



PERINATOLOGÍA Y REPRODUCCIÓN HUMANA

www.elsevier.es/rprh



REVISIÓN

Avances recientes en la fisiología ovárica



L. Arce Sánchez^a, F. Larrea Gallo^b y S. Lira-Albarrán^{b,*}

^aDepartamento de Endocrinología, Instituto Nacional de Perinatología, México D.F., México

^bDepartamento de Biología de la Reproducción, Instituto Nacional de Ciencias Médicas y Nutrición, México D.F., México

Recibido el 20 de junio de 2015; aceptado el 28 de agosto de 2015

PALABRAS CLAVE

Ovario;
Células madre
ováricas;
Función ovárica;
Ovocitos

Resumen Desde mediados de la década de 1950 se aceptó el concepto que el número de ovocitos primarios está determinado desde el nacimiento. En 2004 inició el cambio de este paradigma de la fisiología ovárica al identificarse células madre de la línea germinal mitóticamente activas durante la vida posnatal en el ovario murino. En 2012 se identificó el equivalente de estas células en el ovario humano producto de un protocolo de clasificación de células activadas por fluorescencia que permitió su purificación y caracterización. La potencial aplicación de las células madre de origen ovárico hará posible asegurar la conservación de la función ovárica en condiciones clínicas, en donde la actividad reproductiva podría verse afectada, como es el caso de mujeres jóvenes con cáncer, que requieren de tratamiento que en la mayoría de los casos resulta en alteraciones de la función hormonal y gametogénica del ovario.

© 2015 Instituto Nacional de Perinatología Isidro Espinosa de los Reyes. Publicado por Masson Doyma México S.A. Este es un artículo Open Access bajo la licencia CC BY-NC-ND (<http://creativecommons.org/licenses/by-nc-nd/4.0/>).

KEYWORDS

Ovary;
Ovarian stem cells;
Ovarian physiology;
Oocyte

Recent advances in the ovarian physiology

Abstract Since the early 1950s it was accepted the concept that primary oocyte number is determined since the newborn period. In 2004 initiated the change of this paradigm of ovarian physiology through identification of mitotically active germ line stem cells during postnatal life in the murine ovary. In 2012, it was identified the equivalent of these cells in the human ovary using a fluorescence-activated cell sorting based protocol that permitted the purification of mitotically active ovarian cells. The potential application of ovarian stem cells could in the future improve the actual strategies of conservation of reproductive capacity in clinical conditions where reproductive ability may be impaired, as in the case of women with breast cancer, who require treatment that would cause disturbances of hormonal and gametogenic function.

© 2015 Instituto Nacional de Perinatología Isidro Espinosa de los Reyes. Published by Masson Doyma México S.A. This is an open access article under the CC BY-NC-ND license (<http://creativecommons.org/licenses/by-nc-nd/4.0/>).

* Autor para correspondencia.

Correo electrónico: saul.liraa@incmnsz.mx (S. Lira-Albarrán)

En 1921 Pearl y Schoppe¹ plantearon como una doctrina biológica básica que “durante la vida de un individuo del sexo femenino no hay ni habrá un incremento en el número preestablecido de los ovocitos primarios prenatalmente”. Este concepto se convirtió en uno de los dogmas más representativos de la Biología de la Reproducción desde mediados del siglo pasado y persistió así por más de 50 años². Sin embargo, hace tan solo una década Tilly y cols.³ reportaron en el ovario murino la presencia de células madre mitóticamente activas dando lugar al cambio del paradigma y al inicio del debate sobre la capacidad regenerativa de la línea germinal ovárica durante la vida posnatal³. El objetivo de este trabajo es revisar de la literatura las evidencias que apoyan la existencia de células madre de origen ovárico (Tabla 1) y que plantean, al mismo tiempo, nuevas opciones preventivas o terapéuticas en ciertos casos de infertilidad en la mujer.

El inicio del cambio en el paradigma de la reserva ovárica posnatal

En 2004 Tilly y col.³ informaron que los ovarios de ratones jóvenes y adultos poseen células germinales con la actividad mitótica necesaria para mantener a la poza de folículos; respaldado en la tasa observada de degeneración de ovocitos (atresia) y su aclaramiento. Este grupo de trabajo primero identificó, en la superficie epitelial ovárica de ratones jóvenes y adultos, células ovoides grandes semejantes a células germinales de ovarios murinos fetales⁴, positivas para MVH (Mouse Vasa Homologue), gen evolutivamente conservado que se expresa en células germinales y que regula además el ciclo celular por su actividad de RNA helicasa^{5,6}. El potencial proliferativo de estas células se comprobó mediante la incorporación de 5-bromodesoxiuridina y su importancia para repoblar la poza de folículos posnatales se validó con busulfán⁷, un agente tóxico para las células germinales, que elimina la reserva de folículos primordiales sin inducir atresia.

Por otra parte, los ovarios de ratones silvestres injertados, en ratones hembra transgénicos con expresión ubicua de la proteína verde fluorescente⁸ (*Green Fluorescence Protein*, GFP) mostró infiltrarse con células germinales positivas a GFP y rodearse de células somáticas GFP negativas en los injertos. Lo anterior sugirió que las células germinales transgénicas iniciaron foliculogénesis con las células somáticas residentes de tipo silvestre. En conjunto, estos datos apoyaron que las células germinales ovoides grandes en la superficie del epitelio ovárico podrían ser células germinales proliferativas que sostienen la producción de ovocitos y folículos en el ovario del mamífero en la etapa posnatal³.

Los resultados obtenidos de esta publicación establecieron la posibilidad de la existencia de células madre de la línea germinal (*Germinal Stem Cells*, GSC) en ovarios de mamíferos y de una población estable de células germinales (folículos primordiales) no renovable durante la función reproductiva del ovario. Tilly y cols.⁹ sugirieron que es factible que ambos puntos de vista coexistan, es decir la presencia de una población fija de ovocitos al nacimiento que normalmente no es renovable y la presencia de GSC en el ovario que posean la capacidad de activarse y diferenciarse en folículos primordiales bajo circunstancias especiales. Para resolver este debate fue necesario demostrar la presencia de GSC funcionales en ovarios en etapa pospuberal.

Identificación de células madre ováricas en el modelo murino

En 2009 el grupo de Zou aisló con éxito GSC de ovarios de ratones neonatos y adultos¹⁰. Las células se identificaron en el epitelio de la superficie ovárica con base a los mismos criterios utilizados por Tilly: la expresión de marcadores específicos de la línea germinal evolutivamente conservados (MVH) y la evidencia de actividad mitótica⁹. Las líneas murinas de GSC se establecieron mediante el uso de anticuerpos específicos a MVH con la finalidad de purificarlas de ovarios

Tabla 1 Hallazgos que apoyan la existencia de células madre de origen ovárico

| Referencia | Autores | Hallazgo principal |
|--------------------------------|---|--|
| Nature 2004;428:145-50 | Johnson J, Canning J, Kaneko T, Pru JK, Tilly JL. | Establecieron la existencia de células germinativas proliferativas que mantienen la producción de folículos y ovocitos en el ovario mamífero posnatal |
| Nat Cell Biol 2009;11:631-6 | Zou K, Yuan Z, Yang Z, Luo H, Sun K, Zhou L, et al | Aislaron con éxito células madre de ovarios murinos neonatales y adultos, usando perlas inmunomagnéticas acopladas con un anticuerpo a MVH |
| Aging (Albany NY) 2009;1:971-8 | Niikura Y, Niikura T, Tilly JL. | Plantearon que los ovarios murinos viejos tienen una población escasa de células germinales premeióticas que mantiene la capacidad de formar ovocitos si se expone a un ambiente joven hospedero |
| Differentiation 2010;79:159-70 | Pacchiarotti J, Maki C, Ramos T, Marh T, Howerton K, Wong J, et al. | Demostraron la existencia de una población de células madre de línea germinal en el ovario murino posnatal con características de multipotencialidad |
| Nat Med 2012;18:413-21 | White YA, Woods DC, Takai Y, Ishihara O, Seki H, Tilly JL. | Concluyeron que los ovocitos de mujeres en edad reproductiva tienen, en forma similar a los ratones adultos, escasas células germinales mitóticamente activas que se pueden propagar y generar ovocitos <i>in vitro</i> e <i>in vivo</i> |

tanto de ratones neonatos como adultos. Las poblaciones (GSC neonatales y adultas), discriminadas por esta metodología, mostraron su capacidad de proliferar en cultivo durante más de 15 meses^{9,10} y viabilidad después de su criopreservación. La caracterización de estas líneas celulares a través del uso de diferentes biomarcadores confirmó su naturaleza germinal, además de mostrar un cariotipo normal, elevada actividad de telomerasa y un patrón de impronta femenino¹⁰.

La evaluación funcional de las GSC en términos de su citodiferenciación en folículos primordiales en ratones hembras depletados de células germinales y transplantados con células transgénicas con expresión constitutiva de GFP, mostró la capacidad de estas células de diferenciarse en folículos primordiales con diferentes grados de desarrollo. Estos resultados, apoyan estudios previos³ y confirman la presencia de una poza renovable de células germinales en el ovario con la capacidad de diferenciación en folículos maduros y con potencial reproductivo conservado¹⁰.

Por otra parte, en 2010 Pacchiarotti y colaboradores¹¹ demostraron la existencia de una población de células madre de línea germinal en el ovario murino posnatal con la característica de multipotencialidad, utilizando un modelo transgénico en el que la proteína GFP se expresa bajo el promotor de Oct-4 específico de la línea de células germinales. Las FGSC aisladas mantuvieron después de un año de cultivo sus características y actividad de telomerasa, expresaron marcadores de células madre y de línea germinal y presentaron cariotipo normal¹¹. En forma paralela, el grupo de Tilly reportó que las células madre ovogénicas inactivas en ovarios atroficos de ratones viejos tienen la capacidad de reiniciar la ovogénesis *in vivo* cuando se exponen a un ambiente ovárico de adultos jóvenes, lo cual sugirió que el envejecimiento ovárico puede ser reversible¹². Este mismo grupo de trabajo también logró obtener ovocitos maduros empleando como célula precursora a las células madre ovogénicas con la finalidad de injertarlas a un modelo de ovario murino sin folículos primordiales probando su completa funcionalidad.

Sin embargo, para considerar la posibilidad de la utilidad clínica de estas células fue necesario demostrar que existen células productoras de ovocitos semejantes en ovarios de mujeres en edad reproductiva¹³.

Identificación de células madre en ovarios humanos

En 2012 Telfer y colaboradores¹⁴ identificaron y purificaron células ováricas mitóticamente activas (células madre ovogénicas: OSC, *oogonial stem cells*) caracterizadas por un perfil de expresión génica compatible con células germinales primitivas aisladas por la técnica de clasificación de células activadas por fluorescencia (FACS, por sus siglas en inglés). Estos hallazgos ofrecen la oportunidad de desarrollar nuevas estrategias de preservación de la fertilidad en ciertas circunstancias clínicas particulares. Un ejemplo claro, es su utilidad en el campo de la oncofertilidad, en mujeres jóvenes afectadas con cáncer, en quienes el tratamiento resulta generalmente en la pérdida de la función reproductiva¹⁵. A este respecto, existen diferentes alternativas para la preservación y rescate de la función hormonal y repro-

ductiva del ovario. Por ejemplo, la transposición ovárica, la criopreservación de embriones y de los ovocitos, así como la criopreservación de tejido ovárico¹⁶.

Es relevante señalar que en mujeres en estadios prepúbereales, la criopreservación del tejido ovárico representa, hasta el momento, la única opción disponible para la conservación de la capacidad reproductiva, sobre todo cuando el tratamiento oncológico por las condiciones clínicas de la mujer, no puede retrasarse^{17,18}. Esta posibilidad permite que el tejido ovárico criopreservado, recupere, aún meses después, su capacidad funcional al ser reimplantado *in situ* en las mujeres afectadas^{19,20}.

Por otra parte, la utilización de células madre de origen ovárico, ofrece también la posibilidad, como es el caso de mujeres afectadas de enfermedades malignas, de obtener, a partir de ellas, células germinales con la capacidad de citodiferenciarse en folículos ováricos funcionalmente activos. Esta importante observación, de la presencia de células madre en el ovario y su capacidad *in vitro* de citodiferenciarse en células germinales, representó las bases para el desarrollo exitoso del denominado ovario artificial^{21,22}. Esta nueva y revolucionaria alternativa de tratamiento, ya probada en modelos murinos y primates no humanos, resultará indudablemente en su aplicación en el modelo humano^{23,24}. En relación con este punto, existe todavía un largo camino por recorrer, sobre todo para descartar alteraciones en el proceso de la impronta genética y de la conservación de los mecanismos epigenéticos responsables del desarrollo ovocitario en condiciones normales^{25,26}.

Conclusiones

Los avances recientes en fisiología ovárica han permitido cuestionar paradigmas tradicionales en el área de la endocrinología reproductiva y en particular los relacionados con la población no renovable de células germinales al nacimiento. La aplicación que resulte de estos hallazgos será de invaluable ayuda en mujeres en quienes el tratamiento de enfermedades malignas resulta en la pérdida de la función hormonal y reproductiva del ovario.

Conflicto de intereses

Los autores declaran no tener ningún conflicto de intereses.

Bibliografía

1. Pearl R, Schoppe WF. Studies on the physiology of reproduction in the domestic fowl. *J Exp Zool* 1921;34:101-18.
2. Zuckerman S. The number of oocytes in the mature ovary. *Recent Prog Horm Res* 1951;6:63-8.
3. Johnson J, Canning J, Kaneko T, Pru JK, Tilly JL. Germline stem cells and follicular renewal in the postnatal mammalian ovary. *Nature* 2004;428:145-50.
4. Morita Y, Manganaro TF, Tao XJ, Martimbeau S, Donahoe PK, Tilly JL. Requirement for phosphatidylinositol-3'-kinase in cytokine-mediated germ cell survival during fetal oogenesis in the mouse. *Endocrinology* 1999;140:941-9.

5. Castrillon DH, Quade BJ, Wang TY, Quigley C, Crum CP. The human VASA gene is specifically expressed in the germ cell lineage. *Proc Natl Acad Sci USA* 2000;97:9585-90.
6. Yajima M, Wessel GM. The multiple hats of Vasa: its functions in the germline and in cell cycle progression. *Mol Reprod Dev* 2011;78:861-7.
7. Generoso WM, Stout SK, Huff SW. Effects of alkylating chemicals on reproductive capacity of adult female mice. *Mutat Res* 1971;13:172-84.
8. Hadjantonakis AK, Gerstenstein M, Ikawa M, Okabe M, Nagy A. Generating Green fluorescent mice by germline transmission of Green fluorescent ES cells. *Mech Dev* 1988;76:79-90.
9. Tilly JL, Telfer EE. Purification of germline stem cells from adult mammalian ovaries: a step closer towards control of the female biological clock? *Mol Hum Reprod* 2009;15:393-8.
10. Zou K, Yuan Z, Yang Z, Luo H, Sun K, Zhou L, et al. Production of offspring from a germline stem cell line derived from neonatal ovaries. *Nat Cell Biol* 2009;11:631-6.
11. Pacchiarotti J, Maki C, Ramos T, Marh T, Howerton K, Wong J, et al. Differentiation potential of germ line stem cells derived from the postnatal mouse ovary. *Differentiation* 2010;79:159-70.
12. Niikura Y, Niikura T, Tilly JL. Aged mouse ovaries possess rare premeiotic germ cells that can generate oocytes following transplantation into a young host environment. *Aging (Albany NY)* 2009;1:971-8.
13. White YA, Woods DC, Takai Y, Ishihara O, Seki H, Tilly JL. Oocyte formation by mitotically active germ cells purified from ovaries of reproductive-age woman. *Nat Med* 2012;18:413-21.
14. Telfer EE, Albertini DF. The quest of human ovarian stem cells. *Nat Med* 2012;18:353-4.
15. Woodruff TK. From the bench to bedside to babies: translational medicine made possible by funding multidisciplinary team science. *J Assist Reprod Genet* 2013;30:1249-53.
16. Donnez J, Dolmans MM. Fertility preservation in women. *Nat Rev Endocrinol* 2013;9:735-49.
17. Jadoul P, Dolmans MM, Donnez J. Fertility preservation in girls during childhood: is it feasible, efficient and safe and to whom should it be proposed? *Hum Reprod Update* 2010;16:617-30.
18. Rodríguez-Wallberg KA, Oktay K. Fertility preservation medicine: options for young adults and children with cancer. *J Pediatr Hematol Oncol* 2010;32:390-6.
19. Silber SJ. Ovary cryopreservation and transplantation for fertility preservation. *Mol Hum Reprod* 2012;18:59-67.
20. Donnez J, Dolmans M, Pellicer A, Díaz-García C, Sanchez Serrano M, Schmidt KT, et al. Restoration of ovarian activity and pregnancy after transplantation of cryopreserved ovarian tissue: a review of 60 cases of reimplantation. *Fertil Steril* 2013;99:1503-13.
21. Vanacker J, Luyckx V, Dolmans MM, Des Rieux A, Jaeger J, Van Langendockt A, et al. Transplantation of an alginate-matrigel matrix containing isolated ovarian cells: first step in developing a biodegradable scaffold to transplant isolated preantral follicles and ovarian cells. *Biomaterials* 2012;33:6079-85.
22. Luyckx V, Dolmans MM, Vanacker J, Legat C, Fortuño Moya C, Donnez J, et al. A new step toward the artificial ovary: survival and proliferation of isolated murine follicles after autologous transplantation in a fibrin scaffold. *Fertil Steril* 2014;101:1149-56.
23. Xu M, Kreeger PK, Shea LD, Woodruff TK. Tissue-engineered follicles produce live, fertile offspring. *Tissue Eng* 2006;12:2739-46.
24. Xu M, Fazleabas AT, Shikanov A, Jackson E, Barret SL, Hirshfeld-Cytron J, et al. In vitro oocyte maturation and preantral follicle culture from the luteal-phase baboon ovary produce mature oocytes. *Biol Reprod* 2011;84:689-97.
25. Vermeiden JP, Bernardus RE. Are imprinting disorders more prevalent after human *in vitro* fertilization or intracytoplasmic sperm injection? *Fertil Steril* 2013;99:642-51.
26. Society of Obstetricians and Gynaecologists of Canada; Okun N, Sierra S. Pregnancy outcomes after assisted human reproduction. *J Obstet Gynaecol Can* 2014;36:64-83.