

## Actualizaciones

### Técnicas experimentales para el estudio de la angiogénesis en enfermedades reproductivas femeninas

*Experimental techniques for the study of angiogenesis in female reproductive diseases*

Lic. Scotti, Leopoldina\*; Dra. Abramovich, Dalhia\*; Dra. Irusta, Griselda\*; Lic. Pazos, Camila\*; Lic. Pascuali, Natalia\*; Lic. Haro Durand, Luis\*; Dr. de Zúñiga IgnacioE, Dra. Tesone, Marta\*\* y Dra. Parborell, Fernanda\*  
e-mail: fparborell@gmail.com

\*Instituto de Biología y Medicina Experimental (IByME)-CONICET, Buenos Aires, Argentina

& Centro Médico PREGNA Medicina Reproductiva

# Facultad de Cs. Exactas y Naturales, UBA.

#### Resumen

El desarrollo vascular en el tracto reproductivo femenino es un proceso que se encuentra restringido a la formación del cuerpo lúteo y a la proliferación del endometrio uterino durante los ciclos menstruales. Se han identificado numerosos inductores de la angiogénesis, que incluyen, entre otros, los miembros del factor de crecimiento fibroblástico (FGF) y la familia del factor de crecimiento del endotelio vascular (VEGF), angiopoyetinas (ANGPT), factor de crecimiento transformante (TGF) y factor derivado de plaquetas (PDGF). Los defectos en la angiogénesis ovárica contribuyen a una variedad de desórdenes, incluyendo anovulación e infertilidad, pérdida de embarazo, síndrome de hiperestimulación ovárica (SHEO), síndrome de ovario poliquístico (SOP) y neoplasmas ováricos. Es decir, el endotelio es una fuente y un blanco de sustancias vasoactivas que son secretadas debido a las condiciones que se desencadenan durante los desórdenes ya mencionados. Para evaluar los mecanismos bioquímicos y moleculares que participan en la angiogénesis, se han desarrollado métodos in vitro (migración por herida, tubulogénesis, etc.) e in vivo (implante de Matrigel, membrana corionalantoide, etc.). Los ensayos in vitro pueden ser útiles para validar los primeros pasos de la angiogénesis pero deben ser confirmados por estudios in vivo. En particular, los ensayos in vitro e in vivo descritos en este trabajo para evaluar el desarrollo de los vasos pueden ser aplicados para el estudio de desórdenes reproductivos con alteraciones en la angiogénesis (SHEO, SOP, cáncer de ovario, etc.) mediante la utilización del suero, líquido peritoneal, fluido folicular o de biopsias de distintos tejidos provenientes de las pacientes.

**Palabras clave:** angiogénesis, reproducción femenina, endotelio, pericitos.

#### Abstract

*Vascular development is a process mainly limited to the female reproductive system during corpus luteum formation and proliferation of uterine endometrium in menstrual cycles. Numerous inducers of angiogenesis have been identified, including the members of the FGF-2 (Basic Fibroblast Growth Factor) and Vascular Endothelial Growth Factor A (VEGF) family, angiopoietins, transforming growth factors (TGF) and platelet-derived growth factor (PDGF).*

*Alterations of ovarian angiogenesis contribute to the pathophysiology of different ovarian conditions such as anovulation and infertility, Ovarian Hyperstimulation Syndrome (OHSS), Polycystic Ovary Syndrome (PCOS), pregnancy lost, uterine bleeding, subfertility, endometriosis and ovarian neoplasms. Because of the described reasons, in these pathologic situations, the endothelium would be a potential target due to be the source of vasoactive substances. For the evaluation of biochemical and molecular mechanisms involved in the angiogenesis process, in vitro (wound healing assay, tubular structures formation) and in vivo (Matrigel plug assay, chorioallantoid membrane assay) methodology has been developed. While in vitro assays are useful for the study of early angiogenesis, the observations must be confirmed with in vivo techniques. Particularly, in this review, both in vivo and in vitro assays described are those which are used for the comprehension of reproductive disorders with altered angiogenesis (OHSS, PCOS, ovarian cancer, etc.). These techniques are performed on patient's serum, peritoneal or follicular fluid or tissue biopsies.*

**Key words:** angiogenesis, female reproduction, endothelium, pericitos.

#### Generalidades

La angiogénesis que ocurre en el adulto es el proceso por el cual se forman vasos sanguíneos nuevos

a partir de vasculatura preexistente (1). Esta vasculatura es modificada mediante el brote y crecimiento de nuevos vasos para formar finalmente patrones de vasos interconectados característicos de los vasos sanguíneos maduros. La vasculatura previamente formada debe primero desestabilizarse para permitir la formación de nuevos vasos sanguíneos que irrigen tejidos previamente avasculares. Luego, las células endoteliales proliferan y migran para formar estructuras tubulares inmaduras que terminan siendo redes vasculares interconectadas. Esta vasculatura nueva debe madurar para ser completamente funcional. Durante este proceso, las nuevas células endoteliales se integran y se unen fuertemente a células soporte, como pericitos y células musculares lisas, y a la matriz que rodea el vaso (2) (FIGURA 1).

El desarrollo vascular, en el tracto reproductivo femenino, es un proceso que se encuentra restringido a la formación del cuerpo lúteo y a la proliferación del endometrio uterino durante los ciclos menstruales. Se han identificado numerosos inductores de la angiogénesis (3). Estos incluyen, entre otros, los miembros del factor de crecimiento fibroblástico (FGF) y la familia del factor de crecimiento del endotelio vascular (VEGF), angiopoyetinas (ANGPT), factor de crecimiento transformante (TGF) y el factor derivado de plaquetas (PDGF) (4).

Mientras que el VEGF es el principal iniciador de la angiogénesis, ya que estimula la proliferación de células endoteliales y aumenta la permeabilidad vascular, la formación y diferenciación de una red vascular madura y funcional requiere de la acción coordinada de varios factores. Entre estos se encuentran la angiopoyetina 1 y

2 (ANGPT-1 y ANGPT-2), que actúan a través de sus receptores tirosina-quinasa Tie1 y Tie2 (5). Contrariamente al VEGF, la ANGPT-1 es incapaz de estimular la proliferación de células endoteliales pero es indispensable para estabilizar estas células y las células de músculo liso (5). La ANGPT-1 es capaz de inducir la fosforilación de Tie-2, que desencadena su acción biológica. La ANGPT-2 se une al Tie-2 con la misma afinidad que la ANGPT-1, pero no fosforila al receptor, por lo tanto, actúa como un antagonista natural de ANGPT-1 (5). Trabajos previos han demostrado la expresión de ARNm de VEGF, ANGPT-1 y 2 en el ovario de la rata (5), bovinos (6) y monos (7), lo que sugiere el rol de estos factores en la angiogénesis ovárica. Otro factor angiogénico potente es el PDGF, que recluta las células periendotheliales (pericitos y células de músculo liso) actuando concertadamente con el sistema de ANGPT (8). En particular, se ha encontrado expresión de miembros de la familia de PDGF en ovarios de ratones, ratas y humanos (9). Los efectos biológicos de estos factores están mediados por dos receptores del tipo tirosina-quinasa, receptores PDGF $\alpha$  y  $\beta$ . Las isoformas PDGFA, PDGFB y PDGFC se unen al receptor PDGF $\alpha$ , mientras que PDGFB y PDGFD se unen al receptor PDGF $\beta$ .

En ovario de rata se ha descrito la expresión y localización celular de ANGPT-1, ANGPT-2 y de su receptor Tie-2, así como también el de VEGF y su receptor FLK-1, durante la foliculogénesis (10). Además, en nuestro laboratorio se ha demostrado que la inhibición de VEGF y ANGPT-1, mediante la administración local en el ovario de rata de Trap (inhi-

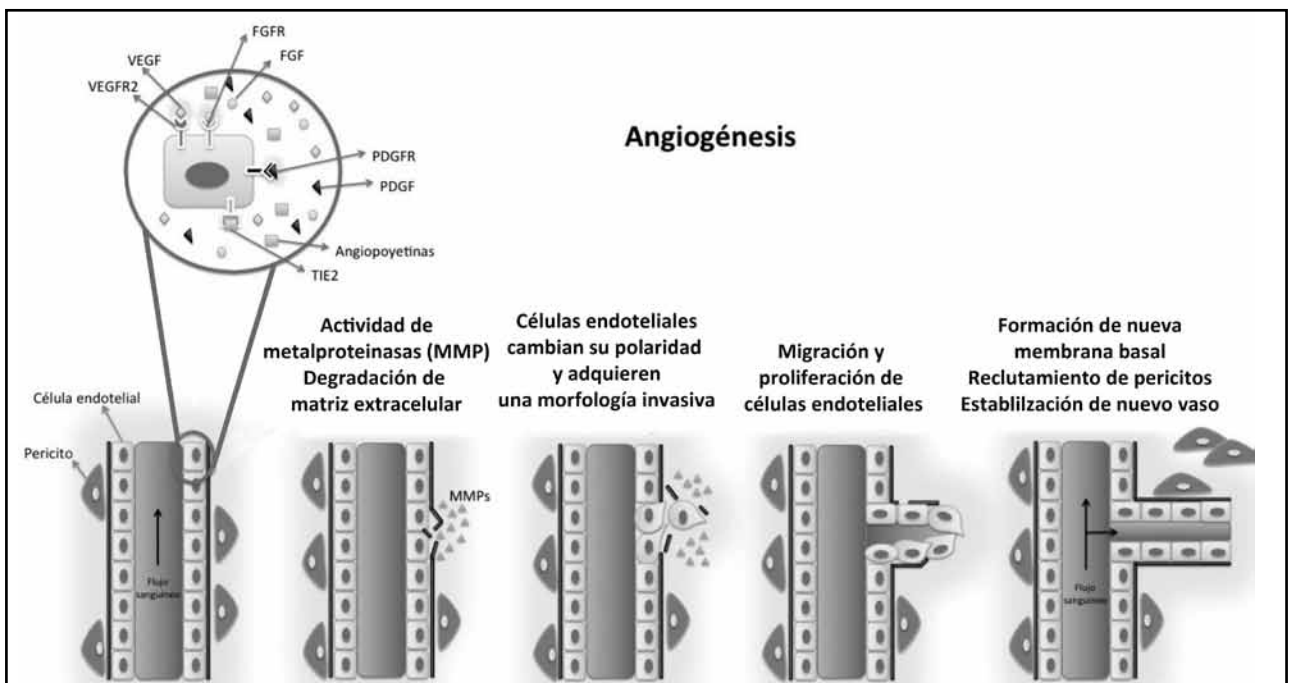


Figura 1. Descripción de los distintos pasos de la angiogenesis.

bidor de VEGF) o de un anticuerpo neutralizante anti-ANGPT-1, causa un desbalance en la relación proteínas antiapoptóticas:proapoptóticas, que lleva a un gran número de folículos a la atresia (11,12).

Por otra parte, recientemente hemos observado que un inhibidor selectivo de los receptores PDGF (AG1295) aumenta el número de folículos atrésicos en ovarios procedentes de ratas tratadas con gonadotrofinas. En este mismo modelo, el tratamiento con AG1295 provoca la aparición de folículos hemorrágicos (*resultados no publicados aún*). Estos resultados sugieren que la inhibición del sistema de PDGF provoca la falta de reclutamiento de células periendotheliales en el ovario, que son esenciales para la madurez de los vasos recién formados.

*Esto es de especial interés debido a que los defectos en la angiogénesis ovárica contribuyen a una variedad de desórdenes, incluyendo anovulación e infertilidad, pérdida de embarazo, SHEO, SOP y neoplasmas ováricos (13,14).*

### **Angiogénesis alterada I: síndrome de hiperestimulación ovárica (SHEO)**

El SHEO es una complicación iatrogénica severa del crecimiento y la maduración folicular ocasionada por la inducción de la ovulación en tratamientos de fertilización asistida (ART), en los cuales se realiza hiperestimulación ovárica con altas dosis de gonadotrofinas. La prevalencia de SHEO se encuentra entre el 5-10% de las pacientes que se someten a ART. Además, la forma severa de SHEO afecta al 0,5-5% de estas pacientes y son necesarios cuidados intensivos inmediatos. Se han descrito varios sistemas de clasificación del SHEO, si bien el más aceptado es el de Golan y cols. (1988) (15), quienes lo clasifican en tres estadios y 5 grados:

**Estadio leve:** *grado 1:* presencia de distensión/malestar abdominal; *grado 2:* igual al anterior, más vómitos o diarrea y ovarios de 5-12 cm.

**Estadio moderado:** *grado 3:* características similares al grado leve más la presencia ecográfica de ascitis.

**Estadio severo:** *grado 4:* características similares al grado moderado, más signos de ascitis/hidrotórax o dificultad respiratoria y *grado 5:* todo lo anterior, más cambios en el volumen sanguíneo, aumento de la viscosidad sanguínea por hemoconcentración, trastornos de la coagulación, alteraciones de la función renal y problemas tromboembólicos.

Actualmente, los criterios utilizados para predecir el desarrollo de SHEO son: niveles de estradiol (E2) (mayor de 4000 pg/ml), número de folículos en el día de administración de gonadotrofina coriónica humana (hCG) (más de 20 folículos mayores a 18 mm)

y la presencia de ovarios poliquísticos por ultrasonido. Las características del síndrome involucran: aumento en el tamaño del ovario, sobreproducción de hormonas esteroideas y sustancias vasoactivas, que contribuyen al aumento de permeabilidad vascular, presencia de ascitis y formación de quistes, que pueden involucrar al tejido luteínico y ser hemorrágicos. Estas características estarían indicando que la angiogénesis juega un papel importante en el desarrollo de esta patología, si bien en la actualidad es escasa la información disponible acerca de la patofisiología de la enfermedad y de sus posibles tratamientos. A pesar del monitoreo de la ovulación por ultrasonido y de la medición de los niveles de E2, estas medidas son aún insuficientes para detectar los casos de SHEO. Debido a ello, actualmente se aplican además otras medidas para evitar una respuesta ovárica exagerada; como son la cancelación del protocolo, disminución de la dosis de hCG y el reemplazo de hCG por agonistas de la GnRH como inductores de la ovulación. Se ha observado que los niveles séricos de VEGF aumentan y, por consiguiente, se incrementa la permeabilidad vascular luego de la administración de hCG en mujeres hiperestimuladas con riesgo a desarrollar SHEO (16).

### **Angiogénesis alterada II: SOP**

El SOP es un síndrome complejo caracterizado por una disfunción ovárica que frecuentemente se presenta asociado a la resistencia a la insulina como condición sistémica. Sus manifestaciones se observan no solo durante la edad reproductiva de la mujer, sino a través de toda su vida, con riesgo de padecer diabetes tipo 2, síndrome metabólico y con las consiguientes complicaciones psicológicas que genera, como ansiedad y depresión. Sus principales características son el hiperandrogenismo y la morfología de ovario poliquístico (17). Presenta como principales manifestaciones clínicas la infertilidad, ausencia o irregularidades menstruales, signos de exceso de andrógenos y obesidad (18).

A pesar de ser la alteración endocrina con mayor prevalencia entre las mujeres en edad fértil, su definición aún es controvertida y muchos aspectos de su patofisiología aún no se conocen. Se han realizado varios consensos respecto al diagnóstico de esta patología; actualmente se acepta el acordado en 2003 en Rotterdam, en el que participaron la *European Society of Human Reproduction and Embryology (ESHRE)* y la *American Society for Reproductive Medicine (ASRM)* (19). En esa reunión se concluyó que el SOP es un síndrome caracterizado por diversos signos y síntomas, por lo que la presencia de uno solo de ellos no es suficiente para realizar un diagnóstico. Por ello, se diagnostica a una paciente con SOP cuando presenta al menos dos de los siguientes síntomas: hiperandrogenismo clínico o bioquímico, oligo o anovulación y ovarios

poliquísticos por ultrasonido. Además, el SOP continúa siendo definido como un síndrome, es decir, no existe un único criterio para su diagnóstico. Más aún, continúa siendo también un diagnóstico de exclusión, donde es necesario descartar la presencia de otras alteraciones endocrinas conocidas que puedan estar produciendo los mismos signos y síntomas para diagnosticar SOP (19).

Las pacientes con SOP tienen altos niveles de VEGF en suero (20,21), el que proviene de una elevada producción ovárica (22). Por esta razón, tienen mayor riesgo de desencadenar SHEO al ser estimuladas con gonadotrofinas (20). El VEGF es el principal candidato involucrado en la patogénesis de SHEO (23), es por esto que las pacientes con SOP, al tener niveles basales elevados de VEGF, son pacientes de riesgo en el caso de una estimulación de la ovulación.

En el SOP el mecanismo autocrino/paracrino en el ovario que culmina con la ovulación de un solo folículo se encuentra alterado. Una de las causas de esta pérdida en la regulación sería el aumento en la expresión de VEGF por las células ováricas, lo que produciría un aumento en el flujo sanguíneo de la cohorte de folículos en desarrollo, que inhibe la atresia folicular y por consiguiente, produce un crecimiento de muchos folículos en forma simultánea en estas pacientes cuando son estimuladas con gonadotrofinas (11). Esta es una de las causas por las que se trata de evitar los protocolos de inducción de la ovulación clásicos y se intenta utilizar el citrato de clomifeno (CC) como primera línea de tratamiento.

En modelos animales de SOP, se ha visto que además del aumento de VEGF en ovario, también está aumentado el sistema de ANGPT y existe un mayor recubrimiento de los vasos sanguíneos con células periendotheliales. En fluido folicular humano proveniente de pacientes con SOP, también se ha encontrado un aumento del sistema de ANGPT-1 (*resultados preliminares*). Es por esto que se propone el estudio de los factores angiogénicos como estrategia de diagnóstico y/o tratamiento para este síndrome (24).

### **Angiogénesis alterada III: neoplasmas ováricos**

Hemos nombrado las características de la angiogénesis fisiológica en cuanto a su transitoriedad y su fina regulación. Las células tumorales producen grandes cantidades de los factores angiogénicos aquí descritos, lo que causa un efecto positivo promoviendo un aumento de la angiogénesis en los tumores. La forma en la cual se da este proceso es objeto de numerosos estudios.

El cáncer de ovario es uno de los tipos de tumores sólidos cuya respuesta a los tratamientos es generalmente temporal. En la mayoría de los casos es recurrente y entre las enfermedades ginecológicas, es una de las que posee una mayor relación fatalidad/caso. Cada año

existen más de 190.000 casos de cáncer de ovario y éste representa el 4% de todos los tipos de cánceres diagnosticados en las mujeres a nivel mundial. Debido a la ausencia de síntomas específicos en los estadios tempranos de esta enfermedad, no existe una estrategia para su detección y al momento de ser diagnosticado, el 75% de los casos ya es completamente metastásico.

El 90% de los casos de cáncer de ovario ocurre de forma esporádica en la población y solo el 10% posee un componente hereditario (25). Cuando esta enfermedad se encuentra en su estadio más avanzado, el mejor tratamiento sería realizar una cirugía apropiada, pero el problema es que no se logra erradicar hasta el último residuo de tejido y por eso se hace imprescindible administrar quimioterapia en la mayoría de las pacientes. La prognosis de esta enfermedad puede estar correlacionada con numerosos factores clínicos y biológicos. El estadio tumoral, el grado de avance y el tamaño de la metástasis se correlaciona con el resultado final luego de la reducción del tumor (26,27). El grado de malignidad de los tumores se clasifica de acuerdo con la Federación Internacional de Ginecología y Obstetricia (FIGO) y abarca los estadios I a IV, que involucran crecimiento del tumor limitado a los ovarios hasta metástasis distante del sitio de origen.

Haciendo mención nuevamente a la terapéutica del cáncer de ovario, cabe destacar que los agentes quimioterapéuticos que se utilizan provocan infertilidad y pérdida en la producción de hormonas sexuales. La combinación de la radioterapia y quimioterapia es la más dañina y en casi el 100% de las pacientes tratadas se desarrolla falla ovárica (28). Además, existen pacientes que recaen y resultan ser resistentes a estas terapias y en estos casos existen limitadas opciones de tratamiento. Es por esta razón que actualmente se están buscando nuevas moléculas blanco, que generalmente consisten en factores asociados a caminos intracelulares de los cuales las células tumorales dependen en cuanto a su proliferación, invasión, metástasis y apoptosis. Debido a esto se están identificando moléculas para futuras terapias que se encuentren alteradas en las células tumorales y que favorezcan su fenotipo tumoral. Estas células poseen diversos procesos alterados, como son: el ciclo celular, caminos intracelulares de señalización, mecanismos angiogénicos y síntesis de receptores de factores de crecimiento. Los vasos sanguíneos intratumorales son muy diferentes de los vasos normales en cuanto a su estructura, función y permeabilidad, lo que dificulta la transferencia de oxígeno y nutrientes, e incluso, de los agentes quimioterapéuticos a las células tumorales (29). La angiogénesis tumoral es un proceso crítico involucrado en el crecimiento y en la metástasis del cáncer de ovario. En cuanto a la inhibición de la angiogénesis como terapia para el tratamiento del

cáncer de ovario, se han realizado diversas estrategias con diferentes blancos, como el VEGF y su receptor por medio de dos estrategias: previniendo la unión del receptor al VEGF o previniendo la activación a nivel intracelular (30). Uno de los primeros compuestos que demostraron poseer efectos significativos en carcinoma de ovario es el bevacizumab, un anticuerpo monoclonal que se une a VEGF, bloqueando su interacción con su receptor. Además, este agente mostró buenos resultados en pacientes con cáncer de ovario recurrente en el 16% de las pacientes sensibles a cisplatino y en el 18% de las pacientes resistentes a éste. Incluso en estos ensayos se ha observado un aumento del período libre de enfermedad, del tradicional 16% al 42% a los 6 meses (31). Sin embargo, en cuanto al tratamiento con bevacizumab, se han realizado distintos ensayos clínicos (GOG 218 e ICON 7) donde se analizó el tiempo y la dosis del inhibidor en combinación con la administración de los quimioterapéuticos. A pesar de los resultados beneficiosos en cuanto al aumento de los períodos libres de enfermedad al combinar bevacizumab con quimioterapia, no se observa aumento en la supervivencia global. Esto, junto con algunos efectos adversos que se observan con estos compuestos y el alto costo que poseen, hace dudar de su real beneficio (32).

### Ensayos in vitro e in vivo para estudiar la angiogénesis ovárica en el tracto reproductivo femenino

Sobre la base de lo descrito anteriormente, la angiogénesis ovárica juega un rol importante en la aparición o desarrollo de SHEO y SOP, como en el cáncer ovárico.

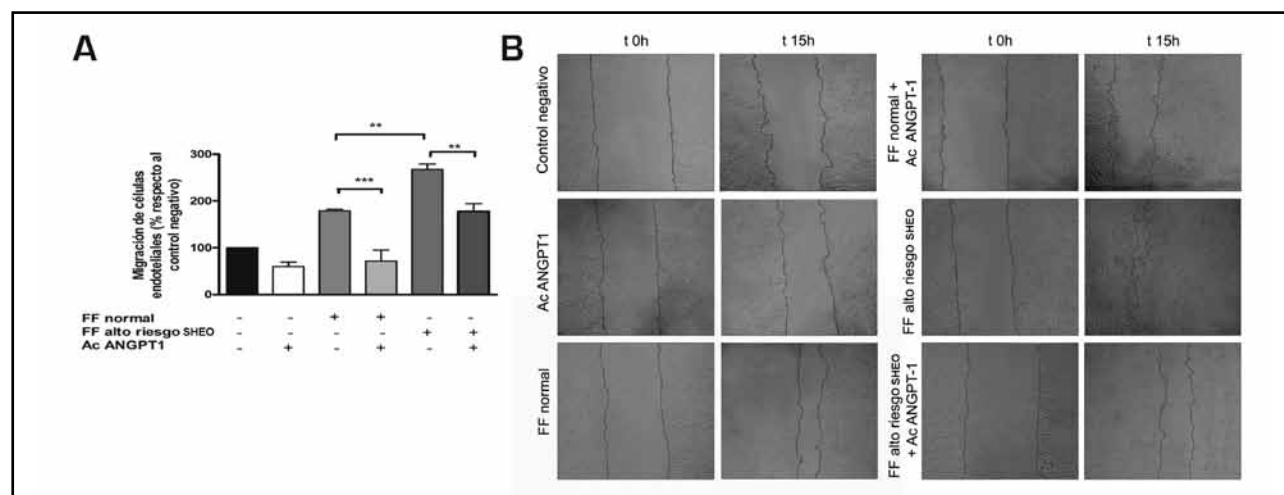
Es decir, el endotelio es una fuente y un blanco de sustancias vasoactivas que son secretadas debido a las condiciones que se desencadenan durante estas enfermedades descriptas. Para evaluar los mecanismos bioquímicos y moleculares que participan se han desarrollado métodos in vitro e in vivo.

Se detallarán a continuación los métodos más relevantes para estudiar la angiogénesis en el tracto reproductivo femenino tanto en condiciones fisiológicas como patológicas.

### Ensayos in vitro de angiogénesis

#### Cultivo de células endoteliales

La migración de células endoteliales es esencial para la angiogénesis. Este proceso de movilidad es direccionalmente regulado por quimiotaxis y estímulos mecanotácticos. Además, implica la degradación de la matriz extracelular para permitir la migración de las células. Distintas vías de señalización se activan y convergen en la remodelación del citoesqueleto. A continuación, las células endoteliales se extienden, contraen y avanzan. Se ha observado que el sistema angiogénico de ANGPT no estimula la proliferación de las células endoteliales, sin embargo, la ANGPT-1 promueve la migración de estas células (33). Una de las formas de evaluar los diferentes parámetros de la angiogénesis es la utilización de cultivos de células endoteliales y la posterior observación de la migración celular frente a distintos tratamientos (34). Sobre la base de ello, se realizó el ensayo de migración de herida en una línea endotelial humana. Este ensayo ha



**Figura 2. Efecto del fluido folicular en la migración de células endoteliales. A)** Cuantificación del ensayo de migración por herida. Las columnas muestran el porcentaje de migración de células endoteliales respecto al control negativo. La migración de células endoteliales en el control negativo fue arbitrariamente definida como del 100%. Los datos se expresaron como la media  $\pm$  EMS (n=20); \*p<0,05; \*\*p<0,01; \*\*\*p<0,001. **B)** Imágenes representativas de la migración endotelial en el ensayo de migración por herida inducida por fluido folicular de pacientes normales y con alto riesgo de desarrollar SHEO preincubado durante 1 hora a 37 °C con un anticuerpo anti-ANGPT-1 y sin él. **FF:** fluido folicular; **SHEO:** síndrome de hiperestimulación ovárica; **Ac ANGPT-1:** anticuerpo antiangiopoyetina-1.

sido utilizado por más de 40 años y se caracteriza por la habilidad que tienen las células para migrar en una pequeña área creada libre de células. Este método ha sido útil no solo para evaluar los factores involucrados en la migración celular, sino también para evaluar el rol de las proteínas de la matriz extracelular, así como de las proteínas que participan de las uniones intercelulares (35). En particular, uno de los objetivos de nuestro laboratorio fue analizar el potencial angiogénico que tienen los fluidos foliculares (FF) provenientes de pacientes con riesgo de desarrollar SHEO utilizando el ensayo de migración por herida (36) (**FIGURA 2**). Los resultados mostraron que los FF de estas pacientes estimulan la migración celular, comparados con los FF de pacientes controles. Sin embargo, cuando se agrega un anticuerpo neutralizante anti-ANGPT-1 (inhibidor) a los FF provenientes de pacientes con alto riesgo a SHEO, se observa una disminución en la migración de células endoteliales, por lo que este proceso angiogénico evidencia valores normales.

Una vez que las células endoteliales han migrado y proliferado en respuesta al estímulo angiogénico, se diferencian para producir nuevos capilares. Entre los diversos ensayos *in vitro* que mimetizan este proceso de diferenciación que sufren las células endoteliales en la angiogénesis, se emplea muy frecuentemente el de la formación de estructuras tubulares en Matrigel (mezcla de proteínas gelatinosas secretadas por células tumorales de ratón, que mimetiza el ambiente extracelular encontrado en varios tejidos). Las células endoteliales de cordón umbilical (HUEC) han sido las principales células utilizadas en este tipo de ensayos. Otros autores y en nuestro laboratorio hemos realizado ensayos de tubulogénesis en cultivos de células endoteliales con Matrigel utilizando los FF o el suero proveniente de pacientes normales, así como de pacientes con distintas patologías (37, 38). Von Otte y cols. observaron que en ausencia de factores angiogénicos o de FF de pacientes normales se encuentra una estructura tipo tubular de forma incompleta, irregular y pequeña en los cultivos de células endoteliales (37). Tan y cols. observaron un aumento en la formación de túbulos con suero de pacientes SOP, efecto que fue revertido luego de 6 meses de tratamiento con el hipoglucemiante metformina (38). En nuestro laboratorio, hemos observado que en presencia de FF de pacientes con riesgo elevado de padecer SHEO, aumenta la formación de estructuras del tipo tubular endotelial comparado con los FF de pacientes normales. Estos resultados son consistentes con los ensayos de migración ya que explicarían la excesiva angiogénesis que poseen las pacientes con riesgo elevado de desarrollar este síndrome.

En cáncer de ovario, este tipo de ensayo se utiliza, por ejemplo, para evaluar la secreción de factores an-

giogénicos por parte de células tumorales. Un ejemplo es el trabajo donde se ha demostrado que al incubar células correspondientes a una línea tumoral ovárica en presencia de metaloproteinasa 1 (MMP1), el medio condicionado de estas células induce la formación de estructuras tubulares en comparación con el medio condicionado de células incubadas en ausencia de estímulo. Esto demuestra que la MMP1 estimula la secreción de factores angiogénicos por parte de células ováricas tumorales (39).

El proceso angiogénico no solo involucra proliferación, adhesión, migración de células endoteliales y formación de túbulos, sino también cambios en el citoesqueleto. Es decir, se producen cambios en la permeabilidad vascular que están dados por la integridad de las uniones estrechas y adherentes entre las células endoteliales. Estas uniones regulan el pasaje de iones, nutrientes y diferentes fluidos desde el espacio intravascular al espacio periférico donde se encuentran los tejidos. Una manera para medir permeabilidad vascular es mediante la técnica de faloidina. Los filamentos de actina polimerizados se unen con el péptido de faloidina que está conjugado a marcadores fluorescentes. Estos filamentos son cruciales para el mantenimiento de las uniones entre células endoteliales, regulando de esta manera la permeabilidad vascular. Levin y cols. (1998) mostraron una marcada redistribución de filamentos de actina en forma transversal cuando las células endoteliales eran incubadas en presencia de VEGF o de FF de pacientes normales comparadas con controles (40). Además, nosotros hemos observado que los FF de pacientes con riesgo elevado de desarrollar SHEO generan filamentos de actina en forma transversal a lo largo de la célula, lo que provoca la formación de fibras de estrés de actina comparados con los FF de pacientes normales.

#### *Cultivos mixtos (cocultivos)*

Los cultivos mixtos son muy interesantes porque nos permiten reproducir las condiciones fisiológicas en las que se encuentran las células en el organismo y permiten investigar las interacciones entre ellas. Se pueden desarrollar cultivos mixtos combinando dos cultivos primarios, cultivos primarios con líneas celulares o dos líneas celulares distintas. Es decir, todos estos cultivos mimetizan un microsistema semejante al de los fisiológicos. En particular, en el área reproductiva, varios autores han utilizado estos tipos de cultivos para evaluar los distintos mecanismos que se desencadenan luego de la unión de gonadotropinas o factores pro y antiangiogénicos a sus receptores presentes en los distintos tipos celulares. Rodewald y cols. (2009) establecieron un nuevo modelo *in vitro* de cocultivo de células de granulosa luteínicas humanas con células endoteliales humanas. Los autores mostraron los efectos de la hCG sobre la

permeabilidad celular y la expresión de claudina 5 (proteína que participa en las uniones estrechas endoteliales y regula la permeabilidad celular) en presencia de un inhibidor de VEGF. Los resultados mostraron que la hCG actúa como un factor paracrino aumentando la permeabilidad endotelial mediante la secreción de VEGF por células de la granulosa luteínicas humanas y por consiguiente, causando una disminución de la expresión de claudina 5 en las células endoteliales (41).

### **Ensayo ex vivo de angiogénesis**

#### *Cultivo de anillos de la aorta*

Este ensayo se caracteriza por representar varios pasos de la angiogénesis que incluyen la proliferación de células endoteliales, migración, diferenciación en nuevos capilares y recubrimiento de pericitos (42). El ensayo consiste en extraer la aorta torácica de la rata, removerle el tejido conectivo y cortar la aorta en diferentes segmentos pequeños tipo “anillo”. Luego son embebidos en una matriz extracelular tridimensional compuesta por fibrina o colágeno y se mantiene en un medio específico. Este tejido comprende 3 diferentes tipos celulares: células endoteliales, células fibroblásticas y células de músculo liso. Luego de varios días de cultivo se puede observar la formación de nuevos microcapilares a partir del explante de la aorta en presencia de factores con actividad proangiogénica. Un ejemplo es el estudio realizado por Berndt y cols. (2009), donde demuestran que la hCG se comporta no solo como un factor que modula la implantación embrionaria mediante el control de la secreción del factor inhibitorio de leucemia (LIF) y la producción de la metaloproteinasa-9, sino también como un factor proangiogénico (43). Para ello utilizaron, entre otros ensayos, el cultivo de los anillos de la aorta en presencia de distintas concentraciones de hCG recombinante y urinaria luego de 9 días de cultivo. La hCG aumentó no solo el número de nuevos capilares, sino también la distancia de la migración celular desde el explante, lo que indica que esta gonadotropina cumple también un rol importante en la angiogénesis.

### **Ensayos in vivo de angiogénesis**

#### *Ensayo de la córnea*

La córnea es un modelo ideal para evaluar la angiogénesis in vivo, ya que se caracteriza por ser avascular y, por lo tanto, el desarrollo de nuevos vasos será solamente debido al material que se agregue (44). Originalmente fue desarrollado en ojo de conejo pero luego fue adaptado al ratón. El ensayo consiste en realizar una abertura en la córnea, donde se coloca el componente de interés. La respuesta angiogénica puede ser monitoreada por observación mediante lupa o midiendo el área de penetración de los vasos mediante técnicas fluorescentes.

La única desventaja de este ensayo es el desarrollo de inflamación, que puede llegar a interferir en la visualización de la neovascularización en la córnea. En el área reproductiva femenina, este ensayo in vivo de angiogénesis podría ser utilizado en el futuro para evaluar el potencial angiogénico que poseen el líquido peritoneal, los sueros y los FF provenientes de pacientes con distintas patologías.

#### *Ensayo del implante de Matrigel*

Este ensayo, comparado con el ensayo de la córnea, no requiere herramientas técnicas específicas de cirugía (45). El Matrigel contiene previamente las sustancias para evaluar y se administra en forma subcutánea. Luego de varios días, el implante puede ser examinado en forma histológica para determinar el desarrollo de vasos sanguíneos que han penetrado al Matrigel. Se puede medir el volumen del plasma mediante la administración de dextrán conjugado a un marcador fluorescente o también mediante la cuantificación de hemoglobina que se encuentra dentro del implante de Matrigel (46). Por ejemplo, Johns A y cols. (1996) demuestran que los estrógenos modulan la angiogénesis tanto en condiciones fisiológicas como patológicas mediante la inducción del factor de crecimiento fibroblástico tipo B (FGFb). Para ello, utilizaron ratones transgénicos sin receptor de estrógenos y ratones salvajes, y luego los ovariectomizaron. Se evaluó el volumen de plasma dentro del implante de Matrigel que contenía FGFb que había sido implantado subcutáneamente en ambos tipos de ratones. En ratones salvajes, la administración de 17 $\beta$ -estradiol aumentó el volumen del plasma del implante de Matrigel medido por dextrán conjugado a fluoresceína, comparado con el de los ratones transgénicos.

#### *Ensayo de membrana corionalantoide (CAM)*

Este ensayo fue originalmente descrito por embriólogos hace 50 años atrás con el objetivo de evaluar el desarrollo de órganos en el embrión. El sistema de vasos sanguíneos de la CAM es inmunodeficiente y similar a la placenta de mamíferos en cuanto a la ausencia de innervación. Además, otra ventaja de este ensayo es que el sistema inmune y nervioso del embrión propiamente dicho no se han desarrollado aún. Sobre la base de estas características, el ensayo de la CAM puede ser utilizado para realizar xenotrasplante con distintos tipos de tejidos que provienen de diferentes especies. Este sistema de la CAM se utiliza para evaluar la angiogénesis tanto en tumores como en tejidos endometriales (47,48), para cultivo de piel humana (49) y de hígado (50), así como también para analizar la toxicidad de biomateriales para ingeniería de tejidos (51).

Al principio, las CAM de los días 7-9 de em-

briones de pollo eran expuestas mediante una pequeña abertura en la cáscara del huevo y los fragmentos de tejido de interés eran colocados directamente arriba de la CAM (52). Los huevos eran reincubados por varios días, y las CAM, junto con los fragmentos tisulares, eran analizadas mediante la cuantificación de los puntos de bifurcación de los nuevos capilares que se encontraban dentro del área de interés (lugar donde se había colocado el material tisular).

Luego se realizó una modificación al ensayo CAM (método in ovo) que consistía en transferir el embrión completo a placas de cultivo de plástico (53). Luego de 3-4 días de incubación, durante los cuales la CAM se desarrolla, se agregan los fragmentos de tejido para evaluar su actividad angiogénica. Las sustancias pueden ser ubicadas en la CAM directamente o sobre anillos de siliconas para delimitar la zona de crecimiento vascular que se evaluará.

Las ventajas que posee este método in vivo para evaluar la angiogénesis son la disponibilidad universal de huevos, relativo bajo costo, rápido desarrollo y crecimiento de los embriones y adecuación a normas éticas vigentes para el uso de animales de experimentación. Además, se pueden llevar a cabo varios tratamientos en la misma CAM, lo que permite que los resultados sean muy confiables. Recientemente, Isachenko y cols. (2012) han propuesto al sistema de la CAM como una técnica para evaluar la calidad de tejido ovárico que fue previamente criopreservado (54). Es importante destacar que la infertilidad aumenta en aquellas mujeres que fueron sometidas a quimioterapia, ya que es un tratamiento que puede dañar las gónadas. La criopreservación de material ovárico antes de la terapia quimioterapéutica con reimplantación posterior representa una buena solución para restablecer la fertilidad en este tipo de pacientes.

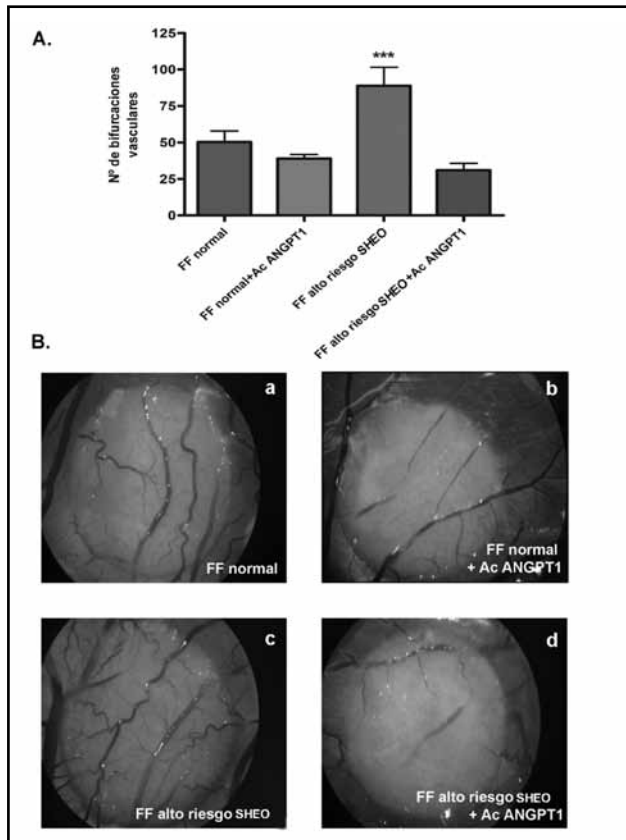
En nuestro laboratorio, hemos puesto a punto este ensayo pero en embriones de codorniz. Estos se incubaron in ovo durante 2 días a 37 °C. Durante el desarrollo ex ovo (embrión desarrollado en una placa de cultivo) se realizó un control de la viabilidad cada 48 h. Luego de los 5 días de incubación ex ovo se colocaron como estímulo los FF, en discos de filtros, de las pacientes con riesgo de desarrollar SHEO y de pacientes normales. Luego de las 48 h postestimulación, los embriones fueron sacrificados y las CAM fueron fijadas en 4% paraformaldehído/2% glutaraldehído en PBS. Los resultados mostraron que los FF de pacientes con riesgo de SHEO causaban un mayor número de ramificaciones vasculares, así como un aumento en el calibre vascular, comparados con los FF de pacientes normales (**FIGURA 3**). En cambio, cuando los FF de SHEO fueron incubados con un inhibidor del factor angiogénico ANGPT-1, se observó una disminución en los parámetros analiza-

dos anteriormente comparados con los FF de pacientes SHEO sin tratamiento. Una de las ventajas de este ensayo es que se pueden analizar otros parámetros además de los estudios morfológicos. Por ejemplo, en las CAM, se puede llevar a cabo la técnica de inmunofluorescencia (IF) para detectar células endoteliales (factor Von Willebrand) y células de músculo liso ( $\alpha$ -actina). En nuestro laboratorio, observamos que los FF de SHEO mostraban un aumento tanto en el área endotelial como en la periendothelial, comparados con los FF normales. En cambio, la presencia del inhibidor de ANGPT-1 en los FF de SHEO disminuía en las áreas celulares mencionadas anteriormente respecto a los FF de SHEO sin tratamiento. También, se pueden realizar estudios bioquímicos, cuantificando mediante ensayos de Elisa los niveles de la integrina  $\alpha\beta 3$ , que se consideran un parámetro angiogénico (55). Los resultados mostraron un aumento de esta integrina en las CAM incubadas con los FF de pacientes con riesgo de desarrollar SHEO, comparados con los FF de pacientes normales. En cambio, la presencia del inhibidor de ANGPT-1 disminuyó los niveles de esta proteína. Es decir, que no solo el VEGF se encuentra involucrado en la severidad del SHEO, sino que también participa otro factor angiogénico, como es la ANGPT-1.

## Conclusiones

Los ensayos in vitro de angiogénesis resultan útiles para llevar a cabo cuantificaciones bajo controles estrictos pero deben de ser interpretados con gran precaución. Estos ensayos pueden servir para validar los primeros pasos de la angiogénesis (proliferación, migración, adhesión y formación de túbulos) pero deben ser confirmados por estudios in vivo. Los cultivos de órgano (ensayo del anillo de la aorta) y los cocultivos (células endoteliales y células de músculo liso) proveen mayor información que los ensayos in vitro ya que permiten evaluar las interacciones entre distintos tipos celulares que participan en el desarrollo de nuevos vasos. Los ensayos in vivo son absolutamente necesarios para evaluar en forma estricta todos los pasos angiogénicos sin eliminar la posible participación de otros sistemas que ocurren alrededor del desarrollo de una nueva vasculatura. La desventaja de estos ensayos in vivo es que son difíciles de desarrollar ya que requieren en su mayoría conocimientos de cirugía o de la técnica propiamente dicha para llevarlos a cabo. En particular, los ensayos in vitro e in vivo que fueron descritos en este trabajo para evaluar el desarrollo de los vasos, pueden ser aplicados para el estudio de enfermedades reproductivas femeninas con alteraciones en la angiogénesis (SHEO, SOP, cáncer de ovario, etc.) mediante la utilización del suero, líquido peritoneal, fluido folicular o de biopsias de distintos tejidos.





**Figura 3. Efecto del fluido folicular en un modelo de angiogénesis in vivo (CAM, membrana corioalantoidea de embrión de codorniz).** **A)** Cuantificación de las bifurcaciones vasculares en el ensayo CAM. Los datos se expresaron como la mediana  $\pm$  EMS (n=20); \*\*\*p<0,001. **B)** Imágenes representativas de las CAM incubadas **(a)** con fluidos foliculares de pacientes normales, **(b)** con fluidos foliculares de pacientes normales con el agregado de un anticuerpo neutralizante anti-ANGPT-1, **(c)** con fluidos foliculares de pacientes con alto riesgo a desarrollar SHEO y **(d)** con fluidos foliculares de pacientes con alto riesgo a desarrollar SHEO con el agregado de un anticuerpo neutralizante anti-ANGPT-1. **FF:** fluido folicular; **SHEO:** síndrome de hiperestimulación ovárica; **Ac ANGPT-1:** anticuerpo antiangiopoyetina-1.

## Referencias

- Risau W. Mechanisms of angiogenesis. *Nature*. 1997;386(6626):671-674.
- Yancopoulos GD, Davis S, Gale NW, Rudge JS, Wiegand SJ, Holash J. Vascular-specific growth factors and blood vessel formation. *Nature*. 2000;407(6801):242-248.
- Findlay JK. Angiogenesis in reproductive tissues. *J Endocrinol*. 1986;111(3):357-366.
- Otrock ZK, Mahfouz RA, Makarem JA, Shamseddine AI. Understanding the biology of angiogenesis: review of the most important molecular mechanisms. *Blood Cells Mol Dis*. 2007;39(2):212-220.
- Maisonpierre PC, Suri C, Jones PF, Bartunkova S, Wiegand SJ, Radziejewski C, et al. Angiopoietin-2, a natural antagonist for Tie2 that disrupts in vivo angiogenesis. *Science*. 1997;277(5322):55-60.
- Goede V, Schmidt T, Kimmina S, Kozian D, Augustin HG. Analysis of blood vessel maturation processes during cyclic ovarian angiogenesis. *Lab Invest*. 1998;78(11):1385-1394.
- Hazzard TM, Molskness TA, Chaffin CL, Stouffer RL. Vascular endothelial growth factor (VEGF) and angiopoietin regulation by gonadotrophin and steroids in macaque granulosa cells during the peri-ovulatory interval. *Mol Hum Reprod*. 1999;5(12):1115-1121.
- Heldin CH, Westermark B. Mechanism of action and in vivo role of platelet-derived growth factor. *Physiol Rev*. 1999;79(4):1283-1316.
- Sleer LS, Taylor CC. Cell-type localization of platelet-derived growth factors and receptors in the postnatal rat ovary and follicle. *Biol Reprod*. 2007;76(3):379-390.
- Abramovich D, Rodriguez CA, Hernandez F, Tesone M, Parborell F. Spatiotemporal analysis of the protein expression of angiogenic factors and their related receptors during folliculogenesis in rats with and without hormonal treatment. *Reproduction*. 2009;137(2):309-320.
- Abramovich D, Parborell F, Tesone M. Effect of a vascular endothelial growth factor (VEGF) inhibitory treatment on the folliculogenesis and ovarian apoptosis in gonadotropin-treated prepubertal rats. *Biol Reprod*. 2006;75(3):434-441.
- Parborell F, Abramovich D, Tesone M. Intrabursal administration of the antiangiopoietin 1 antibody produces a delay in rat follicular development associated with an increase in ovarian apoptosis mediated by changes in the expression of BCL2 related genes. *Biol Reprod*. 2008;78(3):506-513.
- Neulen J, Yan Z, Raczek S, Weindel K, Keck C, Weich HA, et al. Human chorionic gonadotropin-dependent expression of vascular endothelial growth factor/vascular permeability factor in human granulosa cells: importance in ovarian hyperstimulation syndrome. *J Clin Endocrinol Metab*. 1995;80(6):1967-1971.
- Geva E, Jaffe RB. Role of vascular endothelial growth factor in ovarian physiology and pathology. *Fertil Steril*. 2000;74(3):429-438.
- Golan A, Ron-El R, Herman A, Soffer Y, Weinraub Z, Caspi E. Ovarian hyperstimulation syndrome: an update review. *Obstet Gynecol Surv*. 1989;44(6):430-440.
- Pellicer A, Albert C, Mercader A, Bonilla-Musoles F, Remohi J, Simon C. The pathogenesis of ovarian hyperstimulation syndrome: in vivo studies investigating the role of interleukin-1beta, interleukin-6, and vascular endothelial growth factor. *Fertil Steril*. 1999;71(3):482-489.
- Laven JS, Imani B, Eijkemans MJ, Fauser BC. New approach to polycystic ovary syndrome and other forms of anovulatory infertility. *Obstet Gynecol Surv*. 2002;57(11):755-767.
- Norman RJ, Davies MJ, Lord J, Moran LJ. The role of lifestyle modification in polycystic ovary syndrome. *Trends Endocrinol Metab*. 2002;13(6):251-257.
- Revised 2003 consensus on diagnostic criteria and long-term health risks related to polycystic ovary syndrome (PCOS). *Hum Reprod*. 2004;19(1):41-47.
- Agrawal R, Sladkevicius P, Engmann L, Conway GS,

- Payne NN, Bekis J, et al. Serum vascular endothelial growth factor concentrations and ovarian stromal blood flow are increased in women with polycystic ovaries. *Hum Reprod.* 1998;13(3):651-655.
21. Artini PG, Monti M, Matteucci C, Valentino V, Cristello F, Genazzani AR. Vascular endothelial growth factor and basic fibroblast growth factor in polycystic ovary syndrome during controlled ovarian hyperstimulation. *Gynecol Endocrinol.* 2006;22(8):465-470.
  22. Agrawal R, Jacobs H, Payne N, Conway G. Concentration of vascular endothelial growth factor released by cultured human luteinized granulosa cells is higher in women with polycystic ovaries than in women with normal ovaries. *Fertil Steril.* 2002;78(6):1164-1169.
  23. McClure N, Healy DL, Rogers PA, Sullivan J, Beaton L, Haning RV, Jr., et al. Vascular endothelial growth factor as capillary permeability agent in ovarian hyperstimulation syndrome. *Lancet.* 1994;344(8917):235-236.
  24. Abramovich D, Irusta G, Bas D, Cataldi NI, Parborell F, Tesone M. Angiopoietins/TIE2 System and VEGF Are Involved in Ovarian Function in a DHEA Rat Model of Polycystic Ovary Syndrome. *Endocrinology.* 2012;153(7):3446-3456.
  25. Cramer DW. Epidemiology and biostatistics. In: Berek JS, Hacker NF, ed. *Practical gynecology oncology.* Philadelphia: Williams and Wilkins, 2000.
  26. Beller U, Halle D, Catane R, Kaufman B, Hornreich G, Levy-Lahad E. High frequency of BRCA1 and BRCA2 germline mutations in Ashkenazi Jewish ovarian cancer patients, regardless of family history. *Gynecol Oncol.* 1997;67(2):123-126.
  27. Burke W, Daly M, Garber J, Botkin J, Kahn MJ, Lynch P, et al. Recommendations for follow-up care of individuals with an inherited predisposition to cancer. II. BRCA1 and BRCA2. *Cancer Genetics Studies Consortium. JAMA.* 1997;277(12):997-1003.
  28. Cohen LE. Cancer treatment and the ovary: the effects of chemotherapy and radiation. *Ann NY Acad Sci.* 2008;1135:123-125.
  29. Jain RK. Normalizing tumor vasculature with anti-angiogenic therapy: a new paradigm for combination therapy. *Nat Med.* 2001;7(9):987-989.
  30. Martin L, Schilder R. Novel approaches in advancing the treatment of epithelial ovarian cancer: the role of angiogenesis inhibition. *J Clin Oncol.* 2007;25(20):2894-2901.
  31. Burger RA, Sill M, Monk BJ. Phase II trial of Bevacizumab in persistent or recurrent epithelial ovarian cancer or primary peritoneal cancer: A Gynecologic Oncology Group study. *J Clin Oncol.* 2005;23.
  32. Hensley ML. Big costs for little gain in ovarian cancer. *J Clin Oncol.* 2011;29(10):1230-1232.
  33. Lamalice L, Le Boeuf F, Huot J. Endothelial cell migration during angiogenesis. *Circ Res.* 2007;100(6):782-794.
  34. Albert C, Garrido N, Mercader A, Rao CV, Remohi J, Simon C, et al. The role of endothelial cells in the pathogenesis of ovarian hyperstimulation syndrome. *Mol Hum Reprod.* 2002;8(5):409-418.
  35. Todaro GJ, Lazar GK, Green H. The initiation of cell division in a contact-inhibited mammalian cell line. *J Cell Physiol.* 1965;66(3):325-333.
  36. Scotti L, Abramovich D, Pascuali N, de Zuñiga I, Oubina A, Kopcow L, et al. Involvement of the ANGPTs/Tie-2 system in ovarian hyperstimulation syndrome (OHSS). *Mol Cell Endocrinol.* 2013;365(2):223-230.
  37. von Otte S, Paletta JR, Becker S, König S, Fobker M, Greb RR, et al. Follicular fluid high density lipoprotein-associated sphingosine 1-phosphate is a novel mediator of ovarian angiogenesis. *J Biol Chem.* 2006;281(9):5398-5405.
  38. Tan BK, Adya R, Farhatullah S, Chen J, Lehnert H, Randeve HS. Metformin treatment may increase omentin-1 levels in women with polycystic ovary syndrome. *Diabetes.* 2010;59(12):3023-3031.
  39. Agarwal A, Tressel SL, Kaimal R, Balla M, Lam FH, Covic L, et al. Identification of a metalloprotease-chemokine signaling system in the ovarian cancer microenvironment: implications for antiangiogenic therapy. *Cancer Res.* 2010;70(14):5880-5890.
  40. Levin ER, Rosen GF, Cassidenti DL, Yee B, Meldrum D, Wisot A, et al. Role of vascular endothelial cell growth factor in Ovarian Hyperstimulation Syndrome. *J Clin Invest.* 1998;102(11):1978-1985.
  41. Rodewald M, Herr D, Duncan WC, Fraser HM, Hack G, Konrad R, et al. Molecular mechanisms of ovarian hyperstimulation syndrome: paracrine reduction of endothelial claudin 5 by hCG in vitro is associated with increased endothelial permeability. *Hum Reprod.* 2009;24(5):1191-1199.
  42. Burbridge MF, West DC. Rat Aortic Ring: 3D Model of Angiogenesis In Vitro. *Methods Mol Med.* 2001;46:185-204.
  43. Berndt S, Blacher S, Perrier S, Thiry M, Tsampalas M, Cruz A, et al. Chorionic gonadotropin stimulation of angiogenesis and pericyte recruitment. *J Clin Endocrinol Metab.* 2009;94(11):4567-4574.
  44. Muthukkaruppan VR, Kubai L, Auerbach R. Tumor-induced neovascularization in the mouse eye. *J Natl Cancer Inst.* 1982;69(3):699-708.
  45. Passaniti A, Taylor RM, Pili R, Guo Y, Long PV, Haney JA, et al. A simple, quantitative method for assessing angiogenesis and antiangiogenic agents using reconstituted basement membrane, heparin, and fibroblast growth factor. *Lab Invest.* 1992;67(4):519-528.
  46. Johns A, Freay AD, Fraser W, Korach KS, Rubanyi GM. Disruption of estrogen receptor gene prevents 17 beta estradiol-induced angiogenesis in transgenic mice. *Endocrinology.* 1996;137(10):4511-4513.
  47. Berube M, Deschambeault A, Boucher M, Germain L, Petitclerc E, Guerin SL. MMP-2 expression in uveal melanoma: differential activation status dictated by the cellular environment. *Mol Vis.* 2005;11:1101-1111.
  48. Nap AW, Dunselman GA, de Goeij AF, Evers JL, Groot-huis PG. Inhibiting MMP activity prevents the development of endometriosis in the chicken chorioallantoic membrane model. *Hum Reprod.* 2004;19(10):2180-2187.
  49. Kunzi-Rapp K, Ruck A, Kaufmann R. Characterization

- of the chick chorioallantoic membrane model as a short-term in vivo system for human skin. *Arch Dermatol Res.* 1999;291(5):290-295.
50. Katoh M, Nakada K, Miyazaki JI. Liver regeneration on chicken chorioallantoic membrane. *Cells Tissues Organs.* 2001;169(2):125-133.
51. Valdes TI, Kreutzer D, Moussy F. The chick chorioallantoic membrane as a novel in vivo model for the testing of biomaterials. *J Biomed Mater Res.* 2002;62(2):273-282.
52. Form DM, Auerbach R. PGE2 and angiogenesis. *Proc Soc Exp Biol Med.* 1983;172(2):214-218.
53. Brooks PC, Montgomery AM, Cheresch DA. Use of the 10-day-old chick embryo model for studying angiogenesis. *Methods Mol Biol.* 1999;129:257-269.
54. Isachenko V, Mallmann P, Petrunkina AM, Rahimi G, Nawroth F, Hancke K, et al. Comparison of in vitro- and chorioallantoic membrane (CAM)-culture systems for cryopreserved medulla-contained human ovarian tissue. *PLoS One.* 2012;7(3):e32549.
55. Brooks PC, Clark RA, Cheresch DA. Requirement of vascular integrin alpha v beta 3 for angiogenesis. *Science.* 1994;264(5158):569-571.

Actualización

## La obesidad materna y la programación del fenotipo obeso

### *Maternal obesity and the programming of the obese phenotype*

Lic. María Belén Mazzucco y Dra. Verónica White

Laboratorio de Reproducción y Metabolismo. CEFYBO-CONICET, Buenos Aires, Argentina  
Paraguay 2155, piso 17 (1121) CABA - E-mail: vernica73@gmail.com

#### Resumen

La prevalencia de la obesidad se ha incrementado y extendido en toda la población sin distinción de edad, sexo, etnia o clase sociocultural. Año a año la cifra de adultos con sobrepeso y obesidad se incrementa, así como la incidencia de la morbilidad asociada. La abundancia de comidas rápidas, hipercalóricas y relativamente económicas, junto con el estilo de vida sedentario, han colaborado con el desarrollo del fenotipo obeso. Por otro lado y de manera alarmante, existe un aumento en la incidencia de la obesidad en niños menores de cinco años. En un intento de hallar la causa de este incremento, se ha estudiado y observado que los hijos de madres obesas presentan mayor incidencia de obesidad y sobrepeso, lo que indica que la obesidad es una alteración metabólica que se transmite de generación en generación. Se ha establecido que la exposición a un entorno metabólico alterado como la obesidad en etapas críticas del desarrollo “programa” alteraciones en los distintos órganos y sistemas que impactarán en el metabolismo del individuo durante el resto de su vida. En esta revisión se analizarán algunos de los diferentes mecanismos que se alteran durante el desarrollo y conforman las bases para el desarrollo del fenotipo obeso en la adultez.

**Palabras clave:** obesidad, programación perinatal, alteraciones metabólicas, sobrepeso.

#### Abstract

*The prevalence of obesity has extended in to the entire population regardless age, gender, ethnicity or socio-cultural class. Every year, the number of adults suffering from overweight and/or obesity increases, together*

*with the incidence of associated morbidity. The abundance of fast, hypercaloric and relatively cheap food, as well as a sedentary lifestyle, has contributed to the development of the obese phenotype. Furthermore, and alarmingly, there is an increased incidence of obesity in childhood. Moreover, it has been observed that children from obese mother have higher incidence of obesity, indicating that obesity is a metabolic disorder that is transmitted from one generation to the following. It has been established that the exposure to an altered metabolic environment at critical stages of the development, ‘programms’ many metabolic alterations in different organs and systems that will impact later in life. In this review we discuss some of these mechanisms that contribute to the development of the obese phenotype.*

**Key words:** obesity, perinatal programming, metabolic alterations, overweight.

#### Introducción

El sobrepeso y la obesidad son desórdenes metabólicos muy frecuentes en la actualidad. Según la Organización Mundial de la Salud (OMS): “El sobrepeso y la obesidad se definen como una acumulación anormal o excesiva de grasa que puede ser perjudicial para la salud”. El índice de masa corporal (IMC) establece el estado energético de un individuo de acuerdo con su altura y peso en kg/m<sup>2</sup>. Según la OMS, los individuos con un IMC igual o superior a 25 son considerados con sobrepeso y por encima de 30, obesos (Tabla I). La obesidad ha alcanzado proporciones epidémicas a nivel mundial, y cada año mueren, como mínimo, 2.600.000 personas a causa de la obesidad o el sobrepeso. Aunque anteriormente se

consideraba un problema confinado a los países de altos ingresos, en la actualidad la obesidad también es prevalente en los países de ingresos bajos y medianos.

Insuficiencia ponderal	<18,5
Intervalo normal	18,5-24,9
Sobrepeso	>25
Obesidad	>30

**Tabla I.** Clasificación del IMC.

Fuente: <http://www.who.int/features/factfiles/obesity/es/>

Según los últimos informes de la OMS, el sobrepeso y la obesidad causan más muertes que la insuficiencia ponderal. El 44% de los casos mundiales de diabetes, el 23% de las cardiopatías isquémicas y el 7-41% de determinados cánceres son atribuibles al sobrepeso y la obesidad. De acuerdo con los informes de la OMS:

- En 2008, 1400 millones de adultos (de 20 y más años) tenían sobrepeso. Dentro de este grupo, más de 200 millones de hombres y cerca de 300 millones de mujeres eran obesos.
- En estudios realizados en 2012 se proyecta que para 2015 la cifra de adultos obesos superará los 1500 millones.
- Un dato por demás alarmante es que en 2012 se registraron más de 42 millones de menores de cinco años con sobrepeso.

Este crecimiento exponencial de la incidencia de la obesidad sugiere que la causa no podría ser atribuible únicamente a la transmisión génica, sino que serían causas ambientales las que determinarían este incremento. Una nutrición inadecuada, con alto contenido de grasa e hidratos de carbono, en conjunto con una vida sedentaria, estarían inclinando la balanza hacia un fenotipo obeso. Sin embargo, es notorio que la descendencia de madres con obesidad o sobrepeso tiene una mayor incidencia de obesidad, sobrepeso y alteraciones metabólicas (1, 2). Así como los hijos de mujeres que han desarrollado diabetes presentan mayor incidencia de alteraciones metabólicas respecto de los hermanos nacidos previamente al diagnóstico de la diabetes (3), los hijos de madres que incrementan su IMC entre un embarazo y otro presentan mayor peso al nacer y, consecuentemente, mayor riesgo de desarrollar alteraciones metabólicas (4). Asimismo, los hijos de madres obesas presentan mayor índice de alteraciones metabólicas que sus hermanos nacidos posteriormente a una cirugía bariátrica y a la recuperación de la salud metabólica materna (5). Esta

evidencia sugiere que es la exposición al entorno intrauterino de una mujer obesa o con sobrepeso, más que la transmisión génica, la que induce un mayor riesgo de desarrollar un fenotipo obeso. Estos individuos perpetuarán el fenotipo obeso ya que ellos mismos presentarán alteraciones metabólicas en la adultez que transmitirán a las futuras generaciones. La programación del desarrollo de alteraciones metabólicas ocurre durante el período intrauterino y posnatal temprano. En los últimos años, el estudio de la programación ha recibido gran atención. Algunos de los roles que cumplen distintos sistemas y órganos han sido esclarecidos y otros permanecen sin resolver.

### Rol de la placenta

La placenta es el órgano que vincula a la madre con el feto en desarrollo. En la placenta ocurre el intercambio de sustancias entre la sangre materna y fetal, que provee al feto de nutrientes, agua, oxígeno y demás sustancias necesarias para el correcto desarrollo y crecimiento. La regulación del transporte de nutrientes está relacionada con el crecimiento fetal y muchas veces con el crecimiento placentario, que está estrechamente ligado al concepto de eficiencia placentaria (6). Se ha visto que la expresión y actividad de transportadores placentarios de nutrientes se incrementa en respuesta a las demandas fetales de crecimiento. Así, en situaciones normales, placentas pequeñas presentan alta expresión y actividad de transportadores de nutrientes, mientras que las más grandes presentan baja expresión y actividad transportadora (7). Esto sugiere que el feto está modulando de alguna manera la afluencia de nutrientes (8). Es lógico pensar que el feto module el propio pasaje de nutrientes de acuerdo con sus necesidades, y esto implica la modulación del tamaño placentario y la expresión de transportadores placentarios. Sin embargo, se ha observado que la disponibilidad y el ambiente endocrino materno también modulan el transporte de nutrientes (9, 10). La madre y el feto llegan a un acuerdo en el que la placenta es la mediadora y la proveedora de nutrientes y sustancias necesarias para el crecimiento y desarrollo fetal (11). Las alteraciones en el crecimiento fetal ocurren cuando la madre no puede cumplir con las demandas fetales o cuando, por alteraciones del entorno materno, el feto recibe más nutrientes de los necesarios. En este último caso, el feto debe almacenar de alguna manera el exceso de sustratos, lo que, como se explicará más adelante, conduce al desarrollo del fenotipo obeso.

Existen numerosos trabajos que describen la regulación placentaria del transporte de nutrientes. La mayor parte de la glucosa es transportada de manera dependiente de gradiente a través de GLUT-1, 2, 3 y una menor parte de manera dependiente de insulina a través

de GLUT-4 y 12. Los lípidos en circulación se hallan acompañados a macromoléculas con proteínas que son receptoradas por receptores específicos en la placenta. Luego, lipasas placentarias como la LPL (lipoproteína lipasa) y EL (lipasa endotelial) hidrolizan las macromoléculas lipídicas a ácidos grasos que son captados por la placenta por difusión o por proteínas transportadoras. Los aminoácidos son transportados por sistemas específicos con gasto energético como el sistema A (SNAT), L (LAT), tau (TAUT) e y+ (Y+AT). Factores mitogénicos como la insulina y los factores de crecimiento similar a insulina estimulan el transporte de aminoácidos (6).

Son muchos los trabajos que relacionan el perfil hormonal materno y fetal con el transporte placentario de nutrientes, y aunque hay muchos estudios sobre el efecto de diferentes hormonas en la expresión y actividad de transportadores placentarios, es difícil discriminar entre los efectos que tienen las hormonas provenientes de circulación materna y los que tienen las provenientes de circulación fetal (9, 12).

La insulina, una de las hormonas que varía con el estado nutricional, incrementa el transporte de lípidos y aminoácidos (6). El tratamiento de explantos placentarios con insulina induce un incremento del transporte de aminoácidos y combinada con hiperglucemia induce un incremento en la actividad de la LPL, adjudicando un rol a la insulina materna (10, 13). La placenta también expresa receptores de insulina en la vasculatura, de cara a la circulación fetal (14). La infusión fetal de insulina en monos genera, además de crecimiento fetal, un incremento en el crecimiento placentario, lo que sugiere un rol para la insulina fetal (15).

Es interesante resaltar que otra hormona ligada a la homeostasis energética, como la leptina, también induce variaciones en el transporte placentario de nutrientes. Se ha observado una inducción del transporte de aminoácidos en placenta humana, lo que establece un rol para la leptina materna. El endotelio placentario también expresa receptor de leptina (16). Se ha observado un incremento de la expresión de LPL posadministración fetal de leptina, lo que le adjudica un rol a la leptina fetal (17).

En las últimas etapas de la gestación, caracterizada por la resistencia fisiológica a insulina, la insulinemia y la leptinemia se encuentran incrementadas, la primera debido a la resistencia a la insulina, y la segunda debido a la mayor producción de leptina por los adipocitos y la placenta. La obesidad eleva aún más los niveles de ambas hormonas, la insulina por la exacerbación de la resistencia a insulina y la leptina, debido a la gran cantidad de masa adipocitaria y al estímulo que induce la insulina en la producción placentaria de leptina. (18-20). La hiperleptinemia, junto con la resistencia a la insulina,

característica de la obesidad, incrementa la disponibilidad de lípidos maternos en circulación (21). Por otra parte, el feto también produce leptina e insulina y sus niveles se incrementan en modelos de obesidad (17, 22). En conjunto, la placenta en gestaciones complicadas por la obesidad, se encuentra inmersa en un ambiente con altas concentraciones de lípidos, leptina e insulina, las que incrementan el transporte de aminoácidos y lípidos hacia el feto en desarrollo, lo que sustentaría el crecimiento fetal y promovería el desarrollo del fenotipo obeso.

El incremento en la afluencia de nutrientes a través de la placenta, especialmente de lípidos, es frecuente en madres obesas y modelos de obesidad. En la placenta de modelos de obesidad se han observado incrementos en la expresión y la actividad de los transportadores placentarios de lípidos, glucosa y aminoácidos, ligados a un incremento del crecimiento fetal y a la hiperlipidemia (17, 22).

En algunos casos, la obesidad o la dieta grasa generan alteraciones en la angiogénesis placentaria. La incorrecta morfogénesis de los vasos placentarios induce alteraciones en el pasaje de sustancias al feto en desarrollo, con efectos nocivos en el crecimiento fetal. En ratas alimentadas con dieta grasa, y ligado al estrés oxidativo, se han encontrado áreas de necrosis placentaria, con la consecuente disminución del peso placentario y fetal (23). En estos casos, la obesidad induce una disminución de la eficiencia placentaria atribuible a alteraciones en la vasculatura de la placenta, que conduce al retraso del crecimiento intrauterino (24).

La evidencia sugiere que la obesidad, en la mayoría de los casos, induce un incremento en el crecimiento fetal ligado a un aumento del tamaño o transporte placentario. Los individuos gestados bajo estas condiciones nacen con peso elevado para la edad gestacional. Sin embargo, en otros casos, cuando la morfogénesis placentaria se altera en perjuicio del flujo sanguíneo placentario, la eficacia placentaria disminuye, el feto no recibe los nutrientes que demanda y se observa restricción del crecimiento intrauterino. Los individuos gestados bajo estas condiciones nacen pequeños para su edad gestacional. Sin embargo, en términos de programación a largo plazo, el recién nacido pequeño y el grande para edad gestacional presentan similares probabilidades de desarrollar el fenotipo obeso. El rápido crecimiento posnatal compensatorio en el individuo pequeño para la edad gestacional programará alteraciones del metabolismo con el mismo resultado que las programadas por el exceso intrauterino de nutrientes (25).

En los párrafos subsiguientes se detallarán algunos de los mecanismos que programan la obesidad en la etapa adulta de aquellos individuos que, expuestos a un ambiente intrauterino de madre obesa, desarrollan peso adecuado o excesivo para la edad gestacional.

## Regulación del apetito

La regulación de la ingesta es compleja y abarca varios núcleos hipotalámicos. El núcleo arcuato (ARC), situado por encima de la eminencia media, se encuentra en una posición estratégica para la interacción con hormonas y péptidos indicadores del estado energético del individuo y reguladores de la homeostasis energética. En el ARC se encuentran las neuronas que coexpresan neuropéptido (NPY) y proteína relacionada con agutí (AgRP), ambos inductores del apetito y con efectos anabólicos. Además hay otro grupo de neuronas que coexpresan proopiomelanocortina (POMC) y transcripto regulado por cocaína y metanfetamina (CART), supresores del apetito y con efectos catabólicos. Las neuronas del ARC, también llamadas de primer orden, emiten sus proyecciones hacia otros núcleos hipotalámicos como el núcleo ventromedial (VMN), núcleo paraventricular (PVN) y núcleo dorsomedial (DMH) que contienen las neuronas de segundo orden que propagarán las señales que luego se transmitirán al resto del organismo. La desregulación de la producción de alguno de estos péptidos, como así también de la interacción morfológica entre las neuronas que los transmiten, generará alteraciones en la regulación de la saciedad y la homeostasis energética (26).

Las neuronas del ARC expresan receptor de leptina y receptor de insulina. La insulina se produce en respuesta a la ingesta de carbohidratos, siendo así un indicador de la biodisponibilidad de glucosa del individuo. La leptina se produce en respuesta a la acumulación de lípidos y se correlaciona con la masa grasa total del individuo. Estas dos hormonas atraviesan la barrera hematoencefálica a través de un sistema específico y saturable e impactan en el ARC inhibiendo la producción de AgRP y de NPY y estimulando la de POMC y de CART (26, 27). Las alteraciones en la biodisponibilidad de leptina e insulina son responsables de la desregulación de la ingesta y el gasto energético, es por esto que los niveles alterados de estas dos hormonas durante el período de morfogénesis del hipotálamo generan una anómala programación de la homeostasis energética (28, 29).

Se ha observado que durante el desarrollo existen incrementos de leptina circulante coincidentes con aumentos en la expresión hipotalámica de su receptor en determinadas ventanas del desarrollo. Se cree que estas variaciones serían determinantes para establecer los mecanismos de regulación necesarios para el establecimiento de un sistema de regulación de la homeostasis energética adecuada (30). La sobreadministración de leptina en el período posnatal temprano en roedores genera una expresión hipotalámica anómala de NPY, AgRP y POMC (31).

La expresión del receptor de insulina a nivel hipotalámico varía con el desarrollo. La insulina intervie-

ne en los procesos de la formación sináptica, la morfogénesis de las dendritas y la plasticidad (32). Se ha visto que la administración de insulina durante el desarrollo genera alteraciones morfológicas hipotalámicas, hiperinsulinemia y obesidad (29). La sobreexposición a esta hormona en momentos críticos del desarrollo programa al ARC para que en la adultez, la insulina produzca un efecto estimulador sobre la producción de NPY en lugar del mecanismo normal de inhibición, programando en el individuo la hiperfagia y la obesidad (33). Se cree que la resistencia a la insulina hipotalámica está relacionada con una hipermetilación de POMC que es crítica para la regulación de POMC por leptina e insulina (34).

Según la especie, el completo desarrollo de estos centros y su interrelación ocurre en distintos momentos de la vida perinatal y se completa durante la lactancia. Las crías de madres obesas están expuestas a altas concentraciones de leptina, azúcares, grasas e insulina provenientes de la circulación materna durante la gestación y de la leche materna durante la lactancia y como consecuencia, presentan hiperfagia, obesidad y una desensibilización a la inducción de la saciedad por leptina (35). La exposición durante la gestación y la lactancia a dietas maternas con alto contenido graso predisponen a la cría a la hiperfagia y a la preferencia por la "comida chatarra" (36), así como la obesidad y resistencia a insulina (37). El período crítico parece ser el de la lactancia, sin embargo, trabajos desarrollados con crías de madre obesa amamantadas por ratas delgadas muestran alteraciones hipotalámicas consistentes con la programación del fenotipo obeso, lo que indica que las alteraciones tienen su inicio durante la vida fetal (38, 39).

## Alteraciones hepáticas

La descendencia de ratas obesas, con sobrepeso o alimentadas con dietas de alto contenido graso, presentan el síndrome de hígado graso no alcohólico, definido por un incremento en la deposición de lípidos, la presencia de vacuolas lipídicas, fibrosis y alteración de la función hepática. Este síndrome, que es tal vez la manifestación hepática del síndrome metabólico, se desarrolla en varios modelos de obesidad (40-42); en modelos de obesidad en monos, las crías también presentan hígado graso, indicador temprano del desarrollo del síndrome de hígado graso no alcohólico (43). Las alteraciones hepáticas de la descendencia se programan de manera perinatal, asociadas a alteraciones en la presión sanguínea, ritmo cardíaco y a un incremento en la colesterolemia (40, 44). Durante la gestación, las crías de ratas alimentadas con dieta grasa presentan un incremento en el contenido de triglicéridos en el hígado asociado a incrementos en la insulinemia, leptinemia, trigliceridemia y colesterolemia, así como anomalías

hepáticas en la respuesta a la leptina, indicando que la programación comienza durante la vida fetal (17). Las crías de ratas alimentadas con dieta palatable, que en la vida adulta son alimentadas con dieta estándar presentan también hígado graso indicando que la programación es irreversible para la intervención alimenticia en los modelos estudiados (41).

Estudiando las posibles causas de esta acumulación tóxica de lípidos en el hígado, se ha encontrado que ésta se asocia a la resistencia a la insulina, a la disminución de la expresión de los transportadores de glucosa, y a un incremento en la expresión de la proteína de unión al elemento regulador de esterol (SREBP-1), potente activador de la transcripción de genes intervinientes en la lipogénesis (45). Las crías de ratonas obesas desarrollan hígado graso asociado a un incremento en la expresión de genes intervinientes en la lipogénesis y en la inflamación, relacionado con la resistencia a la insulina, además de una disminución en la actividad respiratoria mitocondrial (46). El incremento en la lipogénesis y la disminución de la lipólisis han sido observados por varios grupos de trabajo y están ligados al incremento de la expresión de SREBP-1 y a la disminución de la expresión y actividad de PPAR $\alpha$ , (receptor activado por proliferadores peroxisomales alfa), factor de transcripción involucrado en el catabolismo de lípidos (45, 47). Estas alteraciones parecen estar relacionadas en todos los casos con baja respuesta a la insulina evidenciada por índices de insulinoresistencia como el HOMA, hiperinsulinemia y altas concentraciones plasmáticas de lípidos (17, 41, 45). El análisis de los caminos de señalización a insulina muestran una disminución en la expresión de la subunidad  $\beta$  del receptor de insulina, del sustrato del receptor de insulina (IRS-1), de la proteína p-85 $\alpha$  y un incremento de la proteína-quinasa C (48), lo que indica la programación de la desensibilización a insulina en el hígado de la descendencia de rata alimentada con dieta grasa.

### Alteraciones en el músculo esquelético

Si bien la descendencia de mujeres con sobrepeso, obesas y de modelos de obesidad o sobrepeso presenta un incremento del IMC, el análisis detallado de la composición corporal revela un incremento del porcentaje de grasa en detrimento de la masa muscular magra (20, 48-50). Las crías de ratas alimentadas con “comida chatarra” presentan un incremento de la infiltración adipocitaria en las fibras musculares, concomitante con una disminución en la sensibilidad a insulina y tolerancia a la glucosa, probablemente debido a una disminución del receptor de insulina en músculo esquelético y de GLUT-4 (51). La ruptura de la cascada de señalización del receptor de insulina se ha observado también en la descendencia de un modelo de obesidad en ovejas.

Los fetos de ovejas obesas presentan un incremento de la infiltración adipocitaria muscular, menor número de fibras musculares, incremento de la adipogénesis y una disminución de la fosforilación de las proteínas blanco del receptor de insulina a pesar de un incremento en la insulinemia fetal (52). De forma congruente, la disminución en la expresión y fosforilación de los componentes de la señalización del receptor de insulina en el músculo se ha observado también en la descendencia de ratones hembra obesas (53). Un incremento en la masa de tejido adiposo infiltrado en el tejido muscular, junto con una disminución del desarrollo de las fibras musculares, resistencia a la insulina e hiperinsulinemia, son denominadores comunes en diferentes modelos de obesidad, junto con un incremento en la adipogénesis en detrimento de la miogénesis (54). Estas características se exacerban cuando la cría es expuesta nuevamente a una dieta con alto contenido de grasa (54, 55).

Entonces, la infiltración adipocitaria intramuscular comenzaría durante la vida intrafetal y probablemente, asociada a la producción de citoquinas proinflamatorias, generaría resistencia a la insulina, lo que contribuiría a la programación del fenotipo obeso (52).

### Tejido adiposo

El incremento en el peso materno, así como el IMC previo al embarazo, se correlacionan con la aparición de macrosomía y el incremento del IMC en neonatos, niños y adultos en la descendencia. Además, se ha establecido que el incremento del IMC es causado por un aumento de la masa del tejido graso en el humano (20, 50, 56, 57). El tejido adiposo es el único tejido que tiene capacidad indefinida de crecimiento. El incremento inducido por la dieta en la cantidad de adipocitos es irreversible a pesar de la intervención con dieta saludable (58). La descendencia de ratas obesas presenta un incremento en la concentración sérica de lípidos, leptina, insulina y un incremento en el número y tamaño de los adipocitos (49). El exceso de nutrientes, transferido desde la madre durante el desarrollo gestacional o posnatal temprano, induce un incremento en la masa adiposa ya que glucosa y lípidos son almacenados en forma de lípidos en el tejido adiposo. El incremento del tejido adiposo es inducido por genes activadores de la adipogénesis como PPAR $\gamma$ . Se ha encontrado un incremento en la expresión de este gen y una disminución en la expresión de adrenoreceptores  $\beta_2$  y  $\beta_3$ , ambos inductores de la lipólisis en la descendencia de ratas obesas (55). Asimismo, en fetos de oveja alimentada con dieta hipercalórica se encontró un incremento en la expresión de LPL, leptina y PPAR $\gamma$  (59), genes involucrados en la adipogénesis y/o la lipogénesis. El incremento en la adiposidad y en la expresión de leptina se mantiene de manera posnatal y

los niveles de insulina se correlacionan con la expresión de PPAR $\gamma$  (51, 60). La insulina induce la expresión y actividad del factor de transcripción ADD1 (factor de diferenciación y determinación adipocitaria 1) y SREBP-1, que estimularían la adipogénesis a través de PPAR $\gamma$  y la incorporación de lípidos y la lipogénesis a través de la sintasa de ácidos grasos y la LPL; además, ADD1 y SREBP-1 estimulan la expresión de leptina (61, 62). Es así como el incremento en la afluencia de nutrientes, fácilmente almacenables como lípidos, junto con la hiperinsulinemia, incrementan la adiposidad y programan un aumento de la cantidad de adipocitos, junto con el aumento de la leptinemia que, como se ha detallado, impacta en la regulación de la homeostasis energética. Más aún, la hipertrofia adipocitaria induce la secreción de citoquinas proinflamatorias involucradas en la resistencia periférica a insulina, lo que incrementaría aún más la insulinemia (62). Estudios a largo plazo en la descendencia de madres alimentadas con dieta grasa muestran el traspaso generacional del fenotipo obeso cuando las cuatro generaciones subsiguientes prosiguen alimentándose con la misma dieta. Estas ratas presentan hipertrofia adipocitaria, hiperlipidemia, niveles incrementados de insulina, leptina y algunas citoquinas inflamatorias como el TNF $\alpha$  (factor de necrosis tumoral) involucradas en la resistencia a la insulina, lo que indica que la exposición a dietas con alto contenido de lípidos perpetúa el fenotipo obeso (63).

### Función pancreática

Además de modular la ingesta a nivel hipotalámico la insulina modula la entrada de glucosa en las células, estimula la formación de glucógeno y el almacenamiento de lípidos en el tejido adiposo entre tantas otras funciones anabólicas. Para el cumplimiento de este rol de manera exitosa se requiere de una adecuada producción insulínica frente al estímulo (glucosa y diversos péptidos intestinales estimulados por nutrientes) y una recepción y respuesta adecuada en las células blanco. La exposición a altas concentraciones de nutrientes transferidos desde la madre son un estímulo para el páncreas que produce altas concentraciones de insulina durante la vida fetal y posnatal temprana (17, 64). Como hemos mencionado, la hiperinsulinemia fetal y posnatal altera la programación de la homeostasis energética y programa al individuo para desarrollar obesidad. En humanos se ha estudiado la relación entre el estado energético de la madre y del feto y de la insulinemia neonatal. Los estudios de la glucemia e insulinemia neonatal señalan que el IMC materno se correlaciona con la insulinemia neonatal y está asociado a la resistencia a la insulina neonatal (20).

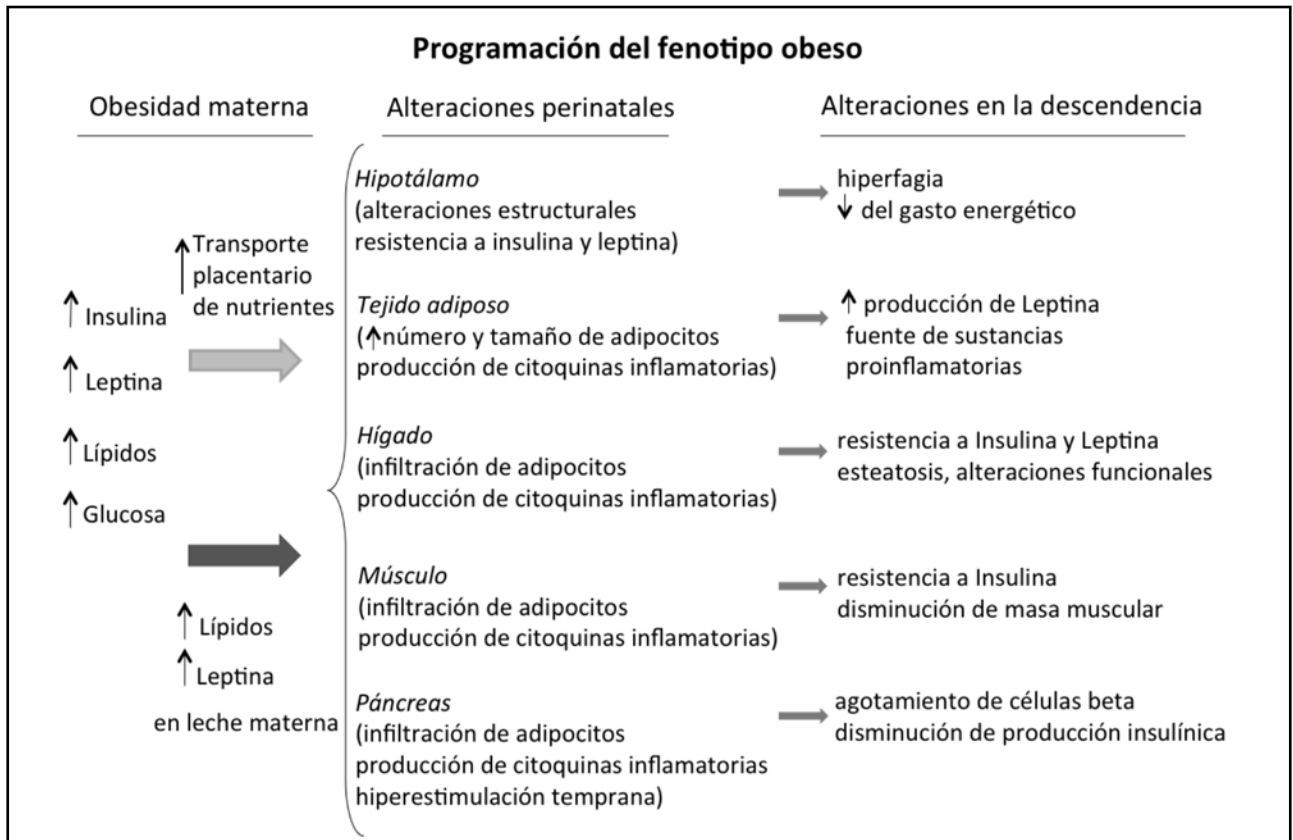
Se han observado numerosas anomalías en la función y estructura pancreática de la descendencia de

ratas alimentadas con dietas de alto contenido de grasa. Se ha observado un incremento de la insulinemia fetal que persiste en el período posnatal, probablemente debido a un incremento en la transcripción de pre-proinsulina y de los inductores de su expresión PDX-1 (*pancreatic duodenal homeobox transcription factor-1*), HNF3 $\beta$  (*hepatocyte nuclear factor 3 $\beta$* ) y BETA2 ( $\beta$ 2/NeuroD) (65). La descendencia de ratas gestadas y en especial amamantadas por madres obesas presenta acumulación de triglicéridos y sobreexpresión de colágeno pancreáticos, lo que indica la programación perinatal de alteraciones estructurales pancreáticas (66). En otros trabajos realizados con modelos similares, en los que se estudió la descendencia a largo plazo (6-12 meses) se ha observado desensibilización sistémica a insulina y disminución de la secreción pancreática de insulina estimulada por glucosa a pesar de un incremento en el contenido de gránulos secretorios de insulina (67, 68). En modelos de obesidad ovina se ha encontrado que los fetos presentan hiperinsulinemia, índices de sensibilidad a insulina disminuidos, hiperplasia pancreática y un incremento en el contenido pancreático de insulina y de células secretoras de insulina (69). Un trabajo posterior, realizado en el mismo modelo por el mismo grupo, muestra que los eventos tempranos desaparecen en el feto a término, que presenta una reducción en número de células  $\beta$ , un incremento de la apoptosis pancreática y una disminución de la insulinemia en el neonato, lo que indica un agotamiento temprano de la función pancreática (70).

### Conclusiones

Todo parece indicar que la exposición a un ambiente perinatal enriquecido en nutrientes se transfiere al feto a través de la placenta y la leche materna. En respuesta, el páncreas fetal y neonatal incrementa la producción insulínica. Sin embargo, el mismo incremento en la afluencia de nutrientes genera un aumento de la adiposidad, localizada en los sitios fisiológicos e infiltrada en órganos como el hígado, músculo y páncreas, induciendo anomalías funcionales en estos órganos. La hiperinsulinemia colabora con la hipertrofia adipocitaria que, debido a la producción de citoquinas inflamatorias, genera insulinoresistencia en los órganos insulino dependientes y colabora con la exacerbación de la hiperinsulinemia. El páncreas, inmerso en un entorno proinflamatorio, recibe el estímulo constante que generan los altos niveles circulantes de lípidos y finalmente se inflama y puede agotarse y disminuir la producción insulínica. La resistencia a la insulina y consecuente adiposidad altera la función hepática y disminuye la masa muscular lo que induce alteraciones en el metabolismo de lípidos y glucosa. Además, la hiperinsulinemia y el incremento en la adiposidad generan un incremento en la producción de leptina por el





**Figura 1.** Esquema de los mecanismos intervinientes y los efectos en la programación del fenotipo obeso.

tejido adiposo, placenta e hígado fetal y neonatal. La hiperleptinemia, junto con la gran producción de citoquinas proinflamatorias, induce resistencia a leptina central y periférica. La hiperleptinemia e hiperinsulinemia impactan en el hipotálamo en formación programando alteraciones que conducirán a la hiperfagia y la disminución del gasto energético. En conjunto, la obesidad materna programa un incremento de la adiposidad, resistencia a la insulina y leptina, alteraciones hepáticas, hiperfagia y disminución del gasto energético, lo que induce el fenotipo obeso en la descendencia (FIGURA 1).

## Referencias

1. Lake JK, Power C, Cole TJ. Child to adult body mass index in the 1958 British birth cohort: associations with parental obesity. *Archives of Disease in Childhood*. 1997;77(5):376-81.
2. Laitinen J, Power C, Jarvelin MR. Family social class, maternal body mass index, childhood body mass index, and age at menarche as predictors of adult obesity. *Am J Clin Nutr*. 2001;74(3):287-94.
3. Dabelea D, Hanson RL, Lindsay RS, Pettitt DJ, Imperatore G, Gabir MM, et al. Intrauterine exposure to diabetes conveys risks for type 2 diabetes and obesity: a study of discordant sibships. *Diabetes*. 2000;49(12):2208-11.
4. Villamor E, Cnattingius S. Interpregnancy weight change and risk of adverse pregnancy outcomes: a population-based study. *Lancet*. 2006; 30;368(9542):1164-70.
5. Kral JG, Biron S, Simard S, Hould FS, Lebel S, Marceau S, et al. Large maternal weight loss from obesity surgery prevents transmission of obesity to children who were followed for 2 to 18 years. *Pediatrics*. 2006;118(6):e1644-9.
6. Jones HN, Powell TL, Jansson T. Regulation of placental nutrient transport--a review. *Placenta*. 2007;28(8-9):763-74.
7. Coan PM, Angiolini E, Sandovici I, Burton GJ, Constanza M, Fowden AL. Adaptations in placental nutrient transfer capacity to meet fetal growth demands depend on placental size in mice. *J Physiol*. 2008;15;586(Pt 18):4567-76.
8. Fowden AL, Ward JW, Wooding FP, Forhead AJ, Constanza M. Programming placental nutrient transport capacity. *J Physiol*. 2006;1;572(Pt 1):5-15.
9. Jansson N, Nilfeldt A, Gellerstedt M, Wennergren M, Rossander-Hulthen L, Powell TL, et al. Maternal hormones linking maternal body mass index and dietary intake to birth weight. *Am J Clin Nutr*. 2008;87(6):1743-9.
10. Magnusson-Olsson AL, Hamark B, Ericsson A, Wennergren M, Jansson T, Powell TL. Gestational and hormonal regulation of human placental lipoprotein lipase. *Journal of Lipid Research*. 2006;47(11):2551-61.
11. Fowden AL, Moore T. Maternal-fetal resource allocation: co-operation and conflict. *Placenta*. 2012;33 Suppl 2:e11-5.
12. Jansson T, Cetin I, Powell TL, Desoye G, Radaelli T, Ericsson A, et al. Placental transport and metabolism in fetal overgrowth -- a workshop report. *Placenta*. 2006;27

- Suppl A:S109-13.
13. Karl PI, Alpy KL, Fisher SE. Amino acid transport by the cultured human placental trophoblast: effect of insulin on AIB transport. *The American Journal of Physiology*. 1992;262(4 Pt 1):C834-9.
  14. Hiden U, Lang I, Ghaffari-Tabrizi N, Gauster M, Lang U, Desoye G. Insulin action on the human placental endothelium in normal and diabetic pregnancy. *Curr Vasc Pharmacol*. 2009;7(4):460-6.
  15. Susa JB, McCormick KL, Widness JA, Singer DB, Oh W, Adamsons K, et al. Chronic hyperinsulinemia in the fetal rhesus monkey: effects on fetal growth and composition. *Diabetes*. 1979;28(12):1058-63.
  16. Akerman F, Lei ZM, Rao CV. Human umbilical cord and fetal membranes co-express leptin and its receptor genes. *Gynecol Endocrinol*. 2002;16(4):299-306.
  17. Mazzucco MB, Higa R, Capobianco E, Kurtz M, Jawerbaum A, White V. Saturated fat rich diet increases fetal lipids and modulates LPL and ObR expression in rat placentas. *The Journal of Endocrinology*. 2013; 29;217(3):303-15.
  18. Misra VK, Trudeau S. The influence of overweight and obesity on longitudinal trends in maternal serum leptin levels during pregnancy. *Obesity (Silver Spring)* 2011;19(2):416-21.
  19. Coxa R, Gualillo O, Pineda J, Garcia MC, Busturia MA, Aniel-Quiroga A, et al. Effect of cyclic 3',5'-adenosine monophosphate, glucocorticoids, and insulin on leptin messenger RNA levels and leptin secretion in cultured human trophoblast. *Biol Reprod*. 2001;65(3):814-9.
  20. Catalano PM, Presley L, Minium J, Hauguel-de Mouzon S. Fetuses of obese mothers develop insulin resistance in utero. *Diabetes Care*. 2009;32(6):1076-80.
  21. Misra VK, Trudeau S, Pemi U. Maternal serum lipids during pregnancy and infant birth weight: the influence of prepregnancy BMI. *Obesity (Silver Spring, Md.)* 2011;19(7):1476-81.
  22. Jones HN, Woollett LA, Barbour N, Prasad PD, Powell TL, Jansson T. High-fat diet before and during pregnancy causes marked up-regulation of placental nutrient transport and fetal overgrowth in C57/BL6 mice. *Faseb J*. 2008;30.
  23. Liang C, DeCourcy K, Prater MR. High-saturated-fat diet induces gestational diabetes and placental vasculopathy in C57BL/6 mice. *Metabolism: Clinical and Experimental*. 2010;59(7):943-50.
  24. Hayes EK, Lechowicz A, Petrik JJ, Storozhuk Y, Paez-Parent S, Dai Q, et al. Adverse fetal and neonatal outcomes associated with a life-long high fat diet: role of altered development of the placental vasculature. *PLoS One*. 2012;7(3):e33370.
  25. Barker DJ. Intra-uterine programming of the adult cardiovascular system. *Curr Opin Nephrol Hypertens*. 1997;6(1):106-10.
  26. Cripps RL, Martin-Gronert MS, Ozanne SE. Fetal and perinatal programming of appetite. *Clin Sci (Lond)*. 2005;109(1):1-11.
  27. Baura GD, Foster DM, Porte D, Jr., Kahn SE, Bergman RN, Cobelli C, et al. Saturable transport of insulin from plasma into the central nervous system of dogs in vivo. A mechanism for regulated insulin delivery to the brain. *J Clin Invest*. 1993;92(4):1824-30.
  28. Long NM, Ford SP, Nathanielsz PW. Maternal obesity eliminates the neonatal lamb plasma leptin peak. *J Physiol*. 2011;15;589(Pt 6):1455-62.
  29. Harder T, Plagemann A, Rohde W, Dörner G. Syndrome X-like alterations in adult female rats due to neonatal insulin treatment. *Metabolism*. 1998;47(7):855-62.
  30. Long NM, Ford SP, Nathanielsz PW. Maternal obesity eliminates the neonatal lamb plasma leptin peak. *The Journal of Physiology*. 2011;15;589(Pt 6):1455-62.
  31. Proulx K, Richard D, Walker CD. Leptin regulates appetite-related neuropeptides in the hypothalamus of developing rats without affecting food intake. *Endocrinology*. 2002;Dec;143(12):4683-92.
  32. Chiu SL, Cline HT. Insulin receptor signaling in the development of neuronal structure and function. *Neural Development*. 2010;15; 5:7.
  33. Davidowa H, Plagemann A. Insulin resistance of hypothalamic arcuate neurons in neonatally overfed rats. *Neuroreport*. 2007;26;18(5):521-4.
  34. Plagemann A, Harder T, Brunn M, Harder A, Roepke K, Wittrock-Staar M, et al. Hypothalamic proopiomelanocortin promoter methylation becomes altered by early overfeeding: an epigenetic model of obesity and the metabolic syndrome. *J Physiol*. 2009;15;587(Pt 20):4963-76.
  35. Kirk SL, Samuelsson AM, Argenton M, Dhonye H, Kalamatianos T, Poston L, et al. Maternal obesity induced by diet in rats permanently influences central processes regulating food intake in offspring. *PLoS One*. 2009;4(6):e5870.
  36. Bayol SA, Farrington SJ, Stickland NC. A maternal 'junk food' diet in pregnancy and lactation promotes an exacerbated taste for 'junk food' and a greater propensity for obesity in rat offspring. *Br J Nutr*. 2007;98(4):843-51.
  37. Nivoit P, Morens C, Van Assche FA, Jansen E, Poston L, Remacle C, et al. Established diet-induced obesity in female rats leads to offspring hyperphagia, adiposity and insulin resistance. *Diabetologia*. 2009;52(6):1133-42.
  38. Gupta A, Srinivasan M, Thamadilok S, Patel MS. Hypothalamic alterations in fetuses of high fat diet-fed obese female rats. *The Journal of Endocrinology*. 2009;200(3):293-300.
  39. Chang GQ, Gaysinskaya V, Karatayev O, Leibowitz SF. Maternal high-fat diet and fetal programming: increased proliferation of hypothalamic peptide-producing neurons that increase risk for overeating and obesity. *J Neurosci*. 2008;28(46):12107-19.
  40. Oben JA, Mouralidarane A, Samuelsson AM, Matthews PJ, Morgan ML, McKee C, et al. Maternal obesity during pregnancy and lactation programs the development of offspring non-alcoholic fatty liver disease in mice. *Journal of Hepatology*. 2010;52(6):913-20.
  41. Bayol SA, Simbi BH, Fowkes RC, Stickland NC. A maternal "junk food" diet in pregnancy and lactation promotes nonalcoholic Fatty liver disease in rat off-

- pring. *Endocrinology*. 2010;151(4):1451-61.
42. Giorgio V, Prono F, Graziano F, Nobili V. Pediatric non alcoholic fatty liver disease: old and new concepts on development, progression, metabolic insight and potential treatment targets. *BMC pediatrics*. 2013;25;13(1):40.
  43. McCurdy CE, Bishop JM, Williams SM, Grayson BE, Smith MS, Friedman JE, et al. Maternal high-fat diet triggers lipotoxicity in the fetal livers of nonhuman primates. *J Clin Invest*. 2009;119(2):323-35.
  44. Elahi MM, Cagampang FR, Mukhtar D, Anthony FW, Ohri SK, Hanson MA. Long-term maternal high-fat feeding from weaning through pregnancy and lactation predisposes offspring to hypertension, raised plasma lipids and fatty liver in mice. *Br J Nutr*. 2009;102(4):514-9.
  45. Gregorio BM, Souza-Mello V, Carvalho JJ, Mandarim-de-Lacerda CA, Aguila MB. Maternal high-fat intake predisposes nonalcoholic fatty liver disease in C57BL/6 offspring. *American Journal of Obstetrics and Gynecology*. 2010;203(5):495 e1-8.
  46. Bruce KD, Cagampang FR, Argenton M, Zhang J, Ethirajan PL, Burdge GC, et al. Maternal high-fat feeding primes steatohepatitis in adult mice offspring, involving mitochondrial dysfunction and altered lipogenesis gene expression. *Hepatology (Baltimore, Md.)*. 2009;50(6):1796-808.
  47. Shankar K, Kang P, Harrell A, Zhong Y, Marecki JC, Ronis MJ, et al. Maternal overweight programs insulin and adiponectin signaling in the offspring. *Endocrinology*. 2010;151(6):2577-89.
  48. Buckley AJ, Keseru B, Briody J, Thompson M, Ozanne SE, Thompson CH. Altered body composition and metabolism in the male offspring of high fat-fed rats. *Metabolism*. 2005;54(4):500-7.
  49. Shankar K, Harrell A, Liu X, Gilchrist JM, Ronis MJ, Badger TM. Maternal obesity at conception programs obesity in the offspring. *Am J Physiol Regul Integr Comp Physiol*. 2008;294(2):R528-38.
  50. Mingrone G, Manco M, Mora ME, Guidone C, Iaconelli A, Gniuli D, et al. Influence of maternal obesity on insulin sensitivity and secretion in offspring. *Diabetes Care*. 2008;31(9):1872-6.
  51. Bayol SA, Simbi BH, Stickland NC. A maternal cafeteria diet during gestation and lactation promotes adiposity and impairs skeletal muscle development and metabolism in rat offspring at weaning. *J Physiol*. 2005;15;567(Pt 3):951-61.
  52. Yan X, Zhu MJ, Xu W, Tong JF, Ford SP, Nathanielsz PW, et al. Up-regulation of Toll-like receptor 4/nuclear factor-kappaB signaling is associated with enhanced adipogenesis and insulin resistance in fetal skeletal muscle of obese sheep at late gestation. *Endocrinology*. 2010;151(1):380-7.
  53. Shelley P, Martin-Gronert MS, Rowlerson A, Poston L, Heales SJ, Hargreaves IP, et al. Altered skeletal muscle insulin signaling and mitochondrial complex II-III linked activity in adult offspring of obese mice. *Am J Physiol Regul Integr Comp Physiol*. 2009;297(3):R675-81.
  54. Simar D, Chen H, Lambert K, Mercier J, Morris MJ. Interaction between maternal obesity and post-natal overnutrition on skeletal muscle metabolism. *Nutr Metab Cardiovasc Dis*. 2012;22(3):269-76.
  55. Samuelsson AM, Matthews PA, Argenton M, Christie MR, McConnell JM, Jansen EH, et al. Diet-induced obesity in female mice leads to offspring hyperphagia, adiposity, hypertension, and insulin resistance: a novel murine model of developmental programming. *Hypertension*. 2008;51(2):383-92.
  56. Jensen DM, Damm P, Sorensen B, Molsted-Pedersen L, Westergaard JG, Ovesen P, et al. Pregnancy outcome and pre-pregnancy body mass index in 2459 glucose-tolerant Danish women. *Am J Obstet Gynecol*. 2003;189(1):239-44.
  57. Sewell MF, Huston-Presley L, Super DM, Catalano P. Increased neonatal fat mass, not lean body mass, is associated with maternal obesity. *Am J Obstet Gynecol*. 2006;195(4):1100-3.
  58. Faust IM, Johnson PR, Stern JS, Hirsch J. Diet-induced adipocyte number increase in adult rats: a new model of obesity. *The American Journal of Physiology*. 1978;235(3):E279-86.
  59. Muhlhausler BS, Duffield JA, McMillen IC. Increased maternal nutrition stimulates peroxisome proliferator activated receptor-gamma, adiponectin, and leptin messenger ribonucleic acid expression in adipose tissue before birth. *Endocrinology*. 2007;148(2):878-85.
  60. Muhlhausler BS, Duffield JA, McMillen IC. Increased maternal nutrition increases leptin expression in perirenal and subcutaneous adipose tissue in the postnatal lamb. *Endocrinology*. 2007;148(12):6157-63.
  61. Kim JB, Sarraf P, Wright M, Yao KM, Mueller E, Solanes G, et al. Nutritional and insulin regulation of fatty acid synthetase and leptin gene expression through ADD1/SREBP1. *J Clin Invest*. 1998;101(1):1-9.
  62. Maiorana A, Del Bianco C, Cianfarani S. Adipose Tissue: A Metabolic Regulator. Potential Implications for the Metabolic Outcome of Subjects Born Small for Gestational Age (SGA). *Rev Diabet Stud*. 2007;4(3):134-46.
  63. Massiera F, Barbry P, Guesnet P, Joly A, Luquet S, Moreilhon-Brest C, et al. A Western-like fat diet is sufficient to induce a gradual enhancement in fat mass over generations. *Journal of Lipid Research*. 2010;51(8):2352-61.
  64. Carpenter MW, Canick JA, Star J, Carr SR, Burke ME, Shahinian K. Fetal hyperinsulinism at 14-20 weeks and subsequent gestational diabetes. *Obstetrics and Gynecology*. 1996;87(1):89-93.
  65. Srinivasan M, Aalinkeel R, Song F, Mitrani P, Pandya JD, Strutt B, et al. Maternal hyperinsulinemia predisposes rat fetuses for hyperinsulinemia, and adult-onset obesity and maternal mild food restriction reverses this phenotype. *Am J Physiol Endocrinol Metab*. 2006;290(1):E129-E34.
  66. Oben JA, Patel T, Mouralidarane A, Samuelsson AM, Matthews P, Pombo J, et al. Maternal obesity programmes offspring development of non-alcoholic fatty pancreas disease. *Biochem Biophys Res Commun*. 2010;26;394(1):24-8.
  67. Taylor PD, McConnell J, Khan IY, Holemans K, Lawren-

- ce KM, Asare-Anane H, et al. Impaired glucose homeostasis and mitochondrial abnormalities in offspring of rats fed a fat-rich diet in pregnancy. *Am J Physiol Regul Integr Comp Physiol.* 2005;288(1):R134-9.
68. Han J, Xu J, Epstein PN, Liu YQ. Long-term effect of maternal obesity on pancreatic beta cells of offspring: reduced beta cell adaptation to high glucose and high-fat diet challenges in adult female mouse offspring. *Diabetologia.* 2005;48(9):1810-8.
69. Ford SP, Zhang L, Zhu M, Miller MM, Smith DT, Hess BW, et al. Maternal obesity accelerates fetal pancreatic beta-cell but not alpha-cell development in sheep: prenatal consequences. *Am J Physiol Regul Integr Comp Physiol.* 2009;297(3):R835-43.
70. Zhang L, Long NM, Hein SM, Ma Y, Nathanielsz PW, Ford SP. Maternal obesity in ewes results in reduced fetal pancreatic beta-cell numbers in late gestation and decreased circulating insulin concentration at term. *Domestic Animal Endocrinology.* 2011;40(1):30-9.

## Revisiones

### Alteraciones inmunológicas en endometriosis

#### *Immunological abnormalities in endometriosis*

Dra. Rosa Inés Barañao

*Instituto de Biología y Medicina Experimental-CONICET*

*Vuelta de Obligado 2490 (C1428ADN) CABA, Argentina - E-mail: inesbaranao@ibyme.conicet.gov.ar*

#### Resumen

La endometriosis es una patología ginecológica estrógeno-dependiente e inflamatoria que se define como la presencia de tejido endometrial fuera de la cavidad uterina.

¿Por qué en las pacientes con endometriosis el tejido endometrial ectópico no es eliminado por el sistema inmunológico?

En el presente trabajo se describe una serie de alteraciones en las distintas poblaciones leucocitarias, citoquinas y otros factores solubles reguladores de la respuesta inmunológica presentes en las pacientes con endometriosis.

Asimismo, se describen los mecanismos por los cuales estas alteraciones, no sólo favorecen la "tolerancia inmunológica" hacia los implantes endometriósicos, sino que, por el contrario, colaboran en el desarrollo de la enfermedad al estimular la proliferación y angiogénesis e inhibir la apoptosis del tejido endometrial ectópico.

**Palabras clave:** endometriosis, líquido peritoneal, tolerancia, macrófagos, citoquinas.

#### Abstract

*Endometriosis is a gynecological inflammatory estrogen dependent pathology that is defined as the presence of endometrial tissue outside the uterine cavity.*

*Why in patients with endometriosis the ectopic endometrial tissue is not eliminated by the immune system?*

*In this paper a series of abnormalities in different leukocyte populations, cytokines and other regulatory soluble factors of the immune response, present in patients with endometriosis, are described.*

*Also are described the mechanisms by which these changes, not only favor the "immunological tolerance" to endometriotic implants but on the contrary, collaborating in the development of the disease by stimulating the angiogenesis and proliferation and inhibit the apoptosis of ectopic endometrial tissue.*

**Key words:** *endometriosis, peritoneal liquid, tolerance, macrophages, cytokines.*

La endometriosis se define como la presencia de tejido endometrial fuera de la cavidad uterina. Es una enfermedad ginecológica benigna, inflamatoria y estrógeno-dependiente. Sus principales síntomas son el dolor pélvico agudo previo o intramenstrual y/o dolor crónico y la infertilidad(1). El dolor puede ser tan intenso que afecta la calidad de vida de la mujer, desde sus relaciones hasta sus actividades diarias y es además la tercera causa de hospitalización ginecológica(2,3).

Es una enfermedad que afecta a alrededor del 10-15% de las mujeres en edad reproductiva; existen alrededor de 200 millones de pacientes en el mundo y un millón en la Argentina. Sin embargo, es posible que la población afectada sea mucho mayor por ser una patología subdiagnosticada debido a que culturalmente se acepta como "normal" que las menstruaciones puedan ser muy dolorosas y porque la única manera de obtener un diagnóstico certero es mediante una laparoscopia(4). Las pacientes con endometriosis se presentan a la consulta generalmente por problemas de infertilidad (dado que entre el 50-80% de estas pacientes son infértiles) y se ha estimado que el retraso en el diagnóstico es de alrededor de 7 años(5).