

Estudio de la foliculogénesis y apoptosis ovárica luego de la administración intraovárica de un inhibidor de VEGF (R₁/Fc Chimera)

Dalhia Abramovich¹; Fernanda Parborell¹; Marta Tesone^{1,2}

1Instituto de Biología y Medicina Experimental (IByME) – CONICET, 2Departamento de Química Biológica, Facultad de Ciencias Exactas, Universidad de Buenos Aires, Buenos Aires, Argentina

Introducción

La angiogénesis en condiciones fisiológicas es infrecuente en el adulto a excepción del tracto reproductor femenino. Los folículos ováricos preantrales no poseen vasculatura propia, la cual es adquirida durante el desarrollo del antro ⁽¹⁾. La adquisición de un adecuado aporte sanguíneo es posiblemente un paso limitante en la selección y maduración del folículo dominante ⁽¹⁾. La degeneración del lecho capilar en folículos que no lograron desarrollarse es un factor relevante causante de atresia ⁽²⁾. El folículo ovárico y el cuerpo lúteo producen el factor de crecimiento del endotelio vascular (VEGFA o VEGF) el cual juega un rol primordial en la angiogénesis ovárica ⁽³⁾.

La administración de un anticuerpo contra el receptor 2 de VEGF (Flk-1/KDR o VEGFR2) inhibe la angiogénesis folicular dependiente de gonadotropinas en ratón lo cual a su vez, bloquea el desarrollo folicular ⁽⁴⁾. Además, se ha observado que la inyección de VEGF en ovario de ratón promueve el desarrollo folicular ⁽⁵⁾. Por otra parte, la inhibición de VEGF con un antagonista denominado Trap, produce una disminución en la angiogénesis folicular y en la expresión de los receptores 1 y 2 de VEGF (VEGFR1 o Flt-1 y VEGFR2) en primates no humanos ⁽⁶⁾. La inyección intrafolicular de un antagonista de VEGF en el

mono rhesus impide la ovulación y el subsecuente desarrollo del cuerpo lúteo ⁽⁷⁾.

Sin embargo, poco se sabe del rol de VEGF en la angiogénesis ovárica y la apoptosis. Particularmente, la relación que existe entre ambos procesos es poco conocida. Se ha reportado la existencia de VEGF y de sus receptores en células de granulosa y en células tecales tanto a nivel de RNA mensajero como de proteína ⁽⁸⁾. Nosotros sugerimos que la apoptosis en células de granulosa de los folículos seleccionados para la ovulación podría prevenirse a través de las acciones autocrinas o paracrinas del VEGF.

VEGF es citoprotector en células endoteliales previniendo la apoptosis. Sin embargo, el rol de este factor en otros tejidos aún no está claro. Algunos trabajos han demostrado que el VEGF es citoprotector en miocitos luego de injuria por isquemia ⁽⁹⁾ y que este factor ejerce un efecto directo de inhibición de la apoptosis en neuronas y estimulación de neurogénesis ^(10,11). Recientemente, Greenaway et al ⁽¹²⁾ ha demostrado que VEGF posee un efecto citoprotector en células de granulosa bovinas por inhibición de la apoptosis y que este efecto estaría mediado por el receptor VEGFR2.

El objetivo de este trabajo fue estudiar si el VEGF intraovárico juega un papel crítico en la supervivencia celular necesaria

para el desarrollo folicular dependiente de gonadotropinas. En particular, hemos examinado el efecto de la administración local de un antagonista de VEGF en el desarrollo folicular, la apoptosis y la expresión de proteínas de la familia de BCL2 (BAX, BCL2 y BCLX), FAS y FASL en folículos ováricos de ratas prepúberes tratadas con gonadotropina coriónica equina (eCG).

Materiales y Métodos

Ratas Sprague-Dawley prepúberes de 21-23 días tratadas con eCG fueron inyectadas con un inhibidor de VEGF (Trap: quimera receptor 1 o Flt-1/Fc recombinante) intrabursa en un ovario. El ovario contralateral fue inyectado con vehículo para ser utilizado como control. Las dosis de Trap ensayadas fueron de 0.1 o 0.5 mg. Los ovarios fueron extraídos 12, 24 o 48 horas luego de la inyección y procesados para cortes histológicos. Se realizó un recuento de folículos a los diferentes tiempos ensayados sobre cortes histológicos teñidos con hematoxilina-eosina. Los folículos fueron clasificados como preantrales (PF), antrales tempranos (EAF), periovulatorios (POF: folículos preovulatorios y cuerpos lúteos recién formados) y atrésicos (AtF). Con la dosis de 0.1 mg no se observaron diferencias significativas a ninguno de los tiempos ensayados y tampoco con la dosis de 0.5 mg a las 12 o 24 horas. Por lo tanto los siguientes ensayos se realizaron con una dosis de 0.5 mg, 48 horas luego de la inyección. Se realizó la técnica de TUNEL sobre cortes histológicos para detectar células apoptóticas.

Por otra parte, se aislaron folículos antrales sanos bajo la lupa (300-450 mm de diámetro) provenientes de ovarios controles y tratados con Trap. Se extrajeron las proteínas de dichos folículos para realizar la técnica de Western blot para la detección de proteínas relacionadas con la apoptosis (BAX; BCL2; BCLXs, BCLXL, FAS y FASL).

Para detectar diferencias en la permeabilidad vascular entre ambos ovarios, se realizó la técnica de azul de Evans (EB) ⁽¹³⁾. Las ratas fueron anestesiadas e inyec-

tadas con 0.2 ml de una solución 5 mM en agua destilada de azul de Evans. Luego de 30 minutos, fueron sacrificadas. Los ovarios fueron extraídos e incubados 24 horas a 37° C en formamida. La absorbancia del colorante en formamida fue leída en un espectrofotómetro a 620 nm.

Resultados

La figura 1 muestra el efecto del Trap sobre la curva de tiempo para el crecimiento folicular. La inyección de 0.5 mg de Trap/ovario no modificó el número de PF ni de EAF (Fig 1B, a y b); sin embargo, disminuyó significativamente el número de folículos periovulatorios (Fig. 1B, c) (Control: 14.08 ± 1.49%; Trap: 8.54 ± 1.72%, p<0.01, n=6) y produjo un aumento significativo en el número de folículos atrésicos (Fig 1B, d) (Control: 10.46 ± 0.54%; Trap: 16.38 ± 1.27%, p<0.05, n=6), 48 horas luego de la inyección. No se observaron diferencias significativas en ningún estadio folicular a las 12 o 24 horas luego de la inyección ni con la dosis de 0.1mg de Trap (datos no mostrados).

Los cortes histológicos muestran además que el tratamiento con Trap produjo una disminución en la densidad de las células estromales con un incremento en el espacio extracelular.

Como las células de granulosa mueren por apoptosis durante el proceso de atresia folicular ^(14,15), se realizó la técnica de TUNEL sobre cortes histológicos. La figura 2A muestra campos representativos de un ovario control y un ovario tratado. El tratamiento con Trap produjo un aumento significativo en el número de células apoptóticas en EAF (Control: 3.17 ± 0.81 células apoptóticas/campo; Trap: 6.81 ± 1.02 células apoptóticas/campo, p<0.05, n=5) (Figura 2 B).

Se realizó la técnica de azul de Evans para medir la permeabilidad capilar en los ovarios control y tratado con Trap. El contenido del colorante en el ovario tratado no fue significativamente diferente al del ovario control (Control: 32.54 ± 1.98 ng EB/mg ovario, Trap: 31.92 ± 1.89 ng EB/mg ovario; p>0.05; n=14).

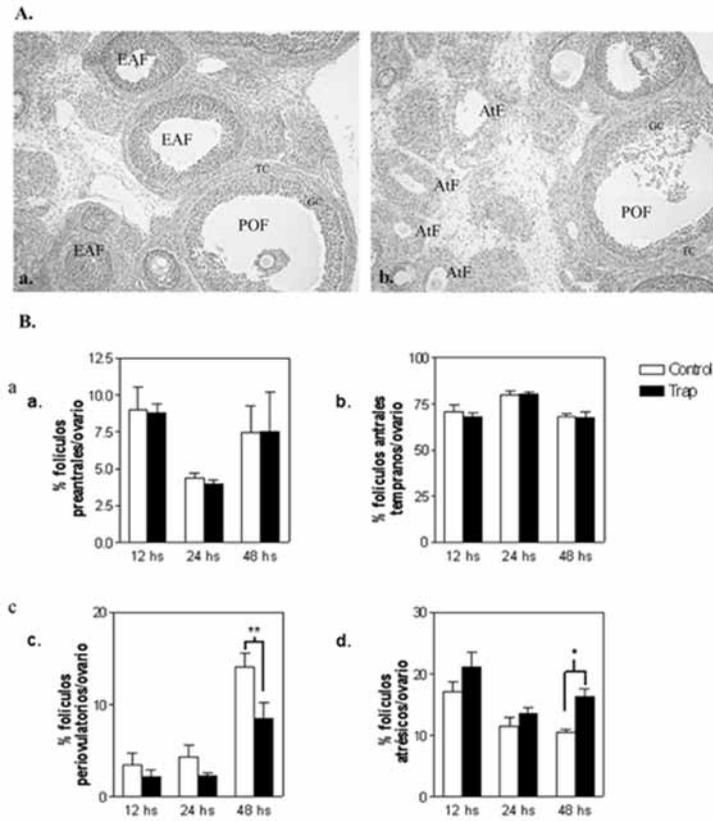


Figura 1: Efecto de la inhibición de VEGF por tratamiento con Trap a diferentes tiempos sobre el crecimiento de los folículos ováricos.

A) Campos representativos de secciones de ovario a 100X. a- Ovario Control; b. Ovario Trap. EAF: folículo astral temprano; Atf: folículo atrésico; POF: folículo periovulatorio; GC: célula de granulosa; TC: célula de la teca.

B) a- Folículos preantrales. b- folículos antrales tempranos. c- folículos periovulatorios. d- folículos atrésicos. *: $p < 0.05$; **: $p < 0.01$; $n=6$

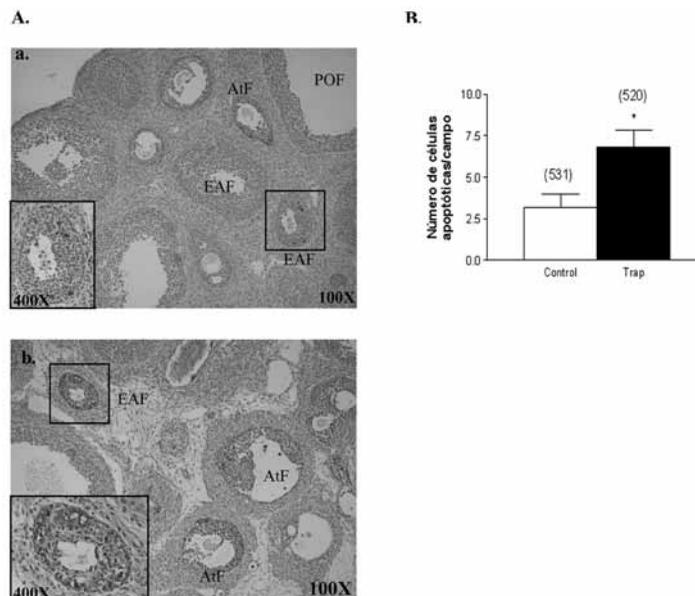


Figura 2:

A) Campos representativos de secciones de ovario marcadas con la técnica de TUNEL. a- Ovario control; b-Ovario Trap. Se muestra una porción de cada sección a mayor aumento. EAF: folículo astral temprano; Atf: folículo atrésico; GC: célula de granulosa; TC: célula de la teca.

B) Técnica de TUNEL. Se determinó el número de células apoptóticas por campo contando células marcadas en campos seleccionados al azar a 400X. El número de folículos analizados se muestra entre paréntesis. Se analizaron tres secciones /ovario (cinco ovarios/grupo). * $p < 0.05$. Paired Student t-Test; $n=5$.

La figura 3 muestra el contenido folicular de las proteínas BCL2, BAX, BCLXs, BCLXL, FAS y FASL medidas por Western blot. La inyección de Trap produjo un aumento significativo en los niveles de BAX (Control: 0.61 ± 0.05 ; Trap: 0.90 ± 0.01 , $p < 0.05$, $n=8$) (Figura 3, A) y una disminución en los niveles de BCL2 (Control: 2.08 ± 0.16 ; Trap: 1.35 ± 0.10 , $p < 0.01$, $n=8$) (Figura 3, B). La relación BCLXL/BCLXs disminuyó significativamente en los folículos obtenidos de ovarios tratados con Trap (Control: 0.51 ± 0.02 ; Trap: 0.34 ± 0.04 , $p < 0.01$, $n=8$) (Figura 3, C) observándose una disminución de BCLXL mayor que la obtenida para BCLXs. No se observaron cambios significativos en los niveles de FAS ni FASL (Figura 3, D y E).

Discusión

Los resultados descriptos en el presente estudio revelan que la administración intrabursa de una forma soluble de VEGFR1 para inhibir el efecto del VEGF produce un aumento en la apoptosis en células foliculares ováricas obtenidas de ratas tratadas con eCG y que los cambios observados en la expresión de las proteínas BAX, BCL2 y BCLX están involucrados en dicho efecto.

La inhibición de VEGF con Trap produjo un aumento en el número de folículos atrésicos y una disminución en el número de folículos periovulatorios en ovario de rata tratada con gonadotropinas. Como la atresia es causada por apoptosis de las células foliculares, examinamos el efecto del Trap sobre la muerte celular programada. La inyección de Trap produjo un aumento en el número de células de granulosa apoptóticas en folículos antrales. Estos datos sugieren que el VEGF podría rescatar a las células de granulosa de la apoptosis e inhibir la atresia folicular.

Tomando en cuenta estos resultados sugerimos que el VEGF desempeña un importante rol en el desarrollo folicular y la atresia mediada por apoptosis. Una buena vascularización o una alta permeabilidad vascular en zonas cercanas a los folículos en desarrollo podrían aumentar el aporte de factores endocrinos o

paracrinos lo que resultaría en una disminución de la atresia y favorecería la selección del folículo. En nuestro modelo, se observó que el tratamiento con Trap produjo una disminución en la densidad de las células estromales con un aumento en el espacio extracelular. Sin embargo, no observamos diferencias en la permeabilidad vascular con el método de azul de Evans. Se están realizando en nuestro laboratorio experimentos *in vitro* para estudiar un posible efecto directo de VEGF sobre las células de granulosa.

Datos previos indican que el bloqueo del VEGF resulta en una menor proliferación de células tecales en ovario de primates no humanos ⁽¹⁶⁾, altera el desarrollo folicular y la secreción de hormonas ⁽⁴⁾ e interfiere con la ovulación, la producción de esteroides y el desarrollo del cuerpo lúteo en mona ^(7,17).

En el presente trabajo, los niveles de FAS y FASL no han sido modificados por el tratamiento con Trap. Estos resultados sugieren que la vía mitocondrial podría estar involucrada en el aumento de la apoptosis. Las proteínas de la familia de bcl2 son las principales participantes de la cascada de eventos de la vía mitocondrial ⁽¹⁸⁾. Los miembros de esta familia pueden dividirse en proteínas proapoptóticas (como BAX y BCLXs) y antiapoptóticas (como BCL2 y BCLXL) y el balance entre ambos tipos de proteínas determina el destino de la célula ⁽¹⁹⁾. En nuestro estudio, se observa una disminución de la expresión de BCL2 y de la relación BCLXL/BCLXs y un aumento de BAX en folículos tratados con Trap.

En conclusión, la inhibición de la actividad de VEGF produciría un aumento en la apoptosis ovárica mediado por un desbalance en la relación proteínas antiapoptóticas/proapoptóticas llevando a un mayor número de folículos a la atresia. El mecanismo podría ser a través de un aumento en el desarrollo de los vasos sanguíneos o bien a través de un efecto directo mediado por el receptor de VEGF en células de granulosa. Por lo tanto, el VEGF sería un factor limitante para el desarrollo folicular y la atresia.

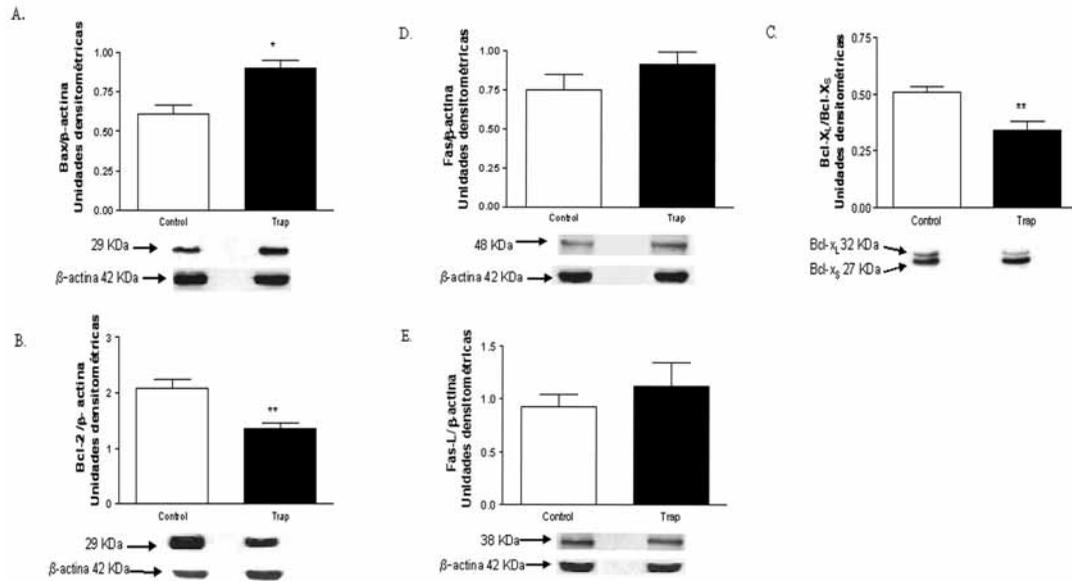


Figura 3: Efecto del tratamiento con Trap sobre el contenido de proteínas pro y anti apoptóticas en folículos antrales.

A) Panel superior: Cuantificación densitométrica del contenido de BAX. Las barras representan la media \pm SEM normalizadas contra β -actina. Panel inferior: Inmunoblot representativo del contenido de BAX en folículos antrales de ovarios de rata control y tratados. (n=8; $p < 0.05$).

B) Panel superior: Cuantificación densitométrica del contenido de BCL-2. Las barras representan la media \pm SEM normalizadas contra β -actina. Panel inferior: Inmunoblot representativo del contenido de BCL-2 en folículos antrales de ovarios de rata control y tratados. (n=8; $p < 0.01$).

C) Panel superior: Cuantificación densitométrica del contenido de BCLX. Las barras representan la media \pm SEM. Panel inferior: Inmunoblot representativo del contenido de BCLX en folículos antrales de ovarios de rata control y tratados. (n=8; $p < 0.01$).

D) Panel superior: Cuantificación densitométrica del contenido de FAS. Las barras representan la media \pm SEM normalizadas contra β -actina. Panel inferior: Inmunoblot representativo del contenido de FAS en folículos antrales de ovarios de rata control y tratados. (n=8).

E) Panel superior: Cuantificación densitométrica del contenido de FASL. Las barras representan la media \pm SEM normalizadas contra β -actina. Panel inferior: Inmunoblot representativo del contenido de FASL en folículos antrales de ovarios de rata control y tratados. (n=8).

Las acciones antiapoptóticas del VEGF en el ovario lo ubican como un factor novel cuya expresión anormal podría llevar al desarrollo de diferentes enfermedades relacionadas con la muerte celular programada. Más aún, los resultados descritos en este estudio podrían aclarar cuáles son los mecanismos a través de los cuales el VEGF tiene un efecto sobre ciertos desórdenes ováricos (como el síndrome de ovario poliquístico o el síndrome de hiperestimulación ovárica). El uso de compuestos antiangiogénicos podría contribuir al desarrollo de nuevas estrategias terapéuticas en estas pacientes.

Referencias

1. Stouffer RL, Martinez-Chequer JC, Molskness TA, Xu F, Hazzard TM. Regulation and action of angiogenic factors in the primate ovary. *Arch Med Res* 2001;32:567-575.

2. Zeleznik AJ, Schuler HM, Reichert LE, Jr. Gonadotropin-binding sites in the rhesus monkey ovary: role of the vasculature in the selective distribution of human chorionic gonadotropin to the preovulatory follicle. *Endocrinology* 1981;109:356-362.

3. Tamanini C, De Ambrogio M. Angiogenesis in developing follicle and corpus luteum. *Reprod Domest Anim* 2004;39:206-216.

4. Zimmermann RC, Hartman T, Kavic S, Pauli SA, Bohlen P, Sauer MV, Kitajewski J. Vascular endothelial growth factor receptor 2-mediated angiogenesis is essential for gonadotropin-dependent follicle development. *J Clin Invest* 2003;112:659-669.

5. Quintana R, Kopcow L, Sueldo C, Marconi G, Rueda NG, Baranao RI. Direct injection of vascular endothelial growth factor into the ovary of mice promotes follicular development. *Fertil Steril* 2004;82 Suppl 3:1101-1105.

6. Wulff C, Wilson H, Wiegand SJ, Rudge JS, Fraser HM. Prevention of thecal angiogenesis, antral follicular growth, and ovulation in the primate by treatment with vascular endothelial growth factor Trap R1R2. *Endocrinology* 2002;143:2797-2807.
7. Hazzard TM, Xu F, Stouffer RL. Injection of soluble vascular endothelial growth factor receptor 1 into the preovulatory follicle disrupts ovulation and subsequent luteal function in rhesus monkeys. *Biol Reprod* 2002;67:1305-1312.
8. Geva E, Jaffe RB. Role of vascular endothelial growth factor in ovarian physiology and pathology. *Fertil Steril* 2000;74:429-438.
9. Rissanen TT, Vajanto I, Hiltunen MO, Rutanen J, Kettunen MI, Niemi M, Leppanen P, Turunen MP, Markkanen JE, Arve K, Alhava E, Kauppinen RA, Yla-Herttuala S. Expression of vascular endothelial growth factor and vascular endothelial growth factor receptor-2 (KDR/Flk-1) in ischemic skeletal muscle and its regeneration. *Am J Pathol* 2002;160:1393-1403.
10. Gora-Kupilas K, Josko J. The neuroprotective function of vascular endothelial growth factor (VEGF). *Folia Neuropathol* 2005;43:31-39.
11. Rosenstein JM, Krum JM. New roles for VEGF in nervous tissue—beyond blood vessels. *Exp Neurol* 2004;187:246-253.
12. Greenaway J, Connor K, Pedersen HG, Coomber BL, LaMarre J, Petrik J. Vascular endothelial growth factor and its receptor, Flk-1/KDR, are cytoprotective in the extravascular compartment of the ovarian follicle. *Endocrinology* 2004;145:2896-2905.
13. Kitajima Y, Endo T, Manase K, Nishikawa A, Shibuya M, Kudo R. Gonadotropin-releasing hormone agonist administration reduced vascular endothelial growth factor (VEGF), VEGF receptors, and vascular permeability of the ovaries of hyperstimulated rats. *Fertil Steril* 2004;81 Suppl 1:842-849.
14. Tilly JL, Kowalski KI, Johnson AL, Hsueh AJ. Involvement of apoptosis in ovarian follicular atresia and postovulatory regression. *Endocrinology* 1991;129:2799-2801.
15. Hughes FM, Jr., Gorospe WC. Biochemical identification of apoptosis (programmed cell death) in granulosa cells: evidence for a potential mechanism underlying follicular atresia. *Endocrinology* 1991;129:2415-2422.
16. Wulff C, Wiegand SJ, Saunders PT, Scobie GA, Fraser HM. Angiogenesis during follicular development in the primate and its inhibition by treatment with truncated Flt-1-Fc (vascular endothelial growth factor Trap(A40)). *Endocrinology* 2001;142:3244-3254.
17. Xu F, Hazzard TM, Evans A, Charnock-Jones S, Smith S, Stouffer RL. Intraovarian actions of anti-angiogenic agents disrupt periovulatory events during the menstrual cycle in monkeys. *Contraception* 2005;71:239-248.
18. Boise LH, Gonzalez-Garcia M, Postema CE, Ding L, Lindsten T, Turka LA, Mao X, Nunez G, Thompson CB. bcl-x, a bcl-2-related gene that functions as a dominant regulator of apoptotic cell death. *Cell* 1993;74:597-608.
19. Oltvai ZN, Milliman CL, Korsmeyer SJ. Bcl-2 heterodimerizes in vivo with a conserved homolog, Bax, that accelerates programmed cell death. *Cell* 1993;74:609-619.