

43
Jey'



UNIVERSIDAD NACIONAL AUTONOMA DE MEXICO

**ESCUELA NACIONAL DE ESTUDIOS PROFESIONALES
ZARAGOZA**

**ACTIVIDAD Y COMPARTAMENTALIZACION DE
LAS ENZIMAS LISOSOMALES DURANTE LA
MADURACION FOLICULAR EN LA CABRA**

T E S I S

**QUE PARA OBTENER EL TITULO DE:
QUIMICO FARMACEUTICO BIOLOGO**

P R E S E N T A

JOSE LUIS SAUER RAMIREZ

**TESIS CON
FALLA LE ORIGEN**

MEXICO, D. F. 1991



Universidad Nacional
Autónoma de México



UNAM – Dirección General de Bibliotecas Tesis Digitales Restricciones de uso

DERECHOS RESERVADOS © PROHIBIDA SU REPRODUCCIÓN TOTAL O PARCIAL

Todo el material contenido en esta tesis está protegido por la Ley Federal del Derecho de Autor (LFDA) de los Estados Unidos Mexicanos (México).

El uso de imágenes, fragmentos de videos, y demás material que sea objeto de protección de los derechos de autor, será exclusivamente para fines educativos e informativos y deberá citar la fuente donde la obtuvo mencionando el autor o autores. Cualquier uso distinto como el lucro, reproducción, edición o modificación, será perseguido y sancionado por el respectivo titular de los Derechos de Autor.

INDICE.

RESUMEN	1
1. INTRODUCCION	2
1.1 OVOGENESIS.	
1.1.A EL ORIGEN DE LA OVOGONIA.	2
1.1.B DESARROLLO DE LA OVOGONIA.	3
1.2 CRECIMIENTO FOLICULAR.	
1.2.A FACTORES HORMONALES.	4
1.2.B DESARROLLO FOLICULAR.	5
1.2.C RELACION ENTRE EL OVOCITO Y EL FOLICULO.	6
1.3 MADURACION DE LOS OVOCITOS.	7
2. BIOQUIMICA DE LA MADURACION.	
2.1 FACTOR INHIBIDOR DE LA MADURACION DEL OVOCITO (OMI).	8
2.2 AMP CICLICO.	8
2.3 OTROS AGENTES.	9
2.4 METABOLISMO ENERGETICO.	10
2.5 SINTESIS DE PROTEINAS.	12
2.6 SINTESIS DEL ACIDO RIBONUCLEICO.	13
2.7 SINTESIS DEL ACIDO DESOXIRIBONUCLEICO.	14
3. ENZIMAS LISOSOMALES.	
3.1 ANTECEDENTES.	14
3.2 PROPIEDADES FISICOQUIMICAS DE LAS ENZIMAS EN ESTUDIO.	16
4. ASPECTOS IMPORTANTES DEL MATERIAL BIOLOGICO.	
4.1 INTERACCION DE FACTORES AMBIENTALES.	16

4.2 CARACTERISTICAS DEL CICLO ESTRAL DE LA CABRA.	17
5. PLANTAMIENTO DEL PROBLEMA.	18
6. HIPOTESIS DE TRABAJO.	18
7. OBJETIVO.	18
8. MATERIAL Y METODOS.	
8.1 OBTENCION DEL MATERIAL BIOLOGICO.	19
8.2 SEPARACION Y CLASIFICACION DE LOS FOLICULOS.	19
8.3 OBTENCION DE LOS DIFERENTES COMPARTIMENTOS.	19
8.4 PROCEDIMIENTOS ANALITICOS.	20
9. RESULTADOS.	
9.1 ENZIMAS LISOSOMALES Y PROTEINAS EN EL LIQUIDO FOLICULAR.	23
9.2 ENZIMAS LISOSOMALES Y PROTEINAS EN LAS CELULAS DE LA CAPA GRANULOSA.	23
9.3 ENZIMAS LISOSOMALES Y PROTEINAS EN LAS CELULAS DE LA TECA.	23
9.4 OBSERVACIONES EN GENERAL	24
10. DISCUSION.	39
11. CONCLUSIONES.	42
12. APENDICE.	
12.1 SOLUCIONES EMPLEADAS PARA EL TRANSPORTE Y HOMOGENEIZACION DE LOS OVARIOS.	43
12.2 PREPARACION DE REACTIVOS PARA LA CUANTIFICACION DE LOS DIFERENTES METABOLITOS	43
12.3 EQUIPO EMPLEADO.	46
13. BIBLIOGRAFIA.	50

RESUMEN.

Estudió de la actividad de tres enzimas lisosomales: (Fosfatasa ácida, aril-sulfatasa y N-acetil- β -D-glucosaminidasa) durante la maduración folicular en la cabra.

Se diseccionaron y clasificaron folículos antrales de cabra por su tamaño en 3 grupos: menores de 3 mm, entre 3 y 6 mm y mayores de 6 mm. Los folículos menores de 3 mm de diámetro se consideraron sanos y se incorporaron directamente al estudio, los restantes se estudiaron bajo un microscopio estereoscópico para ver sus características morfológicas. Los folículos de entre 3 y 6 mm y mayores de 6 mm con apariencia brillante, translúcida y uniforme, vascularización extensa y una capa regular de células granulosa se consideraron sanos. Se midieron las actividades, para las tres enzimas, libres y unidas a partículas de células de la capa granulosa, del saco folicular vacío (células de la teca), y del líquido folicular, empleando métodos fluorométricos. La fosfatasa ácida y la N-acetil- β -D-glucosaminidasa están presentes en los diferentes compartimentos del folículo, sus actividades son notablemente más intensas en las células de la teca que en las células de la capa granulosa. Muestran un comportamiento similar durante el crecimiento folicular; en las células de la teca disminuyen conforme aumenta el tamaño del folículo, después aumentan durante el desarrollo folicular. Por el contrario, la aril-sulfatasa está presente en la fracción unida, a partículas, de las células de la capa granulosa, aumenta durante el desarrollo folicular y tiene un comportamiento característico durante el crecimiento del folículo. La actividad de las tres enzimas en el líquido folicular, en ausencia de cambios atrésicos, disminuyó con relación al desarrollo del folículo.

De nuestros resultados puede concluirse que las enzimas lisosomales están presentes en todos los compartimentos y estadios del crecimiento folicular de la cabra adulta, sus concentraciones varían de acuerdo al desarrollo folicular y los estadios finales del crecimiento se acompañan por un aumento de lisosomas en las células de la teca, así como por la liberación de la actividad hidrolítica dentro del compartimento libre de estas células.

INTRODUCCION.

En los mamíferos la liberación de ovocitos viables capaces de ser fertilizados involucra tres eventos principales: I.- La ovogénesis, que involucra la producción de células germinales femeninas; II.- El crecimiento folicular, que comprende el crecimiento de los folículos ováricos y el concomitante crecimiento de los ovocitos y III.- La maduración de los ovocitos, que consiste en la reanudación de la meiosis inmediatamente antes de la ovulación.

La ovogénesis es un proceso que se inicia en la etapa fetal y se detiene cuando el núcleo del ovocito llega a la profase I de la meiosis (Diploteno), en este estadio la mayoría de los ovocitos experimentan atresia: proceso degenerativo que experimentan los folículos ováricos, los cuales no alcanzan a liberar a la célula germinal. Después de la pubertad, los ovocitos restantes son estimulados por las gonadotropinas hipofisarias para reiniciar la meiosis, pero muy pocos maduran y son ovulados. El crecimiento cíclico de los folículos puede culminar en la ovulación o la atresia folicular.

1.1 OVOGENESIS. (1)

1.1.A.-EL ORIGEN DE LA OVOGONIA.

El origen de las células germinales ha sido un tópico controvertido. Un grupo de investigadores afirma que al inicio del desarrollo embrionario, la célula precursora de las células germinales proviene de sitios extragonadales y dan lugar a gametas femeninas y masculinas, una segunda escuela, propone el concepto que las células germinales femeninas pueden provenir del epitelio germinal y que el número de ovocitos varía con el estadio del ciclo menstrual del ovario adulto de la hembra en el humano (2,142). Evidencias posteriores han mostrado que el primer concepto es el verdadero y que los gonocitos primordiales provienen de fuentes extragonadales (157,101). En el embrión humano, las células germinales primordiales se originan del epitelio del saco vitelino del endodermo, donde se reconocen por primera vez alrededor de la 4ª semana de edad fetal (157). Poseen movimiento ameboideo y son transportadas por la corriente sanguínea o el mesenterio dorsal y eventualmente van a residir en los cordones genitales, donde aumentan rápidamente en número por mitosis.

La corteza del ovario proviene del epitelio celómico (158) y suministra, a la gónada en desarrollo, células foliculares que rodean a las células germinales, constituyendo así los folículos primordiales. La médula ovárica se origina del blastema mesonefrico mediano y provee las células intersticiales para la gónada.

Conforme se incrementa el número de células germinales y foliculares, los cordones medulares -que contienen tejido conectivo y vasos sanguíneos- invaden la corteza y dividen a los folículos en grupos.

1.1.B.- DESARROLLO DE LA OVOGONIA

En la hembra de los mamíferos, las células germinales se transforman en ovogonias desde el final del segundo mes de implantación intrauterina, hasta el séptimo mes de desarrollo embrionario (6). La división final de una ovogonia por mitosis termina en la producción de un ovocito el cual se dividirá por meiosis, lo que da por resultado reducción del número de cromosomas de la ovogonia.

La meiosis involucra una división ecuatorial y otra reduccional. En la primera división, Meiosis I, los cromosomas homólogos se dividen. La profase inicial se puede dividir en cuatro etapas: Leptoteno, Zigoteno, Paquiteno y Diploteno (7). En el estadio de leptoteno, el núcleo contiene el número diploide de filamentos cromosómicos los cuales no están apareados, durante el zigoteno, los filamentos materno y paterno se asocian en pares formando la sinapsis, en el paquiteno, los filamentos apareados se acortan y espesan, en este momento es cuando ocurre el entrecruzamiento entre los pares cromosómicos, en el diploteno, las cromátidas se separan y desenrollan permaneciendo unidas por el quiasma, (punto donde ocurrió el entrecruzamiento). En el estadio inicial de maduración, la cromátida empieza a condensarse a lo largo de la membrana nuclear, el nucléolo se rompe y su membrana se dispersa y finalmente se divide (23), conforme el huso se forma las mitocondrias se mueven para rodearlo. En la telofase I, la cromatina se divide de igual forma, pero el ovocito retiene el volumen del ovoplasma, el primer cuerpo polar recibe la mitad de la cromatina, pero poco del ovoplasma. En la Meiosis II, cada par de cromátidas es unida por un centrómero común y cada cromátida del par se separa de su pareja, el ovocito prosigue a Metafase II donde se detiene la meiosis, la célula germinal es liberada en Metafase II y completa la división cuando un espermatozoide la penetra.

El proceso de meiosis no es sincrónico, en el feto humano se han encontrado células germinales en varios estadios meióticos, desde el tercer mes post-fertilización hacia adelante (7). Antes o poco después del nacimiento, todos los ovocitos han alcanzado la etapa de diploteno y es en este momento cuando entran a un estadio quiescente, punto en el que se forma un núcleo llamado vesícula germinal (47). Durante este periodo quiescente, los nutrientes se almacenan en el ovoplasma (117), el ovocito sintetiza activamente ácido ribonucleico (RNA)* (64) y la organización

* En todas las abreviaturas se utilizará la derivación de sus siglas en inglés."

del núcleo del ovocito en este periodo depende de la especie involucrada (162).

En los roedores, la cromatina está distribuida uniformemente en el nucleoplasma, la cual cambia de la configuración de diploteno al estado de diaquinesis; en otras especies, incluyendo los primates, el núcleo mantiene las características del diploteno.

Los ovocitos quiescentes frecuentemente contienen la mayoría de sus organelos: -Aparato de golgi, elementos del retículo endoplásmico y mitocondrias- concentrados en un área del citoplasma cercana al núcleo, área denominada complejo nuclear, la cual tiene forma de media luna; el citoplasma periférico está ocupado por polisomas. Estos agregados paranucleares son muy prominentes en los ovocitos iniciales de los primates (75) y menos numerosos en otras especies de mamíferos (82), donde principalmente hay grandes complejos de golgi.

La mayor parte de los ovocitos se constituyen como folículos pequeños que forman parte de la reserva de folículos que se encuentran en reposo. Es por un proceso de selección todavía desconocido que algunos de estos folículos en reposo inician periódicamente su crecimiento, dicho desarrollo los llevará a la ovulación o a la atresia.

El crecimiento folicular se inicia cuando el ovocito empieza a crecer y el número de células de la capa granulosa se multiplica. Por otro lado, el crecimiento de la población folicular parece ser un fenómeno continuo que se inicia desde las primeras semanas de vida, de manera que al momento de la primera ovulación el ovario contiene, no solamente, el o los folículos que liberaran a la célula germinal, sino también una población fija de folículos en crecimiento sanos o atrésicos y otra población de folículos que se encuentran en las etapas iniciales de crecimiento.

1.2.- CRECIMIENTO FOLICULAR (11).

1.2.A.- FACTORES HORMONALES.

Los ciclos reproductivos de las hembras en los mamíferos se establecen en el momento de la pubertad, los factores involucrados en su aparición no han sido completamente entendidos, pero se cree que la ciclicidad es el resultado de la interacción de varios mecanismos neuro-endócrinos, algunos de los cuales se desarrollan totalmente dentro del mismo órgano, mientras que otros se establecen en relación con otros órganos de la economía. Cuando la interacción de estos diferentes mecanismos es adecuada, el crecimiento folicular finaliza con la liberación de uno o varios ovocitos, el número de ovocitos liberados es característico de cada especie.

La ciclicidad de los fenómenos que participan en la regulación de la ovulación espontánea ocurre en la mayoría de los mamíferos, resultado de la interdependencia entre el ovario, la hipófisis y el sistema nervioso central, como agentes reguladores de estos mecanismos.

La hipófisis libera dos gonadotropinas involucradas en la activación del ovario, la Hormona Estimulante del folículo (FSH) y la Hormona Luteinizante (LH), estas hormonas estimulan el crecimiento y la división de las células de los folículos las cuales son productoras principales de estrógenos. Conforme los folículos aumentan de tamaño las concentraciones plasmáticas de estrógenos aumentan (135) y estimulan la liberación hipofisiaria de un "pico" de secreción de LH, provocando la ovulación y posteriormente la luteinización del folículo. Después de este suceso se forma un cuerpo lúteo el cual segrega principalmente progesterona.

La FSH se secreta durante el ciclo estral y facilita la producción folicular de estrógenos (69), tiene poco efecto directo sobre la síntesis de esteroides (87). Sin embargo la acción inicial de la LH es incrementar la conversión de algunos precursores esteroides a progesterona (4). Plunkett y colaboradores (123), han postulado que las Prostaglandinas (PGs) juegan un papel importante como mediadoras de ciertas funciones de la LH.

1.2.B.-DESARROLLO FOLICULAR.

El desarrollo folicular ocurre en oleadas como consecuencia de la ciclicidad endocrinológica en la hembra. Las gonadotropinas no son necesarias para el desarrollo folicular inicial, puesto que los folículos crecen en este estado aún después de la hipofisectomía (161). En la etapa temprana de folículo primordial, el ovocito está rodeado por células epiteliales planas, durante el crecimiento folicular estas células llegan a ser cúbicas y proliferan. Conforme los folículos continúan su crecimiento, las células foliculares secretan un líquido el cual se acumula formando un antro folicular (96). Conforme el folículo crece, las células estromales ováricas se diferencian para formar una teca externa y una teca interna, mientras que las células foliculares previas forman el estrato granuloso.

La teca interna esta altamente vascularizada, formada por células secretoras de estrógenos, y está limitada en su lado externo por fibras de la teca externa y en su lado interno por una membrana basal que la separa del estrato granuloso. Ninguna vena sanguínea penetra esta membrana basal, por lo que el ovocito y las células que lo rodean no reciben apoyo circulatorio directo. Conforme el crecimiento folicular continua, el folículo y el antro folicular llegan a ser tan grandes que forman una protuberancia en la superficie del ovario, en este estadio el folículo se llama folículo de De Graff. Después del "pico" de secreción de LH, las células foliculares, en la vecindad del ovocito, son separadas de la pared folicular (71) y están altamente dispersas (161), mientras que el ovocito flota libre en el antro folicular con su corona radiada y su cumulus oophorus.

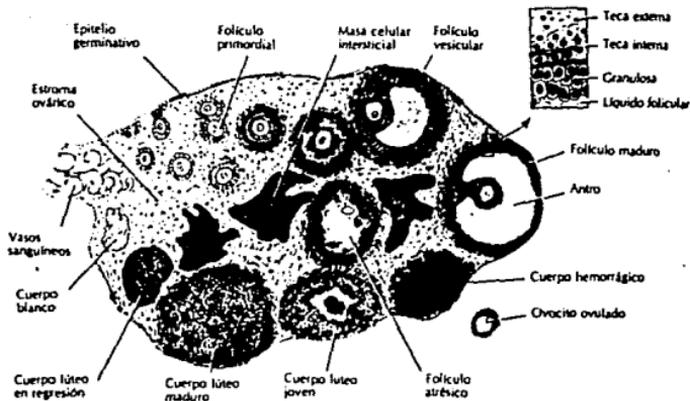


Diagrama del ovario que muestra el desarrollo secuencial de un folículo y la formación del cuerpo lúteo. En el recuadro situado arriba a la derecha se observa una imagen aumentada del corte de la pared de un folículo maduro.

1.2.C. - RELACION ENTRE EL OVOCITO Y EL FOLÍCULO.

Los ovocitos también crecen durante los estadios tempranos del desarrollo folicular, su crecimiento se completa cuando las capas foliculares son de 20 a 30 células (18). Inicialmente los agregados paranucleares están dispersos en el ovoplasma (101), mientras que el ovocito posee escaso retículo endoplásmico (70), el que usualmente está asociado con la síntesis de proteínas.

Los lípidos y las proteínas de la mayor parte del ovoplasma se depositan en el ovocito durante la fase de crecimiento. En el ovocito del hámster, alrededor de las células de la corona, existen elementos fosfolípidicos que parecen estar relacionados con su aparición (76), considerándolos como la fuente de nutrientes ovoplásmicos.

Existe un mucopolisacárido que cubre la zona pelúcida y que se deposita alrededor del ovocito, el espacio que lo separa de las células foliculares es ancho. La zona pelúcida se cree está formada por células foliculares (27), en los ovocitos con cierto desarrollo y zona pelúcida incompleta, en el vitelio cerca de la sustancia zonal, no se observa ninguna especialización local, sin embargo, la células foliculares en esta región son mayores que en otras áreas, lo que su presencia hace suponer una actividad metabólica aumentada.

Gilula y colaboradores (65); Moor y colaboradores (105), observaron que el acoplamiento metabólico entre las

células del cumulus oophurus y el ovocito tiene su máxima actividad antes del "pico" de secreción de gonadotropinas, lo que los llevo a plantear la siguiente hipótesis: "La reanudación de la meiosis se produce como resultado de la ruptura del acoplamiento funcional entre estas células y posiblemente es provocada por la hormona ovulatoria LH." No obstante, la secuencia temporal de los cambios inducidos sobre la maduración meiótica, por acción de la LH, no parece apoyar esta hipótesis. En efecto, según demostraron Moor y colaboradores (105), la ruptura de la Vesícula Germinal (GVBD), precede al desensamble de las uniones comunicantes entre el ovocito y las células del cumulus oophurus y por tanto es anterior a la disminución del fenómeno de acoplamiento metabólico, estos hallazgos fueron comprobados por la observación de que la FSH es capaz de suprimir el acoplamiento metabólico sin inducir la reanudación de la meiosis (106).

1.3.- MADURACION DE LOS OVOCITOS (III). Cambios nucleares durante la maduración.

Thomson (150), reportó que los ovocitos humanos completan las dos divisiones meióticas dentro de sus folículos antes de ser liberados. Por otro lado, Hinselmann (86), no identificó algún estadio intermedio en el proceso de maduración cuando examinó alrededor de 100 ovocitos y concluyó que la maduración continúa después de la ovulación.

Actualmente sabemos que, mientras los cambios ovoplásmicos ocurren durante la fase de desarrollo folicular, el núcleo del ovocito mantiene el estadio de vesícula germinal, la división meiótica prosigue solamente después de que se ha estimulado por la LH. La etapa del desarrollo folicular, la división maduracional, se realiza en ausencia de centriolos (162) ya que estos no están presentes en los ovocitos de los mamíferos.

Durante la maduración del ovocito aumenta el número de granulos corticales periféricos y de cuerpos multivesiculares (102), lo que indica la actividad del ovoplasma, mientras que el aparato de Golgi está pobremente desarrollado y hay poco retículo endoplásmico (23).

La interrelación entre las gónadas, el sistema nervioso central y la hipófisis, propiciaron inicialmente el análisis exclusivo de las fases finales del crecimiento y maduración folicular, enfocando los estudios casi totalmente al fenómeno de la ovulación y dejando a un lado uno de los fenómenos claves de la reproducción en la hembra: el crecimiento folicular; así como la explicación de muchos de los fenómenos del crecimiento y la maduración foliculares desde el punto de vista bioquímico.

BIOQUIMICA DE LA MADURACION FOLICULAR.

2.1 FACTOR INHIBIDOR DE LA MADURACION DEL OVOCITO (OMI).

Pincus y Enzman (122), demostraron que los ovocitos de la coneja separados de su ambiente folicular son capaces de madurar cuando se colocan in vitro en un medio adecuado aún desprovisto de hormonas, esta observación ha sido confirmada y extendida a otras especies de mamíferos (13). La maduración espontánea de los ovocitos aislados indujo a Pincus y Enzman a sugerir que las células foliculares "producen un compuesto o compuestos capaces de inhibir directamente la maduración nuclear del ovocito". Chang (25), fue el primero en demostrar la presencia, en el líquido folicular, de un factor inhibidor de la maduración espontánea de los ovocitos de coneja.

La presencia de células de la capa granulosa también inhibe la maduración de los ovocitos, este efecto depende estrictamente del número de células añadidas. Tsafriri y Channing (155), demostraron que las células de la capa granulosa producen dicho inhibidor de la maduración del ovocito (OMI), también encontraron que las células de la capa granulosa obtenidas de folículos intermedios o pequeños son más activas que las obtenidas de folículos grandes y que el efecto inhibidor de las células de la capa granulosa puede ser revertido al agregar LH al medio de cultivo (153,78).

Recientemente se ha caracterizado parcialmente el OMI (24) y han establecido (153,151) un sistema de bioensayo para su demostración, donde una unidad del OMI es la cantidad necesaria para bloquear la ruptura de la vesícula germinal en el 50 % de los ovocitos. Estos hallazgos parecen indicar que el OMI es un péptido de peso molecular menor de 2000 daltons secretado al líquido folicular por las células de la capa granulosa.

2.2 EL AMP-CICLICO.

Se sabe (90) que tanto la LH como las PGs estimulan la adenilciclase e incrementan las concentraciones foliculares de Adenosín-Monofosfato-Cíclico (AMPC). El AMPC a concentraciones de 10^{-3} M tienen efecto inhibitorio en la maduración del ovocito (85). La adición de AMPC al medio de cultivo de folículos de ratones inhibe el efecto inductivo de la LH sobre la maduración del ovocito, el efecto inhibitorio del AMPC, también se ha observado en ovocitos de ratón y rata sin cumulus oophorus (28,98), por lo tanto, es probable que la inhibición de la maduración de los ovocitos encerrados en el folículo, causada por el AMPC, se deba a su acción directa.

Una hipótesis atractiva, es que las uniones comunicantes permitan el paso del AMPC de las células

foliculares al ovocito inhibiendo su maduración (36). Además, se ha postulado que la meiosis se reinicia al interrumpir la transferencia directa de AMPc al ovocito por el efecto que tienen las gonadotropinas sobre las uniones comunicantes (36,37). Sin embargo, la reducción del acoplamiento intercelular producido por la LH no parece ser el disparador para el reinicio de la meiosis, ya que la iniciación de la maduración precede a la terminación de la comunicación inducida por LH (106,50).

Para explicar la inhibición de la meiosis, en el ratón, se ha sugerido que el incremento de las concentraciones del AMPc en las células del cumulus oophorus activa, en estas, la síntesis de un inhibidor que posteriormente es transmitido al ovocito por medio de las uniones comunicantes, suprimiendo la producción de la GVBD (51,62).

2.3 OTROS AGENTES.

Los estudios del OMI han servido de base para la búsqueda de otros compuestos que funcionen como factores inhibidores de la maduración del ovocito. En 1976 Gwatkin y Anderson, describieron un péptido de unos 10,000 daltones capaz de interferir con la acción activadora de la LH sobre la maduración del ovocito. En 1984 se señaló la presencia de un nuevo péptido más grande que el OMI pero más pequeño que el factor encontrado por Gwatkin y Anderson y con mayor capacidad para inhibir la maduración del ovocito (130), este compuesto fue llamado factor preventivo de la maduración del ovocito (OMPF), su funcionamiento parece estar relacionado con la presencia de ciertos glicosamin-glicanos (GAGs) presentes en el folículo, particularmente la heparina y el heparan sulfato (130).

En efecto, mientras que ninguno de los glicosamin-glicanos utilizados a concentraciones altas (500 µg/ml) parecen tener efecto sobre el proceso de maduración folicular, la heparina y el heparan sulfato en concentraciones muy pequeñas son capaces de impedir completamente el funcionamiento inhibidor del OMPF (131), lo que sugiere que la presencia constante de estos GAGs en el ambiente folicular podría ser necesaria para modificar la actividad de los factores inhibidores de la maduración. A este respecto, debe recordarse que los GAGs pueden modificar la acción de las gonadotropinas e intervenir con su fijación a las células de la capa granulosa (113) y bloquear la activación de la adenilato ciclasa inducida por la LH (129).

Por otra parte, Downs y colaboradores (44) y Eppig y colaboradores (52), sugirieron que las purinas son capaces de ejercer control efectivo sobre la reanudación de la meiosis, en particular, estos grupos de investigadores señalaron la presencia de altas concentraciones de hipoxantina en el líquido folicular y su capacidad para mantener al ovocito detenido en meiosis, posiblemente actuando de manera concertada con el AMPc. La aplicación intraperitoneal de inhibidores de la síntesis de novo de

purinas, como la azaserina, así como inhibidores de la Deshidrogenasa del Monofosfato de Inosina (IMP) -ácido micofenólico y bredinina- provocan la ruptura de la vesícula germinal en ratonas prepúberes estimuladas con Gonadotropina del Suero de la Yegua Preñada, (PMSG) (45). Por el contrario, los inhibidores de la adenilo succinato sintetasa (Hadaacidina y di-Alanosina) no tuvieron efecto inhibitorio alguno, esto hace suponer que la conversión de IMP a derivados de la guanina o de la xantina debería estar involucrada en la acción inhibitoria de la hipoxantina sobre la maduración in vitro del ovocito (52).

Downs y colaboradores (44), encontraron que la guanosina es el inhibidor más activo de la maduración folicular y proponen que los derivados de la guanina producidos dentro del folículo por la IMP-deshidrogenasa desempeñan un papel fundamental en el mantenimiento de la detención de la meiosis, sin embargo, la manera como participa la hipoxantina en este proceso no se ha determinado con precisión.

En los últimos años se ha considerado la participación de los fosfolípidos ováricos en la regulación de la esteroidogénesis mitocondrial de las células foliculares. Farese y Sabir (60), demostraron que la adición de glicerolípidos fosforilados estimulan la síntesis de pregnenolona por el ovario, estas observaciones fueron comprobadas posteriormente por Tanaka y Straus (148), quienes encontraron que la adición de cardiolípidina estimula la síntesis de progesterona a partir de colesterol, probablemente por la activación de la colesterol-desmolasa mitocondrial, más específicamente, la adición de fosfoinosítidos a homogeneizados de tejido luteal estimula la esteroidogénesis (128). Estos resultados se correlacionan con la propuesta de que varios tejidos responden a la estimulación hormonal específica así como a otros estímulos reguladores del metabolismo con una modificación del recambio del fosfatidil-inositol y de sus derivados fosforilados (10,63). La participación de un mecanismo semejante durante la maduración folicular se ha apoyado recientemente por el hallazgo de que la LH estimula la síntesis y el recambio de los fosfoinosítidos en los folículos aislados de los ovarios de la cerda. (40).

2.4 METABOLISMO ENERGETICO.

La maduración espontánea de los ovocitos aislados de rata se acompaña de un incremento gradual en el consumo de oxígeno, este incremento no ocurre sino hasta que el ovocito alcanza la (GVBD) (97,98). Hillensjö y colaboradores (83); Dekel y colaboradores (35), observaron que, después de la estimulación con LH, la velocidad de consumo de oxígeno en el complejo ovocito-folículo decrece durante la maduración del ovocito. Una gran proporción de la actividad respiratoria en el complejo se debe a la respiración de las células que rodean al ovocito (83,97,14), lo cual es

importante para darse cuenta que el aumento en el consumo de oxígeno en el ovocito queda enmascarado por la disminución en el consumo de las células que lo rodean. Sin embargo, estudios más recientes demuestran que el aumento en el consumo de oxígeno por el ovocito no es un requisito para que la maduración nuclear ocurra normalmente (99).

Experimentos realizados utilizando folículos de mamíferos estimulados con LH, muestran un incremento en el consumo de glucosa y en la producción de ácido láctico (112,84,152), sin embargo, Zeilmaker y Verhamme (166), midieron la concentración de lactato dentro del folículo y no encontraron cambios significativos durante el proceso de maduración. En otro trabajo (152), se discute que el incremento en la producción de ácido láctico por los folículos, estimulados con LH, no es necesaria para que ocurra la maduración del ovocito; ya que la supresión del consumo de glucosa con yodo-acetato y la producción del ácido láctico no inhibe la maduración del ovocito. Estos datos parecen indicar que el efecto estimulatorio de la LH no está relacionado con el aumento en la actividad glicolítica del folículo.

Zeilmaker y Verhamme (165), sugirieron que puesto que la disponibilidad de oxígeno es limitada en el folículo, el lactato más que el piruvato puede ser la mayor fuente de energía disponible para el ovocito dentro del folículo, también han sugerido que la incapacidad de los ovocitos libres para consumir lactato puede deberse a la falta de Dinucleótido de Nicotinamida Adenina (NAD) endógeno, el cual es necesario para convertir el lactato a piruvato por la activación de la deshidrogenasa láctica (LDH). Estas sugerencias se basan en las observaciones de que la adición de (NAD) causa la maduración de los ovocitos libres en un medio que contenga lactato como única fuente de energía (139,164,15).

No hay duda que la maduración del ovocito es un proceso que requiere consumo de energía, sin embargo, no existe un acuerdo completo sobre los mecanismos fundamentales de la regulación del metabolismo energético de los ovocitos durante la maduración.

La mayoría de los investigadores opinan que la GVBD no se da bajo condiciones de inhibición del metabolismo aeróbico (165,77), ya sea por la falta de oxígeno o por la presencia de inhibidores respiratorios como el cianuro de potasio (19).

Schultz y Lambert (132), observaron que la maduración de los ovocitos involucra una disminución de las concentraciones de AMP, ATP y un aumento de ADP, lo que indica una utilización masiva de nutrientes por la célula, esto sugiere, que el incremento en el consumo de oxígeno que se observa después de la GVBD debe ser interpretado como un indicador del aumento en la fosforilación oxidativa, con lo que se restablece la concentración de ATP que se utilizo durante la GVBD.

La maduración del ovocito es uno de los procesos que requiere mayor cantidad de energía para la síntesis de proteínas. El punto máximo en una gráfica de consumo de oxígeno en los ovocitos, coincide con el aumento en el que se observa la mayor incorporación de aminoácidos en las proteínas del ovocito (19). Cuando la maduración del ovocito se estudia en condiciones anaeróbicas se observa una reducción substancial de las concentraciones de síntesis de proteínas (137).

2.5 SINTESIS DE PROTEINAS.

Un fenómeno general en todos los mamíferos es el incremento notable de la síntesis de proteínas en el ovocito durante la maduración, la cual se ha estudiado en especies como el ratón (66,133,134), la cerda (100) y la oveja (155), donde el aumento de la síntesis de proteínas es notable sobre todo después de que ocurre la GVBD. En la oveja estos cambios ocurren antes del GVBD, lo que permite inferir que la síntesis proteica es un requisito para la progresión de la maduración. Sin embargo, Smith y Ecker (137) y Ecker y Smith (46), mostraron que el mantener a los ovocitos en condiciones anaeróbicas no detiene su maduración a pesar de que hay una reducción substancial en la velocidad de síntesis de proteínas, Baltus y colaboradores (8), utilizando inhibidores específicos, también obtuvieron evidencias similares.

Schultz y Wasserman (133), sugieren que la inhibición de la síntesis de proteínas durante las primeras cinco horas de la maduración en los ovocitos de ratón, estadio de cromosoma circular bivalente, no afecta la maduración, pero sí afecta la inhibición durante las posteriores cinco horas. En el estadio de metafase I, se previene cualquier progreso de la misma. Por tanto, parecen existir ciertas proteínas que son sintetizadas durante fases específicas de la maduración y son indispensables para que los pasos subsecuentes del proceso se realicen normalmente.

Crosby y colaboradores (31), estudiaron el papel que desempeñan las relaciones intercelulares, dentro del folículo, para regular o mantener la maduración del ovocito, particularmente desde el punto de vista de la síntesis de proteínas. La velocidad de transporte de aminoácidos a través de la membrana del ovocito aumenta considerablemente durante la maduración (104). Este fenómeno también se induce por la supresión de las células foliculares, aún cuando las células del cumulus oophorus se mantengan intactas. Estos resultados hacen pensar que las células foliculares regulan o inhiben el transporte de sustratos a través de las conexiones del complejo cumulus oophorus-ovocito en el folículo completo y que su acción inhibitoria puede ser suprimida por las gonadotropinas. Sin embargo, debe tenerse en cuenta que el cumulus oophorus posee un efecto regulador sobre esta función del ovocito, ya que los

ovocitos aislados no tienen un mecanismo de transporte de aminoácidos estable (31).

Los resultados de Crosby y colaboradores (31), muestran que no sólo las células del cumulus oophorus participan en la determinación del patrón de proteínas sintetizado por el ovocito, sino que las células restantes del folículo también participan: en primer lugar, algunos ovocitos envueltos en su cúmulo son capaces de sintetizar proteínas sin estímulo hormonal, lo que hace suponer que las células del cumulus oophorus por sí solas no son capaces de inhibir por completo la síntesis de proteínas del ovocito; en segundo lugar, los cambios inducidos en este parámetro por el tratamiento con LH de complejos cumulus oophorus-ovocito son similares pero no idénticos a los encontrados en los folículos enteros.

2.6 SÍNTESIS DEL ÁCIDO RIBONUCLEICO (RNA).

En el ovocito en crecimiento, la síntesis de RNA es muy activa y disminuye drásticamente una vez que el ovocito adquiere su mayor tamaño y se inicia la formación del antro (107).

En este momento, el nucléolo del ovocito, originalmente de estructura finamente granular y vacuolada, se hace compacto y agranular (32,109). Estas modificaciones morfológicas y funcionales son requeridas para la adquisición de la capacidad meiótica del ovocito, pero no ocurren en todas las especies al mismo tiempo. En el ratón ocurre cuando el ovocito se hace plurilaminar (29); en el cerdo ocurre en los folículos antrales (32); en el humano se realiza sólo en los folículos antrales grandes (149).

Crozet y colaboradores (32), postularon que la alta velocidad de síntesis de Ácido Ribonucleico heteronuclear (hnRNA) y Ácido Ribonucleico ribosomal (rRNA) que desarrollan los folículos en el momento de formación del antro es necesaria para acumular la información requerida para la realización adecuada de la primera división meiótica. Es posible que la incapacidad para reanudar la maduración meiótica se deba a la ausencia de suficiente Ácido Ribonucleico mensajero (mRNA) que codifique la síntesis de las proteínas que se requieren (109).

Algunos autores sugieren que el efecto de las gonadotropinas en la inducción de la maduración del ovocito puede involucrar la síntesis de RNA, pero sólo bajo ciertas condiciones fisiológicas, ya que la mayoría de los inhibidores de la síntesis de RNA carecen de efecto sobre la maduración cuando los ovocitos están dentro del folículo. En ovocitos libres en metafase I o en estadio de cromosoma bivalente circular los inhibidores mencionados son capaces de evitar la maduración (66).

2.7 SINTESIS DEL ACIDO DESOXIRRIBONUCLEICO (DNA).

Aparentemente no se requiere de síntesis de DNA durante el proceso de maduración. Existen evidencias en anfibios que señalan una posible síntesis de DNA en el citoplasma probablemente de origen mitocondrial.

ENZIMAS LISOSOMALES.

3.1 ANTECEDENTES.

En la década de los cincuentas el estudio de las enzimas hidrolíticas entró en una nueva fase cuando de Duve y colaboradores sugirieron que la fosfatasa ácida y algunas otras enzimas estaban contenidas dentro de las partículas subcelulares llamadas lisosomas, las cuales no se activan hasta que la membrana es perturbada (33). Bitensky, L. (16), sugirió que los esteroides pueden estar involucrados en la modificación de la permeabilidad de la membrana lisosomal. Existe evidencia que los cambios en las concentraciones de fosfatasa ácida están relacionados con cambios en las concentraciones de hormonas esteroides circulantes. La fosfatasa ácida se detectó en el ovario y tejido folicular de varias especies de mamíferos, esta se forma en las células de la capa granulosa y su actividad aumenta cuando los folículos sufren atresia (74,121). También existe evidencia, que durante el cambio en la actividad esteroidogénica ovárica, la LH regula la síntesis de enzimas proteolíticas en la superficie epitelial de folículos preovulatorios; se sabe que dichas enzimas están involucradas en la desintegración de la pared apical del folículo (57).

Cajander y Bjersing (22), mostraron, en la coneja, una acumulación máxima de lisosomas en el epitelio apical de folículos preovulatorios 8 horas después de una dosis ovulatoria de Gonadotropina Coriónica Humana (hCG), los lisosomas desaparecen durante la última hora antes de la ruptura folicular y su contenido se libera extracelularmente (17,22).

Se reportó que, antes de la ovulación, las fibras de colágeno intercelulares disminuyen marcadamente y que al mismo tiempo los gránulos semejantes a los lisosomas aumentan en los fibroblastos de la túnica albugínea y en las células de la teca externa en la pared folicular (118). También demostraron que la actividad enzimática colagenolítica lisosomal aumenta en la pared apical cerca del momento de la ovulación (63).

La fosfatasa ácida esta involucrada en la degradación del folículo apical, antes de la inminente ovulación, y puede ser indicativa de un ovocito maduro (89), generalmente está localizada en los lisosomas y aparato de Golgi (58,63). Narimoto y colaboradores (111), demostraron que esta enzima está en todos los tipos de células de la pared folicular, su actividad es más intensa en la túnica albugínea y células de la teca antes de la ovulación, además de que no solamente

está localizada en los lisosomas y el aparato de Golgi de las células de la teca, sino también en la estructura multivesicular presente en los fibroblastos tecales de este tejido.

Durante el ciclo estral, los órganos reproductivos requieren hidrolasas lisosomales para asegurar la degradación intracelular de macromoléculas que acompañan la ovulación, proliferación y regresión endometrial, las proteínas y enzimas lisosomales siguen los cambios que sufre el útero con relación al peso y secreción uterina, por lo que el incremento en las enzimas y proteínas puede ser únicamente debido al incremento en peso uterino (124). En el útero y endometrio del borrego, la fosfatasa ácida, la fosfatasa alcalina y la β -glucuronidasa disminuyen después de la ovulación (163), estas actividades aumentan en la fase de metaestro y diestro de mamíferos con 4 días de ciclo estral (88,136), en la fase secretoria del útero humano (160,81), en el periodo de preimplantación del ratón (110) y después del tratamiento con progesterona en el hámster (79).

En hámsters hembras adultas que tienen ciclo estral normal, la administración de 30 UI de PMSG provoca superovulación, donde muchos de estos ovocitos pueden ser fertilizados (67). La PMSG y la hCG aumentan las hidrolasas lisosomales en los ovarios de la rata (39,141), así, el efecto de la PMSG y hCG sobre la ovulación, capacitación y fertilización es mediada vía ovario y probablemente por acción de las hidrolasas lisosomales, en términos bioquímicos cada cambio se acompaña de síntesis de proteínas y en particular de la acción de algunas enzimas específicas (159,116,147,120,163). Puesto que la ovulación es independiente del aumento de la presión intrafolicular (53, 125), varios investigadores han relacionado una enzima colagenolítica para el mecanismo de liberación del ovocito del folículo (54,55,56,91).

Por lo tanto, en la hipótesis del mecanismo enzimático para la ovulación, parece lógico considerar el papel de los lisosomas en los procesos de crecimiento y maduración folicular.

Los lisosomas se han relacionado con funciones importantes de la fisiología ovárica, incluyendo crecimiento y desarrollo ovárico (39,48), maduración folicular y atresia (93,59,156), regresión del cuerpo lúteo (9,41,138) y ovulación (21,108). Se ha demostrado que la LH y la hCG promueven la labilización de las enzimas lisosomales en relación a los valores basales (145,39,119), produciéndose un retraso en el aumento del número de lisosomas (48) e hidrolasas celulares totales (38). También son relacionados con el metabolismo de hormonas esteroides (48,49), en algunos aspectos de la acción gonadotrófica incluyendo crecimiento y desarrollo ovárico (39,48) y ruptura folicular (22).

3.2 PROPIEDADES FISICOQUIMICAS DE LAS ENZIMAS EN ESTUDIO.

La fosfatasa ácida (3.1.3.2) tiene un pH óptimo en la región de 5.3 a 5.6 para muchos sustratos, la hidrólisis de la fosfocolina de calcio tiene un pH óptimo de 6.5. El punto isoeléctrico es de pH = 4.4.

Cataliza la ruptura hidrolítica de ésteres fosfóricos a pH ácido.

La N-acetil- β -D-glucosaminidasa (3.2.1.30) es completamente estable si se almacena a 0°C por varios meses, no pierde actividad, aún cuando se halla congelado y descongelado o liofilizado. Se puede mantener a 37 °C por 24 horas a pH de 4.6 o 7.1 sin pérdida de su actividad, pero no a pH mayores. Dos formas de la enzima son detectables por electroforesis en gel de poliacrilamida y enfoque isoeléctrico. La banda mayor tiene un peso molecular de 118,000 daltones y la banda menor un peso molecular de 158,000 daltones. La primera enzima tiene un punto isoeléctrico de 6.45 y la última de 6.86. La preparación pura tiene actividad específica tan alta como la reportada más activa incluyendo la enzima de harina de frijol.

Actúa en la degradación de productos del ácido hialurónico cortando los residuos terminales N-acetil- β -D-glucosaminidos no reducibles.

La aril-sulfatasa (3.1.6.1.) pura migra como una sola banda sobre geles de poliacrilamida a pH = 8.9 y 2.9, tiene un peso molecular aproximado de 110,000 daltones. La composición de aminoácidos no revela alguna característica inusual, excepto por el alto contenido de prolina, el pH óptimo de la enzima es de 4.75.

Es capaz de hidrolizar ciertos ésteres sulfúricos orgánicos y se estudia por la determinación de uno de sus productos de hidrólisis liberado: ácido sulfúrico o la parte orgánica

ASPECTOS IMPORTANTES DEL MATERIAL BIOLÓGICO.

4.1 INTERACCIÓN DE FACTORES AMBIENTALES

En las zonas tropicales de México y América Central, tanto las cabras como las ovejas ovulan todo el año, se sabe que la altitud tiene influencia directa sobre la ovulación y que la temperatura juega un papel preponderante en interacción con la altitud, de ahí que existe una relación estrecha de estos factores ambientales.

Los factores favorables que intervienen para la presentación del celo en otoño son: días cortos, descenso de temperatura y modificación de la luz, así como cambio en el estado de vegetación, del verde fresco al seco, también influyen en la presentación del celo: la raza, el clima -la estación de lluvias esta íntimamente ligado a los periodos

sexuales- latitud, estado de salud y sistema de explotación, así como la característica individual.

4.2 CARACTERISTICAS DEL CICLO ESTRAL DE LA CABRA.

El ciclo estral de la cabra consta de 5 fases: proestro, estro, metaestro, diestro y anestro (1).

a). - Proestro.

En esta fase los folículos están en crecimiento, con un diámetro promedio de 0.5-2.0 mm. Las concentraciones plasmáticas de FSH son altas respecto a la fase de diestro mientras que los estrógenos son bajas. Hay engrosamiento de la pared vaginal y aumento en la vascularización de la mucosa uterina, por otro lado, la vulva y la vagina se congestionan. La duración de la fase es de entre 30-60 horas y no hay signos exteriores de cambios, con excepción de los cambios vaginales iniciales con producción de mucosidad clara.

b). - Estro.

Durante esta fase se efectúa la maduración y ruptura de los folículos de De Graff. Las concentraciones plasmáticas de estrógenos aumentan. Las cabras presentan las manifestaciones del celo que las impulsa a realizar el acto del coito, ya que manifiestan y aceptan al macho. Esta fase del ciclo tiene una duración de entre 30-60 horas. Puede tener una variación de 2-3 días con un promedio de 2.5 días. El útero se prepara para recibir al óvulo y al espermatozoide.

c). - Metaestro.

En esta fase se lleva a cabo el crecimiento del cuerpo lúteo el cual produce progesterona en altas concentraciones lo que evita la formación de otros folículos. Hay descamación del epitelio vaginal con alguna destrucción del endometrio. Es la etapa en la cual se lleva a cabo la implantación del óvulo fecundado y nutrición de este durante la primera mitad de la preñez, se efectúa el desarrollo de la glándula mamaria. La imagen vaginal microscópica esta caracterizada por la presencia de algunos tímpanos que restan de la fase anterior así como células epiteliales nucleadas abundantes y gran profusión de leucocitos.

d). - Diestro.

Es la etapa más larga del ciclo estral, en esta fase el cuerpo lúteo se encuentra maduro y produce altas cantidades de progesterona. Hay crecimiento rápido y persistente de las glándulas y mucosas uterinas, seguido de su involución. Se llevan a cabo cambios marcados en el útero para la implantación del huevo con producción de "leche uterina muy densa". Si se presenta la preñez esta etapa persiste a lo largo de la gestación, si no la hay se presenta una involución gradual del cuerpo lúteo y la hipófisis produce FSH repitiéndose una vez más el ciclo. La imagen vaginal

microscópica muestra una gran cantidad de leucocitos, abundante mucina y escasa cantidad de células epiteliales.

e).- Anaestro.

Es la fase de inactividad del ovario, de todo el aparato reproductor femenino y quietud fisiológica para todos los órganos reproductivos, la cual dura hasta la siguiente estación reproductiva de entre 5-6 meses. En este estadio, en el ovario, faltan por completo folículos en vía de maduración así como cuerpos lúteos.

PLANTAMIENTO DEL PROBLEMA.

Los lisosomas participan en algunos aspectos del crecimiento y desarrollo ovárico (39,48) y ruptura folicular (22). La LH y la hCG, en común con otras hormonas peptídicas, están en parte internalizadas en su célula blanco donde se acumulan en los lisosomas. Este mecanismo contribuye a la degradación del complejo Hormona-Receptor y a la regulación de la acción hormonal (146).

Para entender mejor algunos de los cambios bioquímicos básicos que acompañan a la maduración folicular, consideramos importante correlacionar la presencia y cantidad de estas actividades -libres y unidas de algunas enzimas lisosomales en los diferentes compartimentos que constituye el folículo en crecimiento- con el proceso de maduración folicular.

HIPOTESIS DE TRABAJO.

La presencia y concentración de las enzimas lisosomales libres o unidas están relacionadas con el mecanismo de liberación del ovocito del folículo y juegan un papel regulador en los procesos de crecimiento y maduración folicular.

OBJETIVO.

Cuantificar las actividades de las tres enzimas lisosomales: Fosfatasa ácida, N-acetil- β -D-glucosaminidasa y aril-sulfatasa, por métodos fluorométricos, con ayuda de la 4-metil-umbeliferona, durante la maduración folicular de la cabra en folículos sanos.

MATERIAL Y METODOS.

B.1 OBTENCION DEL MATERIAL BIOLÓGICO.

Se obtuvieron ovarios de cabra criollas, adultas, no gestantes, del rastro de Milpa Alta, D. F., procedentes de explotaciones con empadre continuo (época en que hay cruce de animales y condiciones de manejo muy similares). La zona caprina se encuentra ubicada en el Municipio de San Luis Acatlán, Guerrero a 16° 45' LS y 98° 45' LO, con clima tropical semihúmedo y lluvias en verano (AW 1), altitud de 375 m (s.n.m.), temperatura de 26 °C y precipitación media de 976 mm.

Con base en estudios previamente realizados por Avendaño y colaboradores (1984) con animales de esta zona, la época en la que los animales presentan su mejor momento reproductivo, en términos de incidencia de estros y tasa ovulatoria, es el que comprende los meses de Septiembre a Diciembre, por tal motivo, las muestras se obtuvieron en este periodo.

Las muestras se obtuvieron aproximadamente 15 minutos después de la evisceración de los animales, fueron transportadas al laboratorio en solución salina al 0.15 M a 4 °C, -El tiempo de transporte nunca excedió de 60 minutos-.

B.2 SEPARACION Y CLASIFICACION DE LOS FOLICULOS.

Los folículos antrales se disecaron y separaron por su tamaño y diámetro en tres grupos: menores de 3 mm, entre 3 y 6 mm y mayores de 6 mm, esto se realizó utilizando una regla con escala graduada con intervalos de 1 mm.

Puesto que los folículos menores de 3 mm generalmente son sanos (68), se usaron sin caracterización adicional. Los folículos entre 3 y 6 mm y mayores de 6 mm, se disecaron cuidadosamente para dejarlos libres de tejido estromal y se estudiaron individualmente bajo un microscopio estereoscópico (Magnificación X 120) y clasificarlos de acuerdo a su grado de atresia siguiendo el método de Moor y colaboradores (103) y modificado para cabras por Rosales y colaboradores (127). Los folículos utilizados para este estudio fueron los que estaban sanos y que mostraban las siguientes características: apariencia brillante, translúcida y uniforme, vascularización extensa y una capa de células de granulosa regular.

B.3 OBTENCION DE LOS DIFERENTES COMPARTIMENTOS.

Los líquidos de todos los folículos se colectaron por punción con una aguja calibre 22. Se tuvo precaución para

evitar la contaminación del líquido folicular con sangre, no obstante, se cuantificó la hemoglobina por el método de la benzidina, de tal manera que los líquidos foliculares con más de 25 µg de hemoglobina por ml se consideraron contaminados y no se incluyeron en el estudio (127). El líquido se colectó en forma individual en tubos pequeños de polietileno para centrifuga mantenidos en hielo, se centrifugaron a 3500g por 10 minutos para separar las células de la capa granulosa, el líquido sobrenadante se recentrifugó a 12000g. por 20 minutos. El precipitado de la primera centrifugación se resuspendió en sacarosa 0.25 M (4°C) -ajustada a un pH de 7.4 por la adición de pequeñas cantidades de trietanolamina-, se recentrifugó a 3500g por 10 minutos y el precipitado de células de la capa granulosa libre de líquido folicular se homogeneizó con sacarosa. 0.25 M (4°C) en un homogeneizador Potter-Elvehjem (Vidrio-Teflón) fijo a un motor eléctrico.

El saco folicular vacío se lavó con sacarosa 0.25 M (4°C) para eliminar las células de la capa granulosa restantes del tejido fibroso y se homogeneizó en 1 ml de la solución de sacarosa fría 0.25 M, se consideró a este tejido homogeneizado representativo del tejido tecal total.

Los homogeneizados se centrifugaron a 35,000g por 30 minutos a (4°C) en una centrifuga refrigerada Sorvall IEC B-204, el sobrenadante se recentrifugó en la misma forma. Este último sobrenadante se consideró que contenía la actividad de enzimas lisosomales libres ó recién salidas de los lisosomas labilizados del citoplasma del tejido original. El precipitado se resuspendió en amortiguador de acetatos 0.1 M pH = 4.5 que contenía 0.1 % de bromuro de cetil-trimetilamonio (CTAB), se rehomonizó é incubó 30 minutos a temperatura ambiente (Ver Esquema de Trabajo). Este procedimiento produce rompimiento y solubilización parcial de la membrana lisosomal (95), lo que libera las actividades lisosomales internas y unidas a la membrana de las enzimas lisosomales (126), (Reactivos en apéndice).

8.4 PROCEDIMIENTOS ANALITICOS.

8.4.1 CUANTIFICACION DE PROTEINAS.

La concentración de PROTEINAS se midió por el método de Lowry y colaboradores (94), modificado por la incorporación del tartrato de sodio y potasio a la solución alcalina. Las determinaciones se realizaron en líquido folicular, homogeneizados de paquete y saco folicular, usando albúmina sérica bovina como estándar, (Reactivos y preparación en apéndice).

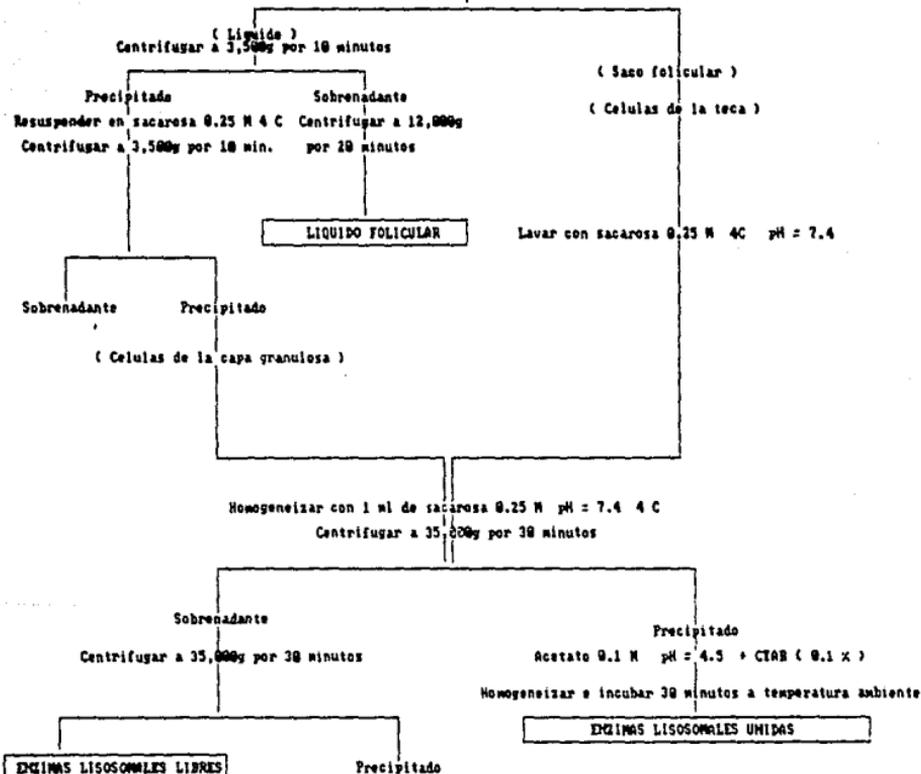
Método:

Se utilizaron alícuotas de 10-50 µl de líquido folicular a intervalos de 10µl para determinar el volumen apropiado para medir la concentración de proteínas, para los

ESQUEMA DE TRABAJO

FOLICULOS

Puncion con aguja calibre No 22



homogeneizados de paquete y saco folicular se usaron alícuotas de 50 μ l.

Para realizar la determinación de proteínas en el líquido folicular, fue necesario diluir la muestra 20 veces dada su alta concentración. Las muestras se llevaron a 0.4 ml con agua destilada y posteriormente se agregaron 2.0 ml de la solución 3, se dejaron reposar 10 minutos y se les agregó 100 μ l de la solución 4, después de 20 minutos de reposo a temperatura ambiente, las mezclas de reacción se leyeron en un espectrofotómetro Coleman Jr. a 550 nm.

8.4.2 CUANTIFICACION DE HEMOGLOBINA.

La HEMOGLOBINA, en el líquido folicular, se cuantificó por el método de la benzidina (30) para evaluar el grado de infiltración sanguínea, (Reactivos y preparación en apéndice).

Método:

Se tomaron alícuotas de 20 μ l de líquido folicular y se llevaron a 50 μ l con agua destilada, posteriormente se les agregó 100 μ l de benzidina al 1 % en ácido acético al 90 % más 100 μ l de H₂O₂ al 1%, después de mezclar el contenido de los tubos se dejaron reposar a temperatura ambiente durante 20 minutos, al término de este tiempo se les agregó 1 ml de ácido acético al 10 % volviéndose a mezclar, se dejaron en reposo a temperatura ambiente 10 minutos y se procedió a leer las mezclas en un espectrofotómetro Coleman Jr. a 515 nm.

8.4.3 CUANTIFICACION DE LAS ACTIVIDADES ENZIMATICAS.

Las Actividades Enzimáticas se midieron fluorométricamente siguiendo la metodología descrita por Rosado y col., (126), por la liberación enzimática de un derivado específico de la 4-metil-umbeliferona. El sustrato se libera bajo la influencia de la enzima lisosomal apropiada, la actividad de las enzimas lisosomales libera 4-metil-umbeliferona, la cual produce una fluorescencia intensa con un punto máximo de emisión a 448 nm cuando se ha excitado a 360 nm en un medio alcalino (pH = 9.5).

Fosfatasa Acida. (E.C.3.1.3.2.).

Método:

20 μ l de cada una de las fracciones se incubaron con 100 μ l de 4-metil-umbeliferil-fosfato 5 mM (Sigma M 8883) y 500 μ l de amortiguador de acetatos 100 mM, pH = 4.8 por 30 minutos a 37°C, las reacciones se detienen con 2.380 ml de amortiguador glicina-NaOH 1.0 M, pH = 10.5 y la 4-metil-umbeliferona liberada se midió fluorométricamente.

N-Acetil- β -D-Glucosaminidasa (E.C.3.2.1.3.0.).

Método:

20 μ l de cada una de las fracciones se incubaron con 100 μ l de 4-metil-umbeliferil-N- β -D-glucosaminido 5 mM (Sigma M 2133) y 500 μ l de amortiguador de citratos 100 mM pH = 5.0 por 30 minutos a 37°C, las reacciones se detienen con 2.380 ml de amortiguador glicina-NaOH 1.0 M, pH = 10.5 y la 4-metil-umbeliferona liberada se midió fluorométricamente.

Aril-Sulfatasa. (E.C.3.1.6.1.).

Método:

De 40-60 μ l de cada una de las fracciones se incubaron con 100 μ l de 4-metil-umbeliferil-sulfato 5 mM (Sigma M 7133) y 500 μ l de amortiguador de acetatos 100 mM pH = 4.8 por 60 minutos a 37°C, las reacciones se detienen con 2.340-2.360 ml de amortiguador glicina-NaOH 1.0 M, pH = 10.5 y la 4-metil-umbeliferona liberada se midió fluorométricamente.

Para la cuantificación de la 4-metil-umbeliferona se hizo un blanco sustituyendo la enzima con sacarosa 0.25 M. La curva de calibración (ver Curva "C" en apéndice), se realizó a partir de una solución de 4-metil-umbeliferona (1 μ M), se tomaron alícuotas de 50 a 300 μ l/sistema, se procesó y se leyó en las mismas condiciones que los problemas. Para asegurar la linealidad cinética todas las condiciones se estudiaron previamente y todas las reacciones se corrieron por duplicado usando dos diferentes cantidades de soluciones enzimáticas. Todos los casos en los cuales la duplicación no se observó se repitieron bajo condiciones adecuadas. Las mediciones se realizaron en un Espectrofluorómetro Perkin-Elmer MPF-3.

B.4.4 ANALISIS ESTADISTICO.

El análisis estadístico se realizó con ayuda de la prueba t de Student para muestras no apareadas comparadas con el tamaño previo y con un nivel de significancia por lo menos de (P < 0.01) para las enzimas en el líquido folicular y un nivel de significancia de (P < 0.05) para el resto de las cuantificaciones.

RESULTADOS.

9.1 ENZIMAS LISOSOMALES Y PROTEINAS EN EL LIQUIDO FOLICULAR.

La actividad específica promedio de las tres enzimas lisosomales en el líquido folicular sano disminuyó conforme aumentó el tamaño del folículo (Tabla 1; Fig. 1). Esta disminución fue lineal en el caso de la fosfatasa ácida ($r = 0.98$), mientras que en la aril-sulfatasa y la N-acetil- β -D-glucosaminidasa la actividad específica disminuyó principalmente durante la fase inicial del crecimiento. La actividad específica de la fosfatasa ácida y la N-acetil- β -D-glucosaminidasa fueron casi semejantes, mientras que la actividad de la aril-sulfatasa fue casi diez veces menor.

La concentración de proteínas, en el líquido folicular sano, aumentó conforme aumentó el tamaño del folículo, aunque éste comportamiento no es significativo (Fig. 2).

9.2 ENZIMAS LISOSOMALES Y PROTEINAS EN LAS CELULAS DE LA CAPA GRANULOSA.

La actividad específica promedio de las fracciones libre y unida de la fosfatasa ácida en las células de la capa granulosa en folículos sanos disminuyó linealmente conforme aumentó el tamaño del folículo ($r = 0.97$; $r = 0.98$) respectivamente (Tabla 3; Fig. 3). La actividad específica unida fue casi dos veces mayor que la actividad específica libre.

La actividad específica promedio de la fracción libre de la N-acetil- β -D-glucosaminidasa en las células de la capa granulosa en los folículos sanos disminuyó conforme aumentó el tamaño del folículo ($r = 0.99$). En la fracción unida la disminución fue drástica para los folículos entre 3-6mm (Fig. 4).

La actividad específica promedio de la aril-sulfatasa en la fracción libre de las células de la capa granulosa de los folículos sanos no mostró cambios significativos, mientras que en la fracción unida la actividad específica aumentó conforme aumentó el tamaño del folículo mostrando cambios significativos con una linealidad de ($r = 0.97$) (Fig. 5).

No se observó ninguna diferencia significativa en la concentración de proteínas, en todos los tamaños estudiados, en las células de la capa granulosa de folículos sanos (Fig. 6).

9.3 ENZIMAS LISOSOMALES Y PROTEINAS EN LAS CELULAS DE LA TECA.

La actividad específica libre promedio de la fosfatasa ácida en las células de la teca de folículos sanos aumentó conforme aumentó el tamaño del folículo ($r = 0.96$). Se observó una diferencia significativa en los folículos entre 3-6 mm, mientras que la actividad específica unida promedio disminuyó drásticamente en los folículos mayores de 3 mm y

después aumentó en los folículos mayores de 6 mm en la que se observó una diferencia significativa (Fig. 7)

La actividad específica promedio de las fracciones libre y unida de la N-acetil- β -D-glucosaminidasa en las células de la teca de folículos sanos mayores de 3 mm disminuyó drásticamente en las dos fracciones. En los folículos más grandes la actividad de la enzima aumentó (Fig. 8).

La actividad específica promedio de la fracción libre de la aril-sulfatasa en las células de la teca de los folículos sanos aumentó de manera significativa en los folículos mayores de 6 mm, mientras que la actividad específica en la fracción unida en los folículos menores de 3 mm fue menor y aumentó de manera significativa en los folículos mayores (Fig. 9).

No se observó ninguna diferencia significativa en la concentración de proteínas, en todos los tamaños estudiados, en las células de la capa granulosa de folículos sanos (Fig. 10).

9.4 OBSERVACIONES EN GENERAL.

La concentración de proteínas en las células de la teca (tanto en la fracción libre como en la fracción unida) tiende a ser mayor, aunque no de manera significativa, cuando se comparó con las células de la capa granulosa.

La concentración de proteínas de las fracciones unidas, tanto en las células de la capa granulosa como en las células de la teca, siempre fueron menores que las fracciones libres. (Tabla 2).

En la tabla 3 se muestra el resumen de los datos obtenidos.

Se puede observar que las actividades específicas de la fosfatasa ácida y de la N-acetil- β -D-glucosaminidasa son mayores en las células de la teca que en las células de la capa granulosa. En las células de la capa granulosa fracción libre, estas actividades disminuyen conforme aumenta el tamaño del folículo. En la fosfatasa ácida fracción unida, se observa un cambio significativo en los folículos mayores de 6 mm, mientras que en la N-acetil- β -D-glucosaminidasa se observa un drástico cambio en los folículos entre 3-6 mm. En las células de la teca disminuye la actividad en los folículos entre 3-6 mm y aumenta en los folículos mayores a este intervalo, con excepción de la fosfatasa ácida fracción libre, la cual aumenta conforme aumenta el tamaño del folículo.

La concentración de la aril-sulfatasa en la fracción libre de las células de la teca fue mayor que la concentración de la fracción libre de las células de la capa granulosa, por otro lado, la concentración de la aril-sulfatasa fue casi 6 veces mayor en la fracción unida de las células de la capa granulosa cuando se comparó con la fracción unida de las células de la teca.

El comportamiento de la aril-sulfatasa es totalmente diferente a la otras enzimas, ya que prácticamente esta

ausente en las células de la teca, aumenta más de dos veces en de las células de la capa granulosa fracción unida conforme aumenta el tamaño del folículo. La actividad en las células de la capa granulosa fracción libre fue prácticamente cero, con actividad 10 veces menor que la actividad de la fracción unida. Ninguna modificación importante de esta actividad enzimática se observó en las células de la teca.

La actividad específica promedio de la fosfatasa ácida y la N-acetil- β -D-glucosaminidasa en las fracciones libre y unida de las células de la capa granulosa disminuyó conforme aumentó el tamaño del folículo, esta disminución fue lineal en el caso de la fosfatasa ácida fracción libre y unida la N-acetil- β -D-glucosaminidasa fracción libre, mientras que la N-acetil- β -D-glucosaminidasa fracción unida disminuyó principalmente durante la fase inicial del crecimiento folicular.

En general, la actividad específica de la fosfatasa ácida, tanto libre como unida, en los dos tipos celulares, fue menor que la actividad específica de la N-acetil- β -D-glucosaminidasa.

TABLA 1.- MEDIA Y E.E.M. DE LA ACTIVIDAD PARCIAL DE TRES ENZIMAS LISOSOMALES EN EL LIQUIDO FOLICULAR DE FOLICULOS DE CABRA DURANTE SU MADURACION.

Tamaño del folículo mm.	LIQUIDO FOLICULAR µg/mg de proteína/hora de 4-metil-umbeliferona
FOSFATASA ACIDA.	
< 3	4.6 + 0.7
3-6	2.8 + 0.3 *
> 6	1.9 + 0.1 *
	r = 0.98
	EEM=3.97
N-ACETIL-β-D-GLUCOSAMINIDASA.	
< 3	5.6 + 0.9
3-6	1.6 + 0.3 *
> 6	1.3 + 0.4
	r = 0.90
	EEM=158.4
ARIL-SULFATASA.	
< 3	0.66 + 0.1
3-6	0.33 + 0.1 *
> 6	0.25 + 0.1
	r = 0.94
	EEM=10.2

r = coeficiente de correlación.

EEM = Error estándar.

* = (P < 0.01) comparado con el tamaño previo (Prueba t de Student para muestras no apareadas).

TABLA 2.- MEDIA Y E.E.M. DE LA CONCENTRACION DE PROTEINAS EN LOS DIFERENTES COMPARTIMENTOS DE LOS FOLICULOS DE LA CABRA DURANTE SU MADURACION.

	COMPARTIMENTO	FRACCION	CONCENTRACION mg/ml
> 3 mm.	Células de la capa granulosa	Libre	4.73 + 1.15
		Unida	2.54 + 0.64
	Células de la teca	Libre	6.11 + 1.79
		Unida	2.94 + 0.48
	Líquido folicular		63.0 + 12.54
3-6 mm.	Células de la capa granulosa	Libre	3.98 + 1.66
		Unida	2.89 + 1.67
	Células de la teca	Libre	5.24 + 1.3
		Unida	3.34 + 1.05
	Líquido folicular		69.1 + 15.80
> 6 mm.	Células de la capa granulosa	Libre	4.47 + 1.58
		Unida	2.36 + 0.59
	Células de la teca	Libre	5.78 + 1.38
		Unida	2.70 + 0.45
	Líquido folicular		74.35 + 12.74

TABLA 3.-COMPARTAMENTALIZACION, MEDIA Y E.E.M. DE LA ACTIVIDAD PARCIAL DE TRES ENZIMAS LISOSOMALES EN LOS FOLICULOS DE LA CABRA DURANTE SU MADURACION.

Tamaño del folículo mm	Células de la capa granulosa		Células de la teca.	
	LIBRE	UNIDA	LIBRE	UNIDA
FOSFATASA ACIDA.				
< 3	9.8 + 1.3	18.6 + 5.5	25.8 + 3.3	46.9 + 3.3
3-6	6.6 + 0.5 *	15.8 + 0.8	36.2 + 6.0 *	19.0 + 2.0 *
> 6	5.4 + 0.6 *	9.4 + 1.5 *	39.8 + 4.0	32.1 + 2.3 *
	r = 0.97	r = 0.98	r = 0.96	r = 0.53
	EEM=16.3	EEM=66.9	EEM=13.0	EEM=126.5
N-ACETIL-β-D-GLUCOSAMINIDASA.				
< 3	19.7 + 3.5	51.5 + 17	106 + 7.0	120 + 26
3-6	13.7 + 0.7 *	12.0 + 2.3 *	33.1 + 4.0 *	22 + 5.6 *
> 6	8.4 + 1.1 *	11.7 + 3.0	42.8 + 5.0 *	53 + 4.5 *
	r = 0.99	r = 0.87	r = 0.80	r = 0.67
	EEM=2.8	EEM=160.0	EEM=33.4	EEM=52.6
ARIL-SULFATASA.				
< 3	0.58 + 0.1	6.0 + 0.5	1.5 + 0.4	1.0 + 0.2
3-6	0.74 + 0.1	12.0 + 0.3 *	1.3 + 0.2	2.3 + 0.6 *
> 6	0.62 + 0.1	14.3 + 0.7 *	2.2 + 0.2 *	1.9 + 0.3
	r = 0.24	r = 0.97	r = 0.74	r = 0.22
	EEM=11.4	EEM=1.6	EEM=43.3	EEM=191.0

r = coeficiente de correlacion.

EEM = Error estandar.

* = (P < 0.05) comparado con el tamaño previo (Prueba t de Student para muestras no apareadas).

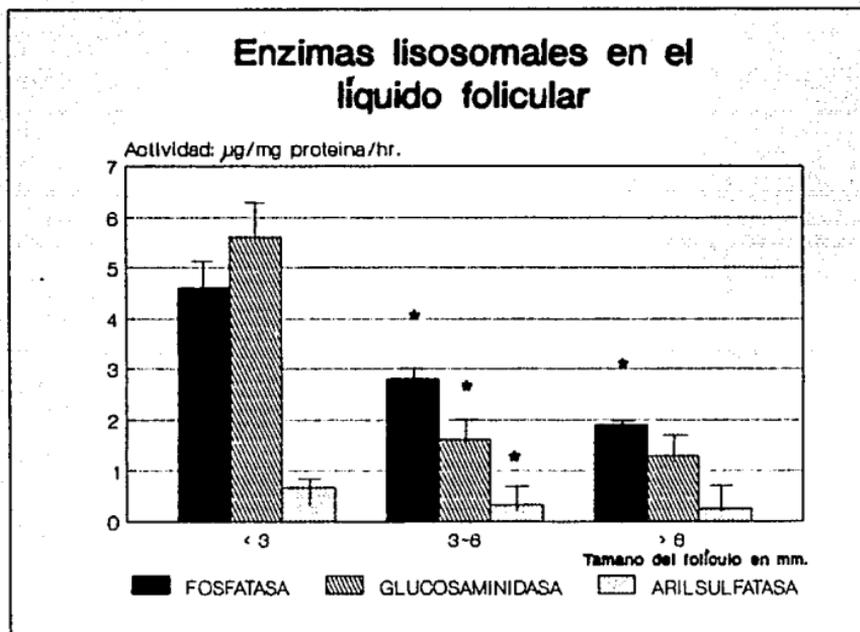


Figura 1.- Cambios en la actividad específica de las enzimas lisosomales, en el líquido folicular sano, durante la fase inicial del crecimiento folicular. Los valores representan el valor promedio \pm DS de cuando menos cuatro experimentos.

* = ($p < 0.01$) comparado con el tamaño previo (Prueba "t" de Student para muestras no apareadas).

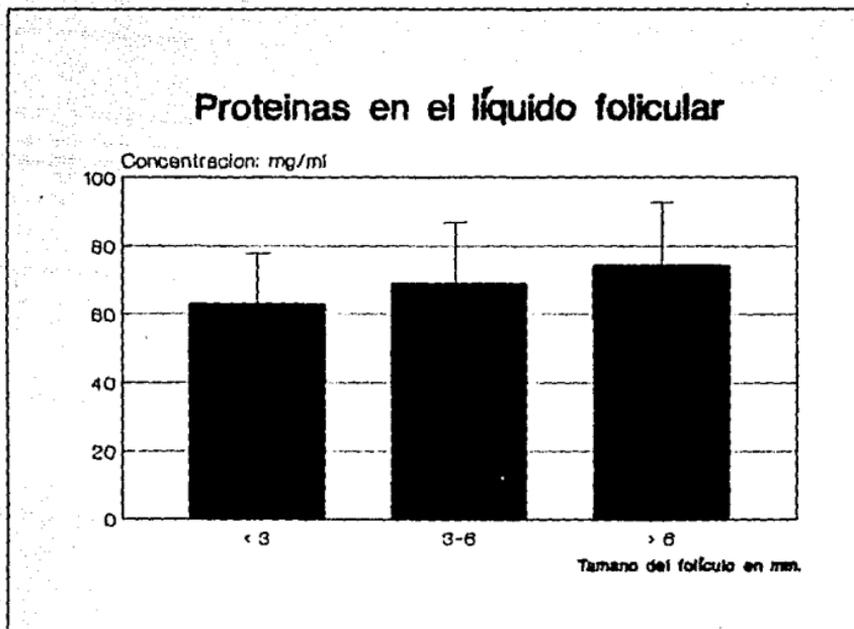
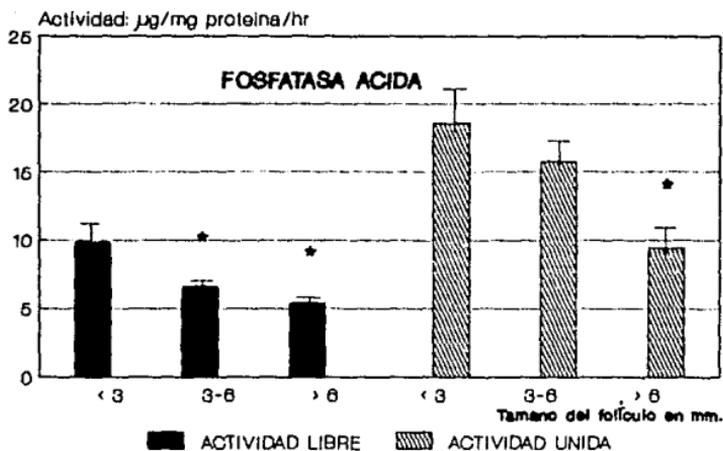


Figura 2.- Cambios en la concentración proteínica, en el líquido folicular sano, durante la fase inicial del crecimiento folicular. Los valores representan el promedio + DS de cuando menos cuatro experimentos.

* = ($p < 0.05$) comparado con el tamaño previo (Prueba "t" de Student para muestras no apareadas).

Actividad específica parcial en células de la capa granulosa.

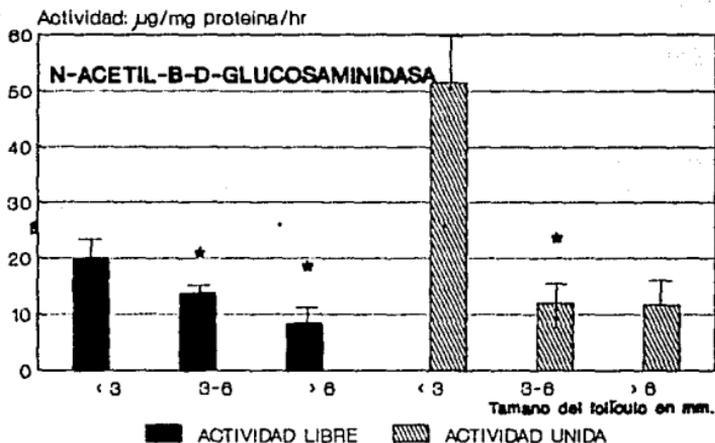


ACTIVIDAD LISOSOMAL LIBRE Y UNIDA

Figura 3.- Cambios de la fosfatasa ácida en las células de la capa granulosa de folículos sanos durante la fase inicial del crecimiento folicular. Los valores representan el promedio \pm DS de cuando menos cuatro experimentos.

* = ($p < 0.05$) comparado con el tamaño previo (Prueba "t" de Student para muestras no apareadas).

Actividad específica parcial en células de la capa granulosa

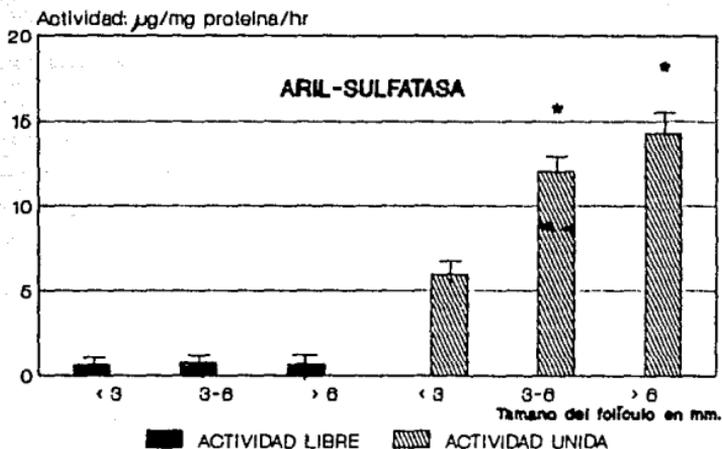


ACTIVIDAD LISOSOMAL LIBRE Y UNIDA

Figura 4.- Cambios de la N-acetil- β -D-glucosaminidasa en las células de la capa granulosa de folículos sanos durante la fase inicial del crecimiento folicular. Los valores representan el promedio \pm DS de cuando menos cuatro experimentos.

* = ($p < 0.05$) comparado con el tamaño previo (Prueba "t" de Student para muestras no apareadas).

Actividad específica parcial en células de la capa granulosa



ACTIVIDAD LISOSOMAL LIBRE Y UNIDA

Figura 5.- Cambios de la aril-sulfatasa en las células de la capa granulosa de folículos sanos durante la fase inicial del crecimiento folicular. Los valores representan el promedio \pm DS de cuando menos cuatro experimentos. * = ($p < 0.05$) comparado con el tamaño previo (Prueba "t" de Student para muestras no apareadas).

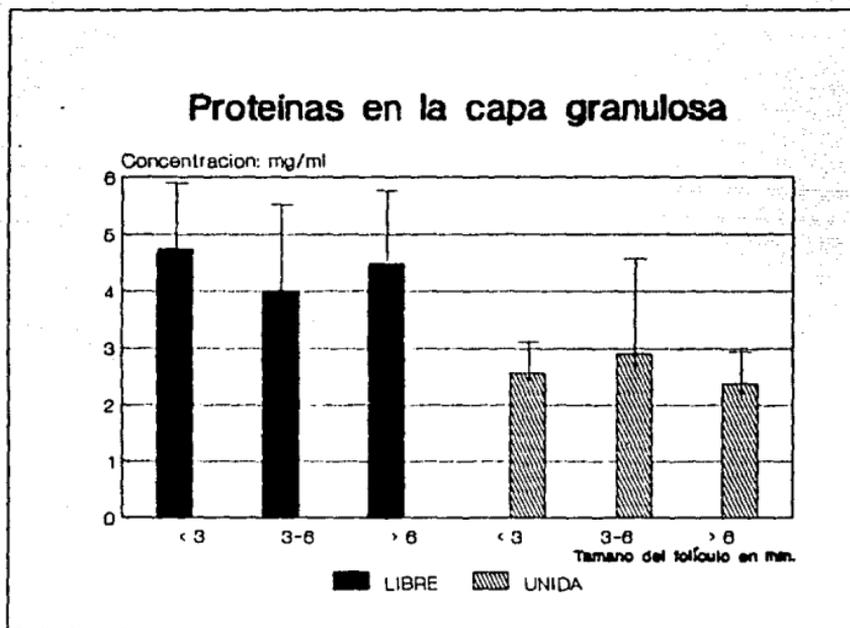


Figura 6.- Cambios en la concentración proteínica libre y unida en las células de la capa granulosa de folículos sanos durante la fase inicial del crecimiento folicular. Los valores representan el promedio + DS de cuando menos cuatro experimentos.

* = ($p < 0.05$) comparado con el tamaño previo (Prueba "t" de Student para muestras no apareadas).

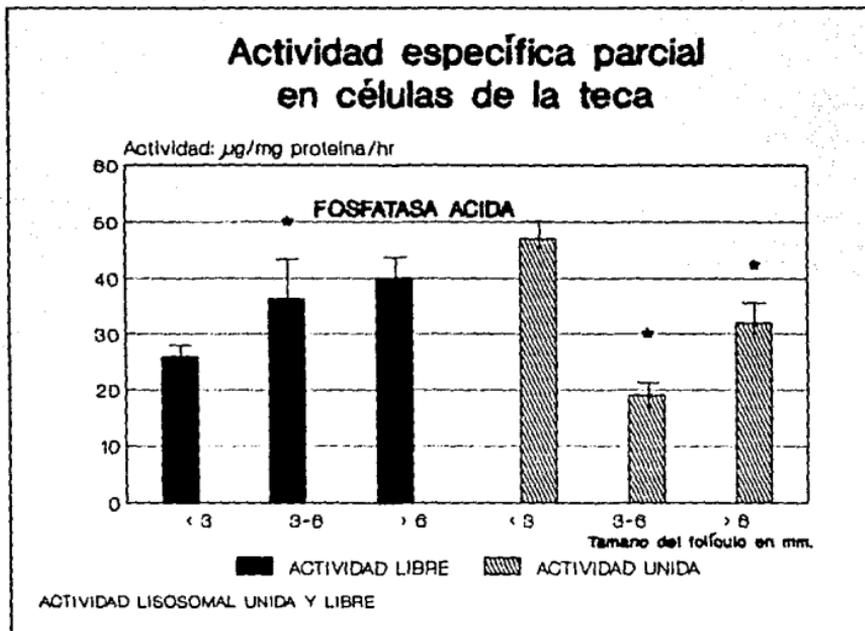


Figura 7.- Cambios de la fosfatasa ácida en las células de la teca de folículos sanos durante la fase inicial del crecimiento folicular. Los valores representan el promedio \pm DS de cuando menos cuatro experimentos. * = ($p < 0.05$) comparado con el tamaño previo (Prueba "t" de Student para muestras no apareadas).

Actividad específica parcial en células de la teca

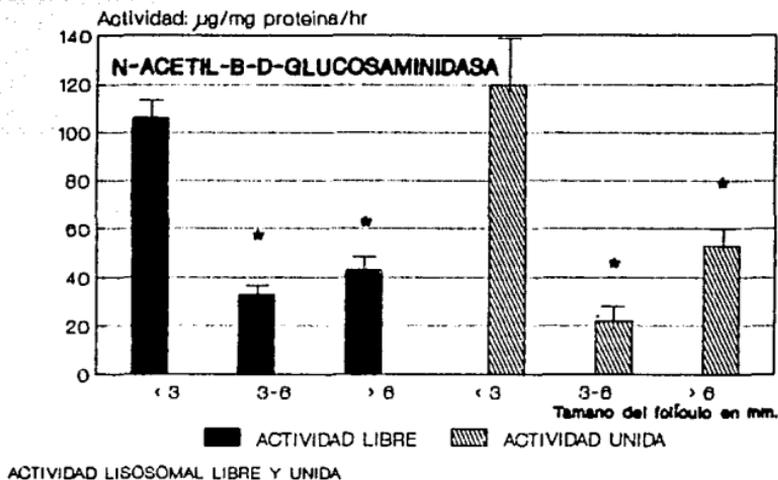


Figura 8.- Cambios de la N-acetil- β -D-glucosaminidasa en las células de la teca de folículos sanos durante la fase inicial del crecimiento folicular. Los valores representan el promedio \pm DS de cuando menos cuatro experimentos. * = ($p < 0.05$) comparado con el tamaño previo (Prueba "t" de Student para muestras no apareadas).

Actividad específica parcial en células de la teca

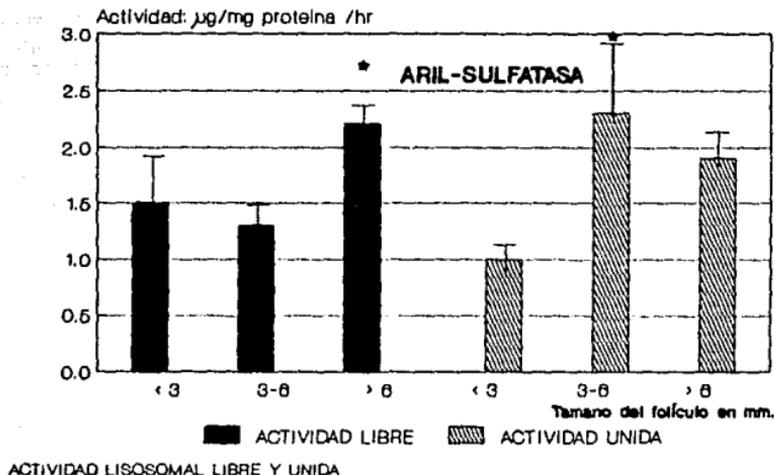


Figura 9.- Cambios de la aril-sulfatasa en las células de la teca de folículos sanos durante la fase inicial del crecimiento folicular. Los valores representan el promedio \pm DS de cuando menos cuatro experimentos.

* = ($p < 0.05$) comparado con el tamaño previo (Prueba "t" de Student para muestras no apareadas).

Proteínas en células de la teca

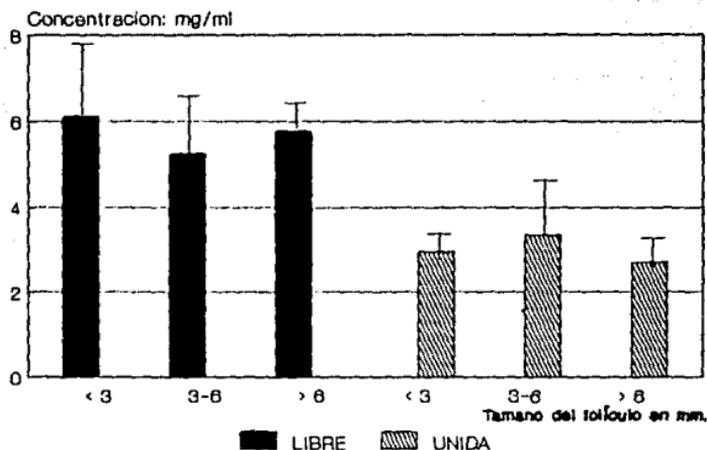


Figura 10.- Cambios en la concentración proteínica, libre y unida, en las células de la teca de folículos sanos durante la fase inicial del crecimiento folicular. Los valores representan el promedio + DS de cuando menos cuatro experimentos.

* = ($p < 0.05$) comparado con el tamaño previo (Prueba "t" de Student para muestras no apareadas).

DISCUSION.

El ovario de los mamíferos adultos es un sistema morfogenético altamente especializado, del cual algunas de sus unidades funcionales, los folículos de De Graaf, se encuentran en diferentes estadios de citomorfosis. Al igual que en otros sistemas morfogenéticos el proceso de diferenciación en el ovario se acompaña del fenómeno de regresión o de degradación. Como han sugerido De Duve y Wattiaux (34), De Duve (33) y Novikoff (114), algunos aspectos de la autólisis celular es mediada por la función de un grupo de estructuras subcelulares rodeadas de membranas ricas en hidrolasas ácidas denominadas lisosomas.

En este trabajo se muestra los resultados obtenidos por la determinación de tres enzimas lisosomales durante la maduración folicular.

De los resultados podemos observar que dos de las enzimas lisosomales, la fosfatasa ácida y la N-acetil- β -D-glucosaminidasa, están presentes en los diferentes compartimentos de los folículos estudiados. Estas actividades son más intensas en las células de la teca que en las células de la capa granulosa, y en general, se observa un comportamiento similar durante el crecimiento y maduración folicular. Por el contrario, la aril-sulfatasa estuvo presente sólo en las células de la capa granulosa y su comportamiento es característico durante el crecimiento folicular.

El viejo concepto de los lisosomas como "Saco Suicida" (34), en el sentido de considerar al sistema lisosomal como un factor importante en los procesos patológicos que llevan inevitablemente a la muerte celular, por autólisis, ha evolucionado a un nuevo concepto completamente diferente, que une la función lisosomal con la regulación de algunos procesos importantes en la economía metabólica normal (42,146). Este cambio conceptual se debe principalmente a la reciente evidencia la cual muestra que los viejos conceptos que indicaban la uniformidad de las partículas lisosomales y apuntaban hacia un proceso de todo o nada para la ruptura de la membrana lisosomal, y que finalmente llevaba a la liberación explosiva de su contenido enzimático (34), deben ser cambiados por dos nuevos conceptos. En primer lugar, ahora se sabe que la activación de la membrana lisosomal puede ir desde un vaciamiento lento de los lisosomas estructuralmente intactos, hasta un estallamiento drástico. Esta inestabilidad gradual de los lisosomas esta en función de la intensidad y calidad del estímulo correspondiente (144), así, la exposición a estrógenos disminuye la estabilidad lisosomal en los órganos blanco. Se ha observado que el tratamiento previo con

dietilestilbestrol o estradiol in vitro aumenta la liberación de algunas enzimas lisosomales (ribonucleasa II), mientras que los tejidos no blanco, como son el pulmón y el riñón, no respondieron al tratamiento hormonal (144), por lo que nuestros resultados parecen estar de acuerdo con dicha hipótesis.

En segundo lugar, hay ahora suficiente evidencia que muestran la existencia de poblaciones de lisosomas funcionalmente diferentes (11,12,73), los cuales están caracterizados por la heterogeneidad de su contenido enzimático (154).

Los resultados obtenidos en este trabajo muestran una heterogeneidad de lisosomas foliculares con respecto al contenido enzimático y a su distribución celular dentro del folículo. Así, la fosfatasa ácida estuvo más o menos distribuida uniformemente en los diferentes compartimentos, aunque esta actividad fue siempre mayor en las células de la teca. La actividad de la N-acetil- β -D-glucosaminidasa tanto libre como unida fue mayor en las células de la teca de folículos menores de 3 mm de diámetro, mientras que la aril-sulfatasa fue más activa en los folículos mayores de 6 mm y se localizó preferentemente en la fracción correspondiente a los lisosomas de las células de la capa granulosa.

Estudios de centrifugación diferencial y zonal muestran que el tratamiento hormonal, en los ovarios de ratas inmaduras, produce una disminución en los lisosomas grandes y lábiles y un aumento en los organelos ligeros que contienen hidrolasas ácidas (39). De estos resultados puede inferirse que el sistema lisosomal contiene componentes múltiples, los diferentes patrones de actividad de las enzimas lisosomales observados durante el crecimiento folicular, parecen confirmar la presencia de varios componentes dentro del sistema lisosomal del ovario y más específicamente dentro de los diferentes compartimentos del folículo caprino.

Las altas actividades de la fosfatasa ácida se han asociado con folículos pequeños en vía de desarrollo (140), disminuyendo conforme aumenta el tamaño del folículo (26,80,156). Los receptores que están unidos a los esteroides, son proteínas fosforiladas (5,43) y la actividad de unión puede ser modificada por la acción de las fosfatasas ácidas y alcalina. Entenmann y colaboradores (49), han propuesto que la deshidrogenación del estradiol a estrona puede ser activamente realizada por una 17β -deshidrogenasa asociada con una subpoblación de lisosomas, es posible que la disminución en la actividad total de la fosfatasa ácida y N-acetil- β -D-glucosaminidasa, durante la maduración folicular normal, en las células de la capa granulosa de los folículos en crecimiento refleje un incremento en la actividad de los receptores de esteroides en estas células. Esta posibilidad es reforzada por la disminución conjunta en la actividad libre e intralisosomal de estas enzimas, la cual muestra la presencia de un

mecanismo activo de regulación en su distribución y síntesis intracelular .

Estudios citoquímicos en folículos ováricos de la rata muestran la presencia de fosfatasa ácida -en las células de la capa granulosa como en las células de la teca- en las vesículas densas, grandes y escasas, y poco frecuente en el aparato de Golgi.

Las células esteroideogénicas ,células de la teca, siempre contienen mayor actividad de fosfatasa ácida en el aparato de Golgi, con lo que puede proponerse que el sistema lisosomal ovárico puede estar involucrado en algunos aspectos de la esteroideogénesis. Es muy probable que los resultados obtenidos en este trabajo, sobre la actividad de la sulfatasa en los folículos ováricos de la cabra, apoyen esta hipótesis. Se puede especular que el sistema lisosomal está involucrado en disponer a los sustratos accesibles para la síntesis de esteroides o en facilitar la secreción de los mismos. La primera de esas posibilidades se ha propuesto como un mecanismo esteroideogénico para la glándula adrenal. Szabo y colaboradores (143), observaron que los patrones de distribución lisosomal en las células adrenales mostraban que esos organelos, disponiendo a los sustratos mas accesibles para la esteroideogénesis, se asociaban con las inclusiones lipídicas.

El efecto del tratamiento gonadotrófico sobre la distribución subcelular de las actividades de algunas enzimas lisosomales en los ovarios de ratas inmaduras, ha demostrado que las actividades de fosfatasa ácida y catepsina aumentan significativamente 5 horas después de la administración de 20 UI de PMSG y 16 horas después del tratamiento adicional con 40 UI de Gonadotropina Coriónica Humana (hCG). La posibilidad de que las actividades de fosfatasa ácida y catepsina puedan ser importantes en la fisiología ovárica se apoya por las actividades específicas tan altas (actividad/mg de proteína) encontradas en el ovario, comparadas con las de otros tejidos (39).

Se ha demostrado que la LH y la hCG promueven la liberación aguda de los lisosomas ováricos con una marcada liberación de enzimas lisosomales cerca del valor basal (39,119,124), así como un retraso en el aumento retardado en el número de lisosomas (48). Puesto que la actividad de la fosfatasa ácida y la N-acetil- β -D glucosaminidasa en las células de la capa granulosa disminuyó con relación al crecimiento folicular, es posible que la LH y hCG actúen selectivamente sobre las células de la teca. En este caso, el período final del crecimiento folicular se acompaña no solamente por un incremento en la actividad libre de estas enzimas, sino, también por un incremento en las actividades unidas y totales lo que muestra un incremento en el número de lisosomas que contienen estas enzimas. El comportamiento de la aril-sulfatasa fue distinto y por lo tanto puede ser regulada por otro mecanismo.

CONCLUSIONES.

Rahi y Srivastava (124), han propuesto la posibilidad de que los incrementos en la actividad de las hidrolasas ácidas del folículo ovárico pueden ser importantes en el proceso de la ovulación, en la capacitación y en la fertilización. Se ha postulado que la descomposición del tejido conectivo en el ápice de la pared folicular, un prerequisite esencial para la ruptura folicular, depende de la actividad hidrolítica (17,22). Debe tomarse en cuenta que estos incrementos no se observaron al menos en la cabra: ni en el líquido folicular, ni en las células de la capa granulosa, pero podrían reflejar principalmente un incremento en las enzimas lisosomales de las células de la teca. Sin embargo, no es claro si las enzimas lisosomales contribuyen a esta degradación del tejido. Por lo tanto, su participación en los procesos mencionados puede considerarse remota.

De nuestros resultados puede concluirse que las enzimas lisosomales están presentes en todos los compartimentos y estadios del crecimiento folicular de la cabra adulta, que sus concentraciones varían de acuerdo al desarrollo folicular, y que los estadios finales del crecimiento folicular se acompañaron de un aumento en el número de lisosomas en las células de la teca, así como por la liberación substancial de la actividad hidrolítica dentro del compartimento libre de estas células. Por lo tanto, parece razonable proponer que los lisosomas, en los fibroblastos de la teca, pueden tener un papel importante en la degradación del tejido conectivo en la pared folicular durante la ovulación.

APENDICE.

12.1 SOLUCIONES EMPLEADAS PARA EL TRANSPORTE Y HOMOGENEIZACION DE LOS OVARIOS.

Reactivos:

- 1.- Cloruro de sodio (0.15 M).
- 2.- Sacarosa (0.25 M; pH = 7.4).
- 3.- Amortiguador de acetatos (0.1 M; pH = 4.5).

Preparación de Reactivos:

- 1.- Cloruro de sodio (0.15 M).
Disolver 8.8 g de cloruro de sodio en agua destilada, aforar a 1000 ml.
- 2.- Sacarosa (0.25 M; pH = 7.4).
Disolver 21.39 g de sacarosa en 200 ml de agua destilada, ajustar el pH por la adición de pequeñas cantidades de trietanolamina y aforar a 250 ml.
- 3.- Amortiguador de acetatos (0.1 M pH = 4.5).
Disolver 23.1 ml de ácido acético glacial en agua destilada, aforar a 100 ml (solución A), disolver 3.28 g de acetato de sodio en 80 ml de agua destilada, aforar a 100 ml (solución B). Tomar 30.0 ml de la solución A más 20 ml de la solución B, el pH debe ser 4.5, si no, se debe ajustar con una solución de hidróxido de sodio y finalmente aforar a 100 ml.

12.2 PREPARACION DE REACTIVOS PARA LA CUANTIFICACION DE LOS DIFERENTES METABOLITOS

Cuantificación de Proteínas: (94).

La cuantificación de proteínas, se basa en el complejo colorido formado por el cobre del reactivo de la solución 2 con los enlaces peptídicos de las proteínas. La intensidad del color es proporcional al número de enlaces peptídicos presentes.

Reactivos:

- 1.- Carbonato de sodio (2.0 %), tartrato de sodio y potasio (0.02 %) en hidróxido de sodio al (0.1 N).
- 2.- Sulfato de cobre 5 H₂O (0.5 %).
- 3.- Solución cupro-alcalina. (1:51).
- 4.- Reactivo de Folin Ciocalteu (Harleco) (1:3).
- 5.- Albúmina sérica bovina.

Preparación de Reactivos:

- 1.- Carbonato de sodio (2.0 %), tartrato de sodio y potasio (0.02 %) en hidróxido de sodio al (0.1 N). (Solución 1).
Disolver 800 mg de hidróxido de sodio en agua destilada (recien hervida para eliminar el CO₂ que captó del medio ambiente), aforar a 200 ml. Disolver 2.0 g de carbonato de

potasio y 20 mg de tartrato de sodio y potasio en hidróxido de sodio 0.1 N y diluir a 100 ml.

2.- Sulfato de cobre $5 \text{ H}_2\text{O}$ (0.5 %). (Solución 2).

Disolver 250 mg de sulfato de cobre $5\text{H}_2\text{O}$ en agua destilada y diluir a 50 ml.

3.- Solución cupro-alcalina 1:51 (Solución 3).

Mezclar 50 volúmenes de la solución 1 con 1 volumen de la solución 2. en el momento de usarse.

4.- Reactivo de Folin Ciocalteu (Harleco). (1:3).

Disolver 1 volumen del reactivo de Folin con 2 volúmenes de agua destilada en el momento de usarse.

5.- Albúmina sérica bovina.

Disolver 15 mg de albúmina sérica bovina con agua destilada y aforar a 5 ml, diluir 1:10 con agua destilada para obtener una concentración de 300 $\mu\text{g/ml}$.

Para la curva estandar se utilizó albúmina sérica bovina liofilizada (ver Curva "A"). El color obtenido de la reacción en este método sigue la ley de Lambert-Beer únicamente cuando la concentración proteica está en el rango de 0 a 100 $\mu\text{g/sistema}$, después de esta concentración pierde la linealidad y la recupera entre los 100 y 500 $\mu\text{g/sistema}$. Por este comportamiento y dado que los límites de concentración manejados en la curva estandar fueron de 15 a 90 $\mu\text{g/sistema}$, cuando las muestras problema mostraron una lectura mayor a la del último punto de la curva fue necesario repetir la cuantificación con una alícuota de menor volumen, igualmente, cuando la lectura fue menor a la del primer punto de la curva, se repitió el experimento con una alícuota de mayor volumen.

Cuantificación de Hemoglobina:(30)

Reactivos:

1.- Benzidina (1 %) en ácido acético al (90 %).

2.- Peróxido de hidrógeno (1 %).

3.- Ácido acético (2.0 %).

4.- Estandar de hemoglobina. (HYCEL).

Preparación de Reactivos.

1.- Benzidina (1 %) en ácido acético al (90 %).

Aforar 9.02 ml de ácido acético glacial a 10 ml con agua destilada. Disolver 100 μg de benzidina con la solución anterior.

2.- Peróxido de hidrógeno (1 %).

Aforar 29.94 ml de peróxido de hidrógeno (3.34 %) a 100 ml con agua destilada.

3.- Ácido acético (2.0 %).

Aforar 2.0 ml de ácido acético glacial a 100 ml con agua destilada.

4.- Estandar de hemoglobina. (Las ampollitas empleadas contenían 800 $\mu\text{g/ml}$ de hemoglobina, para usarlas en la curva estandar se hizo una dilución 1:40, por lo que la concentración final fue de 20 $\mu\text{g/ml}$).

Para la curva estandar se tomaron alícuotas de 10 hasta 50 μ l, (ver Curva B) las cuales equivalen a concentraciones de 200 a 1000 ng/sistema.

Las actividades enzimáticas se midieron fluorométricamente siguiendo la metodología descrita por Rosado y colaboradores (126)

Quantificación de fosfatasa ácida.

Reactivos:

- 1.- 4-Metil-umbeliferil-fosfato (5 mM).
- 2.- Amortiguador de acetatos (100 mM; pH = 4.8).
- 3.- Amortiguador glicina-NaOH (1.0 M; pH = 10.5).

Preparación de Reactivos.

- 1.- 4-Metil-umbeliferil-fosfato (5 mM).
Disolver 12.5 mg de 4-metil-umbeliferil-fosfato en agua destilada y aforar a 10 ml.
- 2.- Amortiguador de acetatos (100 mM; pH = 4.8).
Disolver 23.1 ml de ácido acético Glacial en agua destilada, aforar a 100 ml (Solución 5), disolver 3.28 g de acetato de sodio en agua destilada, aforar a 100 ml (Solución 6). Tomar 20.0 ml de la solución 5 más 30.0 ml de la solución 6, el pH debe ser 4.8, si no, se debe ajustar con una solución de hidróxido de sodio y finalmente aforar a 100 ml.
- 3.- Amortiguador glicina-NaOH (1.0 M; pH = 10.5).
Disolver 3.0 g de glicina en 80 ml de agua destilada y aforar a 100 ml (Solución 3), disolver 800 mg de hidróxido de sodio en 40 ml de agua destilada y aforar a 50 ml (Solución 4). Tomar 50 ml de la solución 3, adicionar 38.6 ml de la solución 4, el pH debe estar próximo a 10.5, si no, se debe ajustar con una solución de hidróxido de sodio y finalmente aforar a 200 ml.

Quantificación de 4-Metil-umbeliferil-N- β -D-glucosaminidasa

Reactivos:

- 1.- 4-Metil-umbeliferil-N- β -D-glucosaminido (5 mM).
- 2.- Amortiguador de citratos (100 mM; pH = 5.0).
- 3.- Amortiguador glicina-NaOH (1.0 M; pH = 10.5).

Preparación de Reactivos:

- 1.- 4-Metil-umbeliferil-N- β -D-glucosaminido (5 mM).
Disolver 18.9 mg de 4-metil-umbeliferil-N-acetil- β -D-glucosaminido en agua destilada y aforar a 10 ml
- 2.- Amortiguador de citratos (100 mM; pH = 5.0).
Disolver 2.10 g de ácido cítrico en 40 ml de agua destilada, aforar a 50 ml (Solución 1)., disolver 5.68 gr de citrato de sodio en 80 ml de agua destilada y aforar a 100 ml (Solución 2).
- 2). Tomar 20.5 ml de la solución 1 más 29.5 ml de la

solución 2, el pH debe ser 5.0, si no, se debe ajustar con una solución de hidróxido de sodio y finalmente aforar a 100 ml.

3.- Amortiguador glicina-NaOH (1.0 M; pH = 10.5).

Disolver 3.00 g de glicina en 80 ml de agua destilada y aforar a 100 ml (Solución 3), disolver 800 mg de hidróxido de sodio en 40 ml de agua destilada y aforar a 50 ml (Solución 4). Tomar 50 ml de la solución 3, adicionar 38.6 ml de la solución 4, el pH debe estar próximo a 10.5, si no, se debe ajustar con una solución de hidróxido de sodio y finalmente aforar a 200 ml.

Quantificación de aril-sulfatasa.

Reactivos:

- 1.- 4-Metil-umbeliferil-sulfato (5 mM).
- 2.- Amortiguador de acetatos (100 mM; pH = 4.8).
- 3.- Amortiguador glicina-NaOH. (1.0 M; pH = 10.5).

Preparación de Reactivos.

1.- 4-Metil-umbeliferil-sulfato (5 mM).

Disolver 14.7 mg de 4-metil-umbeliferil-sulfato en agua destilada, aforar a 10 ml.

2.- Amortiguador de acetatos (100 mM; pH = 4.8).

Disolver 23.1 ml de ácido acético glacial en agua destilada, aforar a 100 ml (Solución 5), disolver 3.28 g de acetato de sodio en agua destilada, aforar a 100 ml (Solución 6). Tomar 20 ml de la solución 5 más 30.0 ml de la solución 6, el pH debe ser 4.8, si no, se debe ajustar con una solución de hidróxido de sodio y finalmente aforar a 100 ml.

3.- Amortiguador glicina-NaOH. (1.0 M; pH = 10.5).

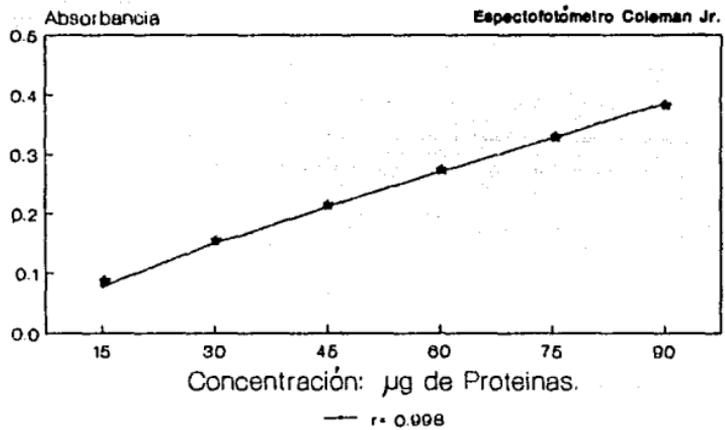
Disolver 3.0 g de glicina en 80 ml de agua destilada y aforar a 100 ml (Solución 3), disolver 800 mg de hidróxido de sodio en 40 ml de agua destilada y aforar a 50 ml (Solución 4). Tomar 50 ml de la solución 3, adicionar 38.6 ml de la solución 4, el pH debe estar próximo a 10.5, si no, se debe ajustar con una solución de hidróxido de sodio y finalmente aforar a 200 ml.

Equipo:

Balanza Analítica
Potenciómetro
Microscopio Estereoscópico
Homogenizador Potter CAFRAMO
Centrífuga Clínica
Centrífuga Refrigerada
Espectrofluorómetro
Espectrofotómetro

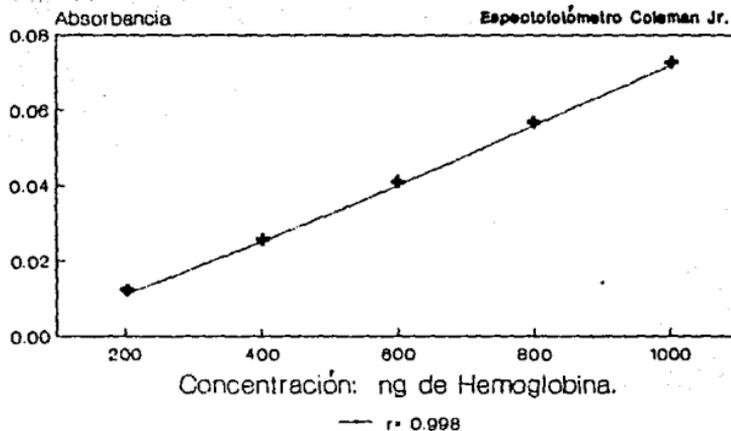
E. Meltzer.
Expandomatic SS-2.
American Optical.
Stirrer Type r-zr-1-64.
Sol-Bat.
IEC B - 20 A.
Perkin Elmer MPF-3L.
Coleman Jr.

PROTEINAS CURVA ESTANDAR "A"



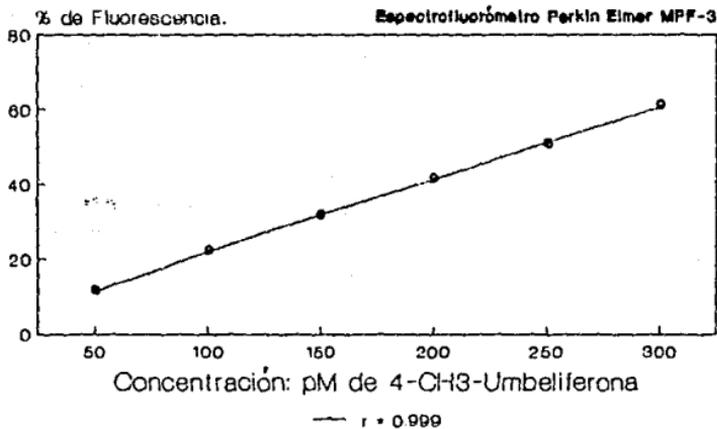
Solución estandar de Albúmina
sérica bovina - 300 µg/ml

HEMOGLOBINA CURVA ESTANDAR "B"



Solución estándar de
hemoglobina - 2.0 ug/ml

4-METIL-UMBELIFERONA CURVA ESTANDAR "C"



Solución estándar de
4-metil-umbeliferona - tUM

BIBLIOGRAFIA.

- 1.- Abraham, A.A.G. (1984): Función Reproductora. En Caprinotecnia I. 2a Edición. Capítulo VIII. Editorial LIMUSA pag. 527.
- 2.- Allen, E. (1923): Ovogenesis during sexual maturity. Amer. J. Anat. 31: 439.
- 3.- Allen, E., Pratt J.P., Newell, Q.U. and Bland, L.J. (1930): Human ova from large follicles including a search for maturation divisions and observations on atresia. Amer. J. Anat. 46: 1.
- 4.- Armstrong D.T., O'Brien, J. and Greep, R.O. (1964): Effects of LH on progesterin biosynthesis in the luteinized rat ovary. Endocrinology 75: 488.
- 5.- Auricchio, F., Migliaccio, A., Castoria, G., Lastoria, S. and Schiavone, E. (1981): ATP-dependent enzyme activating hormone binding of estradiol receptor. Biochim. Biophys. Res. Comm. 101: 1171-1182.
- 6.- Baker, T.G. (1963): A quantitative and cytological study of germ cells in human ovaries. Proc. Roy. Soc. 158: 417.
- 7.- Baker, T.G. (1971): Gametogenesis. Acta Endocr. (Kbh.), Suppl. 166: 18.
- 8.- Baltus, E., Brachet, J., Hanocq Quertier, J., and Hubert, E. (1973): Inhibition of protein synthesis. Differentiation 1: 127-143.
- 9.- Banon, P., Brandes, D. and Frost, J.K. (1964): Lysosomal enzymes in the rat-ovary and endometrium during the estrous cycle. Acta Cytol. 8: 416-425.
- 10.- Berridge, M.J. (1981): Phosphatidylinositol hydrolysis a multifunctional transducing mechanism. Mol. Cell. Endocr. 24: 115-140.
- 11.- Bhattacharya, R. and Mayersbach, H.V. (1976): Histochemistry of circadian changes of some lysosomal enzymes in rat liver. XVII symposium Ges. Histochemie, Bozen 1974. In: Acta Histochem Suppl XVI: 109-116.
- 12.- Bhattacharya, R. (1977): Circadian differences of lysosomes and their enzymes. Leopoldina Symposium Die Zeit und das Leben, Hallen/Saale 1975 In: Nova Acta Leopoldina 225: 171-179.

- 13.- Biggers, J.F. (1972): Metabolism of the oocyte in Oogenesis, University Park Press, Baltimore.: J.D. Biggers and A.W. Shultz. pp 241-251.
- 14.- Billig, H., Hedi, L. and Magnusson, C. (1983): Gonadotrophins stimulate lactate production by rat cumulus granulosa cells. Acta Endocrinol. (Copenh) 103: 562-566.
- 15.- Billing, H. and Magnusson, C. (1985): Gonadotropin-induced inhibition of oxygen consumption in rat oocyte-cumulus complexes: relief by adenosine. Biol. of Reprod. 33: 890-898.
- 16.- Bitensky, L. (1963): In Ciba Foundation Symposium on Lysosomes. London. Churchill. p. 362.
- 17.- Bjersing, L. and Cajander, S. (1974): Ovulation and the mechanism of follicle rupture. III. Transmission electron microscopy of rabbit germinal epithelium prior to induced ovulation. Cell. Tissue Res. 149: 313-327.
- 18.- Blandau, R.J. (1966): The mechanisms of ovulation. In: Ovulation-Stimulation, Suppression and Detection Toronto: J.B. Lippincott Co., R.B. Greenblatt.
- 19.- Brachet, J., Schutter, P.D. and Hubert, E. (1975): Studies of maturation in *Xenopus laevis* oocytes. Energy production and requirements for protein synthesis. Differentiation 3: 3-14.
- 20.- Briggs, M.H. (1973): Steroid hormones and the fertilizing capacity of spermatozoa. Steroids 22: 547-553.
- 21.- Cajander, S., and Bjersing, L. (1975): Fine structural demonstration of acid phosphatase in rabbit germinal epithelium prior to induced ovulation. Cell Tissue Res. 164: 279-289.
- 22.- Cajander, S. and Bjersing, L. (1976): Further studies of the surface epithelium covering preovulatory rabbit follicles with special reference to lysosomal alterations. Cell. Tissue Res. 169: 129-141.
- 23.- Calorco, P.G., Donahue, R.P. and Szollosi, D. (1972): Germinal vesicle breakdown in the mouse oocyte. J. Cell. Sci. 10: 369
- 24.- Centola, G.M., Anderson, L.D. and Channing, C.P. (1981): Oocyte maturation inhibitor (OMI) activity in porcine granulosa cells. Gamete Res. 4: 451-461.

- 25.- Chang, M.C. (1955): The maturation of rabbit oocyte in culture and their maturation, activation, fertilization and subsequent development in the fallopian tubes. J. Exp. Zool. 28: 379-405.
- 26.- Chang, S.C.S., Jones, J.D., Ellefson, R.D. and Ryan, R.J. (1976): The porcine ovarian follicle. I. Selected chemical analysis of follicular fluid at different developmental stages. Biol. Reprod. 15: 321-328.
- 27.- Chiquoine, A.D. (1960): The development of the zona pellucida of the mammalian ovum. Amer. J. Anat. 106: 149.
- 28.- Cho, W.K., Stern, S. and Biggers, J.D. (1974): Inhibitory effect of dibutyryl cAMP on mouse maturation in vitro. J. Exp. Zool. 197: 383-386.
- 29.- Chovinard, L.H. (1971): A light and electron-microscope study of the nucleolus during growth of the oocyte in the prepuberal mouse. J. Cell. Sci. 9: 637-663.
- 30.- Crosby, W. H. and Furth, F.W. (1956): A modification of the benzidine method for measurement of hemoglobin in plasma and urine. Blood 11: 380-385.
- 31.- Crosby, I.M., Osborn, J.C. and Moor, R.M. (1981): Follicle cell regulation of protein synthesis and developmental competence in sheep oocytes. J. Reprod. Fert. 62: 575-582.
- 32.- Crozet, N., Motlik, J. and Szollosi, D. (1981): Nucleolar fine structure and RNA synthesis in porcine oocytes during the early stages of antrum formation. Biol. Cell. 41: 35-42.
- 33.- De Duve, C. (1959): In Subcellular Particles. New York, Ronald Press. T. Hayashi.
- 34.- De Duve, C. and Wattiaux, R. (1966): Functions of lysosomes. Ann. Rev. Physiol. 28: 435.
- 35.- Dekel, N., Hultborn, R., Hillensjo, T., Hamberger, L. and Kraicer, P. (1976): Effect of luteinizing hormone on respiration of preovulatory cumulus oophorus of the rat. Endocrinology 98: 498-504.
- 36.- Dekel, N. and Beers, W.H. (1978): Rat oocyte maturation in vitro: Relief of cyclic AMP inhibition by gonadotrophins. Proc. Natl. Acad. Sci. USA 75: 4369-4373.

- 37.- Dekel, N. and Beers, W.H. (1980): Development of the rat oocyte in vitro: Inhibition and induction of maturation in the presence or absence of the cumulus oophorus Dev. Biol. 75: 247-254.
- 38.- Dimino, M.J. and Reece, R.P. (1973): Effects of gonadotropic hormones on rat ovarian lysosomes. Biol. Reprod. 8: 523-530.
- 39.- Dimino, M.J., Malcom, S.E. and Elfont, E.A. (1977): Changes in acid hydrolase activities of ovarian subcellular fractions of immature rats after gonadotropic treatment. Biol. Reprod. 17: 780-786.
- 40.- Dimino, M.J. Snitzer, J. and Noland T.A. (1987): Early effects of luteinizing hormone on mitochondrial phosphoinositides in ovarian follicles. Biol. Reprod. 36: 97-102
- 41.- Dingle, J.T., Hay, M.F. and Moor, R.M. (1968): Lysosomal function in the corpus luteum of sheep. J. Endocrinol. 40: 325-336.
- 42.- Dingle, J.T. (1973): The role of lysosomal enzymes in skeletal tissues. J. Bone Joint Surg. 55: 87-95.
- 43.- Dougherty, J.J., Puri, R.K. and Toft, D.D. (1982): Phosphorylation in vivo of chicken oviduct progesterone receptors. J. Biol. Chem. 257: 14226-14235.
- 44.- Downs, S.M., Coleman, D.L., Ward - Bailey, P.F. and Eppig J.J. (1985): Hypoxanthine is the principal inhibitor of murine oocyte maturation in a low molecular weight fraction of porcine follicular fluid. Proc. Natl. Acad. Sci. USA 82: 454-458.
- 45.- Downs, S.M. and Eppig, J.J. (1987): Induction of mouse oocyte maturation in vivo by perturbants of purine metabolism. Biol. of Reprod. 36: 431-437.
- 46.- Ecker, R.E. and Smith, L.D. (1971): Influence of exogenous ions on the events of maturation in rana pipiens oocytes. J. Cell. Physiol. 77: 61-70.
- 47.- Edwards, R.G. (1966): Mammalian eggs in the laboratory. Sci. Amer. 215: 72.
- 48.- Elfont, E.A., Roszka, J.P. Dimino, M.J. (1977): Cytochemical studies of acid phosphatase in ovarian follicles: A suggested role for lysosomes in steroidogenesis. Biol. Reprod. 17: 787-785.
- 49.- Entenmann, A.H., Sierralta, W. and Jungblut, P.W. (1980): Studies on the involvement of lysosomes in

- strogens action. III. The dehydrogenation of estradiol to estrone by porcine endometrial lysosomes. Hoppe-Seyles Z. Physiol. Chem. 361: 959-968.
- 50.- Eppig, J.J. (1982): The relationship between cell - oocyte coupling oocyte maturation and cumulus expansion. Dev. Biol. 89: 268-272.
- 51.- Eppig, J.J. Fréter, R.R., Ward - Bailey, P.F. and Schultz, R.M. (1983): Inhibition of oocyte maturation in the mouse participation of cAMP, steroid hormones and a putative maturation inhibitory factor. Dev. Biol. 100: 39-49.
- 52.- Eppig, J.J., Ward - Bailey, P.F. and Coleman, D.L. (1985): Hypoxanthine and adenosine in murine ovarian follicular fluid: concentrations and activity in maintaining oocyte meiotic arrest. Biol. Reprod. 33: 1041-1049.
- 53.- Espey, L.L. and Lipner, H. (1963): Measurements of intra-follicular pressures in the rabbit ovary. Amer. J. Physiol. 205: 1067-1072.
- 54.- Espey, L.L. and Lipner, H. (1965): Enzyme induced rupture of rabbit Graafian follicle. Amer. J. Physiol. 208: 208-213.
- 55.- Espey, L.L. (1967): Ultrastructure of the apex of the rabbit Graafian follicle during the ovulatory process. Endocrinology 81: 267-276.
- 56.- Espey, L.L. and Rondell, P. (1968): Collagenolytic activity in the rabbit and sow Graafian follicle during ovulation. Amer. J. Physiol. 214: 326-329.
- 57.- Espey, L.L. (1974): Ovarian proteolytic enzymes and ovulation. Biol. Reprod. 10: 216-235.
- 58.- Essner, E. (1973): In Electron Microscopy of Enzymes, New York, M.A. Hayat, Van Nostrand Reinhold, vol 1 pp. 44-76.
- 59.- Ezzell, R.M. and Zsego, C.M. (1979): Lutinizing hormone-accelerated redistribution of lysosome-like organelles preceding dissolution of the nuclear envelope in rat oocytes maturing in vitro. J. Cell. Biol. 62: 264-277.
- 60.- Faresé, R.V. and Sabir, A.M. (1979): Polyphosphorylated glycerolipids mimic adrenocorticotropin induced stimulation of mitochondrial pregnenolone synthesis. Biochim Biophys. Acta. 575: 299-304.

- 61.- Farese, R.V. (1983): The phosphatidate - phosphoinositide cycle: and intracellular messenger system in the action of hormones and neurotransmitters. Metabolism 32: 628-641.
- 62.- Freter, R.R. and Schultz, R.M. (1984): Regulation of murine oocyte meiosis: evidence for a gonadotropin - induced, cAMP dependent reduction in a maturation inhibitor. J. Cell. Biol. 98: 1119-1128.
- 63.- Fukumoto, M., Yajima, Y., Okamura, H. and Midorikawa, O. (1981): Collagenolytic enzyme activity in human ovary - an ovulatory enzyme system. Fertil. Steril. 36: 746-750.
- 64.- Ghosal, S.K., Beaoregard, L.J., LaMarche, P.H. DeLuca, F.B. and Parmar, C. P. (1972): Uridine-³H uptake by human oocytes. Canad. J. Physiol. Pharmacol. 50: 285.
- 65.- Gilula, N.B., Epstein M.L. and Burs, W.H. (1978): Cell-to-cell communication and ovulation. A study of the cumulus-oocyte complex. J. Cell. Biol. 78: 58-75.
- 66.- Golbus, M.S. and Stein, M. P. (1976): Qualitative patterns of protein synthesis in the mouse oocyte. J. Exp. Zool. 198: 337-342.
- 67.- Greenwald, G.S. (1976): Effects of superovulation on fetal development and hormone levels in the pregnant hamster. J. Reprod. Fertil. 48: 313-316.
- 68.- Greenwald, G.S. and Terranova, P.F. (1988): The physiology of Reproduction. J. Raven Press, Nueva York, E. Knobil y Neill pp 387-445.
- 69.- Greep, R.O. (1961): Physiology of the anterior hypophysis in relation to production. In sex and Internal Secretions. Baltimore: Williams and Wilkins W.C. Young.
- 70.- Greep, R.O. (1963): Histology, histochemistry and ultrastructure of the adult ovary. In: The Ovary. Baltimore: Williams and Wilkins H.G. Grady and D.E. Smith.
- 73.- Groh, V. and Mayersbach, H.V. (1981): Enzymatic and functional heterogeneity of lysosomes. Cell. Tissue Res. 214: 613-621.
- 74.- Guraya, S.S. and Greenwald G.S. (1964): A comparative histochemical study of interstitial tissue and follicular atresia in the mammalian ovary. Anat. Rec. 149: 411-434.

- 75.- Guraya, S.S. (1967): Cytological and cytochemical studies on the oocyte growth in primates. Res. Bull. Panjab. Univ. 18: 191.
- 76.- Guraya, S.S. (1969): Histochemical study of lipids in the developing ovarian oocyte of the golden hamster (*Mesocricetus auratus*). Acta Anat. (Basel) 74: 65.
- 77.- Gwatkin, R.B. and Haidri, A.A. (1974): Oxygen requirements for maturation of hamster oocytes. J. Reprod. Fert. 37: 127-129.
- 78.- Gwatkin, R.B. and Anderson, D.F. (1976): Hamster oocyte maturation in vitro inhibition by follicular components. Life Sci. 19: 527-536.
- 79.- Hall, K. and Khaligh, H.S. (1968): The action of ovarian steroids and relaxin on glycogen and some enzyme activities in the uterus of the hamster. J. Endocrinol. 40: 353-362.
- 80.- Henderson, K.A. and Cups, P.T. (1981): Acid phosphatase activity in bovine follicular fluid. J. Anim. Sci. 53: 329-337.
- 81.- Henzl, M.R., Smith R.E., Boost, G. and Tyler, E.T. (1972): Lysosomal concept of menstrual bleeding in human J. Clin. Endocrinol. 34: 860-875.
- 82.- Hertig, A.T. (1968): The primary human oocyte: some observations on the fine structure of Balbiani's body and the origin of the annulate lamellae. Amer. J. Anat. 122: 107.
- 83.- Hillensjo, T., Hamberger, L. and Ahren K. (1975): Respiratory activity of oocyte isolated from ovarian follicles of the rat. Acta Endocr. 78: 751-759.
- 84.- Hillensjo, T. (1976): Oocyte maturation and glycolysis in isolated pre-ovulatory follicles of PMS-injected rats. Acta Endocr. 82: 809-830.
- 85.- Hillensjo, T., Ekholm, C. and Ahren, K. (1978): Role of cyclic AMP in oocyte maturation and glycolysis in the pre-ovulatory rat follicle. Acta Endocr. 87: 377-388.
- 86.- Hinselman, H. (1927): Maturity of the human ovum. Klin. Wschr. 6: 2289.
- 87.- Horrobin, D.F. (1969): The female sex cycle. J. Theor. Biol. 22:80.

- 88.- Jelinek, J. and Jelinkova, M. (1975): Changes in the endometrial enzymes of rats during the estrous cycle and early pregnancy. Acta Endocrinol. Suppl. 199:273.
- 89.- Kleiman, D., Insler, V., Leiberman, J.R., Glezerman, M., Albotiano, S., Potashnik, G. and Meizner, I. (1987): Acid phosphatase levels in follicular fluids following induction of ovulation in vitro fertilization patients. J. of in Vitro Fert. and Embryo Trans. 4: 161-164.
- 90.- Lamprecht, S.A., Zor, U., Tsafiriri, A. and Linder, H.R. (1973): Action of prostaglandin E2 and luteinizing hormone on ovarian adenylate cyclase, protein kinase and ornithine decarboxylase activity during postnatal development and maturity in the rat. J. Endocr. 57: 217-233.
- 91.- Lee, C.Y. and Malvin, R. (1970): Acid proteolytic activity of the sow ovarian follicle. Fed. Proc. 29: 643 Abstr.
- 92.- Linder, H.R., Tsafiriri, A., Lieberman, M.E., Zor, U., Krockh Y., Bauminger, S. and Barnea, A. (1974): Gonadotropin action on cultured Graafian follicles: induction of maturation division of the mammalian oocyte and differentiation of the luteal cell. Recent Prog. Horm. Res. 30: 79-138.
- 93.- Lobel, B.L., Rosenbaun, R.M. and Deanh, H.W. (1961): . Enzymic correlates of physiological regression of follicles and corporea lutea in ovaries of normal rats. Endocrinology 68: 232-247.
- 94.- Lovry, O.H., Rosebrough, N.J., Farr, A.L. and Rondell, R.J. (1951): Protein measurement with the folin phenol reagent. J. Biol. Chem. 193: 265-275.
- 95.- Lucy, J.A. (1969): Lysosomal membranes. In J.D. Dingle, H.B. Fell. (eds): "Lysosomes in Biology and Pathology" Amsterdam, North Holland, vol. 2 pp.313-333.
- 96.- Lunenfeld, B., Eshkol, A., Insler, V. and Kraiem, Z. (1968): Metabolic disorders of the ovary. Advanc. Metab. Disord. 3: 153.
- 97.- Magnusson, C., Hillensjo, T., Tsafiriri, A., Hultborn, R. and Ahren, K. (1977): Oxygen consumption of maturing rat oocytes. Biol. Reprod. 17: 9-15.
- 98.- Magnusson, C. and Hillensjo, T. (1977): Inhibition of maturation and metabolism in rat oocytes by cyclic AMP. J. Exp. Zool. 201: 139-147.

- 99.- Magnusson, C. (1980): Role of cumulus cells for rat oocyte maturation and metabolism. Gamete Res. 3: 133-140.
- 100.- Mc Gaughey, W.R. and Van Blerkom, J. (1977): Patterns of polypeptides synthesis of porcine oocytes during maturation in vitro. Dev. Biol. 56: 241-254.
- 101.- McKay, D.G., Herting, A.T. Adams, E.C. and Danzinger, S. (1953): Histochemical observations on the germ cells of human embryos. Anat. Rec. 117: 201.
- 102.- Merchant, H. and Chang, M.C. (1971): An electron microscopic study of mouse eggs matured in vivo and in vitro. Anat. Rec. 171: 21.
- 103.- Moor, R.M., Hay, M.F. and Cran, D.G. (1978): Macroscopic identification and steroidogenic function of atretic follicles in sheep. J. Endocr. 77: 309-318.
- 104.- Moor, R.M. and Smith, M.W. (1979): Aminoacid transport in mammalian oocytes. Expl. Cell. Res. 119: 333-341.
- 105.- Moor, R.M., Smith, M.W. and Dawson, R.M.C. (1980): Measurement of intercellular coupling between oocytes and cumulus cells using intercellular markers. Exp. Cell. Res. 126: 15-29.
- 106.- Moor, R.M. Osborn, J.C., Cran D.G. and Walters, D.E. (1981): Selective effect of gonadotrophins on cell coupling, nuclear maturation and protein synthesis in mammalian oocytes. J. Embryol. Exp. Morph. 61: 347-365.
- 107.- Moore, G.M.P., Lintern Moore, S., Peters, H. and Faber, M. (1974): RNA synthesis in the mouse oocyte. J. Cell. Biol. 60: 416-422.
- 108.- Morales, T.I., Woessner Jr. J.F., Marh, J.M. and Lemaire, W.J. (1983): Collagen, collagenase and collagenolytic activity in rat Graafian follicles during follicular growth and ovulation. Biochem. Biophys. Acta 756: 119-122.
- 109.- Motlik, J., Kopecny, V., Travník, P. and Pivko J. (1984): RNA synthesis in pig follicular oocytes. Autoradiographic and cytochemical study. Biol. Cell. 50: 229-236.
- 110.- Munday, R.N., Kay, D.J. and Cross, M. (1978): Activity and subcellular distribution of mouse uterine

- alkaline phosphatase during pregnancy and pseudo-pregnancy. J. Reprod. Fertil. 54: 293-300.
- 111.- Narimoto, K., Okamura, H., Mori, T., Sakai, M., Espey, L.L. and Ogawa, K. (1985): Cytochemical localitation of acid phosphatase in the rabbit ovarian follicle. Acta Histochem. Cytochem. 18: 525-537.
- 112.- Nølsson, L. (1974): Acute effects of gonadotrophins and prostaglandins on the metabolism of isolated ovarian follicles from PMSG-treated immature rats. Acta Endocrinol. 77: 540-558.
- 113.- Nimrod, A. and Linder, N.R. (1980): Heparin facilitates the induction of LH receptors by FSH in granulosa cells cultured in serum enriched medium FEBS. Lette. 119: 155-157.
- 114.- Novikoff, A.B. (1961) Lysosomas and related particles. In "The Cell" New York, Academic Press. Inc. J.Brachet and A.E., Mirsky vol 2, p 424
- 115.- Odor, L.D. and Blandau, R.J. (1969) Ultrastructural studies on fetal and early postnatal mouse ovaries. 1. Histogenesis and organogenesis Amer. J. Anat. 124, 163.
- 116.- O'Malley, B.W. and Stroit, C.A. (1973): The mechanism of action of progesterone. Washington, D.C. American Physiological Society Washington, D.C. in Greep Ro. "Handbook of Physiology Section 7": pp 591-602.
- 117.- Ohno, S., Klinger, H.P. and Atkin N.B. (1962): Human oogenesis. Cytogenetics 1: 42.
- 118.- Okamura, H., Kawamura, N., Shimada, H. and Tojo, S. (1983): Ovarian enzymatic activity and ovulation. In Xth World Congress of Gynecology and Obstetrics, Academic New York M. Newton p.206-215.
- 119.- Okazaki, T., Straus, III J.F. and Flickinger, G.L. (1977): Lysosomal phospholipase A. activities of rat ovarian tissue. Biochim. Biophys. Acta 487: 343-353.
- 120.- Parr, M.B. and Parr, E.L. (1978): Vol. 2, part 1, Uptake and fates of ferritin in the uterine epithelium of the rat during early pregnancy. J. Reprod. Fertil. 52: 183-188.
- 121.- Pelluso, J.J. Steger, R.W. and Hafez, E.S.E. (1977): Sequential changes asociated with degeneration of preovulatory rat follicles. J. Reprod. Fertil. 49: 215-218.

- 122.- Pincus, G. and Enzman. (1935): The comparative behaviour of mammalian eggs in vivo and in vitro I. The activation of ovarian eggs. J. Exp. Med. 62: 665.
- 123.- Plunkett, E.R., Moon Y.S., Zamecnik, J. and Armstrong, D.T. (1975): Preliminary evidence of a role for prostaglandin F in human follicular function. Amer. J. Obstet. Gynec. 123: 391.
- 124.- Rahi, H., and Srivastava, P.N. (1984): Lysosomal hydrolases in reproductive organs during estrous cycle of the Hamster. Gamete Research 10: 56-66.
- 125.- Rondell, P. (1964): Follicular pressure and distensibility in ovulation. Amer. J. Physiol. 207: 590-594.
- 126.- Rosado, A., Mercado, E., Gallegos, A.J. Wens, M.A. and Aznar, R. (1977): Subcellular distribution of lysosomal enzymes in the human endometrium. I. Normal menstrual cycle. Contraception 16: 287-297.
- 127.- Rosales, A.M., Hernandez-Perez, O., Dominguez, R., Mercado, E. and Rosado, A. (1990): Proteolytic and antiproteolytic activities in goat antral follicles. Anim. Reprod. Sci. 23: 213-222.
- 128.- Sadighian, J.J., Patterson, S.K., Neymark, M.A, Pepe, G.J. and Dimino, M.J. (1985): The effects of phosphoinositides on mitochondrial steroidogenesis by luteal tissue. Philadelphia G.F. Stickley Co., In: Strauss, J.F., Menon, K.M.J. Lipoprotein and cholesterol metabolism in steroidogenic tissues. pp 257-259.
- 129.- Salomon, Y., Amir, Y., Azulai, R., Amsterdam, A. (1978): Modulation of inhibition of heparin of gonadotrophin-stimulated ovarian adenylate cyclase. Biochim. Biophys. Acta 544: 262-272.
- 130.- Sato, E., and Koide, S.S. (1984): Forkolin and mouse oocyte maturation in vitro. J. Exp. Zool. 230: 125-129.
- 131.- Sato, E., Uneno, H. and Koide, S.S. (1986): Mouse oocyte maturation modulated by a granulosa cell factor and heparin and heparan sulfate. Gamete Res. 13: 115-124.
- 132.- Schultz, R.M. and Lambert, C.C. (1973): Changes in adenine nucleotide levels and respiration during 1-methyladenine induced maturation of starfish oocytes. Exptl. Cell. Res. 81: 163-194.

- 133.- Schultz, R.M. and Wasserman, P.M. (1977): Biochemical studies of mammalian oogenesis: Protein synthesis during oocyte growth and meiotic maturation in the mouse. J. Cell. Sci. 24: 167-194.
- 134.- Schultz, R.M., Letorneau, G.E. and Wasserman, P.M. (1978): Meiotic maturation of mouse oocyte in vitro: Protein synthesis in a nucleate and nucleate oocyte fragments. J. Cell. Sci. 30: 251-264.
- 135.- Schwartz, N.B. and Mc Cormack, C.E. (1972): Reproduction: gonadal function and its regulation. Ann Rev. Physiol. 34: 425.
- 136.- Sharma, A., Mathur R.S. and Goyal R.P. (1977): Quantitative evaluation of phosphatases in the uteri of two indian insectivores, hemiechinus auritus collaris (gray) and suneus murinus.
- 137.- Smith, L.D. and Ecker, R.E. (1970): Regulatory process in the maturation and early cleavage of amphibians eggs. Current Topics in Dev. Biol. 5: 1-38.
- 138.- Smith, J.A. and Waynfoth, H.B. (1970): Acid phosphatase activity in viable and regressing rat corporea lutea. J. Endocr. 47: 167-176.
- 139.- Sorensen, R.A. (1972): The utilization of lactate in mouse oocyte maturation and first cleavage. Biol. Reprod. 7: 139-144.
- 140.- Stallcup, D.T. (1970): Enzyme activity of bovine follicular fluid. J. Dairy Sci. 53: 382 (abstr).
- 141.- Strauss, III J.G. and Flickinger, G.L. (1978): A role lysosomes in corpus luteum function. Academic Press, New York " Protein turnover and Lysosome Function. "In H.L. Segal, D.J. Droyle pp. 1521-1541.
- 142.- Swezy, O. and Evans, H.M. (1930): The human ovarian germ cells. J. Morph. Physiol. 49: 534.
- 143.- Szabo, D., Stark, E y Varga, B. (1967): The localization of acid phosphatase activity changes in lysosomas in the adrenal zona fasciculata of intact and hypophysectomized rat following ACTH administration. Histochemie 10, 321-328.
- 144.- Szego, C.M. (1971): In The Sex Steroids; Molecular Mechanisms. New York; Appleton-Century-Crofts. McKerns, K.W.
- 145.- Szego, C.M. (1972): The role of cyclic AMP in lysosome mobilization and their nucleotropic

translocation in steroid hormonal target cell.
 "Advances in Cyclic nucleotide Research. Vol. 1" New
 York: Raven Press P. Greengard G.A., Robinson, R.
 Paoletti pp 541-564.

- 146.- Szego, C.M. (1974): The lysosome as a mediator of hormone action. Recent. Prog. Horm. Res. 30: 171-233.
- 147.- Szego, C.M. (1975): Lysosomal function in nucleocytoplasmic communication. "Lysosome Biology and Pathology" Amsterdam Oxford: Noth Holland Publishing Co., Dingle, J.T., Dean, R.T. Vol. 4, pp 385-477.
- 148.- Tanaka, T. and Straus, J.F. (1982): Stimulation of luteal mitochondrial cholesterol side chain cleavage by cardiolipin. Endocrinol. 110: 1592-1598.
- 149.- Tesarik, J., Travník, P., Kopecny, V. and Kristek, F. (1983): Nucleolar Transformation in the human oocyte after completion and growth. Gamete Res. 8: 267-277.
- 150.- Thomson, A. (1919): The maturation of the human ovum. J. Anat. (Lond) 53: 172.
- 151.- Tsafiriri, A. and Channing, C.P. (1975): An inhibitory influence of granulosa cells and follicular fluid upon porcine oocyte meiosis in vitro. Endocrinology 96: 922-927.
- 152.- Tsafiriri, A., Lieberman, M.E. Ahrén, K. and Linder, H.R. (1976a): Dissociation between LH - induced aerobic glycolysis and oocyte maturation in cultured graafian follicles of the rat. Acta Endocrinol. (Copenhagen) 81: 362-366.
- 153.- Tsafiriri, A., Pomerantz, S.H. and Channing, C.P. (1976b): Inhibition of oocyte maturation by porcine follicular fluid: partial characterization of the inhibitor. Biol. Reprod. 14: 511-516.
- 154.- Uchiyama, Y., Groh V. and Mayersbach, H.V. (1981): Different circadian variations as indicator of heterogeneity of liver lysosomes. Histochemistry 73: 321-337.
- 155.- Warnes, G.M., Moor, R.M. and Jhonson, M.H. (1977): Changes in protein during maturation of sheep oocytes in vivo and in vitro. J. Reprod. Fert. 49: 331-335.
- 156.- Wise, T. (1987): Biochemical analysis of bovine follicular fluid: albumin, total protein, lysosomal enzymes, ions, steroid and ascorbic acid content in relation to follicular size, rank atresia

classification and day of estrous cycle. J. Anim. Sci. 64: 1153-1169.

157. - Witschi, E. (1948) Migration of the germ cells of human embryos from the yolk sac to the primitive gonadal folds. Contr. Embryol. Carneg. Instn. 32: 67.
158. - Witschi, E. (1951): Embryogenesis of the adrenal and the reproductive glands. Recent. Progr. Hormone Res. 6: 1.
159. - Woessner, J.F.Jr. (1969): The physiology of uterus and mammary gland. Lysosome in Biology and Pathology. Amsterdam, London: North Holland Publishing Co., Dingle, J.T., Fell, H.B. Vol. 2 pp 229-329.
160. - Wood, J.C. and Barley, V.L. (1970): Biochemical changes in forming and regressing deciduoma in the rat uterus. J. Reprod. Fertil. 23: 469-475.
161. - Young, W.C. (1961): The mammalian ovary. In: Sex and Internal Secretions Baltimore: Williams and Wilkins W.C. Young
162. - Zamboni, L. (1970): Ultrastructure of mammalian oocytes and ova. Biol. Reprod., Suppl. 2: 44.
163. - Zamiri, M.J. and Blackshaw, A.W. (1979): Enzyme histochemistry of sheep uterus the estrous cycle. Aus. J. Biol. Sci. 32: 409-414.
164. - Zeilmaker, G.H., Hulsmann, W.C., Wensinck, F. and Verhamme, C. (1972): Oxigen - triggered mouse oocyte maturation in vitro and lactate utilization by mouse oocyte and zygotes. J. Reprod. Fert. 29: 151-152.
165. - Zeilmaker, G.H. and Verhamme, C.M. (1974): Observations on rat oocyte maturation in vitro: morphology and energy requirements. Biol. Reprod. 11: 145-152.
166. - Zeilmaker, G.H. and Verhamme, C.M. (1977): Lactate concentrations in pre-ovulatory follicles of pro-oestrous rats before and after onset of oocyte maturation. Acta Endocrinol. 86: 360-383.