impedir el de incremento de biosíntesis de gonadotropinas que determinan los estrógenos aislados. Por tanto, aunque los niveles estrogénicos permanecen altos durante toda la fase luteínica, al final de la misma no se produce ninguna liberación de otro pico de LH y FSH, por impedirlo la progesterona.

Clásicamente, se admite que el ciclo menstrual esta gobernado por un interacción entre hipotálamo, hipófisis y ovario (Tresguerres 2008) , donde el hipotálamo, desempeña un papel preponderante. Se plantea, sin embargo, una dificultad en el entendimiento de cómo un sistema de retroalimentación negativo, como el mencionado anteriormente, ejercido por estrógenos y progesterona sobre la secreción de LH y FSH, puede en un momento determinado, alrededor de la fase ovulatoria, convertirse en un feed-back positivo que determinase la presencia del pico ovulatorio de LH y FSH. Parece que las kisspeptinas secretadas en el area preóptica están relacionadas precisamente con la secreción cíclica de las gonadotropinas a través de la modulación de la pulsatilidad de GnRH.

A la luz de nuevos descubrimientos, el ciclo menstrual se ha interpretado de una forma distinta. Parece que la interrelación hipófisis-ovario es el lugar de génesis de la mayoría de los cambios hormonales que dan lugar al ciclo menstrual, desempeñando el hipotálamo un mero papel secundario en su desarrollo. Sin embargo, esto no quiere

decir que el GnRH no tenga un papel crucial en el mantenimiento del ciclo, por lo que sus mecanismos de control tienen una importancia muy relevante.

Podríamos establecer un símil hidráulico, considerando a la hipófisis como un recipiente con un grifo de entrada (biosíntesis) y otro de salida (secreción). El nivel del líquido (gonadotropinas) se mantiene en equilibrio dinámico ( Tresguerres 2020)

1. Los estrógenos estimulan la síntesis e impiden la liberación de gonadotropinas a la sangre, con lo cual los niveles plasmáticos bajan (feed-back negativo), pero el contenido hipofisario aumenta (aumento del líquido).
2. Si consideramos que el recipiente tiene un sifón como "válvula de seguridad", cuando el nivel del líquido en la hipófisis alcanza una altura determinada funcionará el sifón y se liberará en poco tiempo una gran cantidad de líquido (pico de gonadotropinas).
3. De esta manera podríamos explicarnos la acción de los estrógenos a nivel puramente hipofisario desempeñando el hipotálamo (GnRH) un papel secundario en este proceso.

Sin embargo, como mencionábamos anteriormente, esto no es del todo cierto, ya que no sólo estrógenos y progesterona actuando sobre la hipófisis serán capaces de modificar la secreción de gonadotropinas por la misma, sino que la GnRH, en base a la modificación de la frecuencia de sus pulsos, o de la magnitud de los mismos, también podrá desempeñar un papel importante en el estímulo hipofisario. ( Knobil & Wildt 1983)

La interacción entre todos los componentes mencionados hasta ahora, a través de los circuitos de información positivos y negativos, dan lugar, por consiguiente, a la instauración del ciclo menstrual.

## .CICLO MENSTRUAL

Desde el comienzo de la pubertad, y hasta la menopausia, el ovario funciona produciendo una serie de secreciones hormonales cíclicas que, a través de su acción sobre varios órganos de la economía, darán lugar al ciclo menstrual que se traduce en toda una serie de cambios hormonales

Como hecho más importante de estos ciclos menstruales cabe destacar la liberación de un óvulo fecundable cada mes aproximadamente; sin embargo, el fenómeno más evidente macroscópicamente es el sangrado menstrual, que aparece también con la misma periodicidad y que es consecuencia de la acción coordinada hormonal ovárica sobre el endometrio uterino.

Los esteroides ováricos actúan igualmente sobre otras estructuras del tracto reproductivo, si bien con efectos menos evidentes. Existe, por tanto, también un proceso cíclico en las trompas, útero, vagina, vulva y mamas, en función a los cambios hormonales periódicos a los que da lugar el ovario. .

## ENVEJECIMIENTO Y OVARIO

El envejecimiento es un fenómeno multisistémico que afecta diversos órganos y tejidos,( Harman 1956,2001) generando cambios estructurales y funcionales que limitan su capacidad para mantener su función .El aumento del estrés oxidativo se ha implicado como responsable de muchas de las alteraciones que tienen lugar en el envejecimiento y la menopausia, y el mecanismo de acción podría ser el incremento de peróxidos lipídicos y/o la deficiencia de mecanismos antioxidantes de defensa.

### **Efectos sobre el ovario**

Hay muchas evidencias que sugieren que el declive en la función ovárica que tiene lugar en la menopausia se asocia a un envejecimiento del ovario que se asocia con el incremento del estrés oxidativo y de citoquinas pro-inflamatorias. Las más importantes son la IL-1, la IL-6, y el TNF- $\alpha$ . La deficiencia de estrógenos también parece aumentar la respuesta inflamatoria celular a través de estas citoquinas [ Pfeilschifter 2002].

A nivel ovárico se ha visto que existe una disminución de la función mitocondrial con la edad, y más concretamente una disminución de la actividad de varios enzimas mitocondriales y de algunos elementos de la cadena de transporte electrónico. La expresión de varios genes que codifican algunas de las proteínas que intervienen en la síntesis de ATP se reduce también con el envejecimiento. Estas observaciones apoyan nuestros resultados en los que hemos visto una disminución de ATP en células hepáticas de los animales viejos. Este fenómeno puede deberse al incremento de estrés oxidativo que se puede observar en el líquido folicular, ya que este es capaz de inhibir la respiración mitocondrial. (La melatonina es capaz de proteger la función mitocondrial en algunas situaciones patológicas en las que se liberan radicales libres que son precisamente los responsables de la lesión mitocondrial. Además de reducir el estrés oxidativo, la melatonina puede disminuir la NO sintasa mitocondrial reduciendo por lo tanto la producción de NO y peroxinitritos en la mitocondria que son moléculas capaces de alterar su función. Efectos parecidos se ejercen por parte de la GH, los estrógenos y los fitoestrogenos.

En otro estudio realizado recientemente en nuestro laboratorio el nivel de sustancias proinflamatorias ( $\text{TNF}\alpha$ ,  $\text{IL-1}\beta$  y  $\text{IL-6}$ ) durante el envejecimiento estaba incrementado a nivel hepático mientras que la anti-inflamatoria  $\text{IL-10}$  estaba disminuida. En este caso y al revés de lo que ocurre en el estrés oxidativo no se encontraron diferencias entre hembras ovariectomizadas e intactas. La administración de melatonina, estrógenos y/o fitoestrógenos a las ratas ovariectomizadas disminuyó los niveles de  $\text{TNF}\alpha$ ,  $\text{IL-1}\beta$ ,  $\text{IL-6}$  e incremento los niveles de  $\text{IL-10}$ . El mismo tratamiento en ratas hembras intactas disminuyó significativamente los niveles de  $\text{TNF}\alpha$  y  $\text{IL-6}$ , e incrementó la  $\text{IL-10}$ , pero no cambió el nivel de  $\text{IL-1}\beta$ . Como han visto también otros autores (Sastre y cols., 2000).

### **.-Envejecimiento y estrés oxidativo**

La cantidad de daño oxidativo presente en las diferentes macromoléculas del organismo aumenta con la edad, y la acumulación de dicho daño a lo largo de la vida



tiene consecuencias funcionales importantes (Sohal y cols., 2002). Con la edad, se produce un incremento del daño oxidativo al DNA (Hamilton y cols, 2001), lo que determina el incremento de las mutaciones. También la cantidad de proteínas nitrosiladas y oxidadas aumenta en diversos tejidos (Stadtman , 1992). Además, se reduce la eliminación mediante proteólisis de las proteínas oxidadas, haciendo que éstas se acumulen. Asimismo, se incrementa el daño oxidativo a lípidos (Jeon y cols., 2001). Y todos estos elementos determinan alteraciones de la función mitocondrial que aparecen con la edad, provocando disminución de la producción de ATP y desacoplamiento de la cadena respiratoria, lo cual a su vez genera más radicales libres, y cierra el círculo vicioso (Sastre y cols., 2000; Van Remmen y cols, 2001; Quiles y cols., 2004)

Dos de las moléculas más importantes relacionadas con las lesiones oxidativas son el óxido nítrico (NO) y el monóxido de carbono (CO). Se sabe que el NO, además de su papel como elemento de señalización fisiológico o mediador de inflamación, puede también actuar como radical libre tanto de manera directa como a través de la génesis de peroxinitritos. Si tenemos en cuenta que tanto el NO como los peroxinitritos en exceso alteran la función mitocondrial y la síntesis de fosfatidilcolina (PC) que es un componente esencial de la membrana, sabremos que su medida puede ser un buen índice para evaluar las alteraciones debidas al envejecimiento. Por otro lado el CO es uno de los elementos de una vía metabólica la hemo-oxigenasa-1 (HO-1)-CO, que se ha propuesto recientemente como una de las defensas contra las lesiones oxidativas e inflamatorias y por ello nos puede servir para conocer el grado de afectación metabólica. Como otros marcadores de las lesiones oxidativas podemos medir además del NO y el CO, o los nucleosomas que nos indican las células que entran en apoptosis, el citocromo C citosólico y mitocondrial que junto con la producción de ATP nos indican la situación metabólica de las células, el LPO que nos indica la afectación de la membrana, la Bcl2 como antiapoptótica y también las enzimas glutatión reductasa, peroxidasa o S-transferasa, que nos informan de la capacidad de defensa frente a la oxidación que dispone el organismo.

La familia de Bcl2 está constituida por proteínas tanto inductoras como represoras de apoptosis. La expresión de Bcl2 suprime la apoptosis, mientras que la expresión de

otro de sus miembros, el Bax, la induce. El Bax antagoniza el efecto de Bcl2 y acelera la muerte celular. El balance entre proteínas inductoras y represoras constituye uno de los mecanismos de control más importantes en la regulación de los mecanismos de apoptosis. También las caspasas 3 y 9 son agentes proapoptóticos.

## **ENVEJECIMIENTO**

En humanos, los niveles de melatonina en plasma comienzan un descenso a partir de los 25-35 años, y a la edad de 40-60 años se tiene unos niveles que son un 35-50% de los presentes en individuos jóvenes (Acuña-Castroviejo y cols 2004, (Kennaway, y cols 1999) Y casi más llamativo que la reducción de los niveles es la disminución del pico nocturno (Magri, y cols ,2004) limitando su capacidad de sincronización de los ritmos circadianos. De hecho, a partir de los 40-50 años comienzan a alterarse y desincronizarse nuestros ritmos, lo que genera alteraciones funcionales, conductuales y de adaptación, que constituyen signos de envejecimiento (Acuña-Castroviejo y cols 2004). Paralelamente a esta disminución de la secreción de melatonina, se produce un incremento de la tasa de producción de radicales libres, y una disminución de la actividad de enzimas antioxidantes, como SOD, GRd, y GPx, que están en parte regulados por la propia melatonina. El papel de la melatonina en la regulación del estrés oxidativo parece cada día más evidente.

Asumiendo reducciones tisulares similares en los niveles de melatonina, cabe especular que uno de los factores por los que los individuos viejos presentan un mayor daño oxidativo podría ser la disminución de la producción de melatonina inducida por la edad (Reiter y cols 2002).

### **-Melatonina y ovario**

Se ha visto que existe una disminución de la función mitocondrial con la edad en varios tejidos, y más concretamente una disminución de la actividad de varios enzimas mitocondriales y de algunos elementos de la cadena de transporte electrónico. La expresión de varios genes que codifican algunas de las proteínas que intervienen en la síntesis de ATP se reduce también con el envejecimiento. Estas observaciones apoyan nuestros resultados en los que hemos visto una disminución de ATP en células hepáticas de los animales viejos. Este fenómeno puede deberse al estrés oxidativo, ya que este es

capaz de inhibir la respiración mitocondrial. La melatonina es capaz de proteger la función mitocondrial en algunas situaciones patológicas en las que se liberan radicales libres que son precisamente los responsables de la lesión mitocondrial. Esto ocurre en la isquemia reperusión o en la administración de sustancias inflamatorias o también en modelos experimentales de envejecimiento acelerado. Además de reducir el estrés oxidativo, la melatonina puede disminuir la NO sintasa mitocondrial reduciendo por lo tanto la producción de NO y peroxinitritos en la mitocondria que son moléculas capaces de alterar su función.

Hemos podido comprobar que la administración oral de melatonina aumenta el contenido en ATP de los hepatocitos aislados de hígados de animales viejos, lo que indica una mejoría importante de la función mitocondrial en estos. Se sabe que la melatonina incrementa la actividad de algunas enzimas involucradas en la fosforilización oxidativa y en la síntesis de ATP. (Castillo y cols 2005)

El líquido folicular supone el microambiente específico para el desarrollo del oocito (Agarwal et al 2003). y tiene un importante papel en su calidad, implantación y desarrollo temprano. Este entorno, unido a las células granulosas, esteroides y factores de crecimiento contiene leucocitos y macrófagos y citoquinas que son productores de ROS. (Attaran et al 2000). Un desequilibrio en la producción de ROS bien sea por dichos elementos o por un metabolismo alterado en el líquido folicular puede tener un efecto adverso sobre todos los procesos mencionados. (Agarwal et al 2005)

El aumento de radicales libres puede ser tóxico para la formación del embrión mientras que unos niveles fisiológicos de ROS puede ser indicativo de oocitos sanos que se desarrollan normalmente [Jana et al. 2010]. Por eso el estudio que hemos llevado a cabo ha sido medir los parámetros de estrés oxidativo en el líquido folicular de mujeres donantes de oocitos sanas y jóvenes y compararlos con dichos parámetros medidos en pacientes de menos de 35 años con baja respuesta a las gonadotropinas. Se han medido, TNF alfa, IL1, IL 6, Malonildialdehído, VEGF etc que se viene usando como marcadores en muchos tejidos en alteraciones

relacionadas con el estrés oxidativo [Shacter 2000; Cherubinia et al. 2005; Lykkesfeldt 2007].

En el folículo antral la diferenciación de las células somáticas que rodean al oocito a células del cúmulo es esencial para el desarrollo y viabilidad del oocito (Eppig et al 1996) Las células del cumulo llevan a cabo características funcionales distintas de las granulosa con un mayor grado de proliferación ,baja capacidad esteroideogénica y baja expresión de los receptores para LH (Thomas et al 2003, Gilchrist et al 2004)Estos cambios son dependientes de los factores secretados por el oocito (When et al 2010).

Los valores de LPO tienen una correlación negativa con la fertilización, como vieron ya Oyawoye et al(2003), que también observaron que valores bajos de actividad antioxidante total predicen la existencia de un potencial de fertilización reducido Igualmente a reducción de los antioxidantes tiene la misma significación. (Paszkowski et al1995),

En lo que respecta a nuestros propios resultados, hemos podido ver que comparando los valores de los distintos parametros medidos en el líquido folicular de pacientes con pobre respuesta a las gonadotropinas, procedentes de un programa de FIV. con los de donantes de oocitos de ese mismo programa, hemos obtenido los siguientes resultados

### *Enzimas Antioxidantes*

Hemos podido ver que las concentraciones de glutathion transferasa (GST), glutathion reductasa (GR) así como la actividad de glutathion peroxidasa (GPx) son significativamente más bajas en las pacientes con baja respuesta al compararlas con las donantes de oocitos. Las medias de GST en los folículos de las donantes era  $0,7 \pm 0,03$  nmol min/ mg and  $0,5 \pm 0,03$  nmol min/ mg en pacientes . La media de GR en el líquido folicular fue de  $1,509$  nmol min/ mg en donantes y  $0,94$  nmol min/ mg en pacientes ( $p < 0,0001$ ) y la de GPx de los donantes era  $8,4$  nmol min/ mg y de

7,4 nmol min/ mg en pacientes (p=0,083).

#### *Marcadores de estrés oxidativo*

El malondialdehído (MDA) del líquido folicular estaba incrementado significativamente en las pacientes con baja respuesta (  $39,5 \pm 4,1 \mu\text{mol /mg}$  ) al compararlas con las donantes (  $25,3 \pm 1,4 \mu\text{mol / mg}$  p=0,039) .

Los niveles de los metabolitos del óxido nítrico (NOx) fueron de  $0,34 \pm 0,03 \text{ nmol/mg}$  en donantes y de  $1,2 \pm 0,08 \text{ nmol/mg}$  in pacientes (p=0,0039) .

#### *Marcadores de inflamación*

Los niveles de IL-6 eran más elevados significativamente en las pacientes con baja **respuesta** ( $0,083 \pm 0,01 \text{ pg/ml}$ ) comparadas con las donantes de oocitos ( $0,023 \pm 0,003 \text{ pg/ml}$ ) (p<0,004) lo mismo que los niveles de interleuquina (IL-8) que era mas alta en pacientes ( $2,71 \pm 0,16 \text{ pg/ml}$ ) que en donantes ( $1,85 \pm 0,1 \text{ pg/ml}$ ) (p=0.0024) El nivel de factor de crecimiento endotelial (VEGF) era casi el doble en las pacientes ( $20,6 \pm 1,67 \text{ pg/ml}$ ) que en las donantes ( $12,6 \pm 0,6 \text{ pg/ml}$ ) (p=0.0156) .

No se encontraron diferencias significativas en el líquido folicular en las concentraciones de factor de necrosis tumoral alfa (TNF-alpha) entre ambos grupos .

Por todo lo anteriormente mencionado .podemos deducir que el exceso de marcadores de estres oxidativo y la disminucion de antioxidantes endogenos en el liquido follicular ,puede contribuir en un primer escalon a la disminucion de la capacidad de respuesta follicular a las gonadotropinas ,y en un segundo escalon a un aumento de la apoptosis de los mismos ,con la aparicion de una menopausia precoz. Estos datos se confirman si estudiamos el papel del inflammasoma en el ovario de estas pacientes donde se puede ver un aumento significativo del mismo.

### **Menopausia**

La menopausia se produce por el agotamiento definitivo de la reserva folicular ovárica, lo que supone la pérdida de la capacidad reproductiva, y además como la producción hormonal de la gónada femenina está ligada a la presencia de células del folículo, el agotamiento de estos conlleva toda una serie de cambios

hormonales. ( Palacios 2000) La secreción de esteroides ováricos es insuficiente para mantener el retrocontrol sobre las gonadotrofinas hipofisarias, lo cual implica un aumento paralelo de FSH y LH.

. La edad media a la cual la mujer alcanza la menopausia varía en los diferentes estudios publicados. La O.M.S. asigna la edad de 50 años para la mujer occidental. A partir de los cuarenta años los efectos de la reducción de la reserva folicular ovárica son evidentes.

Los escasos folículos que quedan responden de forma inadecuada al estímulo gonadotrópico hipofisario, con lo que el número de ovulaciones disminuye progresivamente.

El déficit de estrógenos y progesterona, principales hormonas antiandrogénicas, condiciona un aumento de la actividad de la androstendiona y la testosterona sobre sus receptores. Por este motivo, es frecuente encontrar durante la postmenopausia una relativa androgenización.

Aunque, como hemos comentado, la edad de la menopausia oscila entre los 47 y los 52 años, un 1-3% de las mujeres puede sufrir un fallo ovárico precoz que les situará en condiciones de hipoestrogenismo de forma prematura.

Sin embargo recientemente Bukovsky & Caudle (2012,) han conseguido demostrar de forma evidente que durante el periodo que va desde la menarquia hasta los 38 mas menos 2 años se produce un nuevo periodo de producción de gametos femeninos a partir de células troncales ováricas que están presentes en la falsa túnica albugínea del ovario. Estos datos han sido corroborados por Gougeon (2012) demostrando que como ya había visto el grupo de Erickson 1966 en la vaca, en la mujer entre los 18 y 38 años no podía demostrarse la disminución del número de folículos.

Estas células troncales van a seguir dos caminos paralelos que van a conducir por un lado a la aparición de las células granulosas que rodean al ovocito y por el otro con la colaboración de niveles hormonales adecuados y la de células del sistema inmunitario a la aparición de los propios oocitos. De esta forma existe un nuevo periodo durante el cual se vuelven a producir folículos ováricos entre las 15 y los 38 años.

Hay muchas evidencias que sugieren que el declive en la función ovárica que tiene lugar en la menopausia se asocia a un incremento espontáneo del estrés oxidativo y de las citoquinas pro-inflamatorias en dicho órgano . La deficiencia de estrógenos también parece aumentar la respuesta inflamatoria celular a través de estas citoquinas mediante el estímulo del número de receptores y otros cofactores, potenciando de esta forma sus efectos [ Pfeilschifter 2002].

Por otro lado existe la posibilidad de utilizar las células troncales ováricas de la falsa túnica albugínea del ovario para obtener tanto células granulosa como células germinales (ovocitos ) abren la posibilidad de volver a conseguir fertilidad en ovarios sometidos a quimio o radioterapia o incluso en ovarios postmenopáusicos siempre y cuando consigamos un ambiente hormonal e inmunitario adecuado. . Los trabajos de Abban y Johnson( 2009), así parecen indicarlo

## CONCLUSIONES

De todos estos datos podemos extraer varias conclusiones

La primera que la longitud del periodo reproductivo depende fundamentalmente de la producción de folículos nuevos después de la pubertad.

Segunda que a su vez este proceso dependerá de la existencia de estrés oxidativo e inflamación en el ovario en función del grado de envejecimiento del mismo. Esta situación sería potencialmente tratable utilizando melatonina.

Que la existencia de células troncales ováricas después de la menopausia haría teóricamente posible el mantenimiento de la función reproductiva si potenciamos el sistema inmunitario y las hormonas sexuales adecuadamente.

## BIBLIOGRAFIA

- 1) **Abban G Johnson J** Stem cell support of oogenesis in the human Human Reproduction12: 2974-8 ( 2009)
- 2) Acuña-Castroviejo,D, G Escames Rosa, J León López, H Khady, 2004, Melatonina, ritmos biológicos y estrés oxidativo, in Salvador-Carulla L, Cano Sanchez A, and Cabo-Soler JR (eds), Longevidad. Tratado integral

sobre la salud en la segunda mitad de la vida: Madrid, Editorial Médica Panamericana, p. 216-224.

- 3) ADASHI E.Y. "The ovarian life cycle," en *Reproductive Endocrinology*, Yen S.S.C, Jaffe R.B. ,eds.. 3ª Ed. Saunders Philadelphia, Tokyo, 1991. pp.181-237 ,
- 4) Agarwal, A., Gupta, S. and Sharma, R.K. (2005) Role of oxidative stress in female reproduction. *Reprod Biol Endocrinol* 3:28.
- 5) Agarwal, A., Saleh, R.A. and Bedaiwy, M.A. (2003) Role of oxidative oxygen species in the pathophysiology of human reproduction. *Fertil Steril* 79 :829–843.
- 6) Attaran, M., Pasqualotto, E., Falcone, T., Goldberg, J.M., Miller, K.F., Agarwal, A., et al. (2000) The effect of follicular fluid reactive oxygen species on the outcome of in vitro fertilization. *Int J Fertil Womens Med* 45:314–320.
  
- 10) Bejma J, Ramires P, Ji LL : Free radical generation and oxidative stress with aging and exercise: differential effects in the myocardium and liver. *Acta Physiol Scand* 2000; 169: 343-351.
  
- 11) BOTELLA J. "Los mecanismos de la ovulación," en "*El Ovario, Fisiología y Patología*" J. Botella ,ed. Diaz de Santos. Madrid ,1995 b. pp 49-55.
- 12) **Bukovsky A** Novel methods for treating ovarian infertility in older and POF women testicular infertility and other human functional diseases *Reprod Biol Endocrinol* 13:10 ( 2015)
- 13) **Bukovsky A, Caudle MR.** Immunoregulation of follicular renewal, selection, POF, and menopause in vivo, vs. neo-oogenesis in vitro, POF and ovarian infertility treatment, and a clinical trial. *Reprod Biol Endocrinol.* 2012;10:97. doi: 10.1186/1477-7827-10-97.
- 14) **Bukovsky A.** How can female germline stem cells contribute to the physiological Neo-oogenesis in mammals and why menopause occurs? *Microsc Microanal.* 2011;17:498–505.
- 15) **Bukovsky A.** Ovarian stem cell niche and follicular renewal in mammals. *Anat Rec (Hoboken )* 2011;294:1284–306. doi:
- 16) Castillo C, Salazar V, Ariznavarreta C, et al. Effect of melatonin administration on parameters related to oxidative damage in hepatocytes isolated from old Wistar rats. *J. Pineal Res* 2005b; 38:240-246
- 17) Cherubinia, A., Ruggiero, C., Polidorib, C.M. and Mecoccia, P.



- (2005) Potential markers of oxidative stress in stroke. *Free Rad Biol Med* 39:841–852.
- 18) Drew B, Leeuwenburgh C. Aging and the role of reactive nitrogen species. *Ann N Y Acad Sci.* 2002; 959:66-81.
- 19) Eppig JJ, O'Brien M, Wigglesworth K. Mammalian oocyte growth and development in vitro. *Mol Reprod Dev* 1996;44:260
- 20) ERICKSON BH Development and senescence of the postnatal bovine ovary *J Animal Sci* 1966, 25:800-805
- 21) FERIN M., VAN VUGT D., WARDLAW S. "The hypothalamic control of the menstrual cycle and the role of endogenous opioid peptides. " *Rec Progr. Horm, Res* 40:441-486 ,1984.
- 22) **Findlay JK Hutt KJ, Hickey M, Anderson RA** How is the number of primordial follicles in the ovarian reserve established? *Biol Reprod* 2015
- 23) A Garcia-Alix Grynnerup<sup>1</sup>, A Lindhard, S Sørensen The role of anti-Müllerian hormone in female fertility and infertility - an overview *Acta Obstet Gynecol Scand* 2012 Nov;91(11):1252-60. doi: 10.1111/j.1600-0412.2012.01471.
- 24) Gilchrist RB, Ritter LJ, Armstrong DT. Oocyte-somatic cell interactions during follicle development in mammals. *Anim Reprod Sci* 2004;82(83):431
- 25) GOUGEON A. "Regulation of ovarian follicular development in primates. Facts and hypotheses". *Endocrine Reviews* 17:121-155 ,1996.
- 26) **Gougeon A.** Is neo-oogenesis in the adult ovary, a realistic paradigm? *Gynecol Obstet Fertil.* 2010;38:398–401. doi: 10.1016/j.gyobfe.2010.04.013
- 27) Harman D. Aging: a theory based on free radical and radiation chemistry. *J Gerontol.* 1956;11:298-300.
- 28) Harman D: Aging: Overview. *A N Y Acad Sci* 2001; 928:1-21.
- 29) Hamilton ML, Van Remmen H, Drake JA, Yang H, Guo ZM, Kewitt K, Walter CA, Richardson A. Does oxidative damage to DNA increase with age? *Proc Natl Acad Sci U S A.* 2001; 98:10469-10474.
- 30) E Hayes<sup>1</sup>, V Kushnir<sup>2</sup>, X Ma<sup>1</sup>, A Biswas<sup>1</sup>, H Prizant<sup>1</sup>, N Gleicher<sup>3</sup>, A Sen<sup>4</sup> Intra-cellular mechanism of Anti-Müllerian hormone (AMH) in

regulation of follicular development Mol Cell Endocrinol 2016 Sep 15;433:56-65. doi: 10.1016/j.mce.2016.05.019. Epub 2016 May 26nt

- 31) HILLENJÖ T. "Steroid biosynthesis by granulosa thecal and stromal cells: their interaction, en Intraovarian regulation of reproduction", Franchimont P., Channing C.P. ,eds. Academic Press, New York ,1981. pp 33-60.
- 32) HODGEN G.D. "The control of follicle development ovulation and luteal function" en *Lessons from in vitro fertilization*. Naftolin F., De Cherney A.H. ,eds. Serono Symposia Publications. Raven Press. New York ,1997. 35 pp:177-196 ,1987.
- 33) Jana, S.K., Babu, N., Chattopadhyay, R., Chakravarty, B. and Chaudhury, K. (2010) Upper control limit of reactive oxygen species in follicular fluid beyond which viable embryo formation is not favorable. *Reprod Toxicol* 29:447–451.
- 34) KNOBIL E., WILDT L. "Neuroendocrine control of ovarian function in Higher en *Brain and Pituitary peptides* , Leyendecker G., Stock H. and Wild L. ,eds. Karger Basel New York ,1983. pp 11-27.
- 35) KUIPER GGJM,CARLSSON B,GRANDIEN K, ENMARK E, HAGGBLAD J, NILSSON S and GUSTAFFSSON JA "Comparison of the ligand binding specificity and transcript tissue distribution of estrogen receptors  $\alpha$  and  $\beta$  *Endocrinology* 138:863-870 1997
- 36) LEYENDECKER G., WILDT L. "Treatment of infertility with pulsatile administration of GnRH in hypothalamic Amenorrhea" en *Brain and Pituitary peptides*, Leyendecker G., Stock H. and Wild L. ,eds. Karger Basel New York 1983, pp 89-112
- 37) Lykkesfeldt, J. (2007) Malondialdehyde as biomarker of oxidative damage to lipids caused by smoking. *Clin Chim Acta* 380:50–58.
- 38) Mallol Mirón J, Giralte Batista M, Nogués Lloret MR, Sureda Batlle FX, Romeu Ferrán M, Mulero Abellán M. Concepto y valoración del estrés oxidativo. En: Longevidad. Tratado integral sobre la salud en la segunda mitad de la vida. Salvador-Carulla L, Cano Sánchez A, Cabo-Soler JR (eds.). Editorial Médica Panamericana, Madrid 2004; pp.86-95..
- 39) Oyawoye, O., Abdel Gadir, A., Garner A., Constantnovici, N MAYO K.E. "Inhibin and Activin. Molecular Aspect of regulation and function." *Trends Endocrinol Metab.* 5:407-415 ,1994.
- 40) Perrett,C. and Hardiman, P. (2003) Antioxidants and reactive oxygen species in follicular fluid of women undergoing IVF: relationship to outcome. *Hum Reprod* 18:2270–2274.
- 41) Palacios,S, A Jurado, C Menéndez, 2000, Menopausia, in Tresguerres JAF, Aguilar Benítez de Lugo E, Devesa Múgica J, and Moreno Esteban

B (eds), Tratado de endocrinología básica y clínica: Madrid, Editoria Síntesis, p. 865-909.

- 42) K Pantos<sup>1</sup>, M Simopoulou<sup>2</sup>, A Pantou<sup>1</sup>, ARapani<sup>2</sup>, P Tsioulou<sup>2</sup>, N Nitsos<sup>3</sup>, S Syrkos<sup>1</sup>, A Pappas<sup>1</sup>, M Koutsilieris<sup>2</sup>, K Sfakianoudis<sup>1</sup>. A Case Series on Natural Conceptions Resulting in Ongoing Pregnancies in Menopausal and Prematurely Menopausal Women Following Platelet-Rich Plasma Treatment Case Reports Cell Transplant . Sep-Oct 2019;28(9-10):1333-1340. doi: 10.1177/0963689719859539. Epub 2019 Jul 4
- 43) Paszkowski T, Traub AI, Robinson SY and McMaster D (1995) Selenium dependent glutathione peroxidase activity in human follicular fluid. ClinChim Acta 236,173–180.
- 44) P Pfeilschifter J, Koditz R, Pfohl M, Schatz H. Changes in proinflammatory cytokine activity after menopause. Endocr Rev. 2002 Feb; 23(1): 90-119.
- 45) Quiles JL, Ochoa JJ, Huertas JR, Mataix J. Aspectos mitocondriales del envejecimiento. Papel de la grasa de La dieta y el estrés oxidativo. Endocrinología y nutrición 2004; 51: 107-120
- 46) Reiter,RJ, D X Tan, S Burkhardt, 2002, Reactive oxygen and nitrogen species and cellular and organismal decline: amelioration with melatonin: Mech.Ageing Dev., v. 123, p. 1007-1019.
- 47) ROA J, AGUILAR E, DIEGUEZ C, PINILLA L, TENA-SEMPERE M. “New frontiers in kisspeptin/GPR 54 physiology as fundamental gatekeepers of reproductive function” Frontiers in Neuroendocrinology 29:48-69, 2008
- 48) **Rodrigues P, Limback D, McGinnis LK, Plancha CE, Albertini** Oogenesis: Prospects and challenges for the future J cell Physiol 216: 355-365 ( 2008)
- 49) Sastre J, Pallardo FV, Viña J: Mitochondrial oxidative stress plays a key role in aging and apoptosis. IUBMB Life 2000; 45: 427-435.
- 50) Shacter, E. (2000) Quantification and significance of protein oxidation in biological samples. Drug Metab Rev 32:307–326.
- 51) Sohal RS, Mockett RJ, Orr WC. Mechanisms of aging: an appraisal of the oxidative stress hypothesis. Free Rad Biol Med 2002; 33: 575-586.
- 52) Stadtman ER. Protein oxidation and aging. Science 1992; 257: 1220-1224.

- 53) K Sfakianoudis <sup>1</sup>, M Simopoulou <sup>2</sup>, S Grigoriadis <sup>2</sup>, A Pantou <sup>1</sup>, P Tsioulou <sup>2</sup>, E Maziotis <sup>2</sup>, A Rapani <sup>2</sup>, P Giannelou <sup>1 2</sup>, N Nitsos <sup>1</sup>, G Kokkali <sup>1</sup>, M Koutsilieris <sup>2</sup>, K Pantos <sup>1</sup> Reactivating Ovarian Function through Autologous Platelet-Rich Plasma Intraovarian Infusion: Pilot Data on Premature Ovarian Insufficiency, Perimenopausal, Menopausal, and Poor Responder Women *J Clin Med* 2020 Jun 10;9(6):1809. doi: 10.3390/jcm9061809
- 54) Taniyama Y, Griendling KK. Reactive oxygen species in the vasculature: molecular and cellular mechanisms. *Hypertension*. 2003; 42:1075-1081.
- 55) Thomas FH, Walters KA, Telfer EE. How to make a good oocyte: an update on in-vitro models to study follicle regulation. *Hum Reprod Update* 2003;9:541
- 56) Tresguerres JAF, Tresguerres Centeno AF, Salamé F, 2000, Reproducción II: Eje hipotálamo-hipófiso-ovárico, in Tresguerres JAF, Aguilar Benítez de Lugo E, Devesa Múgica J, and Moreno Esteban B (eds), *Tratado de endocrinología básica y clínica*: Madrid, Editorial Síntesis, p. 621-653.
- 57) Tresguerres, JAF, Tresguerres AF, Ariznavarreta C "Envejecimiento del Sistema Endocrino" *Rev Geriatria y Gerontologia* En prensa 2006
- 58) TRESGUERRES J.A.F, TRESGUERRES CENTENO AF, SALAMÉ F." Reproducción II. El eje hipotálamo-hipófiso-ovárico", en *fisiología Humana* J.A.F. Tresguerres ,eds Mc Graw Hill ,2020. New York . pp
- 59) TRESGUERRES JAF, SALAZAR NUSSIO V "Endocrinología Reproductiva" *Avances en Farmacología y Farmacoterapia Acción Medica* Madrid 2003, pp149-192
- 60) TRESGUERRES J.A.F. Fisiopatología de la Reproducción en "Principios de Fisiopatología para la atención Farmacéutica Módulo II" Editorial BGA Asesores Madrid (2008) pp 211-234109.
- 61) Valgimigli M, Merli E, Malagutti P, Soukhomovskaia O, Cicchitelli G, Macri G, Ferrari R. Endothelial dysfunction in acute and chronic coronary syndromes: evidence for a pathogenetic role of oxidative stress. *Arch Biochem Biophys*. 2003;420:255-261.
- 62) Van Remmen H, Richardson A: Oxidative damage to mitochondria and aging. *Exp Gerontol* 2001; 36: 957-968.
- 63) Wen X, Li D, Tozer AJ, Docherty SM, Iles RK. Estradiol, progesterone, testosterone profiles in human follicular fluid and cultured granulosa

cells from luteinized pre-ovulatory follicles. *Reprod Biol Endocrinol* 2010;8:117.

- 64) WEISS G. "Physiology of Relaxin en Gynecological Endocrinology" Gold J.J. and Josimovitch J.B. ,eds. Plenum Press New York, London ,1989. pp 83-88.
- 65) XIAO S., ROBERTSON D.M., FINDLAY J.K. "Effects of activin and FSH-supressing protein follistatin on FSH receptors and differentiation of cultures rat granulosa cells. *Endocrinology* 131:1009-1016 ,1992.
- 66) ZELEZNIK A.J.: "Follicle selection in primates" en *Follicular Development and the ovulatory response* Tsafiri A and Dekel N. ,eds. Serono Symposia Review 23: 1-10 ,1989.

—