

Citoquinas y ovulación *Cytokines and ovulation*

Dres. Roberto Inza, Germán Van Thillo

Instituto de Ginecología y Fertilidad (IFER), Buenos Aires, Argentina

E-mail: ifer@iferr.com.ar

Resumen

El concepto de comunicación bidireccional entre el sistema endocrino y el sistema inmune, donde no sólo el sistema endocrino modula la respuesta del inmune, sino que este último también lo hace sobre el endocrino, ya está bien establecido.

Las citoquinas son péptidos, proteínas o glicoproteínas cuyas cantidades circulantes, en condiciones de ausencia de estrés, son mínimas con un rango de acción primordialmente local ya sea autocrina o paracrina. Sus efectos son caracterizados por el pleiotropismo e incluyen numerosos efectos en células del sistema inmune y modulación de la respuesta inflamatoria.

Muchos de los efectos de las citoquinas, como son proliferación celular, diferenciación celular, apoptosis, angiogénesis y producción hormonal, se evidencian en las distintas fases del ciclo ovulatorio, como la foliculogénesis, esteroideogénesis, la ruptura folicular y ovulación, la remodelación folicular con formación y posterior regresión del cuerpo lúteo.

La principal fuente de citoquinas en el organismo son las células del sistema inmune, es decir, los leucocitos; secundariamente existe una fuente ovárica primaria, es decir, una síntesis *de novo* ovárica en cualquiera de los elementos que conforman el complejo ovárico (células de la teca, granulosa, cúmulo y/u ovocito).

En el contexto de ciclos de fertilización asistida de alta complejidad se ha intentado identificar el o los factores pronóstico que mejor permitan predecir las probabilidades de embarazo e implantación. Ya hay reportes del uso de citoquinas recombinantes en pacientes que realizan fertilización in vitro (FIV) con el objetivo de mejorar la respuesta ovárica.

Palabras clave: citoquinas, ovulación, interferones, factores de crecimiento, factores estimulantes de colonias.

Abstract

The concept of bidirectional communication between the endocrine and immune systems, where not only the endocrine system modulates the immune response but also viceversa, is already well established.

Cytokines are peptides, proteins or glycoproteins that, in the absence of stress, circulate in minimal amounts with a rather local and paracrine action. Their

effects are characterized by the pleiotropism, and this includes various effects on the cells of the immune system and modulation of the inflammatory response.

Many effects of cytokines such as cellular proliferation, differentiation, apoptosis, angiogenesis and local hormonal production are put in evidence in the ovulatory cycle such as in folliculogenesis, steroidogenesis, follicular rupture and ovulation, remodelling to form the corpus luteum.

The principal source of ovarian cytokines are the cells of the immune system, although there is some local primary ovarian production from the cells that form the ovarian complex (thecal cells, granulosa, cumulus, and/or oocyte).

In the context of IVF, there are still many attempts to identify the best prognostic factors of pregnancy and implantation. There are even reports of potential therapeutic uses of recombinant cytokines in order to improve ovarian response.

Key words: cytokines, ovulation, interferons, growth factors, colony stimulating factors.

Introducción

Cada vez se reconoce más el importante papel que juegan las citoquinas en la modulación de la función ovárica¹⁻¹⁰.

El conocimiento que brinda la investigación básica rápidamente se va capitalizando en la forma de nuevos parámetros pronósticos¹¹⁻¹⁷ y/o nuevas terapias¹⁸⁻²⁰.

Los representantes más tradicionales de lo que conocemos globalmente como **sistema endocrino** son las hormonas, mientras que los mediadores del **sistema inmune** son los que hoy se agrupan bajo el término de **citoquinas**.

Aunque tradicionalmente a cada uno de estos sistemas se los reconoce como independientes con algunos puntos de contacto, esta visión ha cambiado ya que existe suficiente evidencia de que hay una profunda influencia mutua entre ambos sistemas.

El objetivo del presente trabajo de revisión es brindar una introducción al amplio mundo de las citoquinas en su influencia sobre el sistema endocrino ovárico.

Concepto de comunicación bidireccional entre el sistema inmune y endocrino

Si tomamos un texto clásico de endocrinología, nos encontraremos con esta definición de hormona: "Biomolécula producida por una célula especializada, que es secretada desde una glándula directamente al torrente sanguíneo y actúa a distancia sobre una célula/tejido blanco, para regular determinadas actividades celulares preexistentes"²¹.

La hormona foliculoestimulante (FSH) y la hormona luteinizante (LH) son péptidos producidos por gonadotropos (célula especializada) de la hipófisis anterior (glándula sin conducto) y actúan a distancia sobre el ovario. Pero también es cierto que hay *hormonas* producidas en el cerebro que tienen acción local²¹.

Por otro lado, la ausencia de estas biomoléculas desencadena un efecto claro en la homeostasis corporal, como por ejemplo, el hipotiroidismo con déficit de producción de hormonas tiroideas. Mientras que las citoquinas son clásicamente consideradas como mediadores del sistema inmune.

Si tomamos la definición del texto de Thompson del año 1991, las citoquinas son: "Proteínas reguladoras secretadas por glóbulos blancos y una variedad de otras células del cuerpo; las acciones *pleiotrópicas* de las citoquinas incluyen numerosos efectos en células del sistema inmune y modulación de la respuesta inflamatoria"²².

Se trata de péptidos, proteínas o glicoproteínas, cuyas cantidades circulantes, en condiciones de ausencia de estrés, son mínimas, con un rango de acción primordialmente local ya sea autocrina o paracrina. Sus efectos son caracterizados por el pleiotropismo²³.

Se introduce el concepto de comunicación bidireccional entre el sistema endocrino y el inmune, donde no sólo el sistema endocrino modula la respuesta del inmune, sino que este último también lo hace sobre el sistema endocrino.

Uno de los primeros ejes hormonales que fueron asociados a la modulación del sistema inmune y por parte de éste fue el eje hipotálamo-hipófiso-adrenal. Estudios de las décadas de los 40, 50 y 60 dan cuenta de evidencia sólida de que la actividad adrenal y las respuestas inmunes son mutuamente influenciadas. Queda claro que los factores de crecimiento (FC) tienen un efecto directo sobre la actividad inmunológica y que los mediadores inmunorreguladores modifican la secreción de los FC²¹.

Estudios de la década de los 80 demostraron que una molécula claramente mediadora del sistema inmune como es el interferón utiliza los mismos canales de acción que una biomolécula clásicamente considerada como hormona, como la norepinefrina²⁴.

Estudios posteriores generaron un replanteo de la terminología y la fisiología de las moléculas del

sistema endocrino al descubrir que células del sistema inmune son capaces de producir biomoléculas consideradas como hormonas, en algunos casos hasta de estirpe hipofisaria. Tal es el caso de la corticotrofina (ACTH), la prolactina y el factor de crecimiento insulino-símil (IGF), por ejemplo. Estas moléculas no solo mantienen sus efectos endocrinos, sino también pueden tener efectos sobre la respuesta inmunológica²¹.

A la luz de estos conceptos habría que replantearse, por ejemplo, cómo considerar la prolactina que se produce en la hipófisis anterior pero que también es producida por los leucocitos del sistema inmune. El consenso es tomar a estas moléculas según el contexto de acción y origen de producción²⁵.

Por lo tanto, las citoquinas inmunomoduladoras conforman un elemento clave en la regulación entre el sistema inmune y el endocrino.

Generalidades de las citoquinas

Clasificación

Las citoquinas presentan una concentración habitual mínima o prácticamente indetectable en ausencia de estrés, aunque aumentan con la enfermedad, el daño o la reparación tisular; suelen poseer un tiempo de vida media muy corto, en algunos casos, minutos; su entorno de acción es predominantemente local, es decir, paracrina y/o autocrino. Participan principalmente en mecanismos reguladores de procesos tisulares locales²³.

El término citoquina involucra un enorme número de moléculas. Inicialmente se utilizaron términos que identificaban el origen de las moléculas del sistema inmune. Es decir, las monoquinas eran productos derivados de los monocitos/macrófagos; las linfoquinas eran productos derivados de los linfocitos; las quimioquinas representaban a los mediadores con actividad quimiotáctica, es decir, atrayente de otras células con respuesta de amplificación del proceso iniciado; y las interleuquinas eran mediadores producidos por un leucocito para actuar sobre otro²¹.

Abbas y cols. agrupan las citoquinas según el rol que tengan en la respuesta inmune y/o eritropoyética²⁶. Las citoquinas que median y regulan la inmunidad innata:

- Interferón tipo I.
- Factor de necrosis tumoral alfa (TNF- α).
- Interleuquinas IL-1, 6, 10, 12 y 15.
- Quimioquinas.

Las citoquinas que median y regulan la inmunidad específica:

- IL-2, 4, 5, 13, 16 y 17.
- Interferón-g.
- Factor de crecimiento tumoral beta (TGF- β).
- Linfotóxina.

Las citoquinas que estimulan la hematopoyesis:

- C-kit ligando.
- IL-3, 7, 9 y 11.
- CSF (*colony stimulating factors*).

Otros según la homología de receptor al que se unan²³⁻²⁶:

- Superfamilia de las inmunoglobulinas.
- Familia de receptores citoquina - Clase I.
- Familia de receptores citoquina - Clase II.
- Familia de receptores TNF.

Finalmente existe una tendencia a agruparlas en alguna de las siguientes superfamilias de citoquinas²⁷:

- Interleuquinas.
- Factores estimulantes de colonias (CSF)
- Interferones.
- Factor de necrosis tumoral (TNF)
- Factores de crecimiento (FC).
- Quimioquinas.

Mecanismos de acción

La característica más relevante en cuanto a su modo de acción, y que a su vez dificulta su estudio, es el **pleiotropismo**. Este concepto implica que el efecto de una citoquina depende de la célula que lo produce, el proceso en el cual se generó su producción y, por ende, en algunos casos una misma citoquina puede tener efectos opuestos dependiendo de la célula que lo produjo y el blanco sobre el que generará su acción; un ejemplo muy característico es la citoquina TNF- α ⁶.

Dentro de los distintos medios de acción, se destaca la ambigüedad en su accionar, una misma citoquina en diferentes blancos puede comportarse en forma diferente y aun tener efectos opuestos según el blanco. Pueden ser redundantes, es decir, más de una citoquina pueden tener similares acciones o efectos. La exposición de una célula a dos o más citoquinas a un mismo tiempo puede llevar a respuestas cualitativamente diferentes (sinergismo/antagonismo). Es muy frecuente observar que las citoquinas ejercen su efecto en forma de cascada, en la que una citoquina puede aumentar (o disminuir) la producción de otra citoquina. Se entiende por *transmodulación del receptor* cuando una citoquina puede aumentar (o disminuir) la expresión del receptor de otra citoquina.

Para el control de la función de las citoquinas existen mecanismos reguladores. Tal es el caso de las citoquinas antagonistas que se unen al receptor pero no generan el efecto habitual y regulan la intensidad de la respuesta, por ejemplo, IL-1Ra²⁷.

Los fragmentos solubles de receptores de citoquina pertenecen al dominio extracelular del receptor celular y neutralizan a la citoquina circulante, por ejem-

plo: IL-2R. Otras citoquinas se unen a receptores pero no activan la célula.

Respuesta inmune normal

La respuesta inmune normal está comprendida entre aquella que poseemos sin necesidad de ser estimulada por un agente específico, conocida como inmunidad innata o celular, y está representada por la inmunidad mediada por los linfocitos T; y la que responde a agentes desencadenantes a partir de los cuales se producen elementos específicos, o anticuerpos, en la llamada inmunidad humoral representada por los linfocitos B^{28,29}.

Tanto los linfocitos B como los T son a su vez regulados por un subtipo específico de linfocitos T llamados cooperadores o *helpers* y la sigla que los identifica es Th. Su marcador de superficie es el antígeno CD4+.

Es posible agrupar la respuesta inmune en dos grandes categorías: una es proinflamatoria con ciertas citoquinas características y su contrapartida, de control o balance, es decir, una respuesta antiinflamatoria también con sus citoquinas características.

De los distintos subtipos de linfocitos Th y sus correspondientes respuestas vamos a centrar la atención en dos grupos de respuesta Th: la Th1 y la Th2.

Respuesta Th1

Una respuesta Th1 es proinflamatoria y favorece la respuesta inmune celular (linfocitos T); es la responsable de la destrucción de parásitos intracelular y tiende a perpetuar la respuesta de tipo autoinmune. El interferón-g (IFN-g) es la citoquina más representativa de la respuesta Th1.

Se han descrito diferentes enfermedades inflamatorias crónicas con predominio de respuesta Th1; comprenden enfermedades autoinmunes órgano-específicas³⁰:

- Esclerosis múltiple.
- Diabetes tipo I.
- Psoriasis.
- Artritis reumatoidea.
- Asociada con alteraciones reproductivas.

Respuesta Th2

La respuesta Th2 tiende a amplificar la respuesta inmune humoral (linfocitos B). Incluye la producción de IL-4, 5 y 13. Está asociada a la respuesta atópica (IgE). El rol de la IL-10 es de regulador, con un efecto característicamente antiinflamatorio³¹.

Tanto los fenómenos atróficos como los alérgicos han sido asociados con una respuesta de tipo Th2; dentro de las enfermedades autoinmunes, se la suele asociar con las del tipo generalizado³².

Balance de respuesta Th1 vs. Th2

En la mujer tiende a predominar un balance a favor de una respuesta Th2, en contraposición con lo que ocurre en el hombre (ver artículo de revisión de la Dra. Barañao)³³. Esto sería beneficioso para el logro y posterior evolución satisfactoria del embarazo ya que un predominio de respuesta Th1 potenciaría el rechazo del feto^{20,34,35}.

Influencia de las citoquinas en el ciclo ovulatorio

No sólo el ovario presenta la capacidad de producir citoquinas frente a un estímulo dado, sino que las distintas estirpes celulares del tracto genital femenino pueden secretar IL-6, IL-8, G-CSF (factor estimulante de colonias granulocitarias), MCP-1 (*monocyte chemoattractic protein-1*: proteína quimiotáctica de monocitos-1) TNF- α y MIP-1 β ³⁶ (*macrophage inflammatory protein-1 β* : proteína inflamatoria de macrófagos-1 β).

Muchos de los efectos de las citoquinas, como son el de proliferación celular, diferenciación celular, apoptosis, angiogénesis y producción hormonal, son evidenciados en las distintas fases del ciclo ovulatorio, como la foliculogénesis, esteroideogénesis, la ruptura folicular y ovulación, la remodelación folicular con formación y posterior regresión del cuerpo lúteo³⁷⁻⁴¹.

En el proceso de implantación también es fundamental la red de citoquinas, aunque al no ser el objetivo del presente análisis, no se va a ahondar en dicho tema.

En la actualidad hay evidencias sostenibles del valor de las citoquinas en el diagnóstico de patologías reproductivas como sucede con la hormona antimülleriana y la inhibina B en cuanto a reflejo de reserva ovárica^{11,12}; la determinación de citoquinas como factores pronósticos (+) para el caso del G-CSF^{40,42} y (-) para el caso de la IL-12 en ciclos de FIV⁴²⁻⁴⁴; o aun el uso terapéutico con sus variantes recombinantes como ya ha sido publicado para el G-CSF-r^{18,45} y M-CSF-r³⁷.

En el año 1994 se publicó una revisión en la que se profundizaba en los fundamentos que surgían de comparar a la ovulación con el proceso inflamatorio; esta publicación a cargo de Espey fundamentaba esta

teoría en el hecho de que era factible encontrar a nivel de circulación general indicios de cambios similares a los observados en una reacción inflamatoria, y que éstos cambios coincidían con la ciclicidad del ciclo ovulatorio⁴⁷. Por otro lado, tal como se verá más adelante, muchos de los mediadores proinflamatorios cumplen un rol central en la ruptura folicular y posterior remodelación y formación del cuerpo lúteo³⁷.

A partir de allí fueron muchas las comunicaciones y líneas de investigación publicadas en las que se vinculó la influencia mutua entre los mediadores del sistema endocrino y el inmune sobre el funcionamiento ovárico^{6,48-51}.

El espectro clínico en que están vinculadas las citoquinas es muy variado, desde pacientes con falla reiterada de FIV, esterilidad sin causa aparente, aborto recurrente, disfunción ovárica, endometriosis y restricción del crecimiento intrauterino. Debido a la heterogeneidad de las poblaciones estudiadas, muchos de los trabajos publicados en la literatura disponible arrojan resultados muy diversos.

Origen de de las citoquinas a nivel ovárico

La principal fuente de citoquinas en el organismo son las células del sistema inmune, es decir, los leucocitos. Secundariamente, existe una fuente ovárica primaria, es decir, una síntesis *de novo* ovárica en cualquiera de los elementos que conforman el complejo ovárico (células de la teca, granulosa, cúmulo y/u ovocito)^{51,52}.

Por lo pronto, se sabe que los monocitos pueden ser activados por el estradiol (E2) y la progesterona (P4). A fines de la década de los 90 se describió la presencia no solo del receptor nuclear para el E2, sino también el receptor de superficie, lo cual confirma la vía de acción del E2 para activar el monocito^{53,54}.

Por su parte, si bien no se han descripto receptores para P4 en el monocito, la P4 muchas veces ejerce su acción a través del receptor del glucocorticoide, el cual fue recientemente descripto en el monocito^{55,56}.

Smith y cols. publicaron un estudio en el cual por técnicas de inmunomarcación determinaron el perfil de subpoblaciones de leucocitos obtenidas de aspiraciones foliculares en FIV. Concluyeron que no era suficiente la punción como tal para justificar la presencia de leucocitos provenientes de circulación general, sino que existe una real mayor proporción de monocitos/macrófagos que de polimorfonucleares (PMN)⁸.

De hecho se registra un incremento de granulocitos, monocitos y linfocitos a nivel circulatorio general, así como un aumento de la concentración sérica de citoquinas proinflamatorias (IL-1 y TNF- α) pero no de IL-6, IL-10 o IL-2. Todo ello conduce a cambios en el fenotipo y actividad secretoria de algunos leucocitos a un

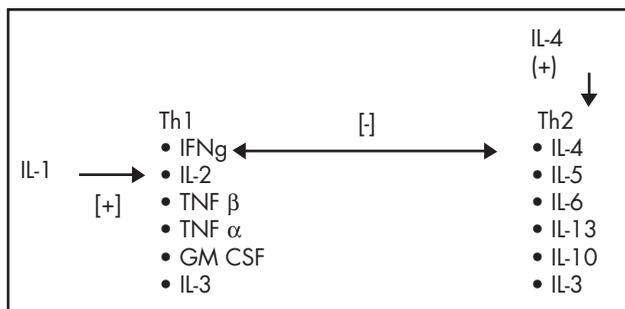


Figura 1. Patrones de citoquinas de los clones de células T.

perfil más proinflamatorio y promigratorio y a cambios en el fenotipo del endotelio que facilitan la adhesión y migración leucocitaria⁵⁴.

Aparentemente, el objetivo sería expandir el estado proinflamatorio en época ovulatoria.

Leucocitos durante el ciclo ovulatorio

Se ha publicado que no hay evidencias de aumentos *significativos* del número de leucocitos circulantes en el ciclo ovulatorio normal⁵⁷, pero de hecho hay un *leve* aumento durante el ciclo ovulatorio normal y se hace más evidente en ciclos estimulados, principalmente de leucocitos activados^{18,58}.

Las subpoblaciones más frecuentes de leucocitos a nivel ovárico son los macrófagos y los neutrófilos, que tienden a aumentar durante la fase folicular tardía^{7,59,60}.

El aumento de leucocitos provenientes de la circulación general conlleva un aumento local de leucocitos ováricos; la liberación por parte de las diferentes subpoblaciones de leucocitos y de las células ováricas de factores proliferantes induce el crecimiento de dicha población local con el consiguiente aumento en la producción de citoquinas ováricas⁸.

En el folículo preovulatorio los neutrófilos y macrófagos se ubican predominantemente en el estrato de las células de la teca^{7,59}.

Tanto las células de la teca como las de la granulosa pueden producir factores estimulantes de colonias (M-CSF para el caso de los macrófagos^{61,62} y G-CSF para el caso de los neutrófilos)^{63,64} como fue demostrado por la presencia de ARNm para dichas citoquinas en estudios por reacción en cadena de la polimerasa (PCR).

En una revisión publicada en el *Human Reproduction Update* de 2004, Wu expone los aspectos más relevantes en los que intervienen los macrófagos y sus productos. No sólo las funciones en el entorno de la respuesta inmune en la que participan los macrófagos (fagocitosis, presentación antigénica, reclutamiento de leucocitos y producción de proteasas) tendrían un rol en el proceso ovulatorio (atresia folicular, regresión luteínica, desarrollo folicular, ovulación y remodelación folicular), sino que muchas de las citoquinas que producen pueden generar un cambio en el balance de respuesta Th1/Th2⁷.

Las células de la granulosa responden en forma directa al estímulo por parte de la FSH. La afluencia de macrófagos y neutrófilos se ve estimulada por factores quimiotácticos producidos no sólo por estas células, sino también por los mismos leucocitos residentes a nivel ovárico. Unos y otros, a su vez, generan una respuesta proliferante y de diferenciación celular que tiende a prolongar la sobrevivencia celular con la consecuente expansión

del efecto de la FSH sobre la producción de distintas citoquinas (EGF: *epidermal growth factor*; TNF- β e IGF)^{7,59,65}.

Evidencias de la influencia recíproca de los mediadores del sistema inmune y la actividad ovárica

La presencia ya ampliamente demostrada de citoquinas en el fluido folicular obligaría a pensar que éstas deberían tener una función específica sobre el desarrollo folicular. No sólo sobre la actividad de las células de la teca o de la granulosa, sino también sobre el oocito mismo. No es suficiente su presencia en el fluido folicular ya que al existir una fuente migrante de citoquinas a nivel ovárico (leucocitos), se requiere una confirmación de capacidad de respuesta ovárica o de producción por parte de las células que componen el aparato folicular.

La presencia de receptores en las células ováricas demostraría una potencial capacidad de respuesta a las citoquinas presentes en el fluido folicular. A la fecha son muchos los reportes en los que se demuestra la presencia de receptores para muchas de las citoquinas presentes en fluido folicular a nivel de las células de la teca, células de la granulosa, estromales y oocito.

Todas las proteínas son sintetizadas a partir de una decodificación del ADN en la forma de un ARNm que se traduce en la proteína luego secretada. La existencia de ARNm para síntesis del receptor de citoquinas (capacidad de respuesta) y de la molécula de citoquina en sí daría evidencia de que existe un sistema ovárico para la producción local de citoquinas.

La presencia de una citoquina en fluido folicular, receptores en células ováricas y ARNm para el receptor y/o citoquina son variables para considerar si una determinada citoquina cumple una función sobre la actividad ovárica.

Valor predictivo de las citoquinas en ciclos de FIV

Son muchas las evidencias de la interacción entre el sistema inmune y el endocrino que influencia el funcionamiento ovárico. En el contexto de ciclos de fertilización asistida de alta complejidad se ha intentado identificar el o los factores pronóstico que mejor permitan predecir las probabilidades de embarazo e implantación.

Desde que se relacionó a las citoquinas con el funcionamiento ovárico y su vinculación con las hormonas esteroideas, se ha intentado estimar su valor pronóstico, pero el perfil de pacientes en los que se ha estudiado es muy heterogéneo y, por ende, los resultados a la fecha no han sido concluyentes.

Variables como edad, diagnóstico vinculado a la condición de esterilidad, patologías asociadas, esquema de estimulación ovárica y aun las diferentes meto-

dologías empleadas para la detección de las citoquinas, hacen difícil establecer un valor pronóstico único en ciclos de FIV/ICSI.

El valor pronóstico de diferentes citoquinas ha sido analizado en grupos de pacientes tan diferentes como fallas reiteradas de FIV, ESCA (esterilidad sin causa aparente), aborto recurrente, disfunción ovárica y restricción del crecimiento intrauterino^{14, 66-68}.

Pero en los casos de endometriosis⁶⁹ y síndrome de ovario poliquístico (SOP)⁷⁰, existiría un perfil de citoquinas alterado que amerita su análisis en forma independiente.

La IL-1 y el TNF- α fueron de las primeras citoquinas estudiadas con relación a los ciclos de FIV⁵⁶. Inicialmente se sugirió que los altos niveles foliculares de IL-1 se asociarían con tasas de fertilización normal y clivaje embrionario pero no necesariamente con embarazo^{39,57}.

Los niveles de IL-12 se han asociado con resultados negativos en ciclos de FIV⁴³ y mala calidad embrionaria⁴²⁻⁴⁴.

Tanto el G-CSF^{42,72,73} como el M-CSF¹³ se han presentado como una variable pronóstica positiva en ciclos de FIV. La BMP15 (bone morphometric protein 15) es producida por el oocito y sus niveles elevados en fluido folicular se asociarían con alta calidad oocitaria y desarrollo embrionario^{71,74}. Se considera que el clivaje embrionario temprano es una variable de buen pronóstico; tanto la IL-2 como el IFN-g estarían elevados en fluido folicular de embriones con clivaje temprano^{42,73}. Factores quimiotácticos como el CCL5 se asociarían con embriones de buena calidad⁴². Otras citoquinas no han demostrado tener un valor pronóstico claro. Si bien se acepta que la IL-8 es importante para la foliculogénesis⁷⁴, sus niveles no se asociaron con tasas de fertilización e implantación^{42,43,75,76}. En forma similar la IL-6 y el GM-CSF no se presentarían como un factor pronóstico claro^{42,57,75,76}. Otro estudio basado en análisis proteómico *multiplex*⁷³ mostró otros resultados con variaciones en menos en las concentraciones de IL-2, IL-4, IL-7 y G-CSF en presencia de alteraciones en la foliculogénesis. Los niveles bajos de IL-2, IL-4, IL-7, G-CSF y MIP 1b (*macrophage inflammatory protein 1b*) y elevados de IL-8 e IL-13 se asociarían con bajas tasas de embarazo. En un ciclo de tratamiento de fertilización asistida de alta complejidad es muy probable que el análisis de los niveles de una determinada citoquina en el fluido folicular no necesariamente se correlacione con los niveles de embarazo y esto se debería a que durante el proceso de fertilización intervienen otras variables, como son el factor masculino y el endometrio como exponente máximo del proceso de implantación en diálogo directo con el embrión.

Citoquinas y familias de citoquinas a nivel ovárico Sistema IL-1

Se trata de una citoquina de tipo proinflamatorio cuya fuente principal se encuentra en los macrófagos activados por el TNF- α , la endotoxina bacteriana y la misma IL-1 β ⁷⁷. Ejerce el efecto a nivel local y sistémico y tiene un rol importante para la expresión de otras citoquinas, principalmente de las englobadas en la respuesta de tipo Th1, de las que destaca la IL-2.

Las gonadotropinas inducen su transcripción en células de la granulosa y células de la teca. Se ha detectado su presencia en fluido folicular y el ARNm para la síntesis de la citoquina.

Entre los procesos en los que este sistema estaría involucrado figuran que induce la producción de prostaglandinas, tiene efecto sobre la síntesis de ácido hialurónico, la actividad de la colagenasa y la modulación de la actividad del plasminógeno ovárico.

El sistema de la IL-1 está integrado por dos formas de IL-1, la α y la β , así como una forma antagonista del receptor (IL-1ra) y dos formas de receptor (R1 y R2)^{27,77,78}.

Gérard y cols. publicaron una revisión del rol de este sistema en el funcionamiento ovárico y buscaron la evidencia publicada de la síntesis de ARNm de la IL-1 α y β , de su antagonista del receptor y de las dos variantes de receptores, a nivel de la teca, granulosa, cúmulo ovocito y registro de actividad en el líquido folicular⁷⁸.

Si bien el sistema de IL-1 está presente en muchas especies, incluida la humana, como sucede con otras citoquinas, no todas las células se comportan de similar manera.

A nivel de las células de la teca humanas se ha descrito la presencia de ARNm para el R1; a nivel de la granulosa habría receptores de ambos tipos y el modulador de la expresión de la IL, que sería el IL-1ra.

Llama la atención que las células del cúmulo, que son las que están más en contacto con el oocito, tengan la capacidad de producir toda la gama de integrantes del sistema de la IL-1, lo cual evidencia no sólo un potencial efecto paracrino para con el oocito, sino también autocrino con respecto a las otras células del cúmulo.

Finalmente el ovocito humano sólo tendría la capacidad de producir el antagonista del receptor de IL-1, aunque los resultados son controvertidos en cuanto a la producción de la IL-1 β ⁷⁸.

No se discute que a nivel del fluido folicular existe una clara evidencia de actividad de IL-1⁷⁹.

Por lo tanto, los autores concluyen en que hay suficiente evidencia de que existe un sistema IL-1 local a nivel ovárico y que este sistema IL-1 tendría un rol importante en el proceso ovulatorio⁷⁸.

El valor pronóstico en ciclos de FIV es discutido⁷⁹ pero un estudio reciente indicaría que los niveles séricos de IL-1 β del día de la captación ovular serían pronóstico en ciclos de estimulación ovárica para ICSI⁸⁰.

Factores estimulantes de colonias

Factor estimulante de colonias de macrófagos (M-CSF o CSF1)

Comprendido en el grupo de factores hematopoyéticos estimulantes del desarrollo de macrófagos y monocitos, estimula la proliferación, diferenciación, sobrevivencia del linaje celular de monocitos y macrófagos y reclutamiento de monocitos y macrófagos⁸¹⁻⁸³.

Es el subtipo más frecuente presente en el tejido ovárico y fluido folicular y tiende a aumentar cerca del período ovulatorio, con lo cual se ha planteado que tendría un rol en el ciclo ovulatorio^{46,84-87}.

Sus efectos los ejerce a través de las citoquinas producidas por los macrófagos TGF- β ⁸⁸ y TNF- α ⁸¹. Las células de la granulosa luteinizadas expresan no sólo la proteína, sino también su receptor^{62,85}.

Salmassi, en un estudio de ciclos de FIV en 95 pacientes, encontró una correlación positiva entre los niveles sanguíneos y en fluido folicular del M-CSF, así como con la respuesta ovárica; de hecho los niveles circulantes podrían ser predictivos de embarazo en ciclos de FIV¹³.

Existe una variante recombinante para tratamientos oncohematológicos, pero recientemente se ha reportado una experiencia clínica en 30 pacientes con baja respuesta ovárica. Se halló que un valor de corte basal para M-CSF-r en 650 UI/ml representaría el límite a partir del cual el agregado de M-CSF1 mejoraría la respuesta ovárica⁴⁶.

Factor estimulante de colonias de granulocitos y macrófagos (GM-CSF o CSF2)

Como sucede con otras citoquinas, el GM-CSF también es producido a nivel ovárico y presenta fluctuaciones con el ciclo ovulatorio⁵¹. Dentro de las funciones adjudicadas a esta citoquina se destaca el rol que cumpliría especialmente durante la fase folicular en lo que es la remodelación folicular, con la conformación posterior del cuerpo lúteo^{89,90}.

Se ha descrito su presencia en fluido folicular⁷⁶ y a nivel del estrato de las células de la teca⁵¹.

El valor pronóstico de esta citoquina no es concluyente en ciclos de FIV^{75,76}.

Factor estimulante de colonias de granulocitos (G-CSF o CSF3)

Esta citoquina pertenece a la familia de citoquinas hematopoyéticas que estimulan el desarrollo de

granulocitos, específicamente los neutrófilos en células de la teca^{91,92}.

Tiene un efecto modulador del contenido de ARNm intraoocitario, induce a la producción por parte de las células de la granulosa de distintas citoquinas y factores de crecimiento⁶⁴.

Aumenta en fase folicular media y tardía, presenta su pico máximo en ovulación con posterior caída en fase lútea^{42,64}. De hecho se ha postulado que la producción de esta citoquina se encontraría bajo la influencia de las hormonas sexuales⁷².

Potencia la respuesta Th2^{93,94} y TNF- α e IL-1. Tiene un efecto estimulante Th2 sobre macrófagos y células T CD4 (+)⁹⁴. Tiene un efecto estimulante sobre IL-10 de los linfocitos T reguladores, que representa un factor importante en la tolerancia al trasplante y para la implantación embrionaria³¹. Estimula la IL-4 en células del cúmulo y al LIF en células T^{95,96}.

Se ha mencionado que participaría en los eventos de autorreparación embrionaria referidos a la elevada incidencia de mosaicismo y aneuploidías embrionarias^{42, 97-101}.

Si bien los neutrófilos son la principal fuente de G-CSF, existen otras fuentes no hematopoyéticas a nivel ovárico⁶³ principalmente en células de la granulosa luteinizadas⁶⁴, de la teca^{63,64}, células endometriales¹⁰², células de la decidua placentaria¹⁰³, y varios tejidos fetales¹⁰⁴.

Existen múltiples reportes de la presencia en fluido folicular, pero también de la identificación por inmunohistoquímica en las células de la granulosa del G-CSF⁶⁴ y el ARNm que la codifica por RT-PCR⁶⁴. Pero lo que resulta más interesante es el hallazgo de receptores para G-CSF en las células de la granulosa, lo que implica que las células de la granulosa son fuente y blanco al mismo tiempo del efecto de esta citoquina^{63,64}.

Se han reportado menores niveles a mayor edad y a su vez, los niveles serían dependientes de la respuesta ovárica⁷². Se ha reportado una correlación inversa con los niveles de E2. Un nivel de corte en 20 pg/ml tendría un valor pronóstico en ciclos de FIV⁴². En ciclos de ICSI, Salmassi⁷² reportó que los niveles en fluido folicular fueron mayores que en los ciclos de FIV convencional. Los ciclos de ICSI tienen mayor proporción de parejas en las que la indicación de fertilización asistida obedece exclusivamente al factor masculino, con la contraparte femenina de la pareja con ovarios sanos y, por ende, un perfil más favorable de estos factores.

El nivel detectado en fluido folicular reflejaría el potencial del embrión surgido de ese folículo, lo cual tendría importancia en ciclos en donde el objetivo es la selección de un solo embrión para ser transferido (SET). A mayor nivel en fluido folicular, habría una mayor tasa de implantación y embarazo^{42,72,73}.

Existe para el caso del G-CSF su variante recombinante con un uso efectivo y seguro como coadyuvante en terapias oncológicas, principalmente en pacientes neutropénicos^{105, 106} y se ha reportado el uso de G-CSF recombinante en una mujer embarazada con neutropenia congénita severa sin perjuicio para el niño¹⁰⁷. Se ha reportado el uso de su variante recombinante en pacientes con alteraciones de la fertilidad. En un estudio randomizado del año 2009, Scarpelli publicó el uso de G-CSF-r para el tratamiento de aborto habitual⁴⁵. En otro estudio, Makinoda reportó los beneficios de la adyuvancia con G-CSF en ciclos de inducción de ovulación con folículos luteinizados no rotos (LUF)¹⁸.

Otras citoquinas

TNF- α

Es una citoquina pleiotrópica por excelencia, producida por distintas células, entre las que se encuentran los macrófagos y neutrófilos activados, luego del *priming* con IFN-g¹⁰⁸.

Inicia una cascada de citoquinas proinflamatorias, y sus efectos están estrechamente vinculados con la apoptosis asociada con respuesta Th1. Regula la expresión de muchos genes en distintos tipos celulares. A nivel ovárico se ha descrito su influencia en la atresia folicular y esteroidogénesis¹⁰⁸.

Se ha reportado su presencia en fluido folicular, así como el ARNm para la proteína en células de la granulosa¹⁰⁹. Se correlaciona con escasa cantidad¹¹⁰ y baja calidad de oocitos¹¹¹ y estaría elevada en pacientes con síndrome de ovario poliquístico²⁰ obesidad y endometriosis¹¹²⁻¹¹⁵.

IL-2 e IFN-g

Citoquinas que caracterizan la respuesta Th1. Son moduladores positivos de IL-18 e IL-12⁴². Su concentración elevada en fluido folicular se correlaciona con menor tasa de embarazo pero también se las ha asociado con clivaje embrionario temprano⁴².

IL-4 y LIF

La IL-4 y el factor inhibitorio de leucemia (LIF) son producidos por los macrófagos y linfocitos T CD4+ del cúmulo¹¹⁶. Son responsables de la respuesta Th2 con reportes de que sus niveles en fluido folicular serían de buen pronóstico en ciclos de FIV¹¹⁷, aunque otros autores no encontraron que los niveles foliculares estuvieran relacionados con el número y la calidad embrionaria¹¹⁸.

Junto con la IL-11, el LIF tiene un rol preponderante en el proceso de implantación del blastocisto¹¹⁸⁻¹²¹.

IL-6

Es una citoquina de tipo proinflamatorio con acción local y sistémica, que actúa modulando distintas citoquinas y estimulando en combinación con la IL-1 la activación de linfocitos T y diferenciación de linfocitos B^{119,120}. Se encuentra presente en fluido folicular⁷⁶.

Se encontraría elevada en pacientes con síndrome de ovario poliquístico²⁰, y en suero¹¹⁵ y fluido peritoneal de pacientes con endometriosis^{121,122}. Aunque otros autores no encontraron que sus niveles fueran pronóstico en fluido folicular^{75,76}, otros reportaron que los niveles bajos de IL-6 en fluido folicular estarían asociados con una mayor probabilidad de embarazo clínico^{116,123}.

IL-8

Es una citoquina proinflamatoria con efectos angiogénicos y promoción del crecimiento celular¹²⁴ que participa activamente en el proceso patológico de la inflamación^{74,125}. Pertenece a la familia de las quimioquinas, actúa como un potente agente atrayendo neutrófilos previo a la ruptura folicular^{124,126-128} con un potente efecto angiogénico^{129,130}.

Si bien es producida mayoritariamente por macrófagos y linfocitos T, se ha reportado su producción por células de la granulosa, de la teca y estroma ovárico^{74,120,126,127,131,132}. La IL-1 β aumentaría la expresión de esta interleucina en el período preovulatorio de la maduración folicular.

Se ha reportado su detección en fluido folicular, de fase folicular tardía en ciclo espontáneo^{74,126} y de ciclos de FIV^{43,76,124,128,133} aunque sus niveles no serían necesariamente predictores de resultado en ciclos de FIV^{43,75,76,116}.

IL-10

Es una citoquina inmunorreguladora que suprime la producción de IL-2 e IFN-g por Th1. Representa un potente modulador de monocitos-macrófagos a través de la disminución de la producción de sus citoquinas proinflamatorias potenciando la respuesta Th2¹¹⁶.

Si bien se ha detectado su presencia en fluido folicular, no tendría un valor pronóstico claro en ciclos de FIV¹¹⁶.

IL-12

Citoquina proinflamatoria que estimula el crecimiento de células NK (*natural killer*), linfocitos T citotóxicos (CD8+) y linfocito T *helper* (CD4+), estimulando la producción de IFN-g y el cambio a una respuesta Th1⁴³. Los niveles elevados en fluido folicular serían un predictor negativo en ciclos de FIV^{43,44}, y se encontraría disminuida en pacientes con síndrome de ovario poliquístico¹³⁴.

IL-18

Sinergiza junto con la IL-12 la producción de IFN-g potenciando una respuesta Th1. Se correlaciona en forma positiva con el número de ovocitos captados¹³⁵ pero negativa con embarazo clínico o evolutivo¹³⁶.

Familia de TGF-β

Comprende a un amplio grupo de citoquinas estrechamente vinculadas con el desarrollo temprano del folículo^{120,137-140}:

- TGF-β
 - 1, 2 y 3
- BMP (*bone morphometric protein*)
 - Hasta 20 subtipos
- GDF (*growth and differentiation factor*)
 - Hasta 9 subtipos
- Activina/inhibina
 - Activinas A, AB, B
 - Inhibinas A y B
- Hormona antimülleriana
- GDNF (*glial cell-derived neurotrophic factor*)
 - GDNF, artemina y neuturina
- VEGF (*vascular endothelial growth factor*)

Las citoquinas prototípicas de este grupo son las homónimas TGF-β y estarían estrechamente vinculadas con el desarrollo folicular, aun antes del efecto gonadotrófico^{137,141} incluyendo roles importantes en el reclutamiento de folículos primordiales, proliferación y/o atresia de células de la granulosa y teca, esteroidogénesis, expresión del receptor gonadotrófico, maduración del oocito, ovulación, luteinización y formación del cuerpo lúteo¹³⁷.

Se ha identificado el ARNm en células de la granulosa y de la teca¹⁴².

VEGF (*vascular endothelial growth factor*)

El factor de crecimiento del endotelio vascular (VEGF) pertenece a la familia del TGF-β¹⁴³.

Se trata de una citoquina con un potente efecto angiogénico y mitogénico de las células endoteliales¹⁴⁴, que a nivel ovárico es producida por las células de la granulosa y de la teca¹⁴⁵.

Se lo ha asociado al aumento de permeabilidad vascular que se observa en respuesta a las gonadotropinas durante el ciclo ovulatorio durante la formación del cuerpo lúteo¹⁴³ y en ciclos con síndrome de hiperestimulación ovárica¹⁴⁶⁻¹⁴⁹ si bien no todos los autores pudieron encontrar esta correlación¹⁵⁰ y se ha sugerido que las diferencias estarían relacionadas con temas metodológicos¹⁴³.

GDF 9 y BMP 15

Citoquinas producidas por el oocito que pertenecen a la superfamilia del TGF-β, agrupadas bajo el

término de productos solubles producidos por el oocito (OSF, *oocyte soluble factors*)¹⁵¹⁻¹⁵⁴. Actuarían estimulando la proliferación de células de la granulosa^{137,155}, inhibiendo la luteinización¹⁵³ y frenando la apoptosis de células del cúmulo⁴.

Por su parte, el oocito cumple un rol activo en la modulación de la actividad de las células que lo rodean a través de factores solubles con función de factor de crecimiento. Dentro de la superfamilia de factores de crecimiento de TGF-β, se encuentran los factores solubles producidos por el oocito conocidos como GDF-9 y BMP-15 (también conocido como GDF-9b)¹⁵⁶⁻¹⁵⁹.

Los factores de crecimiento pertenecientes a la familia del TGF-β actúan a través de receptores de superficie y mediadores intracelulares (SMAD)¹⁶⁰ y en su conjunto resultan indispensables para que se cumpla un ciclo ovulatorio exitoso^{161,162}. Por lo tanto, tal como está extensamente publicado en experimentos con ratones *knock-out*, las alteraciones o defectos en la producción de estos factores de crecimiento, su receptor o sus mediadores intracelulares dan como resultado deficiencias severas en la esteroidogénesis, foliculogénesis o proceso ovulatorio¹⁶³.

Los ratones con ausencia del gen que codifica el GDF-9 (ratón *knock-out* para el GDF-9) son estériles¹⁶⁴ y en ellos, el desarrollo folicular no pasa de un estadio primario. Dentro de las funciones con las que se relaciona al GDF-9 se encontrarían la de promover la proliferación de células de la granulosa en folículos preantrales de ratas¹⁶⁵, la inducción del fenotipo de células de granulosa del cúmulo mediada por la estimulación en la producción de progesterona (P4), la síntesis de ARNm para la COX2, la síntesis de hialuronidasa 2 y la expansión del cúmulo con inhibición de la expresión del ARNm para el receptor LH estimulado por la FSH^{166,167}.

Experiencias provenientes de estudios con animales en cuanto a las funciones biológicas del BMP-15 dan cuenta de que posee un fuerte estímulo de proliferación de las células de la granulosa¹⁶⁸, así como la producción del ligando kit; a su vez se ha sugerido una interrelación estrecha entre el BMP-15 y el receptor de la FSH con un fuerte efecto inhibitorio de la expresión del receptor de FSH³². Estudios más recientes han relacionado al BMP-15 con la expansión del cúmulo¹⁶⁹. Pero su rol final aún no acaba de dilucidarse, pues es probable que su accionar se combine con otras cascadas de factores locales, ya que su ausencia se relacionaría con defectos de fertilidad pero de una forma no tan severa como la que se ha visto en ratones sin la expresión de GDF-9¹⁶³.

Se podría concluir que tanto el GDF-9 como el BMP-15 participarían en el proceso final de maduración folicular, principalmente en la expansión del cúmulo,

evento que se encuentra estrechamente vinculado con los niveles de gonadotrofinas¹⁷⁰.

Tanto el BMP-15 como el GDF-9 ejercen su acción en la célula blanco a través de dos tipos de receptores transmembranosos de los que han sido descritos dos tipos (I y II) con al menos siete variantes (ALK 1-7) para el tipo I, y cinco variantes para el tipo II serina/treonina-quinasa en mamíferos (Act R-II, Act R-IIB, AMHR-II, BMPR-II y TGFR β -II)¹⁷¹.

Al receptor tipo II se lo considera una variante activa con capacidad de activar el receptor tipo I a nivel de su dominio GS yuxtamembranoso por medio de un proceso de fosforilación. Otros factores de modulación asociados con la familia de los TGF- β son los betaglicanos y endoglinas que actuarían como moduladores accesorios (receptores tipo III).

Los mediadores de estos receptores a nivel intracelular son los *SMAD*, que dependiendo de la combinación de los receptores tipo I y II, distintos *SMAD* son activados por fosforilación.

El BMP-15 ejerce sus acciones biológicas a través del receptor de superficie BMP II (BMPR-II) y los efectos de cascada se realizarían a través del receptor BMP 1B (ALK-6) y sus mediadores intracelulares *SMAD* 1/5/8. El GDF-9 actuaría a través del receptor tipo I ALK-5 y los *SMAD* 2/3¹⁵⁹.

Aparecen en fluido folicular y sus niveles se correlacionarían positivamente con el E2 y negativamente con la FSH⁷⁴. Wu analizó los niveles de BMP-15 en fluido folicular y la evolución de los oocitos de 79 parejas y concluyó que a mayor nivel de BMP-15, los oocitos presentaban una mayor tasa de fertilización, clivaje y mejor calidad embrionaria y propuso la hipótesis del BMP-15 como marcador de madurez citoplasmática ya que todos los oocitos compartían similar madurez nuclear⁷⁴.

Conclusiones

El sistema endocrino y el inmune se encuentran íntimamente ligados y comparten rangos de acción que se afectan mutuamente (comunicación bidireccional); de hecho muchos de los eventos de ovulación son comparables a los generados en la respuesta inflamatoria.

Las células del sistema inmune son pasibles de responder a las hormonas circulantes, evidencia de ello es que la población de leucocitos a nivel ovárico varía con el correr del ciclo ovulatorio; no sólo en cantidad absoluta (leve) y relativa (linfocitos activados), sino también en el perfil de producción de citoquinas durante el ciclo ovulatorio.

El papel que juegan las citoquinas en el funcionamiento ovárico se evidencia por su presencia en el fluido folicular, la detección de receptores para diversas citoquinas en los distintos componentes del complejo

folicular (teca, granulosa, cúmulo y/u ovocito) que demuestra una capacidad de respuesta, y la presencia de ARNm para la síntesis de aquellas.

En la mujer existe un predominio de respuesta Th2 que favorece la implantación fetal; un balance o cambio a respuesta Th1 (proinflamatoria) se reflejaría en parámetros de peor pronóstico reproductivo.

Patologías como el síndrome de ovario poliquístico y la endometriosis se asociarían con un perfil de citoquinas diferentes a las del ciclo ovulatorio y el endometrio normal.

Citoquinas como la AMH (hormona antimülleriana)/inhibina B (superfamilia de TGF- β) aproximan el diagnóstico de reserva ovárica.

Los niveles de ciertas citoquinas como el G-CSF en fluido folicular permitirían establecer valores pronóstico para la transferencia de un único embrión (SET).

Ya hay reportes del uso de citoquinas recombinantes en pacientes que realizan FIV con el objetivo de mejorar la respuesta ovárica.

El oocito tiene la capacidad de modular las células de la granulosa a través de GDF-9 y BMP-15 cuyos niveles en fluido folicular serían pronóstico en ciclos de FIV.

Finalmente, se requiere conocer más acerca de la interrelación entre las citoquinas con el fin de establecer su real valor diagnóstico, pronóstico y terapéutico en medicina reproductiva.

Referencias

1. McNatty KP, Fidler AE, Juengel JL, Quirke LD, Smith PR, Heath DA, Lundy T, O'Connell A, Tisdall DJ. Growth and paracrine factors regulating follicular formation and cellular function. *Mol Cell Endocrinol* 2000; 163:11-20.
2. Markstrom E, Svensson EC, Shao R, Svanberg B, Billig H. Survival factors regulating ovarian apoptosis-dependence on follicle differentiation. *Reproduction* 2002; 123:23-30.
3. Bornstein SR, Rutkowski H, Vrezas I. Cytokines and steroidogenesis. *Mol Cell Endocrinol* 2004; 215:135-141.
4. Hussein MR. Apoptosis in the ovary: molecular mechanisms review. *Hum Reprod Update* 2005; 11(2):162-178.
5. Skinner MK. Regulation of primordial follicle assembly and development review. *Hum Reprod Update* 2005; 11(5):461-471.
6. Brannstrom M, Norman RJ. Involvement of leukocytes and cytokines in the ovulatory process and corpus luteum function. *Hum Reprod* 1993; 8:1762-1775.
7. Wu R, Van der Hoek KH, Ryan NK, Norman RJ, Robker RL. Macrophage contributions to ovarian function review. *Hum Reprod Update* 2004; 10(2):119-133.
8. Smith MP, Flannery GR, Randle BJ, Jenkins JM, Holmes CH. Leukocyte origin and profile in follicular aspirates at oocyte retrieval. *Hum Reprod* 2005; 20:3526-3531.
9. Ushigoe K, Irahara M, Fukumochi M, Kamada M and Aono T. Production and regulation of cytokine-induced neutrophil chemoattractant in rat ovulation. *Biol Reprod* 2000; 63:121-126.

10. Nikolettos N, Asimakopoulos B, Köster F, Schöper B, Schultz Ch, Caglar GS, Efthimiadou A, Pagonopoulou O, Diedrich K and Al-Hasani S. Cytokine profile in cases with premature elevation of progesterone serum concentration during ovarian stimulation. *Fisiol Res* 2008; 57:215-224.
11. Roudenbush WE, Kivens WJ and Mattke JM. Biomarkers of ovarian reserve. *Biomarker Insight* 2008; 3:259-268.
12. Sun WS, Stegman BJ; Henne M, Catherino WH and Segars JH. A new approach to ovarian reserve. *Fertil Steril* 2008; 90(6):2196-2202.
13. Salmassi A, Mettler L, Jonat W, Buck S, Koch K and Schmutzler AG. Circulating level of macrophage colony-stimulating factor can be predictive for human in vitro fertilization outcome. *Fertil Steril* 2010; 93:116-23.
14. Margalioth EJ, Ben-Chetrit, Gal M and Eldar-Geva T. Investigation and treatment of repeated implantation failure following IVF-ET. *Hum Reprod* 2006; 21(12):3036-3043.
15. Lee TH, Liu CH, Huang CC, Hsieh KC, Lin PM and Lee MS. Impact of female age and male infertility on ovarian reserve markers to predict outcome of assisted reproduction technology cycles. *Reprod Biol Endocrinol* 2009; 7:100-109.
16. Verhagen TEM, Hendriks DJ, Banasi LFJMM, Mol BWJ and Broekmans FJM. The accuracy of multivariate models predicting ovarian reserve and pregnancy after in vitro fertilization: a meta-analysis. *Hum Reprod Update* 2008; 14(2):95-100.
17. Revelli A, Delle Piane L, Casano S, Molinari E, Massobrio M and Rinaudo P. Follicular fluid content and oocyte quality: from single biochemical markers to metabolomics review. *Reprod Biol Endocrinol* 2009; 7:40-52.
18. Makinoda S, Hirosaki N, Waseda T, Tomizawa H and Fujii R. Granulocyte Colony-Stimulating Factor (G-CSF) in the mechanism of human ovulation and its clinical usefulness. *Current Medical Chemistry* 2008; 15(6):604-613.
19. Chen CD, Chen HF, Lu HF, Chen SU, Ho HN, Tang YS. Value of serum and follicular fluid cytokine profile in the prediction of moderate to severe ovarian hyperstimulation syndrome. *Hum Reprod* 2000; 15:1037-1042.
20. Darai E, Detchev R, Hugol D, Tran Quang N. Serum and cyst fluid levels of interleukin (IL)-6, IL-8 and tumor necrosis factor-alpha in women with endometriosis and benign and malignant cystic ovarian tumours. *Hum Reprod* 2003; 18:1681-1685.
21. Turnbull AV, Rivier CL. Regulation of the hypothalamic-pituitary-adrenal axis by cytokines: actions and mechanisms of action. *Physiol Rev* 1999; 79:1-71.
22. Thompson A. The cytokine handbook. London: Ed. Academic Press. 1998.
23. Roitt I. *Inmunología. Fundamentos* (10ª edición), Cap. 10. Buenos Aires: Editorial Médica Panamericana. 2003:199-223.
24. Gremlich S, Fratta S, Rebellato E, Uras R, Reymondin D, Dammon F, Germond M, and Gerber S. Interleukin-1 receptor antagonist gene (IL-1RN) polymorphism is a predictive factor of clinical pregnancy after IVF. *Human Reproduction* 2008; 23:1200-1206.
25. Amato G, Conte M, Mazziotti G, Lalli E, Vitolo G, Tucker AT, Bellastella A, Carella C and Izzo A. Serum and follicular fluid cytokines in polycystic ovary syndrome during stimulated cycles. *Obstet Gynecol* 2008; 101(6):1177-1182.
26. Abbas AK, Lichtman AH, Pillai S. *Inmunología Celular y Molecular* (6ª edición), Cap. 12. Madrid: Elsevier Saunders. 2008:267-301.
27. Desai P. Cytokines in obstetrics and gynaecology. *J Obstet Gynecol India* 2007; 57(3):205-209.
28. Roitt I. *Inmunología. Fundamentos* (10ª edición), Caps. 1 y 2. Buenos Aires: Editorial Médica Panamericana. 2003.
29. Abbas AK, Lichtman AH, Pillai S. *Inmunología Celular y Molecular* (6ª edición), Secciones I y II. Madrid: Elsevier Saunders. 2008.
30. Zandman-Goddard G, Peeva E, Shoenfeld Y. Gender and autoimmunity. *Autoimmunity Reviews* 2007; 6(6):366-372.
31. Morris ES, MacDonald KP, Rowe V, Johnson DH, Banovic T, Clouston AD, Hill GR. Donor treatment with pegylated G-CSF augments the generation of IL-10-producing regulatory T cells and promotes transplantation tolerance. *Blood* 2004; 103:3573-3581.
32. Otsuka F, Yamamoto S, Erickson GF, Shimasaki S. Bone morphogenetic protein-15 inhibits follicle-stimulating hormone (FSH) action by suppressing FSH receptor expression. *J Biol Chem* 2001; 276:11387-11392.
33. Barañao RI. Hormonas sexuales y respuesta inmunológica. *Revista de la Sociedad de Endocrinología Ginecológica y Reproductiva* 2009; 16(2):20-30.
34. Wegmann TG, Lin H, Guilbert L, Mosmann TR. Bidirectional cytokine interactions in the maternal-fetal relationship: is successful pregnancy a TH2 phenomenon? *Immunol Today* 1993; 14:353-356.
35. Bouman A, Heineman MJ and Faas MM. Sex hormones and the human response in human review. *Hum Reprod Update* 2005; 11(4):411-423.
36. Fahey JV, Scafer TM, Channon JY and Wira CR. Secretion of cytokines and chemokines by polarized cells from the female reproductive tract. *Hum Reprod* 2005; 20(6):1439-1446.
37. Toloubeydokhti T, Bukulmez O and Chegini N. Potential regulatory functions of microRNA in the ovary. *Semin Reprod Med* 2008; 26(6):469-478.
38. Chang CL, Wang TH, Horng SG, Wu HM, Wang HS, Soong YK. The concentration of inhibin B in follicular fluid: relation to oocyte maturation and embryo development. *Hum Reprod* 2002; 17:1724-1728.
39. Mendoza C, Ruiz-Requena E, Ortega E, Cremades N, Martinez F, Bernabeu S, Greco E and Tesarik J. Follicular fluid markers of oocyte developmental potential. *Hum Reprod* 2002; 17(4):1017-1022.
40. Gilchrist RB, Rowe DB, Ritter LJ, Robertson SA, Norman RJ and Armstrong DT. Effect of granulocyte-macrophage colony-stimulating factor deficiency on ovarian follicular cell function. *J Reprod and Fertil* 2000; 120:283-292.
41. Antezak M and Van Blerkon. The vascular character of ovarian follicular granulosa cells: phenotypic and functional evidence for an endothelial-like cell population. *Hum Reprod* 2000; 15(11):2306-2318.
42. Lédée N, Lombroso R, Lombardelli L, Selva J, Dubanchet S, Chaouat G, Frankenme F, Foidart JM, Maggi E, Romagnani S, Ville Y and Piccini MP. Cytokines and chemokines in follicular fluids and potential of the corresponding embryo: the role of granulocyte colony-stimulating factor. *Hum Reprod* 23(9):2001-2009.

43. Gazvani MR, Bates M, Vince G, Christmas S, Lewis-Jones I and Kingsland C. Follicular fluid concentration of interleukin-12 and interleukin-8 in IVF cycles. *Fertil Steril* 2000; 74(5):953-958.
44. Bedaiwy M, Shahin AY, AbulHassan AM, Goldberg JM, Sharma RK, Agarwal A, Falcone T. Differential expression of follicular fluid cytokines: relationship to subsequent pregnancy in IVF cycles. *Reprod Biomed Online* 2007; 15:321-325.
45. Scarpellini F and Sbracia M. Use of colony-stimulating growth factor for the treatment of unexplained recurrent miscarriage: a randomized controlled trial. *Hum Reprod* 2009; 24(11):2703-2708.
46. Takasaki A, Ohba T, Okamura Y, Honda R, Seki M, Tanaka N and Okamura H. Clinical use of colony-stimulating factor-1 in ovulation induction for poor responders. *Fertil Steril* 2008; 90:2287-90.
47. Espey LL. Current status of the hypothesis that mammalian ovulation is comparable to an inflammatory reaction. *Biol Reprod* 1994 Feb; 50(2):233-8.
48. Brannstrom M, Pascoe V, Norman RJ, McClure N. Localization of leukocyte subsets in the follicle wall and in the corpus luteum throughout the human menstrual cycle. *Fertil Steril* 1994; 61:488-95.
49. Gabrielsen A, Petersen K, Mikkelsen AL, Lindenberg S. Intracytoplasmic sperm injection does not overcome an oocyte defect in previous fertilization failure with conventional in-vitro fertilization and normal spermatozoa. *Hum Reprod* 1996; 11:1963-5.
50. Hull MG, Williams JA, Ray B, McLaughlin EA, Akande VA, Ford WC. The contribution of subtle oocyte or sperm dysfunction affecting fertilization in endometriosis associated or unexplained infertility: a controlled comparison with tubal infertility and use of donor spermatozoa. *Hum Reprod* 1998; 13:1825-30.
51. Vanderstichele H, Delay B, De Winter J, De Jong F, Rombaux L, Verhoeven G, Dello C, Van de Voore A and Briers T. Secretion of steroids, growth factors and cytokines by immortalized mouse granulosa cell lines. *Biol Reprod* 1994; 50:1190-1202.
52. Assou S, Anahory T, Pantesco V, Le Carrour T, Pellestor F, Klein B, Reyftmann L, Dechaud H, De Vos J and Hamamah S. The human cumulus-oocyte complex gene-expression profile. *Hum Reprod* 2006; 21(7):1705-1719.
53. Ben Hur H, Mor G, Insler V, Bickstein I, Amir -Zaltsman Y, Sharp A, Gobirson A, Kochen F. Menopause is associated with an increase in blood monocyte number and a relative decrease in the expression of estrogen receptors in human peripheral monocytes. *Am J Reprod Immunol* 1995; 34:363-9.
54. Stefano GB, Prevot V, Beauvillain JC, Fimiani C, Welters I, Cadet P, Breton C, Pestel J, Salzet M, Bilfinger TV. Estradiol Coupling to Human Monocyte Nitric Oxide Release Is Dependent on Intracellular Calcium Transients: Evidence for an Estrogen Surface Receptor. *The Journal of Immunology* 1999; 163:3758-3763.
55. Rosenau W, Baxter JD, Rousseau GG, Tomkins GM. Mechanism Of Resistance To Steroids: Glucocorticoid Receptor Defect In Lymphoma Cells. *Nature New Biol* 237 (70):20-24.
56. Aittomäki S, Pesu M, Groner B, Jänne OA, Palvimo JJ, Silvennoinen O. Cooperation among Stat1, glucocorticoid receptor, and PU.1 in transcriptional activation of the high-affinity Fc gamma receptor I in monocytes. *J Immunol* 2000; 164:5689-5697.
57. Asimakopoulos B, Abu-Hassan D, Metzen E, Al-Hasani S, Diedrich K and Nikolettos N. The levels of steroid hormones and cytokines in follicular fluids are not associated with fertilization outcome after intracytoplasmic sperm injection. *Fertil Steril* 2008; 90:60-64.
58. Hock DL, Huhn RD and Kemmann E. Leukocytosis in response to exogenous gonadotrophin stimulation. *Hum Reprod* 1997; 12(10):2143-2146.
59. Bukulmez O and Arici A. Leukocytes in ovarian function review. *Hum Reprod Update* 2000; 6(1):1-15.
60. Russell DL and Robker RL. Molecular mechanisms of ovulation: coordination through the cumulus complex. *Hum Reprod Update* 2007; 13(3):289-312.
61. Michimata T, Sakai M, Miyazaki S, Ogasawara MS, Suzumori K, Aoki K, Nagata K, Saito S. decrease of T-Helper 2 and T-Cytotoxic 2 cells at implantation sites occurs in unexplained recurrent spontaneous abortion with normal chromosomal content. *Hum Reprod* 2003; 18:1523-1528.
62. Nishimura K, Tanaka N, Kawano T, Matsuura K, Okamura H. Changes in macrophage colony-stimulating factor concentration in serum and follicular fluid in in-vitro fertilization and embryo transfer cycles. *Fertil Steril* 1998; 69:53-57.
63. Yanagi K, Makinoda S, Fujii R, Miyazaki S, Fujita S, Tomizawa H, Yoshida K, Iura T, Takegami T and Nojima T. Cyclic changes of granulocyte colony-stimulating factor (G-CSF) mRNA in the human follicle during the normal menstrual cycle and immunolocalization of G-CSF protein. *Hum Reprod* 2002; 17(12):3046-3052.
64. Salmassi A, Schmutzler AG, Huang L, Hedderick J, Jonat W and Mettler L. Detection of granulocyte colony-stimulating factor and its receptor in human follicular luteinized granulosa cells. *Fertil Steril* 2004; 81(suppl.1):786-791.
65. Stewart CL, Kaspar P, Brunet LJ, Bhatt H, Gadi I, Kontgen F. Blastocyst implantation depends on maternal expression of leukaemia inhibitory factor. *Nature* 1992; 359:76-79.
66. Robertson SA. Control of the immunological environment of the uterus. *Rev Reprod* 2000; 5:164-74.
67. Kaider AS, Kaider BD, Janowic PB, Roussev RG. Immunodiagnostic evaluation of women with reproductive failure. *Am J Reprod Immunol* 1999; 42:335-46.
68. Asimakopoulos B, Köster F, Felberbaum R, Al-Hasani S, Diedrich K and Nikolettos N. Cytokine and hormonal profile in blood serum and follicular fluids during ovarian stimulation with the multidose antagonist or the long agonist protocol. *Hum Reprod* 2006; 21(12):3091-3095.
69. Matalliotakis IM, Goumenou AG, Koumantakis GE, Neonaki MA, Koumantakis EE, Dionyssopoulou E, Athanassakis I and Vassiliadis S. Serum concentrations of growth factors in women with and without endometriosis: the action of anti-endometriosis medicines. *Int Immunopharmacol* 2003; 3:81-89.
70. Wu R, Fujii S, Ryan NK, Van der Hoek KH, Jasper MJ, Sini I, Robertson SA, Robker RL and Norman RJ. Ovarian leukocyte distribution and cytokine/chemokine mRNA expression in follicular fluid cells in women with polycystic ovary syndrome. *Hum Reprod* 2007; 22(2):527-535.

71. Wu YT, Tang L, Cai J, Lu XE, Xu J, Zhu XM, Luo Q and Huang HF. High bone morphometric protein-15 level in follicular fluid is associated with high quality oocyte and subsequent embryonic development. *Hum Reprod* 2007; 22(6):1526-1531.
72. Salmassi A, Schmutzler AG, Schaefer S, Koch K, Hedderick J, Jonat W and Mettler L. Is granulocyte colony-stimulating factor level predictive for human IVF outcome? *Hum Reprod* 2005; 20(9):2434-2440.
73. Ostanin AA, Aizkovich BI, Aizkovich IV, Koznin AY and Chernykh ER. Role of cytokines in the regulation of reproductive function. *Bull Exp Biol Med* 2007; 143(1):75-79.
74. Malizia BA, Wook YS, Penzias AS and Usheva A. The human ovarian follicular fluid level of interleukin-8 is associated with follicular size and patient age. *Fertil Steril* 2010; 93:537-543.
75. Hammadeh ME, Ertan AK, Zepezauer M, Baltas S, Georg T, Rosenbaum GP and Schmidt W. Immunoglobulins and cytokines level in follicular fluid and their relevance to IVF outcome. *Am J Reprod Immunol* 2002; 47:82-90.
76. Hammadeh ME, Ertan AK, Rosenbaum GP and Schmidt W. Relationship between ovarian stimulation regimen and interleukin level in pre-ovulatory follicular fluid and their effect on ICSI outcome. *Am J Reprod Immunol* 2002; 48:255-261.
77. Simón C and Polan ML. Cytokines and reproduction review. *West J Med* 1994; 160:425-429.
78. Gérard N, Caillaud M, Martoriati A, Goudet G and Lalanach AC. The interleukin-1 system and female reproduction review. *J Endocrinol* 2004; 180:203-212.
79. Smith SK, Charnock-Jones DS, Sharkey AM. The role of leukemia inhibitory factor and interleukin-6 in human reproduction. *Hum Reprod* 1998; 13(Suppl 3):237-243.
80. Salamonsen LA, Dimitriades E, Robb L. Cytokines in implantation. *Semin Reprod* 2000; 18:299-310.
81. Stanley ER, Berg KL, Einstein DB, Lee PS, Pixley FJ, Wang Y, Yeung YG. Biology and action of colony-stimulating factor-1. *Mol Reprod Dev* 1997; 46:4-10.
82. Wood GW, Hausmann E and Choudhuri R. Relative role of CSF-1, MCP 1/JE, and RANTES in macrophage recruitment during successful pregnancy. *Mol Reprod Dev* 1997; 46:62-70.
83. Clark SC, Kamen R. The human hematopoietic colony-stimulating factors. *Science* 1987; 236:1229-1237.
84. Shinetugs B, Runesson E, Bonello NP, Brannstrom M and Norma RJ. Colony stimulating factor-1 concentration in blood and follicular fluid during the human menstrual cycle and ovarian stimulation: a possible role in the ovulatory process. *Hum Reprod* 1999; 14(5):1302-1306.
85. Witt BR and Pollard JW. Colony stimulating factor-1 in human follicular fluid. *Fertil Steril* 1997; 68:259-264.
86. Kawano Y, Kawasaki F, Nakamura S, Matsui N, Narahara H and Miyakawa I. The production and clinical evaluation of macrophage colony-stimulating factor and macrophage chemoattractant protein-1 in human follicular fluids. *Am J Reprod Immunol* 2001; 45:1-5.
87. Gallinelli A, Ciaccio I, Gianella L, Salvatori M, Marsella T and Volpe A. Correlation between concentration of interleukin-12 and interleukin-13 and lymphocyte subsets in the follicular fluid of women with and without polycystic ovarian syndrome. *Fertile Steril* 2003; 79(6):1365-1372.
88. Assoian RK, Fleurdelys BE, Stevenson HC, Miller PJ, Madtes DK, Raines EW, Ross R, Sporn MB. Expression and secretion of type beta transforming growth factor by activated human macrophages. *Proc Natl Acad Sci USA* 1987; 84:6020-6024.
89. Jasper MJ, Robertson SA, Van der Hoek KH, Bonello N, Brännström M and Norman RJ. Characterization of ovarian function in granulocyte-macrophage colony-stimulating factor (GM-CSF) deficient mice. *Biology of Reproduction* 2000; 62:704-713.
90. Clark SC, Kamen R. The human hematopoietic colony-stimulating factors. *Science* 1987; 236:1229-1237.
91. Visani G, Manfroi S. G-CSF in the biology and treatment of acute myeloid leukemias. *Leuk Lymphoma* 1995; 18:423-428.
92. Mielcarek M, Roecklein BA, Torok-Storb B. CD14+ cells in granulocyte colony-stimulating factor (G-CSF)-mobilized peripheral blood mononuclear cells induce secretion of interleukin-6 and G-CSF by marrow stroma. *Blood* 1996; 87:574-580.
93. Rutella S, Zavala F, Danese S, Kared H, Leone G. Granulocyte colony-stimulating factor: a novel mediator of T cell tolerance. *J Immunol* 2005; 175:7085-7091.
94. Piccinni MP, Scaletti C, Mavilia C, Lazzeri E, Romagnani P, Natali I, Pellegrini S, Livi C, Romagnani S, Maggi E. Production of IL-4 and leukemia inhibitory factor by T cells of the cumulus oophorus: a favorable microenvironment for pre-implantation embryo development. *Eur J Immunol* 2001; 31:2431-2437.
95. Dunglison GF, Barlow DH, Sargent IL. Leukaemia inhibitory factor significantly enhances the blastocyst formation rates of human embryos cultured in serum-free medium. *Hum Reprod* 1996; 11:191-196.
96. Baart EB, Martini E, van den Berg I, Macklon NS, Galjaard RJ, Fauser BC, Van Opstal D. Preimplantation genetic screening reveals a high incidence of aneuploidy and mosaicism in embryos from young women undergoing IVF. *Hum Reprod* 2006; 21:223-233.
97. Munne S, Velilla E, Colls P, Garcia Bermudez M, Vemuri MC, Steuerwald N, Garrisi J, Cohen J. Self-correction of chromosomally abnormal embryos in culture and implications for stem cell production. *Fertil Steril* 2005; 84:1328-1334.
98. Rossi DJ, Bryder D, Seita J, Nussenzweig A, Hoeijmakers J, Weissman IL. Deficiencies in DNA damage repair limit the function of hematopoietic stem cells with age. *Nature* 2007; 447:725-729.
99. Yannaki E, Athanasiou E, Xagorari A, Constantinou V, Batsis I, Kaloyannidis P, Proya E, Anagnostopoulos A, Fatsas A. G-CSF-primed hematopoietic stem cells or G-CSF per se accelerate recovery and improve survival after liver injury, predominantly by promoting endogenous repair programs. *Exp Hematol* 2005; 33:108-119.
100. Piscaglia AC, Shupe TD, Oh SH, Gasbarrini A, Petersen BE. Granulocyte-colony stimulating factor promotes liver repair and induces oval cell migration and proliferation in rats. *Gastroenterology* 2007; 133:619-631.

101. Giacomini G, Tabibzadeh SS, Satyaswaroop PG, Bonsi L, Vitale L, Bagnara GP, Strippoli P, Jasonni VM. Epithelial cells are the major source of biologically active granulocyte macrophage colony-stimulating factor in human endometrium. *Hum Reprod* 1995; 10:3259-3263.
102. Duan JS. Production of granulocyte colony stimulating factor in decidual tissue and its significance in pregnancy. *Osaka City Med J* 1990; 36:81-97.
103. Calhoun DA, Donnelly WH Jr., Du Y, Dame JB, Li Y, Christensen RD. Distribution of granulocyte colony-stimulating factor (G-CSF) and G-CSF-receptor mRNA and protein in the human fetus. *Pediatr Res* 1999; 46:333-338.
104. Dale DC, Cottle TE, Fier CJ, Bolyard AA, Bonilla MA, Boxer LA, Cham B, Freedman MH, Kannourakis G, Kinsey SE, Davis R, Scarlata D, Schwinzer B, Zeidler C, Welte K. Severe chronic neutropenia: treatment and follow-up of patients in the Severe Chronic Neutropenia International Registry. *Am J Hematol* 2003; 72:82-93.
105. Gomez Raposo C, Pinto Marin A, Gonzalez Baron M. Colony-stimulating factors: clinical evidence for treatment and prophylaxis of chemotherapy-induced febrile neutropenia. *Clin Transl Oncol* 2006; 8:729-734.
106. Kauffmann SJ, Sharif K, Sharman V and McVerry BA. Term delivery in a woman with severe congenital neutropenia, treated with growth colony stimulating factor. *Hum Reprod* 1998; 13(20):498-499.
107. Hsueh A, Billig H and Tsafiri A. *Endocr Rev* 1994; 15:707-724, doi:10.1210/edrv-15-6-707.
108. Carlberg M, Nejaty J, Fröysa B, Guan Y, Söder O and Bergqvist A. Elevated expression of tumor necrosis factor α in cultured granulosa cells from women with endometriosis. *Hum Reprod* 2000; 15(6):1250-1255.
109. Fedrocsak P, Raki M and Storeng R. Characterization and depletion of leucocytes from cells isolated from preovulatory ovarian follicle. *Hum Reprod* 2007; 22(4):989-994.
110. Lee KS, Joo BS, Na YJ, Yoon MS, Choi OH, Kim WW. Relationships between concentrations of tumor necrosis factor- α and nitric oxide in follicular fluid and oocyte quality. *J Assist Reprod Genet* 2000; 17:222-228.
111. Ma CH, Yan LY, Qiao J, Sha W, Li L, Chen Y and Sun QY. Effects of tumor necrosis factor- α on porcine oocyte meiosis progression, spindle organization, and chromosome alignment. *Fertil Steril* 2010; 93(3):920-6.
112. Wu MY, Ho HN. The role of cytokines in endometriosis. *Am J Reprod Immunol* 2003; 49:285-296.
113. Shakiba K and Falcone T. Tumor necrosis factor- α blockers: potential limitations in the management of advanced endometriosis? A case report. *Hum Reprod* 2006; 21(9):2417-2420.
114. Daraï E, Detchev R, Hugol D and Quang NT. Serum and cyst fluid levels of interleukin (IL) -6, IL-8 and tumor necrosis factor- α in women with endometriomas and benign and malignant cystic ovarian tumours. *Hum Reprod* 2003; 18(8):1681-1685.
115. Vujisic S and Zidovec S. Follicular Immunology Environment and the Influence on In Vitro Fertilization Outcome. *Current Women's Health Reviews* 2005; 1:49-60.
116. Ledee-Bataille N, Lapree-Delage G, Taupin JL, Dubanchet S, Taieb J, Moreau JF and Chaouat G. Follicular fluid concentration of leukaemia inhibitory factor is decreased among women with polycystic ovarian syndrome during assisted reproduction cycles. *Hum Reprod* 2001; 16:2073-2078.
117. Hsieh YY, Chang CC, Tsai HD, Lin CS. Leukemia inhibitory factor in follicular fluid is not related to the number and quality of embryos as well as implantation and pregnancy rates. *Biochem Genet* 2005 Oct; 43(9-10):501-6.
118. Lebovic DI, Mueller MD and Taylor RN. Immunobiology of endometriosis. *Fertil Steril* 2001; 75:1-10.
119. Nash MA, Ferrandina G, Gordinier M, Loercher A and Freedman RS. The role of cytokines in both the normal and malignant ovary review. *Endocrine-related Cancer* 1999; 6:93-107.
120. Cheong YC, Shelton JB, Laird SM, Richmond M, Kudesia G, Li TC and Ledger WL. IL-1, IL-6 and TNF- α concentrations in the peritoneal fluid of women with pelvic adhesions. *Hum. Reprod* 2002; 17:69-75.
121. Khan KN, Masuzaki H, Fujishita A, Hamasaki T, Kitajima M, Hasuo A, Miyamura Y and Ishimaru T. Association of interleukin-6 and estradiol with hepatocyte growth factor in peritoneal fluid of women with endometriosis. *Acta Obstet Gynecol Scand* 2002; 81:764-771.
122. Altun T, Jindal S, Greenseid K, Shu J, Pal L. Low follicular fluid IL-6 levels in IVF patients are associated with increased likelihood of clinical pregnancy. *J Assist Reprod Genet* 2010 Nov 3.
123. Arici A, Oral E, Bukulmez O, Buradagunta S, Engin O, Olive DL. Interleukin-8 expression and modulation in human preovulatory follicles and ovarian cells. *Endocrinology* 1996; 137:3762-3769.
124. Nyhlen K, Gautam C, Andersson R, Srinivas U. Modulation of cytokine-induced production of IL-8 in vitro by interferons and glucocorticoids. *Inflammation* 2004; 28:77-88.
125. Runesson E, Bostrom EK, Janson PO, Brannstrom M. The human preovulatory follicle is a source of the chemotactic cytokine interleukin-8. *Mol Hum Reprod* 1996; 2:245-250.
126. Chang RJ, Gougeon A, Erickson GF. Evidence for a neutrophil-interleukin-8 system in human folliculogenesis. *Am J Obstet Gynecol* 1998; 178:650-657.
127. Buscher U, Chen FCK, Kentenich H, Schmiady H. Cytokines in the follicular fluid of stimulated and non-stimulated human ovaries; is ovulation a suppressed inflammatory reaction? *Hum Reprod* 1999; 14:162-166.
128. Koch AE, Polverini PJ, Kunkel SL, Harlow LA, DiPietro LA, Elner VM, Elner SG, Strieter RM. Interleukin-8 as a macrophage-derived mediator of angiogenesis. *Science* 1992; 258:1798-1801.
129. Yoshino O, Osuga Y, Koga K, Hirota Y, Yano T, Tsutsumi O, Fujimoto A, Kugu K, Momoeda M, Fujiwara T, Takekuni Y. Upregulation of interleukin-8 by hypoxia in human ovaries. *Am J Reprod Immunol* 2003; 50:286-290.
130. Runesson E, Ivarsson K, Janson PO, Brannstrom M. Gonadotropin and cytokine regulated expression of the chemokine interleukin 8 in the human preovulatory follicle of the menstrual cycle. *J Clin Endocrinol Metab* 2000; 85:4387-4395.
131. Fujii A, Harada T, Yamauchi N, Iwabe T, Nishi Y, Yanase T, Nawata H and Teraka N. Interleukin-8 gene and protein ex-

pression are up-regulated by interleukin-1 β in normal human ovarian cells and granulosa tumor cell line. *Fertil Steril* 2003; 79(1):151-157.

132. Hammadeh ME, Fischer-Hammadeh C, Georg T, Rosenbaum P, Schmidt W. Comparison between cytokine concentration in follicular fluid of poor and high responder patients and their influence on ICSI outcome. *Am J Reprod Immunol* 2003; 50:131.

133. Gazvani R, Smith L, Fowler PA. Effect of interleukin-8 (IL-8), anti-IL-8, and IL-12 on endometrial cell survival in combined endometrial gland and stromal cell cultures derived from women with and without endometriosis. *Fertil Steril* 2002; 77:62-67.

134. Gutman G, Soussan-Gutman L, Malcov M, Lessing JB, Amit A, Azem F. Interleukin-18 is high in the serum of IVF pregnancies with ovarian hyperstimulation syndrome. *Am J Reprod Immunol* 2004; 51(5):381-4.

135. Vujisic S, Židovec Lepej S, Emedi I, Bauman R, Remenar A and Tiljak MK. Ovarian follicular concentration of IL-12, IL-15, IL-18 and p40 subunit of IL-12 and IL-23. *Hum Reprod* 2006; 21(10):2650-2655.

136. Knight PhG and Glistler C. TGF- β superfamily members and ovarian follicle development review. *Reprod* 2006; 132:191-206.

137. De Muro P, Capobianco G, Formato M, Lepedda AJ, Cherchi GM, Gordini L and Dessole S. Glycosaminoglycan and transforming growth factor β 1 changes in human plasma and urine during the menstrual cycle, in vitro fertilization treatment, and pregnancy. *Fertil Steril* 2009; 92:320-327.

138. McLaughlin EA and McIver SC. Awakening the oocyte: controlling primordial follicle development. *Reproduction* 2009; 137:1-11.

139. Trombly DJ, Woodruff TK, Mayo KE. Roles of transforming growth factor beta superfamily proteins in early folliculogenesis. *Semin Reprod Med* 2009; 27(1):14-23.

140. McNatty KP, Smith P, Moore LG, Reader K, Lun S, Hanrahan JP, Groome NP, Laitinen M, Ritvos O & Juengel JL. Oocyte-expressed genes affecting ovulation rate. *Molecular and Cellular Endocrinology* 205; 234:57-66.

141. Lobb DE. Expression and actions of transforming growth factors during human follicular development. *Fertil Steril* 2009; 92:1080-1084.

142. Manau D, Fábregues Peñarubia J, Creus M, Carmona F, Casals G, Jiménez W and Balasch J. Vascular endothelial growth factor levels in serum and plasma patients undergoing controlled ovarian hyperstimulation for IVF. *Hum Reprod* 2007; 22(3):669-675.

143. Ferrara N. Vascular endothelial growth factor: basic science and clinical progress. *Endocr Rev* 2004; 25:581-611.

144. Geva E, Jaffe RB. Role of vascular endothelial growth factor in ovarian physiology and pathology. *Fertil Steril* 2000; 74:429-438.

145. McClure N, Healy DL, Rogers PA, Sullivan J, Beaton L, Haning RV Jr, Connolly DT and Robertson DM. Vascular endothelial growth factor as capillary permeability agent in ovarian hyperstimulation syndrome. *Lancet* 1994; 23(344):235-236.

146. Rizk B, Aboulghar M, Smitz J and Ron-El R. The role of vascular endothelial growth factor and interleukins in the

pathogenesis of severe ovarian hyperstimulation syndrome review. *Hum Reprod Update* 1997; 3(3):255-266.

147. Kosaka K, Fujiwara H, Yoshioka S and Fujii S. Vascular endothelial growth factor production by circulating immune cells is elevated in ovarian hyperstimulation syndrome. *Hum Reprod* 2007; 22(6):1647-1651.

148. Viilasante A, Pacheco A, Pau E, Ruiz A, Pellicer A and Garcia Velasco JA. Soluble vascular endothelial-cadherin level correlate with clinical and biological aspects of severe ovarian hyperstimulation syndrome. *Hum Reprod* 2008; Doi: 10.1093/humrep/dem429

149. Babayof R, Margalioth EJ, Hleihel M, Amash A, Zylber-Haran GA, Brooks B, Mimoni T and Eldar-Geva T. Serum inhibin A, VEGF and TNF α levels after triggering oocyte maturation with GnRH agonist compared with HCG in women with polycystic ovaries undergoing IVF treatment: a prospective randomized trial. *Hum Reprod* 2006; 21(5):1260-1265.

150. Juengel JL and McNatty KP. The role of proteins of the transforming growth factor- β superfamily in the intraovarian regulation of follicular development review. *Hum Reprod Update* 2005; 11(2):144-161.

151. Di Pasquale E, Beck-Peccoz P, Persani L. Hypergonadotropic ovarian failure associated with an inherited mutation of human bone morphogenetic protein-15 (BMP15) gene. *Am J Hum Genet* 2004; 75:106-111.

152. Shimasaki S, Moore RK, Otsuka F, Erickson GF. The bone morphogenetic protein system in mammalian reproduction. *Endocr Rev* 2004; 25:72-101.

153. Moore RK, Shimasaki S. Molecular biology and physiological role of the oocyte factor, BMP-15. *Mol Cell Endocrinol* 2005; 234:67-73.

154. Otsuka F, Yao Z, Lee T, Yamamoto S, Erickson GF, Shimasaki S. Bone morphogenetic protein-15. Identification of target cells and biological functions. *J Biol Chem* 2000; 275:39523-39528.

155. Laitinen M, Vuojalainen K, Jaatien R, Ketola I, Aaltonen J, Lehtonen E, Heikinheimo M, Ritvos O. A novel growth differentiation factor-9 (GDF-9) related factor is co-expressed with GDF-9 in mouse oocytes during folliculogenesis. *Mech Dev* 1998; 78:135-140.

156. Dube JL, Wang P, Elvin J, Lyons KM, Celeste AJ, Matzuk MM. The bone morphogenetic protein 15 gene is x-linked and expressed in oocytes. *Mol Endocrinol* 1998; 12:1809-1817.

157. Dong J, Altertini DF, Nishimori K, Rajendra Kumar T, Lu N, Matzuk MM. Growth differentiation factor-9 is required during early ovarian folliculogenesis. *Nature* 1996; 531-535.

158. Galloway SM, McNatty KP, Cambridge LM, Laitinen MPE, Juengel JL, Jokiranta TS, McLaren RJ, Luiro K, Dodds KG, Montgomery GW, Beattie AE, Davis GH, Ritvos O. Mutations in an oocyte-derived growth factor gene (BMP15) cause increased ovulation rate and infertility in a dosage-sensitive manner. *Nat Genet* 2000; 25:279-283.

159. Kaivo-Oja N, Mottershead DG, Mazerbourg S, Myllymaa S, Duprat S, Gilchrist RB, Groome NP, Hsueh AJ, Ritvos O. Adenoviral gene transfer allows smad-responsive gene promoter analyses and delineation of type I receptor usage of transforming growth factor-beta family ligands in cultured human granulosa luteal cells. *J Clin Endocrinol Metab* 2005; 90:271-8.

160. Heldin CH, Miyazono K, ten Dijke P. TGF β signaling from cell membrane to nucleus through SMAD proteins. *Nature* 1997; 390:465-471.
161. Ten Dijke P, Miyazono K, Heldin CH. Signaling inputs converge on nuclear effectors in TGF- β signaling. *Trends Biochem Sci* 2000; 25:64-70.
162. Yi SE, LaPolt PS, Yoon BS, Chen JY, Lu JK, Lyons KM. The type 1 BMP receptor Bmpr1B is essential for female reproductive function. *Proc Natl Acad Sci USA* 2001; 98:7994-7999.
163. Yan C, Wang P, DeMayo J, DeMayo FJ, Elvin JA, Carino C, Prasad SV, Skinner SS, Dunbar BS, Dube JL, Celeste AJ, Matzuk MM. Synergistic roles of bone morphogenetic protein 15 and growth differentiation factor 9 in ovarian function. *Mol Endocrinol* 2001; 15:854-866.
164. Hayashi M, McGee EA, Min G, Klein C, Rose UM, van Duin M, Hsueh AJ. Recombinant growth differentiation of cultured early ovarian follicles. *Endocrinology* 1999; 140:1236-1244.
165. Vitt UA, Hayashi M, Klein C, Hsueh AJW. Growth differentiation factor-9 stimulates proliferation but suppresses the follicle-stimulating hormone-induced differentiation of cultured granulosa cells from small antral and preovulatory rat follicles. *Biol Reprod* 2000; 62:370-377.
166. Elvin JA, Clark AT, Wang P, Wolfman NM, Matzuk MM. Paracrine actions of growth differentiation factor-9 in the mammalian ovary. *Mol Endocrinol* 1999; 13:1035-1048.
167. Otsuka F, Yao Z, Lee TH, Yamamoto S, Erickson GF, Shimasaki S. Bone morphogenetic protein-15. Identification of target cells and biological functions. *J Biol Chem* 2000; 275:39523-39528.
168. Van der Hurk R, Zhao J. Formation of mammalian oocytes and their growth, differentiation and maturation within ovarian follicles. *Theriogenology* 2005; 63(6):1717-1751.
169. Moore RK, Otsuka F, Shimasaki S. Molecular basis of bone morphogenetic protein-15 signaling in granulosa cells. *Journal of Biological Chemistry* 2003; 278:304-310.
170. Edwards SJ, Reader KL, Lun S, Western A, Lawrence S, McNatty KP, Juengel JL. The cooperative effect of growth and differentiation factor-9 and bone morphogenetic protein (BMP)-15 on granulosa cell function is modulated primarily through BMP receptor II. *Endocrinol* 2008; 149(3):1026-1030.
171. Mazerbourg S, Klein C, Roh J, Kaivo-Oja N, Mottershead DG, Korchynskiy O, Ritvos O, Hsueh AJ. Growth differentiation factor-9 signaling is mediated by the type I receptor, activin receptor-like kinase 5. *Mol Endocrinol* 2004; 18:653-65.