

00381 23
2ej



UNIVERSIDAD NACIONAL AUTONOMA DE MEXICO

FACULTAD DE CIENCIAS
DIVISION DE ESTUDIOS DE POSGRADO

DIFERENCIACION DE LAS
CELULAS ESTEROIDOGENICAS DEL
OVARIO DE RATA EN AUSENCIA DE
LA LINEA GERMINAL.

T E S I S

QUE PARA OBTENER EL GRADO ACADEMICO DE
DOCTOR EN CIENCIAS (BIOLOGIA)
P R E S E N T A
MARIA CRISTINA REVILLA MONSALVE

DIRECTOR DE TESIS: DOCTOR HORACIO MERCHANT LARIOS

MEXICO, D.F.

FACULTAD DE CIENCIAS



DIV. EST. POSGRADO

1996

TESIS CON
FALLA DE ORIGEN



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 esta 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.

DEDICATORIA

A la memoria de mi padre cuyo ejemplo seguiré toda la vida

A mi madre por su gran valor, cariño y estímulo

A Sergio por su amor, apoyo y paciencia

A Eduardo y Armando por el inmenso amor que me dan

A Silvia, Sergio y Eugenia grandes compañeros de mi vida

AGRADECIMIENTOS

Al Doctor Horacio Merchant Larios

**Por su valiosa orientación y dirección que hicieron posible la
realización de este trabajo.**

**A la Doctora Elvira Estrada Flores
A la Doctora María Luisa Fanjul Peña
A la Doctora Marcela Aguilar Morales
A la Doctora Ma. Genoveva González Morán
Al Doctor Guillermo Laguna Hernández
A la Doctora Patricia Ramos Morales**

Por sus valiosos comentarios a este trabajo.

INDICE

RESUMEN	3
I.- INTRODUCCION	5
Antecedentes históricos	5
Desarrollo del ovario	8
<i>Origen y migración de las células germinales primordiales</i>	8
<i>Diferenciación de la gónada</i>	12
<i>Diferenciación sexual de la gónada</i>	14
<i>Diferenciación del ovario</i>	16
<i>Patrones de diferenciación ovárica</i>	17
Ovogénesis	18
<i>Diferenciación de células germinales a ovogonias</i>	19
<i>Diferenciación de ovogonias a ovocitos</i>	20
<i>Crecimiento del ovocito</i>	22
<i>Maduración del ovocito</i>	26
<i>Control de la inhibición de la meiosis</i>	30
Foliculogénesis	32
<i>Control de la foliculogénesis</i>	37
<i>Tipos de folículos</i>	38
<i>Folículos preantrales</i>	39
<i>Folículos antrales</i>	39
<i>Dominancia folicular</i>	40
Fisiología del folículo	42
<i>Células de la teca</i>	43
<i>Células de la granulosa</i>	45
<i>Cooperación teca-granulosa</i>	47
Ovulación	51
Atresia folicular	54
Luteinización	57
Esteroidogénesis	61
<i>Estrógenos</i>	64
<i>Andrógenos</i>	66
<i>Progestinas</i>	68
Desarrollo folicular durante el ciclo estral de rata	69
<i>Estro</i>	70
<i>Diestro</i>	74
Busulfán	75

II.- PLANTEAMIENTO DEL PROBLEMA	82
III.- HIPÓTESIS	83
IV.- OBJETIVO GENERAL	83
V.- OBJETIVOS ESPECIFICOS	83
VI.- MATERIAL Y METODO	83
VII.- RESULTADOS	85
<i>Número de productos</i>	85
<i>Peso corporal</i>	85
<i>Inicio de la pubertad</i>	85
<i>Determinaciones hormonales</i>	86
<i>Microscopía de luz</i>	91
<i>Microscopía electrónica</i>	91
VIII.- DISCUSIÓN	98
IX.- CONCLUSIONES	113
X.- BIBLIOGRAFÍA	114
XI.- ANEXO	132

RESUMEN

La presencia de las células germinales en los cordones epiteliales al nacimiento de las hembras, es una condición necesaria para el establecimiento de los folículos y la diferenciación estructural de las células somáticas en células sintetizadoras de esteroides. La destrucción de las células germinales primordiales traerá como consecuencia la ausencia de folículos y la no diferenciación de células somáticas en células esteroideogénicas. La forma exacta en que el ovocito induce la diferenciación del estroma no está totalmente determinada. Posiblemente son necesarios para la fragmentación de los cordones epiteliales con la consecuente formación de las unidades foliculares incluyendo tejido epitelial, estroma y vasos sanguíneos.

Los folículos ováricos son estructuras funcionales altamente especializadas que contienen en su interior al ovocito cuyo desarrollo dependerá de la interacción de éste con las células que lo rodean. Los constituyentes celulares de esta unidad funcional son: las células de la granulosa que rodean al ovocito y con el que establecen, a través de uniones "gap", una íntima relación y las células de la teca que están separadas de la granulosa por una lámina basal.

La síntesis y el metabolismo de las hormonas esteroideas ocurre bajo control gonadotrópico en tres principales tipos de células, las intersticiales, las de la teca y las de la granulosa.

Las células intersticiales y las de la teca sintetizan principalmente esteroides C19 (andrógenos) y las de la granulosa sintetizan esteroides C21 y son capaces de aromatizar andrógenos a estrógenos. Después de la ovulación y una vez formado el cuerpo lúteo estas células serán capaces de sintetizar en grandes cantidades progesterona, hormona cuya presencia, en caso de una fecundación exitosa, es fundamental para el desarrollo del nuevo organismo.

El Busulfán (1,4-butanedioldimetanosulfonato) es una droga frecuentemente empleada en el manejo de la leucemia granulocítica que ha demostrado ser capaz de producir esterilidad en la rata, ratón y en el hombre como consecuencia de la destrucción de las células germinales primordiales.

Se ha establecido que la acción de este fármaco sobre la línea germinal es mayor en la etapa en la que las células germinales llegan a la gónada e inician su proliferación lo cual ocurre entre los días 11 al 15 del desarrollo.

Teniendo en cuenta que por lo general la destrucción de la línea germinal con Busulfán no es masiva se consideró encontrar en los diferentes ovarios un grado variado de diferenciación de células esteroideogénicas lo cual daría por resultado concentraciones

hormonales séricas diversas. La correlación se llevó a cabo entre la estructura del ovario y las concentraciones hormonales detectadas tanto en ratas hijas de madres tratadas como en hijas de madres no tratadas.

Bajo este planteamiento se administró a 40 ratas Wistar una dosis de 10 mg/kg de peso de Busulfán por vía intraperitoneal suspendido en 1 ml. de aceite vegetal el día 14 de la gestación. A otro grupo se le administró el mismo volumen de aceite vegetal. Las ratas de ambos lotes se sacrificaron por dislocación craneocervical, después de pesarlas, al mes, dos meses y tres meses de edad. Se obtuvo el suero de todas las ratas y se les extirparon ambos ovarios. En el suero se hizo la determinación de pregnenolona, progesterona, androstendiona, testosterona, estrona y estradiol por el método de radioinmunoensayo (RIA). Los ovarios se fijaron y procesaron de acuerdo a las técnicas convencionales de ME para su análisis al microscopio de luz y al electrónico.

Los resultados revelaron que el número de productos obtenidos de las ratas tratadas era menor que el de las no tratadas. El tamaño de los productos de madres tratadas fue menor lo cual se vio reflejado en la reducción significativa del peso corporal, para todas las edades estudiadas. El inicio de la pubertad de las ratas hijas de madres tratadas presentó un retraso de 6 días. La estructura del ovario demostró que la destrucción de la línea germinal no fue masiva lo cual permitió el establecimiento de un número de células germinales en la gónada que organizaron algunos folículos y por lo tanto fueron capaces de inducir la diferenciación de tejido esteroideogénico. Al comparar los valores hormonales de las ratas hijas de madres no tratadas con los de las hijas de madres tratadas se observó que con excepción de la estrona a los 2 meses, las concentraciones circulantes de todas las hormonas fueron ($p < 0.0001$) menores en las ratas hijas de madres tratadas. Para la estrona la reducción a los 2 meses fue de 6.9%

La destrucción parcial de la línea germinal provoca una reducción en el número de folículos que se diferencian en el ovario con la consecuente disminución de la cantidad de tejido esteroideogénico diferenciado. Como resultado la concentración de hormonas sintetizadas por estos ovarios será menor y esta reducción ejercerá diversos efectos sobre el organismo como son el retraso en el inicio de la pubertad y peso corporal.

I.- INTRODUCCION

Antecedentes Históricos

Durante muchos años el papel del ovario y del óvulo no fue reconocido. Probablemente el origen de ello fue el planteamiento establecido por Aristóteles (384-322 a.C.) de "semilla y suelo", que fue un pensamiento científico dominante durante 2000 años. Aristóteles pensaba que el macho era el dador de la "semilla" y que la hembra jugaba un papel pasivo aportando solo el "suelo" en el cual la "semilla" debería de crecer, asociando el semen con la semilla como una secreción del sistema masculino y los testículos los consideraba solamente pesos para sostener los conductos derechos pero no estaban involucrados con la reproducción. Fue Herophilus de Alejandria (300 a.C.) el primero en reconocer a los ovarios como estructuras anatómicas comparándolas con los testículos. Sin embargo este autor no pudo apreciar ni su estructura ni su función. Fue Soranus de Efeso (nacido en el año 50 d.C.) quien realizó una descripción detallada de los ovarios a los que llamó órganos pareados. Galeno (129-199 d.C.) agregó muy poco a la idea original de Aristóteles sobre la reproducción aún cuando realizó una descripción mas detallada de los ovarios y consideró que éstos producían una especie de "esperma" que era importante para la reproducción. Después de la muerte de Galeno el hombre entró en la Época del Oscurantismo en la que quedó proscrita toda investigación por más de 1000 años.

Hasta el siglo XIV fue Henri de Mondeville quien en un libro de cirugía escrito en 1314 hizo una descripción del aparato genital femenino con ovarios y útero. Otra contribución importante fue la de Leonardo da Vinci (1452-1519) quien realizó un excelente dibujo de las relaciones anatómicas entre el útero humano y los ovarios. Beregario da Capri (1460-1530) agregó poco a la descripción de los "testículos" de las hembras como los llamó en su libro "Isagogae Breves"

Fueron estos estudios los que dieron las bases para que se empezaran a apreciar las diferencias estructurales entre el testículo y el ovario.

Andreas Vesalius de Bruselas (1514-1564) fue el primero en describir en su libro "Fabrica" (1555) los folículos y probablemente el cuerpo lúteo, llamándolos aún "testículos" de la mujer pero apreciando ya la presencia de vesículas llenas de fluido.

A ellos siguieron una gran cantidad de anatomistas pero en realidad poco aportaron al conocimiento del papel de los ovarios y de los óvulos en la reproducción. Las aportaciones del siglo XVI a este conocimiento fueron el reconocimiento de los ovarios como estructuras, recibiendo el nombre de ovarios, aún cuando su función no fue apreciada.

En el siglo XVII William Harvey (1578-1657) en su libro "de Generatione Animalium" publicado en 1651 provocó una confusión mayor en el conocimiento ya que aunque sus observaciones experimentales fueron válidas, la interpretación influenciada por las ideas de Aristóteles lo llevaron a concluir que el ovocito era un producto de la concepción. Los errores de Harvey en relación con los ovarios fueron corregidos por el obispo Niels

Stenson de Dinamarca (1638-1686) quien en su libro "Myologiae Specimen" publicado en 1667 sostiene que los "testiculos femeninos" de mamíferos contienen ovocitos.

Theodore Kerckring (1640-1693) creyó que los folículos de los ovarios humanos y de bovinos eran los ovocitos y comunicó estos resultados a la Royal Society en 1672. Pero de mayor importancia fue la publicación de Regnier de Graaf (1641-1673) quien en su "De Mulierum Organis Generationi Inservientibus" publicado en 1672 propone al folículo entero como el ovocito. Sin duda la principal contribución de von Graaf fue la primera descripción detallada del cuerpo lúteo.

A finales del siglo XVII existía una gran controversia. Por un lado estaba el grupo que apoyaba las ideas de Aristóteles considerando a los ovarios carentes de toda importancia en la reproducción y por otro lado aquellos como Wharton (1656), Descartes (1664) y Le Grand (1672), que pensaban que los "testiculos femeninos" producían su propio "semen", el líquido folicular, que se tenía que mezclar con el semen del macho para dar lugar al embrión. Además existía la nueva escuela "ovista" de Stensen, Kerckring y de Graaf que sostenía que todo el folículo era el ovocito y que la fertilización ocurría dentro del ovario escapando del ovario solo los ovocitos fertilizados. En 1678 con el descubrimiento del espermatozoide de mamíferos por Leewenhoek, se forma una nueva escuela, la "animaculista". Hartsoeker (1694) uno de los adeptos de esta escuela sostenía que podía ver en la cabeza del espermatozoide un feto preformado completo. Van Leewenhoek (1638) sugirió que el huevo de Graaf debía ser impregnado de uno de estos animaculos en un punto particular de su circunferencia para que ocurriera la fertilización y por ello debían de ser eyaculados cientos de espermatozoides para que uno llegara al blanco. En oposición a esta idea, Drelincourt (1685) sugirió que había un huevo verdadero dentro del folículo de Graaf, pero este hecho no sería aceptado hasta casi 150 años después.

Malpighi (1628-1694) sostenía que el folículo de Graaf nunca dejaba el ovario pero que servía como protección al verdadero óvulo que estaba dentro de él, fue también este investigador quien propuso el nombre de cuerpo lúteo y aún cuando lo describió como de naturaleza glandular no apreció realmente que estaba formado por el revestimiento de la ruptura del folículo.

A estos estudios siguieron muchos más pero en realidad los descubrimientos de mayor relevancia para la reproducción se realizaron a principios del siglo XIX. Prévost y Dumas (1824) explicaron excelentemente la ovulación y la formación del cuerpo lúteo en la perra. Observaron que la fertilización debe ocurrir después de que el óvulo ha salido del ovario y llegaron a la conclusión de que los folículos descritos por de Graaf probablemente no era el ovocito mismo pero lo contenían y que el líquido folicular era probablemente necesario para transportar al pequeño huevo al útero. De acuerdo con estas ideas en 1827 von Baer describe e ilustra el ovocito de mamífero dentro del folículo y sostiene que cada animal generado por el coito de macho y hembra evoluciona de un huevo.

En los siguientes años el ovocito de mamífero es redefinido como un componente mas que como un producto de la concepción. Es Newport (1853,1854) quien describe en detalle el proceso de la fertilización y de la segmentación temprana. Con ello por fin

terminaba la gran controversia sobre el mecanismo de la concepción, se dejaba atrás la época descriptiva y se iniciaba la de la investigación fisiológica.

Waldeyer en 1870 fue el primero que estableció el concepto de que la hembra de mamíferos sexualmente madura posee un número finito de ovocitos que son utilizados a lo largo de toda la vida reproductiva. Sin embargo, la idea alternativa de que la generación de ovocitos es un proceso continuo a lo largo de toda la vida reproductiva en forma semejante a lo que ocurre en la espermatogénesis, prevaleció durante la primera mitad del siglo. No fue sino hasta los 50s en que se puso fin a esta idea y se aceptó la propuesta de Waldeyer esencialmente debido a los trabajos de Zuckerman et al. (2).

Goette en 1875 y Nussbaum en 1880 fueron los primeros en reconocer que las células germinales primordiales destinadas a dar origen a ovocitos se originaban de células indiferenciadas localizadas a alguna distancia y aparecían antes de la formación de las crestas genitales (1). La apreciación de la subsecuente organogénesis del ovario de mamífero se obtuvo inicialmente por los trabajos de Winiwater y Saintmont en 1919 y para los 20s ya existía una gran cantidad de información citológica acerca del desarrollo del ovocito (2).

La idea de que el ovario pudiera ser una glándula de secreción interna no había sido retomada desde Aristóteles hasta la época de Fabricius, Malpighi y de Graaf quienes se refirieron al cuerpo lúteo como una glándula. En 1898 Prenant confirma que el cuerpo lúteo es una glándula de secreción interna que libera sus productos directamente a la circulación.

El aislamiento e identificación de los estrógenos del folículo de Graaf fue realizado por Lataste (1886,1887) quien demostró cambios cíclicos en el epitelio vaginal de roedores que se correlacionaban con el estado de desarrollo folicular en los ovarios. Walter Haape en 1900 publica "Sexual Seasons" en el que define claramente las diferentes etapas del ciclo estral. Stockard y Papanicolau (1917) demostraron que era posible conocer la fase del ciclo estral a través de la observación citológica de frotis vaginales.

Allen y Doisy (1923) demostraron que el fluido folicular de puercos podía producir cómicificación del epitelio vaginal de ratas y ratones si se les inyectaba. Doisy lo purificó y encontró que era soluble en lípidos y lo llamó "theelin" del griego thelys que significa hembra y fue Currier quien le dio el nombre de folliculina, nombre que fue cambiado cuando Parkes en 1926 demostró que la hormona que producía el estro era elaborada por el tejido interfolicular aunque también posiblemente por el folículo en condiciones normales. Parkes y Bellery en 1926 propusieron el nombre de estrina. Poco después (1933) Doisy, Butenandt, Laquere y Marrian lograron aislar y caracterizar la estrona y el estradiol. En 1934 se aísla la progesterona en forma cristalina a partir del tejido luteal que fue llamada inicialmente luteosterona para describir su origen y estructura química, otros prefirieron llamarla progestina que describía su actividad biológica. Fue Parkes en 1962 quien estableció el nombre con el que se le conoce actualmente. A finales de los 30s se habían aislado, caracterizado y sintetizado los principales esteroides secretados por el ovario, el 17 β estradiol y la progesterona.

El gran avance en este campo contribuyó a que en 1953 Pincus y Chang hicieran a la píldora una realidad, quizá el descubrimiento científico en este campo que mayor impacto ha tenido para la humanidad (1,2).

Actualmente se sabe que el óvulo de mamíferos es el enlace entre una generación y la siguiente, ya que el cigoto hereda del óvulo una reserva extensiva de macromoléculas y organelos que apoyan los requerimientos nutricionales, de síntesis, energéticos y regulatorios del embrión temprano.

A pesar del avance que en el conocimiento sobre biología de la reproducción se tiene y a pesar de la gran cantidad de grupos de investigación que sobre el área están trabajando hay muchas incógnitas por resolver.

Desarrollo del ovario

De acuerdo al punto de vista más aceptado el desarrollo del ovario de los vertebrados se divide en cuatro fases principales:

1ª Fase.- las células germinales primordiales (Urkeimzellen) que se segregan temprano en el desarrollo, migran de sus sitios de origen y finalmente se establecen en engrosamientos bilaterales del epitelio celómico ventral, las crestas genitales.

2ª Fase.- ocurre después del arribo de las células germinales primordiales a las crestas y consiste en la proliferación de las células germinales y de las somáticas lo cual conduce a la formación del primordio gonadal que es idéntico para ambos sexos (gónada indiferenciada).

3ª Fase.- las gónadas se diferencian en corteza (periferia) y médula (centro) separadas por una túnica albugínea primaria. Las células germinales primordiales están inicialmente en posición periférica.

4ª Fase.- se inicia la diferenciación sexual que consiste en el desarrollo de la corteza y la involución de la médula para el caso de la diferenciación hacia ovario.

Origen y migración de las células germinales primordiales

El origen de las células germinales fue un tema altamente controvertido en el pasado, Waldeyer en 1870 sostenía que las células germinales se originaban durante el desarrollo embrionario por la proliferación del epitelio que cubre a las futuras gónadas, por lo que recibió el nombre de epitelio germinal. En 1880 Nussbaum propuso el origen extragonadal de las células germinales de ranas y tortugas (3) y en 1885 Weisman propuso la teoría de la continuidad del plasma germinal y consideró que las células

germinales se segregan antes de la formación del sistema de órganos del embrión estableciéndose con ello la teoría de la continuidad de la línea germinal (2). Actualmente, el origen extragonadal de las células germinales primordiales y su capacidad para llegar y entrar a las crestas genitales es un hecho perfectamente conocido. Numerosos experimentos en invertebrados y vertebrados han demostrado que ciertos componentes citoplásmicos especializados (Hegner 1914, Bourne 1939) llamados determinantes Keimbahn pueden ser marcados desde el huevo no segmentado y a través de las etapas del desarrollo hasta las gónadas del animal sexualmente maduro. Desde 1960 quedó plenamente establecido que los determinantes "Keimbahn" están presentes en el polo vegetativo del huevo de anfibio poco después de la fertilización y antes de la segmentación (Bourne 1931, 1935, 1939 y 1954). Estos determinantes son ricos en ribonucleoproteínas y ha sido demostrado por Blacker (1966) y Czolowska (1969) que si son destruidas por irradiación o microcirugía el organismo que se desarrolla (rana o sapo) va a carecer de células germinales y será estéril (4)

Las células germinales primordiales se derivan de células sexuales primitivas que se encuentran temprano en el desarrollo, tienen características distintivas como son su tamaño, el poseer un núcleo grande y redondo y varios nucleólos prominentes pero es en realidad a través de técnicas histoquímicas con las que se les puede identificar con mayor precisión ya que contienen enzimas específicas y sustancias como fosfatasa alcalina, glucógeno y esterases (4). Chiquione (1954), utilizando el método histoquímico de Gomori para fosfatasa alcalina, identificó en un embrión de ratón de 8.5 días a las células germinales primordiales esparcidas entre las células del extremo caudal de la línea primitiva, la raíz del mesodermo del alantoides y la esplancopleura del saco vitelino. En 1990, Geinsburg utilizando un método más sensible para detectar la actividad de la fosfatasa alcalina identificó a las células germinales primordiales en un embrión de ratón de 7 días como una agrupación de 8 células en el mesodermo extraembrionario, justo detrás del pedúnculo primitivo (5).

Las células germinales primordiales teñidas con fosfatasa alcalina han sido encontradas desde el momento en que son detectadas en la línea primitiva hasta que alcanzan la gónada (3).

Las células germinales primordiales fueron identificadas originalmente en el endodermo derivado del saco vitelino por la técnica de fosfatasa alcalina (6) pero diferentes estudios sugieren que las células tronco de las células germinales primordiales son de origen ectodérmico (7,8). Las células germinales primordiales residen en el epiblasto del macizo celular interno del blastocisto (9) y están restringidas a derivados del epiblasto de la línea primitiva anterior. Estudios sobre la inactivación del cromosoma X durante la embriogénesis del ratón sugieren que las líneas celulares somáticas están colocadas antes que las células germinales (10). Estudios con embriones marcados con retrovirus sugieren que la línea germinal se establece muy temprano quizá en la etapa de 4-8 células (11). La ruta migratoria de las células germinales primordiales desde el sitio extraembrionario es el mesodermo embrionario de la línea primitiva hacia el endodermo visceral del saco vitelino y al intestino posterior en desarrollo de donde las células germinales primordiales

migran hacia arriba a través del mesenterio dorsal y finalmente alcanzan las gónadas (4). En el embrión de ratón en el día 8 (4 pares de somitas) se han identificado de 15 a 100 células germinales primordiales. Estas grandes células (12 micrómetros de diámetro) se encuentran en el endodermo del saco vitelino y en la región del alantoides que se origina de la línea primitiva. Varias líneas de evidencia sugieren que el rudimento embrionario del alantoides y el extremo caudal de la línea primitiva pueden ser consideradas como regiones de formación de estas células. En este contexto se ha encontrado que el ectodermo primitivo, tomado de la región caudal de huevos cilindros de 7 a 7.5 días y cultivados *in vitro* se diferencian células que tienen las características de las células germinales primordiales (2).

El mecanismo por el cual las células germinales primordiales son conducidas hasta su destino final en las gónadas no ha sido totalmente aclarado (4).

Existen diferentes hipótesis para explicar los mecanismos por los cuales las células germinales primordiales llegan desde sus sitios de origen hasta su posición final en las crestas genitales. Son 4 los mecanismos conocidos actualmente:

- 1.- Activo que involucra movimientos ameboides.
- 2.- Pasivo por crecimiento diferencial de los tejidos que rodean a las células germinales primordiales.
- 3.- Pasivo vascular que considera que pueden ser transportadas por el flujo sanguíneo
- 4.- Atracción química o quimiotaxis.

Para el caso específico de los mamíferos el transporte pasivo a través del flujo sanguíneo ha quedado descartado limitándose éste a las aves y reptiles (4) y presentándose probablemente en algunos mamíferos como vaca, cerdo, borrego y cabra lo cual permitiría el intercambio de células germinales primordiales entre gemelos no idénticos en los que se fusiona la circulación placentaria antes de que las células germinales primordiales lleguen al primordio gonadal formándose así las quimeras. Sin embargo la idea que prevalece es que el transporte de las células germinales primordiales por vía sanguínea en mamíferos es accidental (3).

En cuanto a la posibilidad de un transporte activo de las células germinales, la presencia de pseudópodos en las células germinales primordiales (12) apoya fuertemente la posibilidad de esta forma de migración. Hay gran cantidad de trabajos que apoyan este punto de vista, se ha demostrado que en presencia de gel de colágena con fibronectina tridimensional las células germinales primordiales se elongan y translocan por contracción citoplásmica. Estudios *in vivo* que revelan que las células germinales primordiales colocadas en monocapas celulares presentan un comportamiento locomotor de alguna manera diferente al de las células ameboides, éstas se elongan con pseudópodos y filopodios y frecuentemente con una lámina conductora lo cual indica una locomoción direccional. Se sabe que a partir del día 10 las células germinales de ratón adquieren características de células locomotoras y se ha visto que pasan a través de la lámina basal del epitelio del intestino hacia el mesenterio dorsal enviando pseudópodos y migran si se les pone en cultivo (5).

La migración orientada hacia las gónadas que en un principio pareció poco probable está siendo comprobada por una serie de experimentos que han demostrado la presencia de fibronectina en el camino migratorio de las células germinales primordiales estimulando su migración (13). Estudios *in vitro* han demostrado que la capacidad de locomoción se ve incrementada cuando se agrega fibronectina al sustrato en el que se cultiva estas células (5). Se sabe que la fibronectina aporta la sustancia adhesiva que necesitan las células germinales primordiales para su migración. Estudios histoquímicos han demostrado la presencia de grandes acumulaciones de fibronectina a lo largo de la ruta de migración. Al aislar células germinales primordiales de los mesenterios dorsales de embriones de ratón de 10.5 días postcoito, el 30% de ellas fueron capaces de adherirse a cajas de cultivo cubiertas con fibronectina de plasma de bovino. Este bajo nivel de adhesión es óptimo para células migratorias que deben ser capaces de moverse dentro de una red fibrilar densa que contiene fibronectina. Unos días después de haber llegado a las crestas genitales las células germinales primordiales pierden completamente su habilidad para adherirse a la fibronectina. La adhesividad de estas células a la fibronectina parece ser un proceso regulado en el desarrollo. De igual manera se ha demostrado que las células germinales se adhieren a la fibronectina vía la integrina $\alpha 5 \text{ B}$ que reconoce la región de fibronectina arg-gly-asp-ser. Dolci encontró que existen 3 integrinas (A3B1, A5B1, A6B1) en células germinales primordiales de 12.5 y 15.5 días postcoito. Esta es la primera evidencia directa de que estas células expresan receptores de integrina y establecen un punto muy importante sobre el hecho de que la falta de adhesión de las células germinales primordiales postmigratorias a la fibronectina no se debe a la ausencia del receptor a integrina. Falta por investigar por qué las células germinales primordiales poseen gran cantidad de integrinas y cuál es la función de cada una de ellas. Un segundo papel de la fibronectina parece ser el de estimular la motilidad de las células germinales primordiales; como se ha demostrado en cultivo de tejido de estas células en monocapas celulares sobre las que migran aumentando esta capacidad al agregársele fibronectina (14). La interpolación de estos resultados puede sugerir que las múltiples señales de las moléculas de la matriz extracelular y/o de las células que las rodean, son necesarias para estimular la migración de las células germinales primordiales *in vivo* a lo largo del camino de fibronectina la cual debe ser presentada a las células germinales primordiales con una conformación espacial precisa (5).

Durante la migración, las células germinales primordiales de la rata poseen un glicoconjugado de superficie único con α -N-acetilgalactosamina que se pierde al arribar a las gónadas (16). En el ratón se ha detectado que este glicoconjugado es ligeramente diferente lo cual implica una diferencia entre géneros en la cubierta de migración de las células germinales primordiales. Estas cubiertas de glicoconjugados específicos pueden ser importantes en el reconocimiento y guía de la migración (4).

Otro mecanismo para su transporte puede ser una translocación pasiva durante los arreglos morfogénicos de los tejidos en desarrollo (invaginación del intestino posterior) y finalmente también es posible que las células germinales primordiales sean atraídas por sustancias quimiotácticas producidas por las gónadas. Rogulska (17) demostró que este attractante parece no ser clase específico ya que cuando se transplantan fragmentos de

intestino posterior que contienen células germinales primordiales de ratón a la cavidad celómica de un embrión de pollo, algunas de las células germinales primordiales de ratón se establecen en o cerca de las gónadas del huésped (3,4). En cultivo las crestas genitales ejercen un efecto de atracción sobre las células germinales primordiales, esto parece estar mediado por el factor de crecimiento transformante $\beta 1$ (TGF- β 1) que también inhibe la proliferación de las células germinales primordiales *in vitro* (18).

La especificidad de los tiempos y la ruta de migración sugieren que el proceso de migración se lleva a cabo por la suma de mecanismos de transporte.

Durante la fase de migración las células germinales se multiplican por mitosis, en el caso del ratón de 15 a 100 células que se encuentran en el día 8 postcoito a los 9 días encuentran 170 a 350 , a los 11 a 12 días hay 500 y a los 13-14 días hay mas de 2000 en las crestas genitales totalmente colonizadas (se cree que se dividen 7 a 8 veces durante un período de 4 días de migración). Las células germinales primordiales proliferan solo 2 a 3 días después de haber llegado a las crestas genitales y menos del 1% presentan fase S en embriones de 16 a 17 días (2).

Es importante señalar que desde la etapa de migración puede ser reconocido el sexo de las células germinales primordiales a través de la presencia del corpúsculo de Barr que representa un cromosoma X inactivo. En hembras de ratón la inactivación es preferencialmente del cromosoma X paterno en las membranas extraembrionarias, mientras que la actividad del cromosoma X en el tejido embrionario cambia durante el desarrollo embrionario encendiendo o apagando la actividad del cromosoma X paterno o materno (19). En las células germinales femeninas uno de los cromosomas X también se inactiva durante la migración, pero se reactivan al llegar al primordio gonadal (20). En las ovogonias de humanos y ratón solo un cromosoma X es activo (21,22) pero la reactivación ocurre cuando las células germinales entran en leptótena de la primera profase meiótica (23). Hay evidencia que indica que la metilación del DNA está correlacionada con el mantenimiento de la inactivación de los genes sobre el cromosoma X inactivo en tejidos somáticos adultos de hembras (24). En las células germinales primordiales de la hembra el cromosoma X inactivo escapa de la metilación lo que puede explicar la posterior activación en meiosis (25,26). Los cromosomas X permanecen activos durante el crecimiento y la maduración del ovocito(3).

Diferenciación de la gónada

Waldeyer (1870) y Balfour (1878) propusieron hace mas de un siglo que la masa central de la gónada se originaba en el mesonefros, sin embargo esta idea fue abandonada hasta que Witschi (1931,1951) llegó a la misma conclusión estudiando anfibios y mamíferos. En diferentes especies (ratón, bovino, humano, borrego y conejo) se han observado corrientes celulares que conectan la gónada con el tejido mesonefrico, estas células son la *rete ovarii*. De igual manera numerosos experimentos han demostrado que el mesonefros influye en el desarrollo y función gonadal y la diferenciación de las células germinales. Cuando los ovarios indiferenciados de ratón son despojados de los tejidos mesonefricos,

es decir de la *rete ovarii*, se evita la diferenciación ovárica y la meiosis (27). El mesonefros parece ser crucial no solo para el desarrollo gonadal sino también para la formación de la corteza suprarrenal (28).

La gónada temprana indiferenciada está formada por un tejido mesenquimal laxo cubierto por el epitelio celómico y sostenido por el tejido mesonefrico en desarrollo. Las células mesenquimales pueden ser reconocidas a lo largo de todo el desarrollo en ambos sexos ya que en etapas muy tempranas del desarrollo son invadidas por capilares (29). En cuanto a su inervación, la información es limitada pero se sabe que sigue a la irrigación. El epitelio que cubre las gónadas es llamado epitelio germinal, antes de que tenga lugar la diferenciación sexual gonadal no hay separación completa del epitelio y los tejidos subyacentes ya que la lámina basal no está intacta. La capa de epitelio consiste de células pleomórficas en proliferación que en ciertos lugares tienen apariencia cilíndrica. Las células germinales primordiales probablemente en proceso de migración frecuentemente son contenidas en el epitelio (31). Durante la diferenciación sexual gonadal el epitelio celómico que cubre las gónadas se desarrolla diferencialmente en los dos sexos. En la hembra la lámina basal del epitelio celómico se completa mucho antes en el desarrollo. Como consecuencia, el epitelio permanece en algunos lugares en contacto con las células germinales subyacentes. Las células germinales primordiales se pueden ver dentro del epitelio mucho tiempo después de que se ha iniciado la diferenciación gonadal. Se ha encontrado también un tipo celular semejante a linfocitos en las gónadas indiferenciadas en ambos sexos y en diferentes especies. Son células redondas que contienen muchos ribosomas, retículo endoplásmico esparcido y un núcleo relativamente pequeño, frecuentemente esférico con cromatina periférica densa. Pueden estar aisladas o formar agregados situados cerca de las células germinales primordiales. En el ratón desaparecen la primera semana después del nacimiento. No se conoce la función de estas células.

La gónada en desarrollo frecuentemente contiene células germinales en cordones o grupos que no solo están conectadas al mesonefros en la parte basal de la gónada (32) sino también al epitelio superficial como es el caso de humano y rata. Estas observaciones dieron apoyo a la idea de que el epitelio superficial prolifera hacia abajo y/o las células mesonefricas se mueven hacia arriba entre las células germinales, dando lugar a los linajes de células de soporte o células de la granulosa (33). Byskov (1978) y Wartenberg (1978) propusieron un origen dual de las células de la granulosa, del mesonefros y del epitelio superficial. De hecho las células de la granulosa y las de Sertoli presentan muchas características funcionales y estructurales que apoyan su origen común, son de tipo epitelial encerradas en un compartimento específico de células germinales, están dotadas de un equipo para producción de esteroides, poseen receptores para los mismos estímulos (gonadotropinas y factores de crecimiento), secretan inhibina en colaboración con FSH (hormona folículo estimulante), son capaces de expresar la hormona antimülleriana responsable de la regresión del conducto de Müller en el macho en patrones temporales diferentes (34, 35). Ni las células de Sertoli ni las de la granulosa son positivas a la reacción de NCAM (neural cell adhesion molecule) en etapas tempranas, mientras que las de folículos mas grandes, sí (36). Durante el crecimiento y

diferenciación de los folículos muchas características de las células de la granulosa cambian.

En el ratón y otros mamíferos en los que el mesonefros es pequeño y no funcional, las células mesonefricas parecen participar en la formación gonadal antes de la diferenciación sexual gonadal (37). Es posible que el grado y tiempo de migración de las células somáticas a la gónada en desarrollo dependa del estado funcional del mesonefros en esas especies. Si las células de soporte se originan de tipos celulares iguales o diferentes puede ser importante para entender la diferenciación sexual de la gónada (3).

Diferenciación sexual de la gónada

La diferenciación sexual en los mamíferos euterios es un proceso secuencial que se inicia con el establecimiento del sexo cromosómico en el momento de la fertilización seguida por el desarrollo del sexo gonadal y culminando con la formación de los fenotipos sexuales. Cada paso en este proceso es dependiente del anterior. Se sabe que la presencia de los dos cromosomas X es una condición indispensable para el desarrollo normal del ovario.

La cresta genital carece de células germinales y consiste de un epitelio superficial y un mesénquima subyacente. Hay controversia en relación al origen de las células somáticas de la futura corteza ovárica. La hipótesis de Witschi (1948) sostiene que el epitelio celómico da lugar a los elementos somáticos mientras que Byskov y Hoyer (1988) sostiene que el blastema mesonefrico hace la principal contribución a las células somáticas. De acuerdo a esta última hipótesis, los túbulos de la rete del mesonefros penetran al mesénquima subyacente para formar los cordones primitivos que van a rodear a las células germinales invasoras y dar lugar a los folículos ováricos (38).

El sexo gonadal de los mamíferos está normalmente determinado por el sexo genético (39). En 1959 se encontró que en mamíferos el cromosoma Y estaba asociado a la formación del testículo (40). A partir de entonces muchos estudios han demostrado que los cromosomas Y llevan la secuencia que se conoce como TDF (testis determining factor) o gene determinante de testículo en humanos TDY o Tdy en ratones (41, 42). En 1966 el TDY se localizó en el brazo corto del cromosoma Y y después se propuso que la sustancia determinante del testículo en el brazo corto podía ser idéntica al antígeno masculino H-Y independientemente del cariotipo y de hecho casi todos los mamíferos que poseen testículo son positivos a H-Y independientemente del cariotipo (43). Actualmente se sabe que el antígeno Y no juega un papel principal en la determinación sexual. Los genes H-Y y TDY se mapean en diferentes porciones del cromosoma Y (44). Actualmente se cree que en la determinación sexual masculina que se encuentra en el cromosoma Y participa en forma importante el gene llamado SRY (sex determining region Y) en humanos y Sry en ratones (45, 46). De hecho se cree que este es el gene que funciona como interruptor para dirigir la expresión de una cascada genética que da por resultado el desarrollo testicular. Aún cuando este gene fue localizado en el

cromosoma Y, un mínimo de 19 genes, algunos autosómicos y otros en el cromosoma X, han sido implicados en la diferenciación sexual.

Se ha propuesto que además del o de los genes determinantes del testículo que se encuentran en el cromosoma Y y los genes autosómicos necesarios para la diferenciación a testículo, los genes determinantes de ovario son esenciales para la embriogénesis del ovario (47). También se ha postulado la existencia de genes determinantes de ovario y de acuerdo a ello los genes determinantes de testículo son activados antes y neutralizan a los genes determinantes de ovario, como los individuos XX carecen del gene determinante de testículo, los genes determinantes de ovario son libres para actuar (48,49).

En ausencia de los genes determinantes del sexo masculino, la diferenciación gonadal podrá proseguir para ovario, diferenciación que para el caso de los mamíferos no puede ser alterada por efectos hormonales. La diferenciación de las gónadas es como la de la mayoría de otros órganos, el resultado de una serie de eventos interpuestos que entre otros incluye la interacción célula-célula, proliferación celular, inhibición de crecimiento, muerte celular programada y promoción de tipos celulares seleccionados. La influencia específica de uno de estos eventos puede alterar la estructura y función de la gónada de los mamíferos pero no le va a modificar el sexo genético (3).

El primer signo de un dimorfismo sexual de las gónadas es el desarrollo de células de Sertoli primordiales y su agregación en cordones espermatogénicos. El ovario fetal no presenta características tempranas de desarrollo por lo que se podría identificar tempranamente por exclusión hasta que posteriormente las células primitivas de la granulosa se empiecen a organizar alrededor de los ovocitos en división para formar los folículos primordiales, o hasta el momento en que se identifique que la célula germinal ha iniciado el proceso de meiosis que ocurre tempranamente en las hembras.

Se sabe que la diferenciación de la gónada es totalmente independiente de la presencia o tipo de célula germinal. Ni la destrucción selectiva de las células germinales con drogas (50) ni la excisión quirúrgica (51) inhiben el desarrollo de la gónada. De ello se concluye que las células somáticas de la gónada primitiva se pueden organizar a ovario o a testículo con o sin células germinales primordiales (49).

La diferenciación endocrina del ovario se evidencia en algunas especies con el inicio de la capacidad de síntesis de estrógenos, sin embargo el papel de las hormonas femeninas en el desarrollo no está totalmente claro. La síntesis de estrógenos no parece ser esencial para el desarrollo normal del fenotipo femenino, los estrógenos pueden tener un papel en el desarrollo del ovario mismo (49).

Antes de que se inicie la diferenciación, la gónada indiferenciada contiene todos los tipos celulares que necesita para diferenciarse a testículo u ovario (Gillman 1948). La dirección del desarrollo futuro dependerá, como ya se mencionó, del sexo genético (Dodal 1960, Beatty 1960) y de factores ambientales internos y externos (4).

La gónada indiferenciada está compuesta por :

- 1.- tejido medular que dará origen a los cordones medulares del testículo
- 2.- tejido cortical formado por epitelio celómico que puede desarrollarse como cordones sexuales secundarios para formar el ovario
- 3.- mesénquima que contribuye a formar el resto de la gónada en ambos sexos (incluyendo el tejido techal e intersticial)
- 4.- células germinales primordiales que tienen un origen extragonadal y se desarrollarán a espermatogonias u ovogonias de acuerdo al sexo genético (4).

Es a partir de estas estructuras que se diferenciará el ovario, diferenciación que consiste esencialmente en la proliferación de la corteza y la regresión de la médula .

Diferenciación del ovario

Las etapas iniciales del desarrollo gonadal están caracterizadas por un engrosamiento del epitelio celómico localizado ventralmente sobre el mesonefros. En esta región, la lámina basal que está por debajo del epitelio es discontinua y la organización epitelial se empieza a hacer evidente. Se han detectado dos componentes estructurales, el epitelio y el estroma o tejido conjuntivo. La formación de los cordones epiteliales internos en la rata tiene lugar gradualmente como lo sugiere la presencia de una lámina basal incompleta y el contacto directo célula a célula entre las células epiteliales colocadas estrechamente y las células estromales dispuestas laxamente en las etapas tempranas. El mesonefros parece participar en la formación de las crestas genitales de rata. La lámina basal de algunos túbulos mesonéfricos se rompen inicialmente del lado del epitelio genital a medida que este empieza a engrosar. Posteriormente se hace continuo con la lámina basal de los cordones epiteliales internos y estas estructuras de alguna manera participan en la formación de la parte epitelial interna de la gónada. Aún cuando varias células de los túbulos mesonéfricos estén sufriendo degeneración, otros están proliferando y eventualmente se establecerá la conexión con los cordones epiteliales en crecimiento. La gónada femenina crece mas lentamente en comparación con el testículo y las diferencias no son solamente en la velocidad de crecimiento sino en la diferencia del proceso morfogénico del ovario en el que el volumen es aumentado por la proliferación de las células germinales primordiales y las somáticas epiteliales. Al principio del desarrollo del ovario la vascularización y la cantidad de tejido conjuntivo son escasos pero posteriormente el tejido epitelial sigue un patrón de organización similar al del testículo y se adquiere un arreglo en forma de cordones que a diferencia de los del testículo, mantienen su continuidad con el epitelio superficial y las células germinales primordiales pronto entran a la profase de la primera división meiótica. En la parte mas interna de la gónada femenina, las asociaciones entre algunos túbulos mesonéfricos y las formaciones epiteliales internas, persisten y formarán la *rete ovarii* (52).

El fenómeno de diferenciación gonadal se debe analizar desde el punto de vista de las interacciones epitelio estromales que eventualmente conducen al establecimiento del sexo gonadal de acuerdo a la constitución genética del organismo. Los procesos involucrados en la morfología gonadal pueden ser descritos como:

- 1.- proliferación de células epiteliales y estromales
- 2.- segregación del tejido epitelial y estromal por una lámina basal
- 3.- subdivisión de un componente epitelial en áreas internas y externas y el estroma que los rodea que conduce al establecimiento de un territorio androgénico y ginogénico
- 4.- eventos que conducen al antagonismo córtico-medular (52)

Después de llegar a la superficie del epitelio gonadal las células germinales primordiales se mueven hacia la corteza y junto con las células epiteliales de soporte dan lugar a los cordones sexuales corticales. Los componentes somáticos del ovario se originan del epitelio celómico y mesénquima de la pared dorsal del cuerpo y la contribución del mesonefros (2).

Patrones de diferenciación ovárica

Las líneas celulares somáticas que se derivan del mesonefros, epitelio celómico o mesénquima preexistente, pueblan la gónada junto con las células germinales invasoras, antes de que tenga lugar la diferenciación sexual morfológica.

Hay dos patrones de diferenciación, dependiendo de si las células germinales primordiales del ovario sufren meiosis inmediata sin la producción previa de esteroides o si llevan a cabo una meiosis retardada con secreción de esteroides antes de que se inicie la meiosis (53). En especies con meiosis inmediata (ratón, rata y hamster) las células germinales del ovario entran en la profase de la primera división meiótica simultáneamente con, o poco después de, que el sexo gonadal pueda ser reconocido morfológicamente. Estos ovarios producen pocos o ningunos esteroides de novo, hasta que los folículos estén formados. En especies con meiosis retardada (puerco, borrego, perro y vaca) el inicio de la meiosis en la hembra se retarda hasta 45 días (vaca) con respecto a la diferenciación testicular, tales ovarios producen diferentes cantidades de esteroides durante el período de retraso. En especies con meiosis inmediata, el ovario aparece compacto cuando se inicia la meiosis en una etapa temprana de la diferenciación sexual. Las células germinales están distribuidas en forma uniforme, frecuentemente en racimos en todo el tejido ovárico (ratón y hamster) o en una región cortical básicamente bien definida (humanos). En especies con meiosis retardada, las células germinales son encerradas en cordones de células germinales durante el período de retraso. En algunas especies (puerco, gato, mink, borrego y vaca) los cordones de las células germinales están alineados con la lámina basal y claramente definidos del mesénquima laxo que los rodea. Los cordones tienen forma irregular y están empacados estrechamente con células somáticas y germinales. Al final del período de retraso los cordones celulares empiezan a romperse en la parte central del

ovario cerca de los cordones celulares mesonéfricos intraováricos (*rete ovarii*). Este proceso está relacionado con el inicio de la meiosis. El desarrollo del ovario fetal humano, representa un ejemplo transitorio entre la meiosis inmediata y retardada. Aún cuando hay un período de retraso de dos a tres semanas hay poca o ninguna síntesis de novo de esteroides. Los cordones celulares mesonéfricos intraováricos ocupan la médula antes de que se inicie la meiosis y las células germinales localizadas corticalmente están confinadas a cordones (4).

Ovogénesis

La ovogénesis estrictamente hablando es la formación, desarrollo y maduración de los gametos femeninos, comienza durante el período embrionario y termina de meses a años después en el individuo sexualmente maduro. Este proceso da por resultado la formación de células capaces de dar origen a nuevos individuos que expresan y mantienen las características de la especie.

Tradicionalmente la ovogénesis se ha dividido en:

- 1.- Proliferación
- 2.- Crecimiento
- 3.- Maduración

La proliferación ocurre en la mayoría de los mamíferos solo en la etapa fetal y consiste en la multiplicación mitótica de las ovogonias, concluye con la suspensión de estas divisiones, la entrada a la meiosis y su detención en la profase I (dictiótenua).

El crecimiento se lleva a cabo en los ovocitos primarios que están detenidos en la dictiótenua de la meiosis, implica la síntesis de gran cantidad de macromoléculas y organelos que en diferente grado apoyan los requerimientos nutricionales, de síntesis, energéticos y regulatorios que serán utilizados por el embrión durante el desarrollo temprano.

La maduración consiste en el reinicio de la meiosis, la culminación de la primera división para obtener ovocitos secundarios y la expulsión del primer corpúsculo polar y la continuación de la meiosis hasta su nuevo detenimiento en la metafase II y finalmente la ovulación o la atresia.

El proceso de ovogénesis en mamíferos incluye varios pasos importantes como son:

- 1.- Presencia de células germinales primordiales de origen extragonadal
- 2.- Migración de las células germinales primordiales a los primordios de las gónadas
- 3.- Diferenciación sexual de las células germinales
- 4.- Cesación de la mitosis (ovogonias) e iniciación de la meiosis (ovocitos)

- 5.- Detenimiento de la meiosis en la fase de dictiótenua
- 6.- Crecimiento del ovocito
- 7.- Reinicio de la meiosis (maduración meiótica) y ovulación
- 8.- Término de la meiosis en respuesta a la fertilización (54)

Desde la aparición de las células germinales primordiales durante el desarrollo fetal hasta la ovulación de los huevos no fertilizados en adultos sexualmente maduros, la ovogénesis representa uno de los procesos más altamente especializados y biológicamente regulados. La obtención de un ovario funcional depende de que se lleven a cabo exitosamente tres eventos principales durante las etapas tempranas de la embriogénesis: el inicio de la meiosis, el encierro de las células germinales en compartimentos esféricos y la diferenciación de las células productoras de esteroides.

Diferenciación de células germinales a ovogonias

Después de que las células germinales primordiales invaden la gónada y alcanzan la superficie del epitelio gonadal se mueven hacia la corteza y proliferan intensamente aumentando en forma impresionante su número y junto con las células epiteliales de soporte dan lugar a los cordones sexuales corticales (55). Los componentes somáticos del ovario se originan del epitelio celómico y mesénquima de la pared dorsal del cuerpo, y el mesonefros probablemente también hace una contribución. En el embrión de ratón de 13 días (52-60 somitas) que contiene un ovario diferenciado, la migración se ha completado con todas las células germinales primordiales convertidas a ovogonias que se dividen activamente en los cordones sexuales. Las ovogonias presentan una morfología característica (incluyendo la presencia de puentes intercelulares que conectan células adyacentes) y una alta frecuencia de divisiones mitóticas (2), divisiones que continuarán hasta que entren a la meiosis. La velocidad de mitosis durante el tiempo que precede a la meiosis varía entre especies. En especies con meiosis retardada la actividad mitótica es baja durante la mayor parte del periodo de retardo pero aumenta rápidamente poco antes de que se inicie la meiosis (56). En especies en las que la meiosis empieza poco después de la diferenciación sexual gonadal, el periodo de actividad baja, o es muy corto (rata) o no existe (ratón) y la meiosis se introduce por una serie de divisiones mitóticas poco después de la diferenciación sexual gonadal (57). Frecuentemente grupos de células germinales se dividen en forma sincrónica y la misma sincronía se presenta a través de la meiosis (58, 59). Las células germinales de tales grupos están conectadas por puentes intercelulares y se ha propuesto que una sola célula tronco da origen a esos grupos de células germinales. Los puentes pueden servir para la transferencia de diferentes sustancias (productos génicos) (60). Este tipo celular es el que va a llevar a cabo la síntesis premeiótica de DNA el cual persiste a través de toda la vida del ovocito hasta la fertilización o la atresia. No hay neoformación de DNA en los ovocitos después de que entran a la meiosis. Es importante señalar que la fase premeiótica es la más sensible y esta sensibilidad disminuye a medida que avanza la meiosis (3).

Diferenciación de ovogonias a ovocitos

Una de las características fundamentales del paso de ovogonias o ovocitos es que las primeras dejan de dividirse y entran a la meiosis deteniéndose en diplótena, convirtiéndose así en ovocitos primarios. Esta conversión depende del contacto con las células derivadas de la *rete ovarii*, que son de origen mesonefrico (53). Las primeras células que entran a la meiosis están localizadas en el borde interno del ovario, donde las interacciones entre las células somáticas y las germinales ocurre primero. Se ha postulado que las células mesonefricas producen una sustancia inductora de la meiosis ya que cuando se cultivan ovarios fetales de ratón con o sin mesonefros se observa que si la separación del ovario se llevó a cabo lo suficientemente temprano, el ovario carece de folículos y la meiosis está bloqueada. No se conoce la naturaleza de la sustancia inductora pero evidentemente involucra sistemas de segundo mensajero (61).

Se cree que son factores derivados localmente los que tienen mayor influencia en la inducción de la quiescencia de las células germinales después de entrar a las primeras etapas de la meiosis y dirigir a las células somáticas para que cesen de proliferar cuando quedan encerradas en los folículos primordiales. Hay experimentos que indican que las células somáticas son la fuente de una sustancia difusible que es responsable de que las células germinales dejen de dividirse e inicien la meiosis. Los factores que la detienen en diplótena han sido menos investigados.

El gran número de ovocitos que se pierde por atresia durante la foliculogénesis temprana parece involucrar a aquellos que fracasan en detenerse en diplótena hacia diacinesis y por lo tanto degeneran. Se ha planteado la hipótesis de que el contacto con las células somáticas que lo rodean es necesario para evitar que se complete la meiosis y por ello el factor que determina la sobrevivencia de las células germinales puede ser el encierro dentro de los folículos (62).

En el día 12 de la embriogénesis pocas ovogonias (5%) entran a la fase de preleptótena y después a la leptótena. Una vez que se inicia la profase meiótica, aparentemente no hay requerimientos endócrinos para continuar la meiosis. Es durante la preleptótena (interfase que sigue a la última división mitótica) que tiene lugar la última replicación de DNA en preparación para la meiosis. Esta actividad de síntesis señala la transformación de ovogonia a ovocito. Es posible que un factor que se origine en la *rete ovarii* o simplemente el contacto con la *rete ovarii* induzca a la ovogonia a entrar a la meiosis. En el embrión de ratón de 14 días (61-62 pares de somitas) la población de células germinales está dividida igualmente entre ovogonias y ovocitos y el día 17 el ovario contiene sólo ovocitos en diferentes etapas de la profase de la primera división meiótica (63). Los ovocitos progresan por la leptótena en 3-6 horas y después les toma de 12-40 horas completar la cigótena. Durante la cigótena los cromosomas homólogos se aparean y se unen por sinapsis para formar lo que parece ser un solo cromosoma pero que en realidad es un bivalente compuesto por 4 cromátidas. En el embrión de 16 días casi todos los ovocitos están en paquítena, etapa que dura cerca de 60 horas e involucra el intercambio genético. Por ello toma aproximadamente 4 días completar la progresión nuclear de leptótena a paquítena. El día 18 los primeros ovocitos están en diplótena con

sus cromosomas mostrando quiasmas que resultan del intercambio genético. Al nacimiento, la mayoría de los ovocitos han entrado a la diploténa tardía mejor conocida como dictiótenua y el 5º día postparto casi todos los ovocitos han alcanzado la fase de dictiótenua en la que permanecerán hasta que sean estimulados para reiniciar la meiosis una vez alcanzada la madurez sexual (2).

Poco después del nacimiento el ovario está poblado por aproximadamente 8000 ovocitos detenidos en la meiosis y encerrados en varias células foliculares escamosas, aproximadamente el 50% de los ovocitos se pierden durante las primeras dos semanas posteriores al nacimiento y esto es atribuible en gran medida a ovocitos que dejan el ovario a través del epitelio superficial. Durante este mismo periodo un número de ovocitos empiezan a crecer (5%). El inicio del crecimiento del ovocito está aparentemente regulado dentro del ovario, siendo el número de ovocitos que entran a la fase de crecimiento una función del tamaño del "pool" de ovocitos sin crecimiento (64).

Los ovocitos y sus células foliculares crecen en coordinación progresando a través de una serie de etapas morfológicas (65). En ratones sexualmente maduros, los ovocitos completan el crecimiento antes de la formación del antro folicular; consecuentemente la mayoría del crecimiento del folículo ocurre después de que el ovocito ha dejado de crecer. El crecimiento es continuo terminando en la ovulación del ovocito maduro o en la degeneración (atresia) del ovocito y su folículo. El completar el crecimiento del ovocito toma en ratón 2 a 3 semanas un periodo relativamente corto en comparación de los meses o años requeridos para el crecimiento en algunas especies de no mamíferos. Durante la fase de crecimiento, estando detenido en la fase de dictiótenua el ovocito aumenta 300 veces su volumen y se convierte en una de las células más grandes del organismo. Cada ovocito está contenido en un folículo que crece junto con éste, presentando un aumento de una sola capa de células aplanadas a tres capas de células cuboidales para cuando el ovocito ha completado su crecimiento (66,67). Cuando el folículo está constituido por dos capas de células de la granulosa, se diferencia la teca, separada de éstas por una membrana basal. Durante un periodo de varios días, mientras el ovocito se mantiene de un tamaño constante, las células foliculares sufren rápidas divisiones aumentado a más de 50000 células. El folículo presenta un antro incipiente de varias capas de grosor y a medida que el antro se expande el ovocito toma una posición acéntrica rodeado por dos o más capas de células de la granulosa. La capa más interna se hace columnar y constituye la corona radiada, estas células forman uniones intercelulares especializadas llamadas uniones "gap" con el oolema, este ovocito totalmente crecido recibe el nombre de ovocito primario.

Los ovocitos primarios totalmente crecidos en los folículos de Graaf reasumen la meiosis y completan la primera división reductiva justo antes de la ovulación. Este reinicio puede ser mediado por estímulos hormonales *in vivo* o por la liberación de los ovocitos de sus folículos en un medio adecuado *in vitro*. Los ovocitos sufren la progresión nuclear de dictiótenua a metafase II recibiendo el nombre de ovocitos secundarios. Permanecen en esta fase en el oviducto o en cultivo hasta que son estimulados para completar la meiosis ya sea por la fertilización o la activación partenogenética. La progresión de dictiótenua a metafase II se llama maduración meiótica y se caracteriza por la disolución de la

membrana nuclear del ovocito (vesícula germinal), condensación de la cromatina en diferentes bivalentes, separación de los cromosomas homólogos, emisión del primer corpúsculo polar y detenimiento de la meiosis con los cromosomas alineados en la metafase II. Estos ovocitos completan su meiosis con la separación de las cromátidas y emisión del segundo corpúsculo polar en la fertilización (2).

Crecimiento del ovocito

Durante toda la vida reproductiva de los mamíferos los ovarios contienen "pools" de ovocitos: en crecimiento y en no crecimiento detenidos en dictiótenua. Solo los ovocitos totalmente crecidos reasumen la meiosis y son ovulados durante cada ciclo reproductivo. El reclutamiento de ovocitos del "pool" de crecimiento está aparentemente bajo el control de las gonadotropinas, aún cuando el crecimiento del ovocito sin desarrollo folicular ocurre en animales hipofisectomizados y en cultivo *in vitro* en ausencia de hormonas. El considerable aumento de tamaño que sufre la célula es indicador de un intenso periodo de actividad metabólica que a su vez se refleja en marcados cambios en la ultraestructura del ovocito incluyendo la biogénesis de algunos organelos. Por ejemplo los gránulos corticales y la zona pelúcida, ambos involucrados en regular la fertilización aparecen en el ovocito durante el periodo de crecimiento.

El primer signo de crecimiento se identifica no en el ovocito sino en las células de la granulosa que lo rodean ya que éstas empiezan a multiplicarse (62).

Posteriormente el núcleo o vesícula germinal de los ovocitos en crecimiento incrementa su diámetro y consecuentemente el crecimiento de los ovocitos da un marcado cambio en la relación de volumen citoplásmico y nucleoplásmico aumentando de 8:1 en ovocitos pequeños a cerca de 64:1 en ovocitos totalmente crecidos. Concomitantemente con el aumento de tamaño del núcleo, el nucleólo y los cuerpos extranucleolares sufren cambios ultraestructurales progresivos mientras que los cromosomas permanecen como bivalentes altamente difusos. Una vez que se ha completado el crecimiento la cromatina asume una apariencia más condensada, especialmente en la cercanía del nucleólo. Esta transformación en la organización de la cromatina se caracteriza por una envoltura progresiva del nucleólo por la heterocromatina. El cambio en la mayoría de los mamíferos empieza poco después de la formación del antro (68, 69).

A lo largo de todo el crecimiento el nucleólo aumenta de diámetro. Este agrandamiento es acompañado por cambios progresivos en la estructura nucleolar fina indicadora de un periodo de una intensa síntesis de RNAr. El nucleólo sufre una transición durante el crecimiento del ovocito de difuso a reticulado compuesto primariamente por una red fibrogranular (ovocitos pequeños) a una masa densa, exclusivamente fibrilar (ovocitos totalmente crecidos) (70).

Durante el crecimiento hay un aumento importante en el número de mitocondrias y marcados cambios ultraestructurales. Los ovocitos pequeños contienen mitocondrias elongadas con numerosas crestas orientadas transversalmente en la configuración típica y en la mayoría de los casos contienen una sola vacuola. El crecimiento continuado del ovocito se acompaña por la acumulación de mitocondrias redondas que están vacuoladas

y empiezan a presentar crestas arqueadas en forma columnar. Durante todo el periodo de crecimiento las mitocondrias están estrechamente asociadas con retículo endoplásmico liso e incrementan gradualmente su número, muchas de ellas en forma de pesa, lo cual indica un crecimiento mitocondrial extensivo. Los ovocitos totalmente crecidos contienen mitocondrias redondas u ovales, altamente vacuoladas que han arqueado y arreglado concéntricamente sus crestas. Por lo tanto, la morfología de las mitocondrias de los ovocitos totalmente crecidos es radicalmente diferente de las mitocondrias de ovocitos que no están en crecimiento (71).

El aparato de Golgi también sufre grandes cambios, cambios que son indicadores de una gran actividad de esta estructura. En ovocitos pequeños las membranas de Golgi están en una pila aplanada de láminas arqueadas asociadas con pocas o ninguna vacuola o gránulos. Durante las primeras fases de crecimiento, las membranas de Golgi se hacen mas activas como lo evidencian las láminas que se espacian (hinchándose en las partes terminales) por la aparición de vacuolas y por la proximidad de numerosas vesículas de lípidos. De la mitad a la parte final del crecimiento del ovocito las membranas de Golgi presentan aumento en el número de lamelas apiladas muy dilatadas que están asociadas con numerosas vacuolas, gránulos, vesículas cubiertas y vesículas de lípidos. Estos cambios son consistentes con la participación aumentada del aparato de Golgi en el procesamiento y concentración de productos de secreción (glicoproteínas de la zona pelúcida y la formación de los gránulos corticales) (72).

En el ovocito los gránulos corticales son pequeños y esféricos unidos por membrana y se encuentran en la región cortical de los huevos no fertilizados semejanado lisosomas. Estos gránulos aparecen por primera vez durante el crecimiento del ovocito asociados con la expansión del aparato de Golgi que se ha movido a la región subcortical. Aunque no está totalmente claro que los gránulos corticales se deriven del aparato de Golgi cierta evidencia sugiere que hay una contribución de cuerpos multivesiculares al igual que del retículo endoplásmico granuloso. La población de gránulos es heterogénea con respecto a su contenido, algunos de ellos contienen arreglos cristalinos. No está claro si esta heterogeneidad en contenido refleja diferencias funcionales o simplemente diferentes grados de maduración de los gránulos (73).

La zona pelúcida, cubierta extracelular gruesa que rodea a los huevos de mamíferos, aparece durante el crecimiento del ovocito aumentando su grosor a medida que el ovocito aumenta su diámetro. Es permeable a grandes moléculas y a virus. Los componentes protéicos de la zona son sintetizados y secretados por el ovocito en crecimiento, representando la principal actividad metabólica del ovocito durante este periodo. La aparición del material de la zona pelúcida en el espacio perivitelino se correlaciona con la iniciación del crecimiento del ovocito, los ovocitos que no están en crecimiento no tienen zona pelúcida. En las etapas tempranas del crecimiento el material de la zona aparece como parches de filamentos finos entre el ovocito y las células foliculares. Estos filamentos son todos igual de anchos y de varios micrones de longitud y muestran una periodicidad estructural. A medida que avanza el crecimiento, la zona pelúcida se hace mas densa, hay una red densa y gruesa de filamentos interconectados que rodean totalmente al ovocito y lo separan de las células de la granulosa. El contacto

entre el ovocito y la capa mas interna de las células foliculares continúa vía los complejos de unión formados entre las microvellosidades del ovocito y las extensiones de las células foliculares que penetran la zona pelúcida. La zona es depositada durante el crecimiento en anticipación a su función durante la fertilización ya que contiene los receptores a espermatozoides (74).

El RNAr se acumula a medida que el ovocito crece lo cual está acorde con los cambios en la morfología nucleolar durante este período. Se ha estimado que el número de ribosomas presentes en el citoplasma aumenta 3 a 4 veces a medida que el diámetro del ovocito aumenta. El enorme cambio en el volumen del ovocito durante este período de crecimiento sugiere que la densidad de ribosomas (número de ribosomas por micrómetro cúbico de citoplasma) disminuye 10 veces. El número de ribosomas presentes en polisomas también se incrementa varias veces y el número de polisomas, que son abundantes en ovocitos pequeños, disminuye dramáticamente (menos de 10% del total) en los ovocitos grandes. Estos cambios en la población de ovocitos durante el crecimiento concuerdan con los cambios en las velocidades de síntesis de proteínas por ovocito que aumentan dramáticamente, la velocidad por picolitro de citoplasma disminuye durante el crecimiento (2).

En ovocitos totalmente crecidos y en ovocitos no fertilizados se encuentran estructuras semejantes a enrejados (placas, lamelas y arreglos fibrilares). En algunos casos los enrejados parecen agregados altamente ordenados de cadenas individuales. Las cadenas a su vez están compuestas por partículas que están conectadas por puentes dando lugar a una periodicidad. Las cadenas individuales están interconectadas de manera que los enrejados forman capas de hojas. La función de este componente citoplásmico no se conoce pero puede servir de vitelo o de una forma de almacenamiento de ribosomas ya que desaparece completamente durante la segmentación (75).

Una de las principales actividades durante el crecimiento es la síntesis de RNA ya que virtualmente todo el RNA se sintetiza durante este período. La síntesis de RNA y su acumulación muestran una cinética bifásica con respecto al volumen del ovocito. Durante las fases temprana y media, los cambios en la estructura nucleolar y en los niveles de actividad de RNA polimerasa son consistentes con las altas cantidades de DNA ribosomal. La velocidad de síntesis de RNA durante este período es alta con respecto a algunas células somáticas. Cuando los ovocitos han crecido tres cuartas partes de su volumen final contienen casi la misma cantidad de RNA que los ovocitos totalmente crecidos (76). Se puede decir que el aumento total es de 300 veces en RNA lo que concuerda con cambios nucleares y tamaños nucleolares al igual que con niveles de síntesis durante este período. El RNA se sigue sintetizando en ovocitos totalmente crecidos aunque a menor velocidad comparada con la etapa de la mitad del crecimiento y declina a niveles escasamente detectables después del inicio de la maduración meiótica (2).

Otra de las actividades esenciales durante esta fase es la síntesis de proteínas, son las mismas proteínas las que se sintetizan durante todo el crecimiento pero a diferentes velocidades relativas y en diferentes tiempos. Cuando el ovocito ha crecido 300 veces hay un aumento en el tamaño del "pool" de metionina de 0.16 a 56 fmole/ovocito. El "pool"

total de metionina sirve como precursor de la síntesis de proteínas que aumenta alrededor de 38 veces. Usando valores absolutos, solo la mitad de la proteína presente en el ovocito totalmente crecido puede ser considerada como sintetizada durante el crecimiento. Para el caso de los ovocitos que crecieron *in vivo*, los valores absolutos de síntesis de proteínas pueden ser sustancialmente más altos. La presencia de componentes semejantes a vitelo deben ser considerados ya que el ovocito de mamífero tiene la capacidad de acumular este componente a partir de la sangre. Los ovocitos sintetizan durante esta etapa varias proteínas codificadas por el genoma mitocondrial, esta síntesis representa del 1 al 2% de la síntesis total, y son las mismas proteínas las que se sintetizan aún durante la transformación morfológica de las mitocondrias (77). La síntesis de las proteínas ribosomales ocurre a diferentes velocidades durante todo el crecimiento, representa el 1.5% y da lugar a una acumulación que refleja el gran número de ribosomas ensamblados durante esta etapa.

La síntesis de las glicoproteínas de la zona pelúcida así como su secreción ocurren en esta fase y representa el 5 al 10% de la síntesis total, estas glicoproteínas de la zona pelúcida representan la principal clase de proteínas glucosiladas y entre ellas se encuentra la ZP3 que funciona como receptor de espermatozoides y como inductor de la reacción acrosomal durante la fertilización (78).

Las histonas H2A, H2B, H3 y H4 representan el 0.2 a 0.3% de la síntesis total siendo la de la H4 el 0.05 a 0.07%.

La síntesis de tubulina, principalmente la de las subunidades α y β que son las más abundantes, representa el 1.5 a 2% de la total y se cree que es utilizada para formar los husos relativamente grandes que se observan durante la maduración meiótica (79).

Un 1% de la síntesis es de la actina que ocurre durante toda la fase de crecimiento. La distribución entre α (tipo músculo) β (citoplásmica) y γ (citoplásmica) es de 5, 8 y 15% respectivamente.

La calmodulina es sintetizada y acumulada durante el crecimiento, representa el 0.3% y ocurre a una velocidad desconocida.

No se conocen las velocidades de síntesis de la creatinquinasa pero se sabe que representa el 1.4%, cantidad que probablemente es utilizada para mantener altos los niveles de ATP en los ovocitos totalmente crecidos. Tampoco se conocen las velocidades de síntesis de la glucosa 6 fosfato deshidrogenasa ya que su actividad específica permanece constante durante todo el período de crecimiento. La gran cantidad almacenada se requiere para producir equivalentes de NADPH reductores.

La síntesis de ciertas proteínas está regulada de una forma postranscripcional como es el caso de las proteínas de fertilización, el RNA de estas proteínas es sintetizado durante todo el crecimiento pero se traduce a velocidades extremadamente bajas. Es después de la fertilización cuando esta clase de proteínas es sintetizada a grandes velocidades utilizando el RNAm transcrito días o semanas antes durante el crecimiento del ovocito (2).

Maduración del ovocito

El proceso de maduración consiste en la conversión del ovocito primario (totalmente crecido presente en folículos antrales) en ovocito secundario que será liberado en la metafase de la segunda división meiótica para su fecundación. Este evento que *in vivo* es regulado por LH implica el rompimiento de la vesícula germinal, la formación del huso de la metafase I, el movimiento del huso hacia la corteza del ovocito, la separación de los cromosomas homólogos con la formación del primer corpúsculo polar y el detenimiento en la metafase II dentro del folículo preovulatorio.

La maduración meiótica, también llamada proceso de maduración, involucra importantes cambios metabólicos necesarios para la activación del huevo en la fertilización ya que solo los ovocitos que han madurado meióticamente pueden ser fertilizados. Cabe señalar que los ovocitos primarios totalmente crecidos maduran espontáneamente.

El momento en que las células germinales entran al proceso meiótico varía entre sexos y especies. Como ya se mencionó, en las hembras la meiosis se inicia en forma temprana lo que ha llevado a postular que existe un reloj interno que regula la meiosis en forma autónoma. En apoyo a ésta se ha encontrado que células germinales ectópicas, localizadas en la glándula adrenal fetal (ratón) empiezan la meiosis al mismo tiempo que las células germinales femeninas en el ovario, sin embargo el hallazgo de una sustancia inductora en las glándulas adrenales fetales del humano en ambos sexos ha restado valor a las observaciones anteriores (3).

Se sabe que las primeras células germinales que entran a la meiosis en el ovario fetal son siempre las que están en la parte basal del ovario cerca de la conexión mesonefrica y gradualmente las ovogonias con una localización mas periférica entran a la meiosis (80). Fueron estas observaciones las que llevaron al planteamiento de la hipótesis de que las células derivadas del mesonefros inducían la meiosis lo cual era apoyado por el hecho de que en cultivo de ovarios fetales la meiosis era dependiente de la presencia del tejido mesonefrico en ratón y hamster pero no en rata y conejo (3).

La maduración o competencia meiótica sucede en dos pasos:

1.- la adquisición de la capacidad de sufrir el rompimiento de la vesícula germinal con la progresión a metafase I y después a metafase II (81). Ciertas evidencias sugieren que la adquisición de la competencia meiótica es dependiente del tiempo pero independiente de la presencia de las células foliculares, contactos celulares heterólogos y crecimiento celular (82).

2.- la transición de G2 a la fase M del ciclo que está regulada por un factor citoplásmico promotor de la maduración (MPF). La actividad de MPF aparece durante la maduración meiótica de los ovocitos, alcanzando sus niveles mas altos en la metafase de la meiosis I y II, disminuye en la anafase-telofase de la meiosis I y después de que se ha completado la meiosis (83).

Los eventos estructurales asociados con la transición de G2 a M involucran varias modificaciones importantes en la estructura nuclear y citoplásmica. Estos cambios pueden incluir la aparición de una cubierta perinuclear de heterocromatina, la pérdida de un arreglo de interfase de los microtúbulos y la aparición de centrosomas fosforilados (84). Se ha planteado que la FSH podría tener un papel en la adquisición de la competencia meiótica.

El rompimiento de la vesícula germinal es un proceso que *in vitro* se inicia con una ligera ondulación de la envoltura nuclear que continúa incrementándose en las siguientes 1-2 horas. Estas ondulaciones pueden estar relacionadas con la condensación de los cromosomas que se inicia durante este período. Los poros nucleares desaparecen aproximadamente en 1 hora de cultivo, los rompimientos de la envoltura nuclear son visibles dos horas después. A las tres horas de incubación la envoltura nuclear es dispersada completamente en pares de membranas que se unen a las del retículo endoplásmico y quizá jueguen un papel en la formación de la envoltura pronuclear y nuclear (85). El tiempo en el que desaparece la membrana nuclear es de 11 minutos. La desaparición del nucleólo ocurre poco después de entrar en contacto con el citoplasma. En contraste, la lámina nuclear, una red fibrosa que comprende laminina A, B y C que está en la membrana nuclear interna, persiste al rompimiento de la vesícula germinal y parece desintegrarse justo antes de la metafase de la meiosis I. Durante la maduración meiótica también hay cambios en el número y distribución de los gránulos corticales en preparación para la fecundación y su papel bloqueador de la polispermia (86, 87).

Durante esta etapa del desarrollo los cromosomas del ovocito (bivalentes) pasan por la metafase I y telofase I deteniéndose en la metafase II. Los cromosomas difusos de la dictiótena (semejantes a los plumosos) sufren una condensación significativa a lo largo del margen interno de la envoltura nuclear, concomitantemente con el comportamiento ondulatorio de la envoltura (88). Durante este período los quiasmas se mueven hacia los extremos de los cromosomas. La cromatina se hace heterocromática y contiene densos gránulos que incrementan su número a medida que aumenta la condensación de los cromosomas que ocurre dentro del vestigio agranular del núcleo dentro de los 20 minutos de disolución nuclear. Después de 2 a 3 horas de cultivo, cuando la condensación de los cromosomas casi se ha completado, el bivalente tiene forma de V y es telocéntrico y está frecuentemente asociados con fragmentos de la envoltura nuclear. Poco después los cromosomas altamente condensados se arreglan circularmente en el centro del huevo, pierden sus contactos con los fragmentos nucleares y se arreglan en el ecuador de la metafase I.

Durante el período de rompimiento de la vesícula germinal y condensación de los cromosomas aparecen los cinetocoros con microtúbulos asociados al igual que otros centros de organización de los microtúbulos. Los microtúbulos se extienden desde estos centros a través de rompimientos de la envoltura nuclear al nucleoplasma (70,71). Aparentemente hay un cinetocoro asociado con cada cromátida de cada homólogo cromosomal. A diferencia de la situación en la mayoría de las células, los polos del huso del ovocito carecen de centriolos y están compuestos solamente de bandas del llamado material pericentriolar que se asocia con los polos del huso durante la prometáfase y está

altamente fosforilado y condensado en metafase; desaparece de los polos del huso durante la telofase. En paralelo con estos cambios progresivos en la organización del material pericentriolar en los polos del huso, los centrosomas citoplásmicos que también contienen este material y microtúbulos, sufren alteraciones en el número y localización durante la maduración meiótica. Estas estructuras son mucho más numerosas en prometafase a anafase de la meiosis y están localizadas en la corteza del ovocito, excepto en el sitio de anclaje del huso (89). El tamaño del huso aumenta progresivamente. Uno de los polos del huso está localizado cerca de la corteza de la célula, el huso está rodeado por un área densa compuesta por mitocondrias, vacuolas y gránulos. Los gránulos corticales están excluidos del sitio de anclaje del huso donde se localiza una gruesa banda submembranosa de filamentos de actina. A medida que la meiosis procede a anafase, los bivalentes se mueven hacia los extremos opuestos del huso y éste gira 90°. Estos movimientos aparentemente involucran la participación de los microfilamentos. Es notorio que los ovocitos en maduración pasan 6 horas en prometafase I (período desde la condensación inicial de los cromosomas a la alineación de los bivalentes en la placa de la metafase I) y cerca de 4 horas en la metafase II. Este largo período probablemente refleja el tiempo necesario para sintetizar y ensamblar el huso.

En cultivo, la anafase y la telofase se presentan durante las 10 a 13 horas y es en este período aparece una saliente destinada a ser el corpúsculo polar. Durante la telofase se forma el cuerpo medio (un anillo membranoso vacuolar basofílico alrededor de la región central del huso) y se inicia el pellizcamiento del corpúsculo polar. La separación de los cromosomas homólogos tiene lugar simultáneamente con la segmentación asimétrica del citoplasma del ovocito conteniendo una mitad del complemento original de cromosomas (telofase tardía). Además de los cromosomas, el primer corpúsculo polar contiene una variedad de organelos incluyendo mitocondrias, ribosomas y gránulos corticales (90). Aún cuando ocasionalmente se encuentra un huso en el primer corpúsculo polar raramente es una estructura bien definida y los cromosomas empiezan a degenerar en la telofase I tardía. Sobre el huso de la metafase II de los ovocitos no fertilizados hay un área deficiente en organelos como los gránulos corticales pero rica en microfilamentos submembranosos de actina. Aún las membranas plasmáticas que están encima del huso son relativamente lisas, mientras que el resto de la superficie del huevo posee gran cantidad de microvellosidades. Los centros de organización de microtúbulos no asociados con el huso se encuentran en el citoplasma cerca de la corteza de la célula. La progresión más allá de la metafase II con separación de cromátidas y emisión del segundo corpúsculo polar debe esperar la fertilización o la activación partenogenética.

Se ha visto que el reinicio de la meiosis también implica una reducción en el número de uniones estrechas entre las células de granulosa y aumenta las uniones internalizadas o nexus anulares. Se ha demostrado que hay una disminución en el RNAm de las uniones "gap" de las células de la granulosa en folículos preovulatorios 90 horas después del pico de LH en ratas (38). El aumento de la LH anula la acción de OMI lo cual va a permitir el reinicio de la meiosis (91). Estos eventos están correlacionados con el aumento en la secreción de progesterona y la disminución en la densidad de las partículas de las uniones

“gap” de las células de la granulosa (92). Se ha demostrado que la LH controla el reinicio de la meiosis independientemente de su efecto esteroideogénico ya que la inhibición de la esteroidogénesis no altera el efecto de la LH sobre el reinicio de la meiosis (93).

Como ya se mencionó durante la fase de maduración se presentan cambios importantes en la actividad metabólica de los ovocitos. Aún cuando la síntesis de RNA continúa en ovocitos totalmente crecidos, la síntesis de RNA casi no es detectable después del rompimiento de la vesícula germinal y condensación de cromosomas. La cesación está aparentemente asociada con la disolución del nucleólo. La mitad del RNA poliadenilado acumulado durante el crecimiento del ovocito es degradado o desadenilado durante la maduración meiótica, razón por la cual en el período cuando ciertos mensajeros maternos son utilizados por primera vez hay un decremento de los niveles totales de RNA poliadenilado que es heredado al ovocito no fertilizado. A medida que avanza la maduración meiótica el “pool” de metionina sintetizado en la fase de crecimiento disminuye, disminución que es de carácter fisiológico. La velocidad de síntesis se reduce dramáticamente después del rompimiento de la vesícula germinal y la condensación de los cromosomas, parece ser que el decremento de la síntesis absoluta de proteína refleja la conversión del RNA del ovocito y/o algún mecanismo de control traduccional.

El descenso en la síntesis total de proteínas se refleja en una gran variedad de proteínas específicas como la tubulina, actina, histonas y proteínas ribosomales que disminuyen entre un 30 a un 50% y la síntesis de lactatodeshidrogenasa disminuye de un 80 a 90 % durante la maduración meiótica. La síntesis de las glicoproteínas de la zona pelúcida disminuye a niveles extremadamente bajos, de igual manera se ha observado la aparición y desaparición de ciertas proteínas, cambios ocurren después del rompimiento de la vesícula germinal. Se cree que los cambios son el resultado de la mezcla del nucleoplasma y el citoplasma y se esperaría que participara en la regulación de la progresión del ciclo celular meiótico. Esta regulación podría estar mediada por las subunidades reguladoras MPF, p34cdc2 y ciclinas al igual que las proteínas estabilizadoras de MPF tales como el factor citostático CSF y c-mos (94).

Además del control traduccional, modificaciones post traduccionales de tales proteínas del ciclo celular constituyen un mecanismo crítico por medio del cual se regula la progresión meiótica (3)

La maduración meiótica representa la etapa final de la preparación del ovocito para la fertilización y desarrollo temprano. Los cambios bioquímicos que ocurren en este período parecen involucrar modificaciones post traduccionales en la proteínas que controlan el ciclo y que son esenciales para la progresión meiótica.

Control de la inhibición de la meiosis

La inhibición de la meiosis está regulada por una serie de factores entre los cuales está la presencia de AMPc. Se sabe que el descenso de los niveles intracelulares de AMPc señala la reentrada de los ovocitos a la meiosis. No hay disminución de los niveles de AMPc antes del rompimiento de la vesícula germinal *in vitro* o *in vivo* (95). Además el AMPc está involucrado en la regulación de la transición de G2 a M durante el ciclo mitótico. La participación de AMPc en la maduración meiótica implica que, como en muchas situaciones biológicas, actúa vía una proteínaquinasa AMPc dependiente, una enzima consistente de una subunidad catalítica C y una reguladora R (96). Aún cuando este complejo R-C es enzimáticamente inactivo, la unión de AMPc a la subunidad R (inhibitoria) da por resultado la disociación del complejo y la activación de la subunidad C. Asumiendo que la continua fosforilación de una proteína del ovocito por la proteínaquinasa (PK) es esencial para mantener el detenimiento meiótico, los niveles de AMPc pueden por ello regular la maduración meiótica determinando la cantidad de subunidad C libre (bajo AMPc) las fosfoproteínas del ovocito serían fosforiladas y se podría iniciar la maduración meiótica. Hay evidencias que sugieren que el AMPc es solo uno de los componentes del complejo sistema que mantiene a los ovocitos en dictióteta. El incremento de AMPc en las células del cumulus es notorio en presencia de F y la producción de la progesteronaSH o toxina del cólera que dan por resultado una inhibición de la maduración meiótica sin aumento detectable de los niveles de AMPc. Lo cual sugiere que un factor inhibitorio diferente a AMPc es transferido del cumulus al ovocito (97).

Los activadores proteínaquinas de la subunidad C inhiben la meiosis actuando distalmente a un descenso en la actividad de PK AMPc dependiente antes de los cambios en el metabolismo de la fosfoproteína del ovocito que es necesaria para el reinicio de la meiosis.

Otro de los factores que intervienen en la regulación del reinicio de la meiosis es el calcio a través de la calmodulina (98). Se sabe que los inhibidores del transporte del calcio transmembranar evitan el rompimiento de la vesícula germinal *in vitro*. El aumento del calcio extracelular disminuye la efectividad del dbAMPc como inhibidor de la meiosis y la disminución del calcio aumenta su efectividad. Los niveles de calcio y AMPc pueden actuar sinérgicamente a través de un paso dependiente de calmodulina para regular la maduración meiótica.

Se sabe que la LH induce la maduración de los ovocitos y la producción de la progesterona en folículos intactos *in vitro*, sin embargo la LH aparentemente no induce la maduración vía la síntesis de progesterona (99). No se sabe si otros esteroides como el estradiol y la testosterona juegan algún papel en la regulación de la maduración meiótica. De hecho un número de esteroides potencian la inhibición inducida por FSH de la maduración meiótica de los ovocitos encerrados en las células del cumulus *in vitro*, solo inhiben la maduración de los ovocitos desnudos cuando sus niveles de AMPc están elevados por exposición a dbAMPc o forskolina.

Se ha sugerido que un producto de las células de la granulosa conocido como inhibidor de la maduración (OMI) es el que mantiene a los ovocitos en dictióteta (100). Lo cual concuerda con el hecho de que el líquido folicular inhibe la maduración del ovocito *in vitro*. El OMI es un polipéptido con un PM de 1-2 kilodaltons, resistente a una temperatura de 60°C y al tratamiento con carbón, y es destruido con tripsina lo cual confirma que es un péptido/proteína no esteroideal. Es secretado por las células de la granulosa de pequeños folículos antrales y se encuentra en el líquido folicular de los ovarios de una variedad de mamíferos pero no ha sido caracterizado en humanos u otros primates. El OMI aparentemente ejerce su actividad inhibitoria vía las células del cumulus ya que previene la maduración de los ovocitos cultivados con células del cumulus pero no interfiere con la maduración de los ovocitos desnudos. De lo anterior se puede concluir que el OMI puede atravesar por las uniones estrechas entre las células del cumulus y el ovocito. Se ha visto que los folículos preovulatorios tienen relativamente bajas concentraciones de OMI y que éste no es especie específico. Es posible que la acción inhibitoria de OMI sea potenciada por AMPc lo que sugiere que OMI podría participar en algunos de los efectos de AMPc sobre los ovocitos encerrados en el cumulus *in vitro* (97).

Recientemente se ha evidenciado que una hipoxantina y/o adenosina, los componentes de bajo peso molecular del líquido folicular, también participan en la prevención de la maduración espontánea de los ovocitos *in vitro*.

Las uniones estrechas representan regiones de continuidad física entre las células, en muchos sistemas biológicos sirven como mediadores de la comunicación intercelular y el acoplamiento metabólico permitiendo el paso de pequeñas moléculas entre las células. A lo largo del crecimiento del ovocito y la foliculogénesis, las uniones estrechas median la comunicación intercelular entre los ovocitos y las células de la granulosa y los mantienen acoplados. Antes de la ovulación hay una disminución significativa de uniones "gap" y el ovocito y las células del cumulus pierden su acoplamiento como resultado de la mucificación y la expansión del cumulus (101) En este estado el cumulus es retraído de la superficie del ovocito. La pérdida de uniones estrechas del cumulus está temporalmente correlacionada con el rompimiento de la vesícula germinal y la expansión del cumulus (102). Aún cuando el acoplamiento entre el ovocito y las células del cumulus termina antes de la ovulación, no se completa hasta después del rompimiento de la vesícula germinal. Podría pensarse que es la terminación de la comunicación entre el cumulus y el ovocito y por lo tanto la cesación de la transferencia del factor inhibidor OMI lo que determina el inicio de la maduración meiótica, sin embargo factores como niveles intracelulares de AMPc, enzimas reguladoras de los niveles de AMPc, calcio, calmodulina, esteroides etc. también tienen participación en esta regulación. Hasta el momento no ha podido quedar totalmente aclarada cuál es la interacción de todos estos factores ni *in vivo* ni *in vitro*, pero es claro que la integridad del folículo mantiene al ovocito del mamífero en el detenimiento meiótico.

Foliculogénesis

Los folículos son las principales unidades funcionales del ovario de mamífero, su función es aportar el sistema de soporte necesario para que la célula germinal femenina se desarrolle, logre su máximo potencial y finalmente al ser ovulada, dé continuidad a la especie. El folículo está constituido por un gameto femenino y por células somáticas que contribuyen de diferentes formas a realizar sus funciones. Aportan los requerimientos nutritivos del ovocito para su crecimiento, posteriormente controlan la maduración nuclear y citoplásmica del ovocito contenido en aquellos folículos que son seleccionados para ser ovulados y finalmente contribuyen a la atresia y destrucción del ovocito. Estos efectos directos de las células foliculares sobre el desarrollo y destino del ovocito son mediados por cambios en el micromedio dentro del folículo y llevados a cabo en gran parte por productos que se secretan al líquido folicular (103).

El proceso de formación de folículos no ha sido claramente descrito pero se sabe que es un proceso en el que células poco diferenciadas son condicionadas a ciertos patrones de desarrollo y se ensamblan. En él, diferentes tipos celulares sufren un crecimiento y maduración coordinada para formar una estructura morfológica y funcionalmente compleja (62).

La formación de folículos primordiales en los ovarios de mamíferos se conoce como foliculogénesis. Las descripciones clásicas de este proceso basadas en observaciones al microscopio de luz consideraban las siguientes etapas de desarrollo:

- 1.- sincicio celular de ovocitos en la que grupos de ovocitos interconectados estaban rodeados de células estromales delgadas
- 2.- ovocitos desnudos en la cual los ovocitos estaban juntos en racimos pero sin células interpuestas
- 3.- folículo independiente en la que los ovocitos se rodeaban de células de la granulosa y por la membrana basal.

Actualmente el punto de vista más aceptado por los autores modernos es el propuesto por Byskov et al (104) que interpretaron la continua asociación de los cordones sexuales gonadales con los túbulos mesonéfricos como una sola estructura que llamaron *rete ovarii* y la han dividido en tres regiones distintas:

- 1.- extraovárica
- 2.- de conexión
- 3.- intraovárica.

Aún cuando estos autores suponen alguna contribución por las células del epitelio en algunas especies de mamíferos, ellos describen la formación de los folículos primordiales como un proceso de migración de células pregranulosas de la rete extraovárica a la intraovárica (105).

En la mayoría de los mamíferos la proliferación de las ovogonias está restringida a la etapa prenatal o poco después del nacimiento, que es cuando las ovogonias dejan de

dividirse activamente y se transforman en ovocitos primarios quiescentes. Las ovogonias desnudas (sin cubierta folicular) están conectadas como un sincicio via los puentes intercelulares. Una vez que las ovogonias son aisladas y rodeadas por células foliculares aplanadas, las células de la pregranulosa, se forman los folículos primordiales que se encuentran en la corteza interna del ovario. Estos folículos constituyen la reserva en reposo de folículos que no están en crecimiento y que son progresivamente "utilizados" durante la vida reproductiva, su tiempo de aparición varía entre las diferentes especies. Existen discrepancias entre los diferentes autores en relación a los tiempos de aparición de estos folículos, para el caso de la rata Mauleón (1978) opina que ocurre en primer día postparto y Veno (1989) que es después del primer día postparto. (18, 106).

Cuando los ovocitos alcanzan la diplótena, deben ser encerrados en un folículo junto con las células de la granulosa. En muchas especies los ovocitos individuales son rodeados por las futuras células de la granulosa que son delineadas por una lámina basal intacta, en algunas especies (perro) mas de un ovocito es encerrado dentro de un folículo (folículo poliovular). Si los ovocitos en etapa diplótena no son encerrados en un folículo, degeneran (107).

Los folículos se empiezan a formar en la parte interna de la corteza del ovario donde los ovocitos alcanzan primero la diplótena. En muchas especies las células de la granulosa de estos folículos en desarrollo están conectados con los cordones de la *rete* derivados intraováricos mesonéfricos. Se ha demostrado que la formación del folículo depende de que un número suficiente de células mesonéfricas hayan invadido el ovario en desarrollo. Estos experimentos también indicaron que la desaparición del epitelio superficial del ovario no afectaba la foliculogénesis temprana, siendo poco probable que este epitelio sea una fuente importante de células de la granulosa, por lo menos durante la formación de los primeros folículos. Estas observaciones no excluyen la contribución del epitelio superficial o de células mesenquimales a la capa de células de la granulosa. Es posible que los folículos formados tardíamente, en la periferia del ovario, contengan menos células mesonéfricas que los formados mas temprano y situados centralmente (108).

De hecho los folículos que se forman primero en el centro del ovario fetal o neonatal presentan un patrón diferente de formación, crecimiento y diferenciación comparado con el de los folículos de un ovario maduro. Esto puede reflejar que las células de la granulosa cambien en relación con su origen, sensibilidad a hormonas y factores de crecimiento, dependiendo de la etapa de desarrollo en que se forman los folículos lo cual está relacionado con la localización de éste dentro del ovario.

La foliculogénesis temprana en el centro del ovario depende de la migración de las células de la *rete* extraovárica, que se dividen mitóticamente, hacia la *rete* intraovárica que rodea a los ovocitos centralmente y no de una proliferación local (109). Algunas de estas células se convierten en células de la granulosa mientras que otras de la *rete* intraovárica se diferencian en las primeras células intersticiales (110).

Simultáneamente con el inicio del crecimiento del ovocito, las células somáticas que lo rodean empiezan a proliferar y las células aplanadas de la granulosa se hacen cuboidales encerrando a la célula germinal en varias capas, formándose así el folículo primario. Esta fase inicial del crecimiento del ovocito y el desarrollo del folículo preantral parece ocurrir

independientemente de las hormonas gonadotrópicas (62). Una vez que el folículo ha acumulado unos miles de células de la granulosa, para formar una estructura multilaminar sólida, el espacio extracelular se expande para formar una cavidad llamada antro, probablemente en respuesta a una regulación hormonal endógena. En el folículo antral existen dos poblaciones específicas, las células del cumulus, organizadas como un epitelio pseudoestratificado que encierra al ovocito y las células de la granulosa murales, que comprenden las capas internas de la pared del folículo y forman un epitelio pseudoestratificado en contacto con la lámina basal que es adyacente a la teca externa. Finalmente en respuesta a la estimulación hormonal ocurren dos eventos principales en el complejo cumulus-ovocito: el ovocito totalmente crecido completa su primera división meiótica y se detiene, otra vez, en la metafase II y las células del cumulus que rodean a la célula germinal sufren una expansión o mucificación, consistente en la depósito de una matriz extracelular rica en ácido hialurónico que hace que las células se separen. Finalmente el ovocito de la metafase II, aún encerrado en las células del cumulus dilatadas, es ovulado al oviducto y está listo para la fertilización. La asociación entre las células germinales y las somáticas de la granulosa persiste a través de todo el crecimiento y esta asociación es crucial para el crecimiento y diferenciación del ovocito, al igual que para las células de la granulosa, asegurando con ello la ovogénesis (111).

El mecanismo que dispara el crecimiento folicular inicial no se conoce pero si se sabe que una vez que se inicia continúa hasta el final del periodo reproductivo. Se ha reportado que las gonadotropinas exógenas estimulan el inicio del crecimiento folicular. Varios estudios de folículos preantrales en cultivo han demostrado un crecimiento folicular exitoso que depende de FSH y se retarda en animales hipofisectomizados, fetos humanos ancefálicos y ratones tratados con antagonodotropinas (3). También se ha planteado que son factores intraováricos (factores de crecimiento locales) los que la disparan o aún que puede ser un evento al azar. Las hormonas intraováricas o una sustancia inhibitoria que emana de los folículos en degeneración pueden influenciar el inicio del desarrollo folicular. Se ha sugerido que el factor de crecimiento de fibroblastos bovinos (b FGF) derivado del epitelio superficial (germinal) del ovario, puede jugar un papel en el proceso de desarrollo temprano de los folículos. Se postulado que la señal de iniciación proviene de los ovocitos (62).

En folículos preantrales de hamster se ha visto que el crecimiento es estimulado por el factor de crecimiento epidermal (EGF) y por el factor de crecimiento transformante (TGF α) *in vivo* e *in vitro*. Parece ser que EGF participa en la iniciación del crecimiento folicular. Otros factores, especialmente aquellos que estimulan el crecimiento y la esteroidogénesis como el factor semejante a insulina (I y II) son candidatos para disparar el inicio del crecimiento folicular (3).

Es difícil técnicamente discriminar entre folículos que están aún quiescentes y los que ya empezaron a crecer, la transición no se puede detectar solo por morfometría y aún más, cuando la detección se realiza con marcadores de proliferación celular, los estudios de cinética celular no pueden identificar a los folículos que recién han entrado a la fase de crecimiento(62).

Los datos sugieren que las hormonas circulantes afectan la velocidad a la cual los folículos primordiales quiescentes empiezan a crecer. Un hecho importante es que el "pool" de folículos primordiales en reposo es disminuido no solo por los folículos que entran a la fase de crecimiento sino también por atrición (muerte y desaparición) de los folículos primordiales (80). El número de folículos que empiezan a crecer varía con la edad del animal, mas folículos empiezan a crecer por unidad de tiempo en ovarios de roedores infantiles que en adultos (62).

Una vez que se iniciado el crecimiento folicular este procede aún en ausencia de gonadotropinas, hormona del crecimiento o tiroidea, hasta una etapa relativamente tardía del desarrollo. En cuanto a la velocidad de proliferación de las células de la granulosa, el determinante mas significativo es el tamaño folicular. Bajo diferentes condiciones fisiológicas, la proliferación de las células de la granulosa aumenta con el tamaño del folículo, hasta la penúltima etapa de crecimiento. Esto sugiere que los factores autócrinos y parácrinos son de gran importancia para controlar el crecimiento folicular. Las señales de un compartimento folicular probablemente influyen la proliferación de otros compartimentos. Las células de la teca también parecen secretar factores que influyen la velocidad de proliferación de las células de la granulosa ya que al cocultivar células de la granulosa con las de la teca se observa un aumento en el número de células y en la incorporación de [^3H] TdR . Las células de la teca secretan TGF- β que estimula la incorporación de [^3H] TdR por células de la granulosa en cultivo. Las células de la teca de folículos de tamaño mediano (que crecen rápidamente) se tiñen mas intensamente para TGF- β pero esta intensidad de tinción disminuye en grandes folículos preovulatorios (que crecen mas lentamente).

Las condiciones intraováricas tienen también un impacto en las velocidades de proliferación celular. El flujo sanguíneo del ovario varía marcadamente durante el ciclo estral y el flujo sanguíneo a varias regiones dentro del ovario puede ser afectado drásticamente por la presencia de grandes folículos preovulatorios o cuerpos lúteos. La red microvascular de los folículos que están madurando es por lo menos dos veces mas densa que la de los folículos maduros (118). Por lo tanto las diferencias en el flujo sanguíneo alteran la disponibilidad de nutrientes a las células en proliferación que a su vez van a influenciar sus tiempos de generación.

Las variaciones en las velocidades de proliferación, como ya se mencionó, son afectadas por hormonas hipofisarias y esteroideas. Se ha visto en ratas adultas que folículos de tamaños similares crecen a diferentes velocidades en diferentes días del ciclo estral; las células de la granulosa de grandes folículos (mas de 600 células) crecen mas lentamente durante la gestación que durante el ciclo estral. Estos efectos pueden ser adjudicados a variaciones de esteroides circulantes en estos estados reproductivos ya que se ha visto que cuando se les administran estrógenos a ratas inmaduras hipofisectomizadas a altas concentraciones de DES sus ovarios aumentan grandemente de tamaño y se llenan de folículos grandes que carecen de antró.

Los factores ambientales también han demostrado jugar un papel en el crecimiento folicular, la dieta, la hora del día y la estación del año afectan la velocidad de proliferación de las células de la granulosa. El índice mitótico de las células de la granulosa de folículos

de tamaño medio fue significativamente mas alto a medio día en ratas en estro expuestas a una alternancia de luz 12x12 en comparación con las que fueron expuestas a luz 14x10 (62).

La mayoría de las señales de maduración funcional de las células de la granulosa y de la teca aparecen durante la penúltima etapa de crecimiento (8ª y 9ª generación). Las células de la granulosa de ratas hipofisectomizadas y tratadas con DES carecen de antro, de la capacidad de producir estradiol y/o receptores a LH sobre las células de la granulosa. Cuando son tratadas con FSH o PMSG (gonadotropina del suero de yegua preñada) desarrollan antros, adquieren receptores a LH y desarrollan actividad de aromatasa 24 horas después de la exposición. Por lo tanto queda demostrado que FSH es el inductor primario de la maduración de las células de la granulosa disparando no solamente la aparición de los receptores a LH y la enzima aromatasa sino también otras características funcionales de madurez, incluyendo la síntesis de proteoglicanos, activador de plasminógeno, IGF-1 y la expresión del gene de la inhibina. FSH actúa solo como una señal permisiva de maduración de las células de la granulosa; es la célula de la granulosa mas que la FSH la que determina la naturaleza de la respuesta celular. Todos los folículos del ovario están probablemente expuestos en forma igual a FSH pero solo los folículos de las etapas tardías responden a la hormona adquiriendo características de maduración funcional. La naturaleza de la respuesta ha sido predeterminada y el estímulo de FSH simplemente sirve para disparar su expresión. En esta etapa del desarrollo las células de la granulosa están limitadas a dos posibles alternativas de desarrollo, maduración funcional o muerte.

Al responder a FSH el folículo adquiere la maquinaria necesaria para la maduración final (luteinización), está listo para luteinizarse; la exposición a LH dispara al folículo para que complete su desarrollo programado. Se ha visto que un número de señales diferentes a la LH también pueden disparar la luteinización. Entre ellas se encuentran la FSH altamente purificada, AMPc, GMPc y la escisión quirúrgica del ovocito del folículo. Sin importar cuál sea el factor que dispare, la respuesta de las células de la granulosa es siempre igual lo cual indica que las señales inductivas sirven solo para que entre en acción una respuesta preprogramada mas que instruir a la célula a escoger programas de desarrollo alternativos.

Además de las hormonas y los factores de crecimiento, la matriz extracelular y el contacto célula-célula también afectan la expresión fenotípica de las células de la granulosa totalmente maduras. La asociación intercelular entre las célula de la granulosa es esencial para la adquisición de receptores a LH; la FSH sola no puede inducir el receptor en células de la granulosa monodispersas en cultivo, solo puede inducir la enzima aromatasa (62).

Control de la foliculogénesis

A pesar de la existencia de gran cantidad de folículos en crecimiento muy pocos son los que maduran hasta la etapa preovulatoria en cada ciclo estral o menstrual. El número de folículos que maduran cada ciclo es regulado con límites muy estrictos por un mecanismo global clásico que involucra a la FSH, inhibina y/o estradiol.

En ratas, los folículos que sobreviven para ovular son aquellos que alcanzaron la 8ª generación de desarrollo durante los aumentos secundarios de FSH que ocurren en la mañana del estro. Estos folículos serán capaces de ovular en respuesta a un aumento de LH 3 días después, los folículos que llegan a la 8ª generación de desarrollo, cuando las concentraciones de FSH son bajas, nunca maduran totalmente y sufren atresia.

Como parte de su respuesta a niveles elevados de FSH los folículos de la 8ª generación empiezan a sintetizar y a secretar factores que suprimen la secreción de FSH. Esta señal de retroalimentación negativa de los folículos es probablemente la inhibina o el estradiol o una combinación de ambos. La magnitud de la señal de retroalimentación negativa emitida por cada folículo se cree está correlacionada directamente con su grado de madurez. Los niveles de FSH estarán determinados por la señal de retroalimentación negativa acumulada de todos los folículos, cada uno secretando una cantidad diferente de acuerdo a su etapa de maduración. El nivel de FSH determina la velocidad a la cual cada folículo va a progresar a la siguiente etapa de maduración. La continua retroalimentación entre todos los folículos en maduración y la secreción de FSH regula el número de folículos que alcanzan la etapa preovulatoria.

La cantidad de folículos que mueren en la octava generación de crecimiento tienen un papel importante. Mientras mas grande sea la generación de folículos interactivos mucho mas estrictos serán los controles de los tiempos de ovulación. Esto ocurre a expensas de un número cada vez mayor de folículos que sufren atresia. En ratas jóvenes ciclando, la extensa atresia de los folículos antrales tempranos ocurre durante la selección de una "cuota" ovulatoria apropiada, probablemente debido a que hay exceso de folículos disponibles y solo unos cuantos son seleccionados. Cuando hay pocos folículos en la línea de crecimiento la longitud de un ciclo reproductivo se hace mas variable pero menos folículos sufren atresia durante el proceso de selección. Las ratas empiezan a presentar ciclos estrales irregulares a medida que el número de folículos primordiales disminuye en sus ovarios con la edad. El número de óvulos liberados se mantiene constante en todas las ratas que ovulan.

La LH, al igual que la FSH, es crucial para la maduración final de los folículos preovulatorios, en ratas concentraciones de LH por debajo de los límites basales pueden evitar la maduración de los folículos preovulatorios. Esta condición ocurre durante el período prepuberal, embarazo, pseudoembarazo y lactancia (62)

Tipos de folículos

Existen 8 tipos principales de folículos:

- pequeños sin crecimiento que son los folículos primordiales (1-3a en ratones)
- preantrales que son los primarios de una capa y secundarios multilaminares (3b-5b) que se caracterizan principalmente por aumento en el tamaño del ovocito y en el número de células de la granulosa antrales
- terciarios o de Graaf (6-8) cuya característica es la formación de un antro lleno de líquido folicular y un mayor incremento en el número de células de la granulosa y estos pueden ser pequeños o grandes para indicar su grado de expansión y los antrales grandes a su vez se describen como no ovulatorios o preovulatorios para indicar su madurez de acuerdo al criterio funcional aceptado (103).

La llamada fase prefolicular no es propiamente una fase sino mas bien un breve período en la organogénesis ovárica antes del inicio de la foliculogénesis. Esta fase puede ocurrir en la vida embrionaria, en neonatos o aún en etapas prepuberales, dependiendo de la especie. Parecería carente de función esteroideogénica en algunas pero no en todas las especies. La síntesis de esteroides en los ovarios de roedores es indetectable o muy limitada antes de que se formen los folículos. El ovario de rata empieza a formar folículos en el día 1 postnatal y no responde a la producción de estrógenos estimulada por gonadotropinas durante el período fetal (103).

En el ovario prefolicular existen juntos los ovocitos y las células de la granulosa dentro de cordones irregulares organizados en nidos en la corteza ovárica. El arreglo de ovocitos y células de la granulosa es empaquetado cercanamente con una aposición de membranas ya que en esta etapa no se ha formado la zona pelúcida que separa a las células de la granulosa del ovocito y una serie de vellosidades foliculares terminan en uniones "gap" en el plasmolema del ovocito (18). Es en esta etapa cuando las células de la granulosa pueden servir primariamente para proveer nutrientes al ovocito. Se ha demostrado que mas del 85% de los nutrientes son tomados primero por las células de la granulosa vecinas antes de ser transferidas al ovocito función que es continuada en los folículos en desarrollo de los adultos por las células especializadas de la granulosa, la corona radiada. Está claro que los aminoácidos no polares como leucina y valina pueden ser capaces de pasar las células de la granulosa e interactuar directamente con el ovocito mientras que la mayoría de los aminoácidos entran cooperativamente al ovocito (18).

Las células de la granulosa en los ovarios prefoliculares parecen ser activas para fagocitar a las células germinales en degeneración.

Los ovocitos y las células de la granulosa son enteramente interdependientes en la formación de los folículos, sin cualquiera de los dos no puede ocurrir una esteroideogénesis sustancial ni crecimiento del ovocito. Por ello un aspecto muy importante de la fase prefolicular es el establecimiento de las asociaciones entre las células de la granulosa y el ovocito que conducen a la foliculogénesis.

No se ha descrito claramente el proceso de formación de folículos. Se ha sugerido que el folículo se forma por la fragmentación de los cordones ováricos en ovarios de animales recién nacidos, algunos folículos primordiales frecuentemente están conectados a otro por puentes intercelulares tubulares quizá en las regiones donde la fragmentación de los cordones no ha sido completada (50).

Folículos preantrales

Los folículos preantrales se desarrollan de folículos primarios y se caracterizan por el aumento de tamaño del ovocito y la proliferación de las células de la granulosa estos son también llamados folículos secundarios (18). No se conocen los factores responsables de la iniciación del crecimiento de los folículos a partir del "pool" de no crecimiento. Pero se ha demostrado que el desarrollo subsecuente de los folículos preantrales no es dependiente de gonadotropinas y continúa después de la hipofisectomía (113). A medida que el folículo aumenta de tamaño las células de la teca se diferencian de células del estroma del ovario, formando con ello una cubierta de células aplanadas alrededor de la membrana basal folicular. La formación de la capa de la teca es variable entre los folículos individuales, en el ratón se hace distinta en la etapa de múltiples capas, en hamster se diferencia en folículos con 7 a 8 capas de células de la granulosa y la diferenciación entre teca interna y externa ocurre posteriormente cuando ocurre la formación del antro para el caso del ratón.

Folículos antrales

La formación de la cavidad antral en el folículo secundario lo convierte en un folículo terciario

Durante la primera fase, el crecimiento del ovocito y del folículo son lineares y están positivamente correlacionados. Una vez que el ovocito está cerca del tamaño máximo, poco después de la formación de la cavidad antral, sigue la segunda fase del crecimiento folicular consistente en actividad mitótica de las células de la granulosa y de la teca y la acumulación de líquido folicular que se hace el elemento dominante. Existe una relación muy íntima entre el ovocito y las células de la granulosa que lo rodean. La población de células de la granulosa no es uniforme pero a medida que el folículo antral se desarrolla estas células se organizan en regiones distinguibles con funciones especializadas. Las células de la granulosa en la capa inmediata al ovocito (corona radiada) establecen un íntimo contacto con el ovocito hasta la etapa preovulatoria por medio de procesos celulares que atraviesan la zona pelúcida y forman complejos de uniones "gap" con el oolema. Estas son las células que sirven de nodrizas, proveyendo nutrientes para el crecimiento del ovocito y probablemente intercambiando factores reguladores con el

ovocito y con ello liberando las señales requeridas para la maduración coordinada del folículo y el ovocito. Las células del cumulus comprenden una masa celular que rodea al ovocito (cumulus oophorus) y pega el ovocito a la pared del folículo. Las células del cumulus físicamente soportan al ovocito dentro del folículo y pueden contribuir a sus necesidades nutricionales y reguladoras. La mayoría de las células de la granulosa forman la región mural o parietal que son las que cubren la cavidad folicular. Las células murales adyacentes a la membrana basal son las primeras en diferenciar su capacidad de respuesta esteroideogénica a LH basada en la adquisición de sitios de unión a LH (18). Está bien establecido que la síntesis de RNA aumenta durante el crecimiento folicular y alcanza su pico antes de que se forme la cavidad antral. Después de la formación del antró el índice mitótico en las células del cumulus es tres veces mayor que en las murales y aún en las células murales hay un gradiente ya que se marcan tres veces más las células más profundas del cumulus (114).

Dominancia folicular

El número de folículos que es reclutado generalmente es mayor que el número característico de los folículos ovulatorios para una especie dada. Solamente el número especie específico de folículos continúa creciendo por más días y alcanza el tamaño ovulatorio, estos son los folículos dominantes ya que se cree que una vez que han sido seleccionados de alguna manera evitan el crecimiento y diferenciación de los folículos hermanos y evitan el reclutamiento de otros folículos. No se sabe qué determina cuál o cuáles folículos son seleccionados. Si se plantea la hipótesis de que los folículos son reclutados debido a que son expuestos a elevaciones ligeras de la FSH circulante justo alrededor del momento cuando normalmente deberían empezar la atresia, quizá se podría decir que el folículo seleccionado está exactamente en la etapa de desarrollo adecuada en el momento adecuado y por lo tanto es capaz de responder mejor a la ligera elevación de FSH para continuar con su crecimiento (115).

Para explicar la razón por la cual los folículos subordinados no continúan su crecimiento existen 2 hipótesis. Una de ellas plantea que el folículo dominante secreta algún factor que hace imposible el crecimiento y desarrollo de los folículos subordinados. En especies monotocas tal factor debería de ser de naturaleza endocrina ya que induciría regresión de los folículos subordinados en ambos ovarios. Aún cuando ésta parecía ser adecuada y que se había descrito una proteína reguladora del folículo (FRP)(116), estudios posteriores parecen no apoyar estos resultados. Alternativamente el folículo dominante podría causar la regresión de los subordinados indirectamente vía una retroalimentación negativa. De acuerdo a esta hipótesis la secreción de reguladores de retroalimentación, como el estradiol e inhibina, por el folículo dominante (o quizá por toda la cohorte de folículos) durante los primeros días después del reclutamiento podrían provocar una disminución en los niveles de FSH que no podrían sostener el crecimiento de los subordinados. El folículo dominante, para no sufrir atresia, debería de haber alcanzado una etapa de diferenciación en la cual pudiera sostener el crecimiento en presencia de bajos niveles de

FSH circulante. Se ha demostrado que niveles de FSH que son insuficientes para el reclutamiento de folículos son suficientes para mantener el crecimiento folicular una vez que se ha iniciado (117). La capacidad del folículo dominante para seguir creciendo y desarrollándose se puede deber a un mayor flujo sanguíneo a través del folículo y/o adquisición del folículo dominante de receptores a LH en las células de la granulosa (118).

Aunque se podría pensar que existe un gran desperdicio de folículos durante el desarrollo folicular el hecho es que teniendo una serie de folículos que alcanzan la etapa en la que una ligera elevación de FSH puede reclutarlos para otro crecimiento asegura que cuando ocurra una ligera elevación de FSH los folículos van a ser reclutados rápidamente y el reclutamiento de más folículos que el número ovulatorio asegura que por lo menos uno va a estar en la etapa exacta de maduración para continuar con su desarrollo.

La secreción de grandes cantidades de estradiol por los folículos seleccionados parece ser de primordial importancia y los separa de los subordinados. En la mayoría de los mamíferos la síntesis folicular de estradiol requiere de la cooperación de tipos celulares endocrinos y de ambas gonadotropinas, con células de la teca produciendo andrógenos en respuesta a LH y células de la granulosa aromatizando a los andrógenos a estradiol en respuesta a FSH y posteriormente en el desarrollo folicular en respuesta a FSH y LH (119). La mayor capacidad de secretar estradiol se origina de la mayor capacidad de las células de la teca para responder a LH secretando andrógenos y de las células de la granulosa para aromatizar los andrógenos.

Se sabe que elevaciones pequeñas pero sostenidas de LH son cruciales para el desarrollo de folículos ovulatorios. LH estimula la diferenciación de la teca incluyendo una mayor capacidad de secretar andrógenos. La aromatización de andrógenos por células de la granulosa aumenta la producción de estradiol que es crucial para que continúe la diferenciación de las células de la granulosa.

En ratas, una vez que ha sido seleccionada la cohorte de folículos, procede la diferenciación del folículo para que proceda el aumento en la secreción de estradiol rápidamente en un lapso de 2-3 días. Los cambios en la capacidad esteroidogénica de los folículos ovulatorios de rata parecen estar mediados por cambios en los niveles de RNAm para las enzimas esteroidogénicas apropiadas. Se ha demostrado que los niveles del RNAm para 17α hidrolasa y aromataasa aumentan durante el desarrollo de folículos antrales antes de la elevación de LH (119). Los niveles de estos mensajes descienden precipitadamente en folículos que han sido expuestos a niveles elevados de LH. Los niveles de RNAm para P450 scc aumenta en respuesta a un incremento de gonadotropinas y este mensaje se expresa constitutivamente junto con un cambio en la producción de progesterona durante la fase luteal. Los mecanismos que permiten que concentraciones basales y aumentos de LH y FSH provoquen resultados completamente diferentes no se conocen totalmente (115).

Fisiología del folículo

En todas las especies de mamíferos son dos los principales tipos celulares involucrados en la esteroidogénesis:

- a.- células secretoras que responden a LH que comprenden células de la teca interna de la envoltura folicular y las células intersticiales del estroma
- b.- células que responden a FSH consistiendo exclusivamente de células de la granulosa que solo después de la maduración folicular adquieren la capacidad de responder a LH

Las células de la granulosa y las teca/intersticiales tienen orígenes embrionarios diferentes. Las células de la granulosa se derivan principalmente, aunque quizá no exclusivamente, de ciertas células de la *rete* intraovárica que se asemejan mucho a las células de la granulosa en términos de sus organelos y microfilamentos (103). Como ya se mencionó anteriormente, a medida que madura el folículo, las células de la granulosa se van a diferenciar de acuerdo a su posición, hecho que les va a conferir funciones diferentes.

Las células de la teca parecen diferenciarse de las células mesenquimales en el estroma del ovario. La teca no está presente en los folículos primarios pero se diferencian a medida que los folículos crecen y maduran, es evidente que las células de la teca se originan continuamente a lo largo de la vida reproductiva. Las células mesenquimales progenitoras son quizá células del tejido conjuntivo laxo, se ha sugerido que también se pueden formar de ciertas células de la *rete ovarii* (ratón) que están inicialmente contiguas a las células de la granulosa pero que se separan por asociación con el ovocito cuando el folículo es encerrado.

Las células intersticiales primarias tienen su origen en las células mesenquimales y en las de la *rete ovarii*. Las células intersticiales secundarias que se encuentran en el ovario adulto, se derivan de células de la teca en folículos atrésicos (120). Mientras que el ovocito y las células de la granulosa que rodean a un folículo atrésico degeneran y son eliminadas del ovario, las células de la teca en la envoltura folicular sobreviven como pequeñas islas de células esteroidogénicas en el estroma ovárico. Sobre esta base se pueden esperar ciertas similitudes en función de células de la teca y células intersticiales secundarias de los ovarios adultos. Las células de la teca y las intersticiales probablemente no tienen propiedades biosintéticas idénticas ya que las células intersticiales, en contraste con las de la teca, son menos influenciadas por sustancias regulatorias parácrinas secretadas por la membrana granulosa pero ellas pueden recibir innervación simpática directa. Las células intersticiales secundarias también difieren de las de la teca en su actividad biosintética de andrógenos que no solo persiste durante toda la vida reproductiva sino que continúa en ovarios viejos (103,121).

Células de la teca

La diferenciación de las células de la teca y la síntesis de andrógenos aromatizables es una condición obligatoria para la producción folicular de estradiol y la diferenciación de las células de la granulosa. Estudios previos indican que la diferenciación de las células de la teca es dependiente de aumentos sutiles en las concentraciones de LH (122). Se ha demostrado también que las células de la teca de folículos antrales pequeños y preovulatorios requieren de la síntesis de LH/AMPC para la biosíntesis de andrógenos, mientras que cuando las células de la teca se luteinizan la esteroidogénesis es menos dependiente de LH o de AMPC, por lo menos en cultivo (119, 123).

La diferenciación de esta capa se inicia en el folículo primario y consiste de fibroblastos y células epiteliales y posiblemente transicionales. En la rata la teca externa es aparente alrededor de pequeños folículos antrales con un diámetro de 0.1 a 0.25 mm consistiendo de fibroblastos, células de músculo liso y una variedad intermedia. Algunas de las células definitivamente muestran características ultraestructurales de músculo liso y se ha demostrado la presencia de actina y miosina en varias capas de células de la teca externa que rodea a los grandes folículos de Graaf (18, 62).

La teca sufre una marcada diferenciación morfológica. Muchas células de la teca interna localizadas justo por fuera de la membrana basal son ricas en retículo endoplásmico liso y poseen características esteroidogénicas mientras que otras de las células de la teca interna están altamente vascularizadas (62).

Las células de la teca están unidas por uniones estrechas. Se ha reportado una distribución de nervios colinérgicos y adrenérgicos en la teca de numerosas especies. En la rata los nervios adrenérgicos están presentes en los vasos sanguíneos de la teca interna, en las células fibromusculares de la teca externa y en el estroma. La actividad colinérgica está representada por una densa zona de la teca externa que alcanza su máxima densidad en el folículo preovulatorio, fibras nerviosas que contienen sustancia P corren cerca de los folículos primordiales en el estroma cortical de ratas. En los vasos sanguíneos y en la teca externa se han identificado un número de péptidos reguladores siendo el más abundante el neuropéptido Y. La agregación y diferenciación final de la teca folicular ocurre bajo la influencia de factores de crecimiento que emanan del complejo ovocito-granulosa. Indudablemente existen interacciones recíprocas entre las células de la teca y las de la granulosa que deben tenerse en cuenta cuando se consideren las propiedades morfológicas, bioquímicas y esteroidogénicas de los compartimentos aislados y se ha demostrado que existe una retroalimentación positiva entre los compartimentos tecal y granulosa. La producción de factores de crecimiento por la teca puede influenciar por vía parácrina a las células de la granulosa. En rata las células teca/intersticiales secretan TGF β . En todas las especies la teca interna está separada de las células de la granulosa por una banda PAS positiva que es la lámina basal. El tiempo de aparición de la teca interna bien diferenciada varía en relación al desarrollo de las células de la granulosa de una especie a otra, en ratón es de 3 capas de células de la granulosa y en hamster de 6. En roedores y muchas otras especies, las células de la teca son la principal fuente de

precursores de andrógenos que son transportados al compartimento granuloso para su conversión a estrógenos.

La teca interna desarrolla un aporte vascular que se desarrolla en la porción interna adyacente a la membrana granulosa. La vascularización de la teca interna está ligada a arteriolas externas y a vénulas en la teca externa. Este patrón no cambia durante todo el desarrollo, excepto por la expansión de los vasos sanguíneos para mantener el crecimiento folicular, este patrón es igual para todos los mamíferos (18).

Los productos esteroideos más abundantes de las células de la teca maduras en todas las especies son los compuestos C 19 incluyendo los 4-ene-3 β hidroxiesteroideos y los andrógenos 5 α reducidos que son los producidos por el catabolismo del colesterol. Como la teca interna está altamente vascularizada a medida que el folículo madura, es razonable que, la internalización de la lipoproteína en la sangre sea la principal fuente de colesterol para la esteroidogénesis de la teca *in vivo*. La esteroidogénesis en ausencia de lipoproteína de colesterol *in vitro* es limitada (103). Es aparente que los cultivos de las células intersticiales ováricas producen intermediarios 5-ene-3 β hidroxí y 4- en 3 -oxo (124). La acción de LH vía receptores específicos presentes en las células de la teca en todas las etapas foliculares (125) y la producción consecuente de AMPc proveen el principal estímulo para estas actividades esteroidogénicas (126).

Estudios con células intersticiales de ratas hipofisectomizadas en cultivo indican que las células expresan constitutivamente Δ 5- 3 β - hidroxiesteroide deshidrogenasa y tienen receptores funcionales a LH pero no son esteroidogénicamente activos hasta que son inducidos a diferenciarse con LH o con prostaglandina E2 (PGE2) (127).

La acción esteroidogénica de LH sobre las células de la teca aparentemente incrementa las actividades 17 α -hidroxilasa:C-17, 20-liasa en ovarios o folículos de rata. Estas actividades de enzima están limitadas en velocidad y parecen ser el sitio en el cual LH estimula la producción de esteroides C19 por células de la teca a medida que los folículos progresan de las etapas antrales pequeñas a folículos preovulatorios tempranos en rata y donde la producción ovárica de andrógenos es restringida sustancialmente, en los folículos preovulatorios tardíos (103).

Aún cuando la progesterona no es limitante como un intermediario para la producción de andrógenos tecales en pequeños folículos antrales, la acumulación de progesterona en pequeños folículos antrales y preovulatorios de rata es estimulada *in vitro* por hCG lo cual indica que la activación del receptor a LH también estimula un paso en la conversión de colesterol a progesterona. La producción de progesterona por las células de la teca está regulada hormonalmente y varía con la etapa de desarrollo folicular. El efecto de LH es probablemente el resultado de una actividad incrementada del rompimiento de la cadena lateral C 27.

La androstendiona es el principal esteroide aromatizable C 19 producido por las células de la teca interna aislada. La mayor abundancia de androstendiona que de testosterona se debe a una deficiencia en 17 β hidroxiesteroide deshidrogenasa, un hecho que tiene significado en la cooperación esteroidogénica de las células de la teca y de la granulosa. El segundo metabolito 5 α reducido más abundante es 5 α - androstane 3 α , 17 β -diol que puede ser derivado de la testosterona por las mismas reacciones que la androstendiona y

puede ser el resultado de la conversión de androsterona a 5α androsten- $3\alpha,17\beta$ -diol en una reacción reversible catalizada por una aparentemente débil actividad te cal de 17β -hidroxiesteroide deshidrogenasa.

La actividad de las 5α reductasas, que es la mas alta antes de entrar a la pubertad, disminuye grandemente en los ovarios de ratas adultas. Rutas alternas del catabolismo de progesterona, además de las involucradas en la producción de andrógenos, también ocurren en las células de la teca.

Las células de la teca también pueden aromatizar andrógenos y contribuir directamente a la secreción de estrógenos en varios grados dependiendo de la especie y la etapa folicular. La mayoría de los estudios indican que la actividad de aromatasas (conversión de esteroides C 19 a estrógenos) en las células de la teca no es significativamente mayor que en las células de la granulosa.

Hay poca información directa para distinguir las funciones esteroidogénicas de las células intersticiales secundarias de las de la teca interna y en general se asume que las vías biosintéticas son similares (103).

Se ha demostrado que las células de la teca también sintetizan renina, relaxina, prostaglandina y factores angiogénicos (62).

Células de la granulosa

Mientras que las vías esteroidogénicas de las células de la teca e intersticiales funcionan primariamente en la producción de novo de los andrógenos, las vías de las célula de la granulosa están organizadas principalmente para el metabolismo de los esteroides C 19 (andrógenos) a estrógenos y para la síntesis de novo de progesterona y sus metabolitos C21. La cooperación entre los compartimentos de la teca y de la granulosa parece ser crucial para el control por las gonadotropinas de la secreción hormonal esteroidea en todas las especies. Esta cooperación toma forma de intercambio de vías intermediarias de esteroides, efectos esteroideales directos sobre actividades enzimáticas y regulación parácrina. Evidencias de estudios *in vivo* e *in vitro* indican que las células de la granulosa de grandes folículos antrales y preovulatorios son el sitio principal, aunque no exclusivo, de la actividad de aromatasas y biosíntesis de estrógenos. La regulación de actividad de aromatización de andrógenos en las células de la granulosa de todas las especies es por acción de FSH .

Estudios con células de la granulosa de rata sugieren que el citocromo P-450 aromatasas es inducido por FSH o dbAMPc. Además de la acción de FSH para inducir la enzima aromatasas en las células de la granulosa, la biosíntesis de estrógenos requiere la cooperación de las células de la teca aportando los sustratos de andrógenos para la reacción de aromatización.

La producción de progesterona y sus metabolitos (progestinas) es una de las principales actividades biosintéticas de las células de la granulosa en grandes folículos antrales y preovulatorios. La biosíntesis de progesterona ocurre inicialmente en respuesta a la estimulación con FSH, pero esta acción es posteriormente aumentada por LH después de

que sus receptores se han diferenciado. LH sola no estimula la biosíntesis de progesterona en células de la granulosa en cultivo de ratas hipofisectomizadas. Una mayor estimulación de la biosíntesis de progesterona ocurre *in vivo* después del aumento de LH, frecuentemente después de un decrecimiento en la producción cuando las células de la granulosa sufren diferenciación (luteinización).

La vía biosintética de progesterona en las células de la granulosa es típica en todas las células esteroidogénicas, involucrando la conversión de colesterol a pregnenolona y después a progesterona. En etapas antrales y preovulatorias, el colesterol intracelular se deriva casi totalmente de la síntesis de novo y quizá en pequeñas cantidades de almacenes endógenos de lípidos, el colesterol asociado con lipoproteínas en la sangre no pueden penetrar la capa granulosa avascular. Solo después de la ovulación es cuando la lipoproteína extracelular puede ser la principal fuente de colesterol como precursor para la biosíntesis en células granulosa-luteínicas.

La aparente reacción limitante para la biosíntesis de progesterona, regulada por la acción de FSH sobre las células de la granulosa, es el rompimiento de la cadena lateral del colesterol. Se ha sugerido que los efectos de la estimulación hormonal de esta actividad enzimática involucran un aumento en la asociación de colesterol con P-450 scc vía un péptido activador de bajo peso molecular. FSH también puede aumentar la actividad de la enzima que rompe la cadena lateral en este tipo celular. La P-450scc y adrenoxina aumentan solo en la fase luteal temprana y media, lo cual sugiere que la inducción en esta etapa es primariamente el resultado de la estimulación con LH.

FSH y subsecuentemente LH estimulan grandemente la actividad de las células de la granulosa de $\Delta 5, 3 \beta$ hidroxisteroide deshidrogenasa : $\Delta 5-4$ isomerasa. Después de la estimulación con gonadotropina la actividad de $\Delta 5, 3 \beta$ hidroxisteroide deshidrogenasa aparentemente no es limitante para la síntesis de progesterona en células de la granulosa de ratas inmaduras que no acumulan substancialmente pregnenolona durante la síntesis de progesterona.

El metabolismo de la progesterona a 20α dihidroprogesterona es influenciada por la estimulación de 20α hidroxisteroide deshidrogenasa. En contraste LH aparentemente no es requerida para la misma actividad de esta enzima en los ovarios en proestro de rata. La conversión de progesterona a 20α dihidroprogesterona en el cuerpo lúteo de la rata es importante para regular la actividad prostestacional durante la gestación y el parto (118).

Las células de la granulosa (excepción de bovino) no tienen actividades significativas de enzimas de rompimiento de cadena lateral de C 21 y sintetizan pocos o ningunos esteroides C 19 de pregnenolona o progesterona (128).

Las células de la granulosa poseen considerable actividad de 17β hidroxisteroide deshidrogenasa que actúa sobre esteroides C 19, androstendiona y testosterona, al igual que productos de aromatización, estrona y estradiol. Aún cuando la androstendiona es el principal andrógeno ovárico en la mayoría de las especies, la reacción 17β hidroxisteroide deshidrogenasa favorece la producción de estradiol como el principal estrógeno ovárico. La presencia de 5α reductasa y 3α hidroxisteroide deshidrogenasa en las células de la granulosa también permite que los andrógenos derivados de la teca sean convertidos a varios metabolitos reducidos del anillo A. FSH no influencia la

producción de metabolitos 5α reducidos de testosterona (androsterona y 5α androstane- 3α , 17β diol) en cultivo de células de rata.

Desde el punto de vista fisiológico la aromatización de los andrógenos derivados de la teca es quizá la vía más importante de metabolismo de andrógenos de las células de la granulosa (103).

Se ha demostrado que las células de la granulosa tienen receptores a LH, FSH, somatomedina C, factor semejante a insulina (IGF-1), GnRH y activador de plasminógeno (62).

Cooperación teca-granulosa

Las células de la teca son estimuladas por LH para producir andrógenos aromatizables y las células de la granulosa responden a FSH con un aumento en la actividad de aromatasas pero sin la producción de novo de sustratos C19.

La teoría moderna de dos tipos celulares/dos gonadotropinas se demuestra con el hecho de que las células de la teca interna (y quizá también las células intersticiales) son estimuladas por LH para producir andrógenos que a su vez atraviesan la membrana basal para ser utilizados para la biosíntesis de estrógenos dentro de las células de la granulosa en una reacción estimulada por FSH. La evidencia en varias especies de la exclusiva localización de sitios de unión a FSH en las células de la granulosa y de sitios de unión inicialmente sobre las células teca-intersticiales y solo después sobre las células de la granulosa. La evidencia *in vitro* apoya el concepto de cooperación metabólica en la biosíntesis de estrógenos por dos tipos celulares y es de tres tipos:

- 1.- los andrógenos producidos en la teca salen de estas células para participar en la biosíntesis de estrógenos, siendo la diferencia que los andrógenos se difunden hacia la capa de las células de la granulosa
- 2.- la adición de andrógenos aromatizables a las células de la granulosa es esencial para la producción significativa de estrógenos y la adición de pregnenolona u otro precursor C21 a las células teca les tiende a aumentar la producción de andrógenos
- 3.- la recombinación de tejido aislado de la teca y células de la granulosa coincubado demuestran sinérgico en la síntesis de estrógeno siempre y cuando los dos tipos celulares sean estimulados por las gonadotropinas apropiadas *in vitro* o sean derivadas de folículos esteroidogénicamente activos.

La hipótesis de la cooperación celular requiere que los andrógenos de origen tecal difundan a través de la membrana basal para que tengan acceso a la enzima aromatasas de las células de la granulosa, difusión que ocurre y de hecho hay un gradiente de andrógenos desde la teca a través de la membrana basal hacia las células murales y finalmente hasta el líquido folicular.

En cuanto a la actividad esteroidogénica de los folículos hay evidencia indirecta que sugiere que en varias especies se adquiere una actividad esteroidogénica limitada a la etapa preantral aunque se expresa débilmente hasta la etapa antral. Los receptores a FSH se encuentran en las células de la granulosa de todas las etapas foliculares, incluyendo folículos preantrales tempranos (129). La contribución precisa de los folículos preantrales a la producción de esteroides ováricos no está bien entendida, principalmente debido a las dificultades para estudiar las actividades secretorias relativamente bajas *in vivo* y porque la metodología para aislar folículos preantrales no está bien desarrollada. Como las células de la teca de ratas inmaduras producen cantidades mínimas de estrógenos (130) y las preparaciones de células intersticiales en cultivo solo producen pequeñas cantidades de estrógenos (131), la síntesis neonatal de estrógenos ováricos *in vitro* puede ser un indicador de la actividad de aromatasa en las células de la granulosa. Sin embargo es posible que las células tecales e intersticiales neonatales en esta etapa difieran de aquellas en ratas más viejas y sean capaces de biosintetizar estrógenos. El crecimiento folicular en la rata neonatal empieza el día 2 postparto con folículos multilaminares formados el día 6 pero es hasta el día 10 que los primeros folículos con antrao aparecen en números significativos. Los datos sugieren que los folículos preantrales del período neonatal pueden responder a gonadotropinas y producir esteroides. Se ha demostrado que hay actividad de $\Delta 5$ 3β hidroxisteroide deshidrogenasa en células intersticiales en ovarios que a los 4 y 5 días son capaces de convertir progesterona marcada a estrógenos y se ha sugerido que las células intersticiales son responsables de estas actividades esteroidogénicas en la rata neonatal (132). Los sitios de unión de FSH, que se cree son específicos de las células de la granulosa, se han demostrado también en el ovario los días 5 y 6 (133) y se ha encontrado que FSH estimula la producción de AMPc y de esteroides en ratas de 4 días. Otros estudios con ovarios de ratas de 4 días de edad, en cultivo, han demostrado que la producción es estimulada por (Bu)2AMPc y la conversión de testosterona a estradiol es también estimulada por (Bu)2AMPc o FSH. La producción de estrógenos en estos estudios no fue estimulada substancialmente por FSH sola pero se incrementó grandemente por FSH en combinación con LH, lo cual concuerda con la forma de regulación de "dos tipos celulares - dos gonadotropinas". Estudios incubando *in vitro* ovarios de rata establecieron que FSH, LH o PGE2 estimulan cada una en diferente grado la producción de progesterona, androstendiona y estradiol en ovarios de 6 días y no antes. En estos estudios folículos preantrales secundarios eran las etapas más avanzadas, lo cual sugiere que la regulación por gonadotropinas de la síntesis *de novo* de las tres principales clases de esteroides puede ser producida por los folículos preantrales en desarrollo en cooperación con las células intersticiales. La LH fue el estímulo más potente para la producción de androstendiona y estradiol. La actividad de fosfodiesterasa limita la respuesta esteroidogénica a gonadotropinas en ovarios tempranos. Las capacidades esteroidogénicas se diferencian en los ovarios neonatales de rata aún antes de la total capacidad de respuesta a gonadotropinas y antes de la formación de los folículos antrales. La capacidad de respuesta a LH puede ser también regulada por la acción local de esteroides.

No se conocen los niveles a los cuales las actividades esteroideogénicas de los ovarios neonatales de rata pueden ser influenciadas por los altos niveles de FSH circulante y otras hormonas hipofisiarias presentes en este período. Solo se puede especular que las vías esteroideogénicas presentes en los ovarios neonatales de rata pueden ser expresadas como resultado de la cooperación de folículos preantrales y células intersticiales presentes en ovarios en edades de desarrollo posteriores, incluyendo adultos. Los esteroides secretados por los folículos preantrales en todas las etapas de desarrollo pueden estar influenciados por concentraciones locales dentro del ovario, afectando con ello la función folicular o maduración. Sin embargo hasta el momento todos los estudios realizados no han aportado la evidencia concluyente de que ocurra una esteroideogénesis significativa dentro del comportamiento folicular.

Muchos estudios *in vivo* con ratas normales inmaduras o hipofisectomizadas indican que los ovarios que consisten primariamente de folículos preantrales grandes son esteroideogénicamente capaces de responder a gonadotropinas. Los grandes folículos que se forman en ratas hipofisectomizadas no muestran una síntesis autónoma de estrógenos sino que requieren la estimulación con FSH o andrógenos aromatizables. Parece ser que la actividad significativa de aromatasa ocurre solo cuando los folículos antrales se forman en respuesta a la estimulación con FSH (103).

Las células de la granulosa aisladas de folículos primarios y preantrales de ovarios de ratas normales o hipofisectomizadas tienen una mínima producción de progestinas o estrógenos cuando se cultivan sin gonadotropinas aún en presencia de sustratos aromatizables. Otra característica de la citodiferenciación de las células de la granulosa como la formación de receptores a LH, también están ausentes en las células en cultivo sin gonadotropinas indicando que estas células están mínimamente diferenciadas. Es por ello aparente que las enzimas esteroideogénicas clave están ausentes o débilmente expresadas en células de la granulosa de folículos preantrales de ratas hipofisectomizadas o inmaduras normales. Como los folículos preantrales pueden, y probablemente lo hacen, desarrollarse sin el apoyo de gonadotropinas, es probable que las células de la granulosa de por lo menos las etapas preantrales tempranas no sean muy activas esteroideogénicamente. Es probable que los incrementos cíclicos en gonadotropinas circulantes actúen de manera coordinada para estimular la citodiferenciación y esteroideogénesis de células de la granulosa en folículos preantrales tardíos. Las células de la granulosa de folículos preantrales de ratas responden en cultivo a FSH con una secreción aumentada de esteroides C₂₁ y una actividad incrementada de aromatasa. Estos efectos esteroideogénicos *in vitro* generalmente aparecen después de 24 horas lo cual sugiere la necesidad de inducción de enzimas esteroideogénicas.

Se sabe que ciertas enzimas esteroideogénicas están presentes (aunque quizá no expresadas en forma máxima) en folículos preantrales que no han sido estimulados con gonadotropinas. Las células de la granulosa aisladas de ratas inmaduras, en cultivo, son capaces de convertir pregnenolona exógena a progesterona, 20 α dihidroprogesterona y probablemente cantidades menores de metabolitos de esteroides C₂₁ 5 α reducidos (142). También pueden convertir testosterona rápidamente a sus metabolitos 5 α reducidos, incluyendo 5 α androstane-3 α , 17 β diol y androstane. La demostración histoquímica de la

actividad de $\Delta 5 \beta$ hidroxisteroide deshidrogenasa en el ovario de rata indica que esta enzima está expresada fuertemente en las células de la granulosa de folículos preovulatorios pero está expresada solo débilmente en las etapas antrales anteriores. Esto coincide con la evidencia bioquímica de que la inducción de esta enzima requiere la estimulación de FSH.

Son diferentes los factores que pueden ser responsables de la limitación en la competencia esteroideogénica de folículos preantrales. Las células de la granulosa tienen receptores a FSH que por lo menos en los folículos preantrales tardíos están funcionalmente acoplados a adenilciclasa, estos receptores no funcionan óptimamente ya que se requiere estrógenos para aumentar la producción de AMPc estimulado por FSH. Esta respuesta aumentada de AMPc permite que FSH incremente la actividad de aromatasas y síntesis de estrógenos, así como el número de receptores a gonadotropinas y sitios de unión a AMPc (135). Estos cambios están asociados con el desarrollo del folículo antral. Aún cuando se asume que FSH y LH circulante están igualmente disponibles para las células de la granulosa de folículos preantrales y de etapas tardías por difusión de capilares de la teca a través de la pared folicular y hacia las capas de la granulosa, esta afirmación no ha sido totalmente probada. El tamaño molecular *per se* no es un factor limitante para la entrada de gonadotropina a la membrana folicular. La capacidad de folículos sanos y esteroideogénicamente activos para concentrar gonadotropinas en el líquido folicular parece indicar la importancia de la disponibilidad de FSH a la producción de esteroides. Está claro que las células foliculares aisladas de grandes folículos preantrales responden a gonadotropinas y las requieren para la producción de esteroides, pero no se sabe en que medida los folículos preantrales de varias especies secretan esteroides *in vivo*, en respuesta a fluctuaciones cíclicas normales en los niveles circulantes de gonadotropinas.

Los folículos antrales y especialmente los preovulatorios tempranos son la fuente mas importante de esteroides ováricos durante el ciclo. El patrón cambiante en la secreción de esteroides está asociado con un crecimiento aumentado de la célula folicular, citodiferenciación y considerable expansión del antro que ocurre en respuesta a cambios en los niveles de FSH y LH. La capacidad de secretar cantidades significativas de estrógenos, lo cual es una función que adquieren cuando se forman los folículos antrales, es sumamente importante para el aumento de la capacidad de respuesta de las células de la granulosa a FSH y subsecuentemente a LH. La acción directa de estrógenos a nivel folicular y el efecto indirecto adicional de la inhibición de retroalimentación de la secreción de gonadotropinas son factores importantes que contribuyen a la selección folicular.

La formación de un antro lleno de líquido folicular provee un marcador morfológico conveniente de la etapa de desarrollo del folículo cuando el crecimiento dependiente de gonadotropina empieza y la secreción de esteroides aumenta grandemente. La formación del antro es inducida por la acción de FSH, pero no por LH sola y probablemente refleje cambios en la función secretora de las células de la granulosa dependiente de FSH, al igual que la entrada de fluido intersticial. La vascularización aumentada y efectos

esteroidales sobre la permeabilidad vascular podrían también influenciar la acumulación antral de fluidos. La formación del antró no es absolutamente necesaria para la maduración folicular preovulatoria en todas las especies (Tenrecidae y Erinaceidae no forman folículos antrales).

Las células de la granulosa de folículos antrales tempranos generalmente no tienen características ultraestructurales típicas de células secretoras de esteroides por lo que se creyó que no tenían tal función. Solo después del aumento de LH se pueden observar cambios ultraestructurales en los organelos asociados con la esteroidogénesis en las células de la granulosa. Estos cambios son considerados la manifestación más temprana de luteinización morfológica, antes de la ovulación.

Las principales fuentes de estrógenos y progesterona ovárica durante la fase folicular son los grandes folículos antrales y preovulatorios y los pequeños y grandes folículos antrales son fuentes de andrógenos antes del aumento de LH.

Las mediciones de esteroides en el plasma venoso reflejan niveles de secreción a la circulación.

Ovulación

Existen varias teorías para explicar el mecanismo de la ovulación. La ruptura y liberación del ovocito secundario a la mitad del ciclo han sido atribuidos a una presión intrafolicular aumentada de líquido folicular, contracción del músculo liso intramural, mucificación, expansión y a un desalojo del cumulus del estrato granuloso y rompimiento por enzimas proteolíticas de la pared folicular (143).

La primera hipótesis propuesta sostenía que la ovulación ocurría como resultado de la acción de una enzima proteolítica específica que rompía la pared folicular causando la liberación del ovocito secundario. Posteriormente se demostró que varias serinproteasas podían debilitar la pared folicular e imitar la ovulación en conejos. En la teoría proteolítica las células foliculares secretan activador de plasminógeno que conduce a la formación de plasmina que debilita la pared del folículo (144). Posteriormente se demostró que la producción de activador de plasminógeno es controlada por hormonas. La teoría de mucificación sostiene que el complejo cumulus-ovocito se separa del estrato granuloso y la corona radiada se expande como resultado del depósito de glicosaminoglicanos inducidos por FSH/LH (145).

La teoría muscular está basada en la presencia de células de músculo liso en la teca y el bloqueo de las contracciones de músculo liso por EDTA que reduce la eficiencia ovulatoria. No se sabe si el inicio de las contracciones es neural o parácrino (38, 146).

La ovulación inducida por LH provoca cambios en la estructura celular del folículo, en su actividad proliferativa y esteroidogénesis de los folículos preovulatorios. Estos cambios ocurren en el intervalo entre el pico de LH y la ovulación, este intervalo es relativamente constante para cada especie (12-15 horas en el ratón y rata y 28-36 en el humano). Los cambios ultraestructurales que ocurren en las células de la granulosa antes de la

ovulación, incluyen cambios continuos del retículo endoplásmico granuloso al retículo endoplásmico liso y un cambio a una estructura mas homogénea de la cromatina. Las características típicas de luteinización como son, el aumento del retículo endoplásmico liso y la aparición de las mitocondrias con crestas tubulares, empiezan a aparecer aún antes de la ovulación en muchas especies. La evidencia histoquímica del aumento de la actividad esteroideogénica, también se hace evidente al aproximarse la ovulación. La actividad de $\Delta 5,3\beta$ hidroxisteroide deshidrogenasa es débil en células de la granulosa de folículos antrales en desarrollo pero aumenta con el aumento de estrógenos (136). En contraste con estos cambios en las células de la granulosa, las células de la teca interna muestran alta actividad de esta enzima durante toda la maduración del folículo. La producción de esteroides es alterada substancialmente en el periodo preovulatorio, después del aumento de LH. En minutos después del aumento de LH hay un importante incremento en la secreción de progesterona y estrógenos en especies como rata, chango y conejo, seguido por un marcado decremento a los niveles basales en varias horas. Esta fase inhibitoria después del aumento de LH o del tratamiento hCG está marcada por un decremento en las concentraciones de andrógenos aromatizables y estrógenos en el líquido folicular u ovarios.

En la rata hay un gran aumento preovulatorio de progesterona y de 20α dihidroprogesterona que ocurre cerca del momento del pico de LH. Estos extremadamente altos niveles de progestina (mayor que en la corta fase luteal del diestro), son probablemente derivados de las células de la granulosa cuando empiezan su proceso de luteinización pero no se conoce la contribución de las células teca/intersticiales. La LH, estimula la secreción de progesterona *in vitro* por células de la granulosa maduras de rata y el pretratamiento *in vivo* con testosterona aumenta significativamente esta secreción (141). Las determinaciones de esteroides en el líquido folicular de folículos preovulatorios se han hecho en ratas a las que se les dio primero un tratamiento con PMSG a bajas dosis para inducir la maduración folicular y luego LH para inducir la ovulación. En estos estudios la concentración de progesterona aumentó 7 veces una hora después del tratamiento con LH y se mantuvo durante 10 horas. Las concentraciones de androstendiona y estradiol en el líquido se elevaron antes del tratamiento con LH, aumentaron ligeramente una o dos horas después del tratamiento con LH y después descendieron a niveles extremadamente bajos por 6 horas. En otros estudios la inhibición de la esteroideogénesis y en particular de la producción de estradiol ocurre durante la segunda mitad del periodo preovulatorio en la rata (103).

La regulación de la inhibición transitoria de la producción de esteroides en el periodo preovulatorio de todas las especies probablemente ocurre a varios niveles. La evidencia de células luteales y células de la granulosa indica que concentraciones relativamente altas de LH causan una desensibilización transitoria a nivel de receptor de gonadotropina de tal manera que las células blanco se hacen refractarias a la estimulación de gonadotropinas. La desensibilización de las células de la granulosa es seguida por una regulación de receptores para LH, FSH y estrógenos. Normalmente durante la fase luteal se forman nuevos receptores y las células adquieren nuevamente su sensibilidad a LH en el tiempo en que la producción de progesterona aumenta grandemente. La liberación

pulsátil de niveles tónicos de LH durante la fase folicular puede ser importante para prevenir la desensibilización y la regulación que ocurre en forma natural en respuesta a altas concentraciones y prolongada exposición a LH a la mitad del ciclo.

La inhibición de la producción de estradiol después del aumento preovulatorio de LH es primariamente el resultado de la producción disminuida de andrógenos en las células de la teca e intersticiales. En un estudio *in vitro* con folículos de Graaf de rata, se demostró que la inhibición en la secreción de andrógenos era el resultado de la actividad reducida de la 17α hidroxilasa y/o C17,20 liasa ya que había una inhibición de la acumulación de estradiol, androstendiona y testosterona, 4-6 horas después del tratamiento con LH. Se ha sugerido que el factor protéico estimulado por LH puede inhibir las enzimas requeridas para el rompimiento de la cadena lateral C17 de la progesterona. Un estudio con ratas inmaduras tratadas con PMSG demostró que una dosis ovulatoria máxima de LH *in vivo*, provoca un aumento inicial en los andrógenos ováricos a las dos horas y después una reducción de andrógenos y estradiol 4-8 horas después de la inyección de LH con concentraciones declinando 6 horas después (138).

Se cree que la inhibición de la producción de estrógenos inducida por LH ocurre principalmente a nivel de 17α hidrolasa:C17, 20 liasa seguida por un decremento secundario en la actividad de aromatasa. Estudios *in vivo* e *in vitro* demostraron que la principal causa del rápido descenso en la secreción de estrógenos después del aumento de LH es la ilimitada disponibilidad de andrógenos aromatizables debido a las velocidades disminuidas de rompimiento de la cadena lateral de C21. Los niveles disminuidos de 17α hidrolasa :C17, 20 liasa responsables de la disminución de la producción de andrógenos están asociados con una marcada reducción en los niveles microsomales de citocromo P-450 en el ovario preovulatorio. El descenso en la actividad inducida de LH de estas enzimas limitantes era dependiente de la continuidad en la síntesis de RNA y proteína.

La secreción preovulatoria de estrógenos que llega a su pico poco antes del aumento de LH parece ser el mediador de la acción inhibitoria sobre la producción de andrógenos por la acción intraovárica directa (139). *In vitro* se ha visto que el estradiol inhibe la producción de andrógenos por células intersticiales del ovario en preparaciones celulares (140). En rata el tratamiento con estrógenos *in vivo* aumenta la producción *in vitro* de la respuesta de progesterona estimulada por LH de las preparaciones de células de la teca, lo cual sugiere que la viabilidad de las células de la teca se mantiene a pesar de la reducción en la producción de andrógenos (141).

Las prostaglandinas también pueden estar involucradas en la regulación esteroidogénica durante el período preovulatorio. Altos niveles de prostaglandinas (F y E) se encuentran en el fluido folicular de folículos preovulatorios de muchas especies (conejo, rata, puerco, humano) La síntesis de prostaglandinas es probablemente estimulada vía la acción de LH aumentando el AMPc. Las prostaglandinas pueden estar involucradas en la desensibilización a gonadotropinas, PGE2 estimula la producción de andrógenos en células de la teca. La adenilciclasa es desensibilizada a LH y FSH en la etapa preovulatoria, pero las células de la granulosa siguen respondiendo a PGE2. Las prostaglandinas también pueden mediar los efectos de LH sobre el aumento del flujo sanguíneo y la distribución intraovárica de sangre influenciando con ello la secreción de

esteroides a la circulación. Otro papel importante de las prostaglandinas en la ovulación es probablemente la ruptura folicular ya que este proceso es bloqueado por inhibidores de prostaglandín sintetasa y por antisuero contra prostaglandinas (103, 142).

Atresia folicular

La atresia es un fenómeno universal característico de vertebrados mamíferos y no mamíferos. En los no mamíferos los folículos son obliterados por una actividad fagocítica masiva por las células de la granulosa que a su vez degeneran. Los cambios morfológicos son menos drásticos en el ovario de mamífero (18). Se ha estimado que el 77% de los folículos se hacen atrésicos en el ratón y mas del 99% en el humano. Los folículos se hacen atrésicos en cualquier etapa del desarrollo pero los factores que inician y controlan la atresia no se conocen totalmente. Se sabe que son varios los factores que la determinan entre los cuales están el estado fisiológico del individuo (edad, salud), factores genéticos y ambientales (18, 38).

La mayor pérdida de ovogonias y ovocitos primarios ocurre durante la vida fetal y el período prepuberal, y el proceso es irreversible (62). Este proceso degenerativo en euterios puede ser el resultado de una adaptación evolutiva a la viviparidad y el relativo bajo número de descendientes de esta clase de vertebrados. Alternativamente la atresia puede ser el mecanismo por el cual las células germinales y somáticas programadas para morir pueden movilizar productos sintetizados a pocos folículos que van a ser reclutados y seleccionados para la ovulación.

Una vez que el folículo entra en el "pool" de crecimiento o es ovulado o se convierte en atrésico, es importante señalar que los folículos que no están en el "pool" de crecimiento también pueden degenerar (18).

Las ratas y ratones tienen aproximadamente de 15-20 folículos antrales grandes, 12-16 horas antes de la ovulación. Aproximadamente el 50% van a ovular y el resto sufre atresia. 6 horas después del aumento de gonadotropinas en el proestro, los folículos preovulatorios se distinguen de los atrésicos por la hiperemia de la pared folicular de los que van a ovular (38).

No es posible reconocer las etapas incipientes de la atresia, excepto por la reducida translucidez del folículo, el núcleo picnótico de las células de la granulosa y una relación andrógeno-estrógenos mayor de 1 (38). Un signo definitivo de atresia es que el 5% de las células de la granulosa tengan los núcleos picnóticos en la sección mas larga (147). A medida que avanza la atresia la degeneración de las células de la granulosa tiene todas las características de muerte celular apoptótica por lo que la apoptosis o muerte celular programada ha sido hipotetizada como un mecanismo de atresia folicular (117).

Se ha observado que en los folículos atrésicos se incrementan los espacios intercelulares en las células de la granulosa probablemente representando la pérdida de uniones "gap" que se reducen en los folículos atrésicos (147).

Los principales componentes celulares del folículo de Graaf que están involucrados en el proceso de atresia son: el ovocito, las células de la granulosa y las de la teca interna. De éstas el ovocito es el más lábil y su muerte se caracteriza por el rompimiento de la vesícula germinal (pseudomaduración o pseudosegmentación) (38) que incluye la alineación de los cromosomas en metafase y posiblemente la expulsión del corpúsculo polar, retracción del ovocito, regresión del ooplasma y los organelos tienden a agregarse y a desaparecer, la envoltura nuclear pierde su apariencia bilaminar, aumenta su grosor, se separa y rompe (18). Inicialmente el núcleo del ovocito está localizado periféricamente en las células que van a sufrir atresia, a diferencia de los ovocitos que son tradicionalmente activos (148). Los ovocitos atrésicos tienen pocas o ninguna célula del cumulus. La zona pelúcida se hialiniza (38) y sufre cambios estructurales con la formación de un retículo compacto de unidades globulares conectadas a cortos filamentos que a su vez están interconectados (18), cambios que ocurren cuando las microvellosidades del ovocito y la corona radiada se retraen. El ovocito y las células de la corona radiada se desacoplan con la reducción en el número de uniones "gap" hecho que aísla al óvulo del microambiente normal y finalmente el ovocito se desintegra siendo sus remanentes consumidos por células fagocíticas. La zona pelúcida puede persistir como una banda grasosa refringente dentro de la corteza ovárica.

Uno de los principales indicadores de atresia de los grandes folículos antrales es la cesación de la mitosis de las células de la granulosa, la ausencia de síntesis de DNA y proteínas, el aumento en el número de lisosomas y de enzimas hidrolíticas, aumento en el número y tamaño de las gotas de lípidos citoplasmáticos, disminución en el número de receptores a FSH y niveles de aromatasa lo cual da como consecuencia la reducción en la síntesis de estrógenos mas que un aumento en la producción de andrógenos (149). De igual manera se ha identificado un gradiente de picnosis del núcleo de las células de la granulosa (antral a basal), células que son eliminadas por neutrófilos y macrófagos (150). El antró es invadido por elementos del tejido conjuntivo y la membrana basal se pliega, engrosa y finalmente se rompe (151). En el líquido folicular se van a encontrar concentraciones aumentadas de androstendiona, testosterona dihidrotestosterona así como cantidades mínimas de estradiol y progesterona. El estrato granuloso se adelgaza y despega de la membrana basal (152) y los cuerpos apoptóticos protruyen de las células de la granulosa antrales (153).

Las células de la teca se van a hipertrofiar y a acumular grandes gotas de lípidos siendo aparentemente estas células la fuente de precursores ováricos de esteroides o de material de que se reutilizará para el futuro desarrollo de folículos (38). Estas células van a presentar las características típicas de células esteroideogénicas como son la presencia de un retículo endoplásmico liso y mitocondrias con crestas tubulares. Durante la atresia las células de la teca asumen una forma cuboidal con membranas plasmáticas excesivamente dobladas. Esta transformación de las células de la teca durante la atresia es similar a la morfología del intersticio secundario y por ello en muchas especies las células de la teca son progenitoras del intersticio secundario. El hecho de que estas células sean funcionalmente similares a las células intersticiales se demuestra por la secreción *in vitro*

de progesterona y la presencia de actividad de 3β hidroxisteroide deshidrogenasa (154). En varias especies (puerco, vaca y borrego) el destino final de la teca es la completa regresión sin contribución al intersticio.

La membrana basal se hace mas gruesa y fragmenta y presenta una intensa acumulación de fibronectina en las células que limitan con ella (rata, vaca y puerco).

Uno de los últimos pasos es el colapso total del folículo, la atrofia de las células de músculo liso en la teca externa (ratón) que puede ser la causa del encogimiento final.

Durante la atresia la androstendiona es el principal producto sin incorporación de acetato a la progesterona. En la etapa final se forma también 17 hidroxiprogestero.

Como las células de la granulosa tienen receptores a andrógenos es factible que las acciones atretogénicas de los andrógenos sean ejercidos directamente en estas células. La testosterona reduce la disponibilidad de receptores a estrógenos. DHT provoca una reducción de folículos primarios, secundarios y terciarios (18).

En folículos atrésicos de rata la degeneración de toda la pared de la granulosa toma cerca de 24 horas y otras 24 antes de que el ovocito quede totalmente desnudo de células del cumulus (18).

Hay varias hipótesis para explicar por qué las células de la granulosa están propensas a morir, se cree que las condiciones extracelulares que fueron adecuadas para mantener el folículo a través de su largo período de crecimiento, repentinamente se hacen insuficientes para sostener la viabilidad una vez que el folículo ha alcanzado su etapa antral. Es obvio que al crecer el folículo, las capas avasculares de la granulosa se hacen mas gruesas, y en algún punto durante el crecimiento el folículo encuentra un bloqueo metabólico, las células mas internas de la granulosa estarán demasiado lejos de los capilares tecales para recibir un adecuado suplemento de oxígeno. Los estudios en otros tejidos indican que el oxígeno puede difundir a una distancia máxima de 150 micrómetros y los folículos maduros de ratas miden más de 350 micrómetros y tienen capas de células de la granulosa que miden más de 120 micrómetros de grosor. Este hecho podría sugerir que los folículos pueden sufrir atresia durante la etapa antral temprana debido a que en esa etapa es cuando alcanzan los límites de gradiente de difusión del oxígeno. El folículo no solamente va a sufrir un inadecuado suplemento de oxígeno sino que además está en su fase de mayor proliferación ya que la división de las células de la granulosa es mas rápida durante la etapa antral temprana que en cualquier otra etapa (62). Las demandas cada vez mayores de intercambio de oxígeno y aporte nutricional y la limitada distancia de difusión resultan fatales para las células de la granulosa por lo que los folículos no pueden avanzar en esas condiciones mas allá de la etapa antral temprana a menos que adquieran nuevas características metabólicas y estructurales que solucionen estos problemas. Se sabe que las concentraciones de FSH mayores a las basales rescatan a los folículos antrales tempranos de la atresia permitiendo que logren los pasos finales de la diferenciación y ovulación. El paso de los folículos antrales tempranos hacia los preovulatorios se acompaña de niveles de FSH por arriba de los basales. Se ha propuesto que las concentraciones elevadas de FSH inducen cambios en las células de la granulosa

que aumentan su capacidad de sobrevivir bajo condiciones hipóxicas. Tales cambios pueden incluir modificaciones que faciliten el intercambio de gases y nutrientes entre las células o la inducción de vías metabólicas alternativas que favorezcan las condiciones de anaerobiosis (62). Se han descrito muchos de los efectos específicos de FSH sobre las células de la granulosa, muchos de los cuales incluyen la inducción de enzimas necesarias para aumentar la biosíntesis de esteroides y la adquisición de características que preparan al folículo para la ovulación. FSH aumenta el número de uniones estrechas de las células de la granulosa lo que podría alterar el intercambio intercelular de nutrientes, también podría alterar el metabolismo de las células de la granulosa para favorecer las condiciones hipóxicas. Poco después del aumento de FSH las células murales dejan de dividirse lo cual reduce la demanda metabólica. En adición la rápida acumulación de líquido folicular antral después de la exposición a altos niveles de FSH altera la geometría del folículo, la capa de la granulosa del folículo de Graaf se hace mas delgada y las células individuales son mas pequeñas y están mas compactas, comparadas con los folículos antrales.

La atresia es una forma fisiológica de muerte (apoptosis) y este mecanismo de muerte celular durante la atresia puede involucrar la expresión de nuevos genes. Cuando están llegando a su madurez final las células de la granulosa no solo adquieren la maquinaria para la expresión final de su fenotipo funcional sino también las endonucleasas endógenas que sirven para su propia destrucción. La activación de estas endonucleasas endógenas puede ser el mecanismo de atresia.

Se ha sugerido que la atresia es un fenómeno mediado por complemento y se ha propuesto que un estímulo hormonal inapropiado puede conducir a cambios en la permeabilidad de la membrana basal que podría dar acceso al folículo a proteínas séricas que podrían conducir a una activación intrafolicular del sistema de complemento, destruyendo la integridad de la membrana plasmática de las células de la granulosa (155).

El complemento también se puede activar por el activador de plasminógeno o plasmina presente en los grandes folículos (156). Hay evidencias preliminares de que hay activador de complemento en el líquido folicular de los folículos antrales de rata (62)

Luteinización

El cuerpo lúteo es una glándula que se desarrolla rápidamente del folículo ovulado y lleva a cabo una función vital en el proceso de reproducción a través de la secreción de progesterona, necesaria para la implantación del blastocisto. Después de la implantación, la continua secreción de progesterona es esencial para mantener un útero quiescente y un medio intrauterino adecuado para el desarrollo. Si no ocurre la fertilización y la implantación, el cuerpo lúteo involuciona con el consecuente descenso de la progesterona que conduce a un incremento en la secreción pulsátil de LH, a una mayor síntesis de estrógenos y a una nueva fase folicular.

Si la implantación ocurre, el embrión envía señales al cuerpo lúteo ya sea directamente o indirectamente para continuar secretando progesterona y evitar la regresión del cuerpo lúteo (157).

Una propiedad intrínseca del cuerpo lúteo es la capacidad para sintetizar *de novo* esteroides a partir de las células luteinizadas de la granulosa y de la teca (158). Las células de la granulosa de un folículo maduro miden cerca de 10 micrómetros de diámetro y tienen un retículo endoplásmico granular esparcido, poseen un complejo microsomal de enzimas de tipo aromatasas que convierten los andrógenos a estrógenos. Cuando el folículo ha alcanzado la madurez las células de la granulosa ya han adquirido receptores a LH por las acciones combinadas de FSH y LH y el aumento preovulatorio de LH estimula a estas células a diferenciarse a células luteales lo cual involucra una hipertrofia de las células de la granulosa que miden de 20-40 micrómetros, hay un aumento en la relación núcleo citoplasma, una marcada expansión del retículo endoplásmico liso y la aparición de grandes cantidades de gotas de lípidos que contienen ésteres de colesterol (159). La célula luteal en diferenciación tiene una gran capacidad para sintetizar progesterona y en especies como humano y rata el cuerpo lúteo retiene su actividad de aromatasas y produce estrógenos.

El cuerpo lúteo tiene la capacidad intrínseca para sostener la síntesis de progesterona y de recibir señales extrínsecas como son las hormonas luteotróficas. Los primeros días después de la ovulación el cuerpo lúteo de muchas especies continúa el curso de desarrollo normal y secreta progesterona sin ayuda de hormonas luteotróficas. Este fenómeno se considera como una secreción autónoma de progesterona sobre las bases de que el cuerpo lúteo sobrevive y secreta progesterona en ausencia de las hormonas de la hipófisis (160). Aún cuando las células en etapas tempranas de luteinización no parecen requerir hormonas hipofisarias, diferentes al estímulo inicial de LH, para la esteroidogénesis se deben tomar en cuenta otros reguladores potenciales como son la necesidad de lipoproteína derivada del colesterol para mantener en niveles altos la esteroidogénesis (161). Se sabe que la somatomedina C y la insulina tienen acciones tróficas sobre las células de la granulosa y células luteales *in vitro*, incluyendo la estimulación de la síntesis de progesterona y las respuestas aumentadas a otras hormonas tróficas. Los estrógenos estimulan la síntesis de progesterona en células de la granulosa bien diferenciadas y en células luteinizadas en cultivo y aumenta la respuesta a otras hormonas. Las interacciones de estos factores no hipofisarios sobre células luteinizadas no están bien entendidos pero sus acciones sobre las células de la granulosa las hacen candidatas para la regulación de la esteroidogénesis en células luteinizadas. Alternativamente, las células luteinizadas están llevando a cabo un programa limitado de diferenciación iniciado por LH y pueden no requerir factores extrínsecos para completar este programa y para la esteroidogénesis por varios días (157).

Posteriormente el cuerpo lúteo requiere de hormonas hipofisarias para su mantenimiento, estas son la prolactina y la LH. La prolactina promueve la secreción de progesterona en rata (160).

La LH tiene actividad esteroidogénica en el cuerpo lúteo y es considerada como la hormona luteotrófica más importante en la mayoría de las especies. El contraste entre estas dos hormonas ilustra la complejidad y aparente diversidad que ha evolucionado en las diferentes especies para regular el cuerpo lúteo. La LH ejerce su efecto esteroidogénico agudo a través de la activación de adenilciclase, el aumento de las

concentraciones de AMPc intracelular y la estimulación del movimiento de colesterol hacia las mitocondrias. Por otro lado el efecto esteroidogénico de la prolactina está mediado por mecanismos que parecen no involucrar un aumento en AMPc. En muchas especies la LH tiene un efecto agudo en el tejido luteal que es demostrable en incubaciones de corto tiempo. La prolactina no aumenta la esteroidogénesis en forma aguda en la mayoría de las especies pero puede estimular la producción de progesterona en las células luteales de rata dispersas en presencia de lipoproteínas (160, 161). En rata y conejo la LH tiene efectos esteroidogénicos agudos en el tejido luteal pero la acción directa de LH sobre las células no es requerida para que el cuerpo lúteo funcione normalmente después de la ovulación. En la rata, la prolactina y los estrógenos son las dos hormonas luteotrópicas esenciales (162).

La lista de hormonas luteotrópicas o efectores, por ejemplo aquellos capaces de producir una respuesta aguda en la esteroidogénesis de células luteales o en el mantenimiento de la producción de progesterona, puede ser extendido más allá de la prolactina, LH y estrógenos para incluir catecolaminas, prostaglandina E₂, gonadotropina coriónica humana y otras hormonas derivadas de los tejidos placentarios fetales y maternos. La actividad *in vitro* de la hormona no implica necesariamente un papel fisiológico obligado. La LH es activa universalmente para estimular la síntesis de progesterona en el tejido luteal o células *in vitro* aún cuando en ratas y conejos la LH parece ser ayudada por estrógenos, siendo estas dos especies la excepción.

Las catecolaminas presentan un problema conceptual similar al de LH, los tejidos luteales poseen receptores a catecolaminas del subtipo B1 o B2. La adenilciclasa sensible a catecolaminas está presente en el tejido luteal y las catecolaminas estimulan la producción de progesterona por células luteales *in vitro* pero, con excepción del gato, no se conoce el papel de las catecolaminas en la regulación del cuerpo lúteo en otras especies (157, 163).

Un aspecto muy importante involucrado en la luteinización es la vascularización, se sabe que el flujo sanguíneo (por gramo de tejido) hacia el cuerpo lúteo es mayor que hacia cualquier otra glándula u órgano siendo de aproximadamente el 90% del flujo sanguíneo ovárico durante la fase luteal media, el espacio vascular ocupa cerca del 20% del volumen del cuerpo lúteo y 60% de la superficie de las células luteales da directamente a un capilar. Las proyecciones estructurales sobre la membrana celular luteal son desiguales a los capilares endoteliales y la densa red de capilares provee una corta distancia de difusión entre las membranas plasmáticas de la célula luteal y la sangre. La rápida adquisición de un suplemento sanguíneo y la alta velocidad de flujo sanguíneo han llevado al planteamiento de que las hormonas luteotrópicas son también las que promueven el cambio en el flujo sanguíneo. En conejos y ratas, donde los estrógenos son luteotrópicos, éstos también son candidatos como reguladores del flujo sanguíneo luteal, efecto que se ha visto en otros tejidos que responden a estrógenos (157).

La aparente carencia de inervación del cuerpo lúteo y la carencia de cambios agudos en el flujo sanguíneo en respuesta a cambios en los estímulos luteotrópicos sugiere que la vascularización del cuerpo lúteo no es controlada por él mismo (164) ya que el flujo sanguíneo al cuerpo lúteo fluctúa de acuerdo a cambios en la presión arterial promedio.

Se sabe también que los vasos del cuerpo lúteo conservan características de vasos inmaduros y al no tener la capacidad de alterar la resistencia se comportan en forma pasiva y la regulación del flujo sanguíneo del cuerpo lúteo es mediado por cambios en la resistencia de arterias o arteriolas que están fuera del cuerpo lúteo.

El descenso del flujo sanguíneo luteal es el primer evento que conduce a la regresión luteal. Otra teoría es que el descenso del flujo sanguíneo es un evento secundario que acompaña o sigue a los cambios regresivos primarios en las células luteales. Utilizando prostaglandina $F2\alpha$ que es un vasoconstrictor y un agente luteolítico en varias especies, se ha visto que cambios en el flujo sanguíneo luteal preceden a la disminución de la secreción y viceversa (157).

El tejido luteal es una fuente de prostaglandinas y por ello en algunas especies una acción local o parácrina de las prostaglandinas puede estar involucrada en la regresión. Los receptores de prostaglandina $F2\alpha$ están localizados sobre células luteales (160). La acción primaria de prostaglandinas puede ser sobre células luteales y los cambios en el flujo sanguíneo luteal pueden sobrevenir en forma secundaria de alteraciones en la actividad celular luteal. El flujo sanguíneo del cuerpo lúteo puede también ser cambiado por la acción vasoconstrictora de la prostaglandina sobre arteriolas del estroma ovárico, de las cuales se deriva la sangre luteal. El sistema de vasculatura luteal puede ser sujeto a rápidas alteraciones en la estructura, quizá dando lugar a procesos de regresión. La regresión luteal es acompañada por pérdidas dramáticas en el número de células endoteliales luteales. Esta pérdida de células endoteliales semeja el proceso de apoptosis debido a que algunas células endoteliales empiezan a protruir a la luz del capilar y forman uniones adherentes a través de la luz de los capilares. Estas células endoteliales muestran condensación nuclear y citoplásmica y fragmentación con el rompimiento subsecuente de la membrana plasmática y los organelos. Algunas de estas células endoteliales en degeneración son englobadas por células endoteliales viables. Es tentador especular que la disminución en el flujo sanguíneo luteal durante la luteólisis está relacionado primariamente a esta regresión de capilares luteales mas que a vasoconstricción (165).

Es importante la abundante evidencia que existe para diferentes poblaciones de células esteroidogénicas luteales, cada una con poblaciones de receptores diferentes y con diferentes respuestas. No solamente puede una población celular cambiar su respuesta a una hormona dada, a medida que se diferencia y envejece, sino que una población celular puede potencialmente influenciar a otra (166). La evidencia del efecto luteolítico de oxitocina aunado al conocimiento de que ésta es sintetizada en el cuerpo lúteo conduce a la idea de que el cuerpo lúteo puede participar en su propia muerte vía oxitocina. Otro péptido, la relaxina, que es producido por el cuerpo lúteo también causa luteólisis por vías desconocidas. El cuerpo lúteo parece tener su propia regulación en tiempo para ciertos eventos, se ha sugerido que tiene mecanismos intrínsecos para su propia regulación. Debido a que es una glándula efímera, el cuerpo lúteo, tiene requerimientos especiales que la preparan para su propia destrucción mientras está llevando a cabo su crucial papel en la secreción de progesterona (157).

Esteroidogénesis

Los esteroides foliculares son producidos a partir del colesterol derivado de una de tres posibles fuentes:

- a) el colesterol preformado tomado de la sangre primariamente en la forma de lipoproteínas circulantes
- b) colesterol preformado almacenado dentro de la célula ovárica, ya sea como colesterol libre, un constituyente de las membranas celulares o liberado de ésteres de colesterol almacenados dentro de las gotas de lípidos citoplasmáticos
- c) colesterol sintetizado de novo en la célula ovárica de componentes de dos carbonos derivados del metabolismo de carbohidratos, grasa o proteína dentro de la célula (103).

La cantidad en que se utilicen una u otra de las fuentes de colesterol para la esteroidogénesis ovárica varía con las especies animales y el tipo celular involucrado. La utilización de cada uno puede ser sujeta a regulación con la importancia cuantitativa de una fuente u otra, que varían de acuerdo al estado fisiológico (167). La mayoría de los estudios sobre el papel del colesterol de diferentes fuentes como precursores esteroidogénicos ováricos, han utilizado tejidos extrafoliculares (cuerpo lúteo, tejido intersticial o células de la granulosa luteinizadas). En estos estudios el colesterol en lipoproteínas circulantes parece ser la fuente mas importante del colesterol esteroidogénico. Se ha acumulado evidencia que apoya un mecanismo de toma que involucra la unión de lipoproteínas extracelulares y a su componente apoproteína a receptores específicos localizados en la membrana celular, seguidos por la internalización del complejo receptor-lipoproteína, la toma de estos complejos por lisosomas, degradación de lipoproteínas por estererasas lisosomales y liberación del colesterol libre que entonces es capaz de tener acceso a las enzimas esteroidogénicas. El colesterol de lipoproteínas de baja densidad (LDL) y lipoproteínas de alta densidad (HDL) han sido implicadas como receptores esteroidogénicos en estos tejidos (168).

Existen diferencias entre especies en cuanto a la relativa importancia de las dos clases de lipoproteínas; HDL es de mayor importancia cuantitativa en roedores y LDL es la principal forma circulante de colesterol esteroidogénico en otras especies incluyendo el humano.

Las diferencias en la vascularización de varios componentes celulares del ovario influncian el grado en que las lipoproteínas circulantes pueden servir como precursores esteroidogénicos.

El cuerpo lúteo al igual que la corteza adrenal, tienen un abundante suplemento sanguíneo y un endotelio capilar altamente permeable, permitiendo que grandes moléculas de lipoproteínas tengan acceso a los receptores de lipoproteínas sobre las células luteales *in vivo*. La teca interna recibe aporte sanguíneo de un suplemento

vascular igualmente rico y puede por ello utilizar lipoproteínas de colesterol. Por otro lado las capas granulosa del foliculo están aisladas del contacto directo del aporte sanguíneo por una membrana basal relativamente impermeable que provee una barrera para grandes moléculas como LDL. Después de que se ha iniciado la luteinización por el aumento de LH *in vivo*, ocurre la penetración de la red capilar a través de la membrana basal, permitiendo el acceso de lipoproteínas a las células de la granulosa.

Las células ováricas, particularmente aquellas en una posición para tomar colesterol de lipoproteínas circulantes, almacenan cantidades sustanciales de colesterol en gotas de lípidos intracelulares, primariamente como ésteres de ácidos grasos de cadena larga. Un equilibrio entre el colesterol y ésteres acilgrasos en estos depósitos intracelulares y colesterol libre es mantenido por un balance de dos enzimas acilcoenzima A: colesterol aciltransferasa (ACAT) comunmente llamada colesterol estersintetasa y colesterol esterhidrolasa (colesterol esterasa) la primera favoreciendo el almacenamiento de exceso de colesterol en una forma esterificada y la última catalizando la liberación del colesterol almacenado. Las actividades de estas dos enzimas al igual que la 3-hidroxi-3-metilglutaril coenzima A-reductasa (HMG CoA reductasa), una enzima limitante de la velocidad en la biosíntesis del colesterol, están bajo control hormonal además de ser reguladas por los niveles intracelulares del colesterol y el colesterol libre y las contribuciones relativas a la esteroidogénesis del colesterol extracelular, del almacenado intracelularmente y del sintetizado *de novo*, a partir de precursores moleculares mas pequeños, puede diferir considerablemente bajo diferentes condiciones fisiológicas.

El primer paso en la conversión de colesterol a esteroides y el paso que generalmente se cree limitante de la velocidad de esteroidogénesis bajo la mayoría de condiciones, es la segmentación de la unión C20,22 dando por resultado un componente C21, pregnenolona, y un fragmento de carbón 6, aldehídoisocaprónico. El sistema enzimático que cataliza esta reacción está localizado en el lado de la matriz de las membranas mitocondriales internas. Es un complejo multienzimático que comprende 3 componentes: citocromo P-450_{sc} que es una oxigenasa terminal (aceptor de electrones), un flavinnucleótido (FAD) que contiene flavoproteína y una proteína luteodoxina sulfurada que contiene hem o adrenodoxina en células luteales o adrenales respectivamente y que sirve para transportar un electrón entre otros dos componentes (177). La reacción utiliza nicotinamida adenina dinucleótido fosfato (NADPH) generada dentro de la mitocondria por oxidación de los intermediarios del ciclo de Krebs o ácidos grasos. Tres moles de cada NADPH y de oxígeno son utilizados por mol de colesterol que sufre rompimiento de la cadena lateral. Se ha propuesto que el sustrato de colesterol y los intermediarios hidroxilados permanecen unidos a P-450_{sc} hasta que el producto final, la pregnenolona es formada y liberada (169).

Los productos esteroideos más abundantes de las células de la teca maduras en todas las especies son los compuestos C19 incluyendo los 4-ene-3 β hidroxisteroides y los andrógenos 5 α reducidos que son producidos por el catabolismo del colesterol. Como la teca interna está altamente vascularizada a medida que el foliculo madura, es razonable que, la internalización de la lipoproteína en la sangre sea la principal fuente de colesterol para la esteroidogénesis de las células de la teca *in vivo*.

La acción de LH vía receptores específicos presentes en las células de la teca en todas las etapas foliculares y la producción consecuente de AMPc provee el principal estímulo para las actividades esteroideas.

En cultivo se ha demostrado que las células intersticiales de ratas hipofisectomizadas constitutivamente expresan $\Delta 5-3\beta$ -hidroxiesteroide deshidrogenasa y tienen receptores funcionales a LH pero no son esteroideogénicamente activos hasta que son inducidos a diferenciarse con LH o prostaglandina E2 (PGE2). Esto refleja que existen mecanismos de control similares en el tejido tecal que también responde a LH o PGE2 con un aumento en la secreción de andrógenos (103).

La acción esteroideogénica de LH sobre las células de la teca aparentemente incrementa las actividades 17 α -hidrolasa:C-17,20-liasa en ovarios o folículos de rata. Estas actividades enzimáticas están limitadas en velocidad y parecen ser el sitio en el cual LH estimula la producción de esteroides C19 por células de la teca a medida que los folículos progresan de las etapas antrales pequeñas a folículos preovulatorios tempranos en la rata y donde la producción ovárica de andrógenos es restringida sustancialmente, en los folículos preovulatorios tardíos (103).

Aún cuando la progesterona no es limitante como un intermediario para la producción de andrógenos tecales en pequeños folículos antrales, la acumulación de progesterona en pequeños folículos antrales y preovulatorios de rata es estimulada *in vitro* por hCG, indicando esto que la activación del receptor a LH, también estimula el paso en la conversión de colesterol a progesterona. Las células de la teca aisladas de pequeños folículos antrales y preovulatorios producen, cantidades mayores de progesterona cuando son estimulados por AMPc, siendo ésta mayor en la teca de los folículos preovulatorios. Es evidente que la producción de progesterona por células de la teca, también está hormonalmente regulada y varía con la etapa del desarrollo folicular. Este efecto de LH es probablemente el resultado de una actividad incrementada del rompimiento de la cadena lateral de C27 y es consistente con una mayor producción de pregnenolona en células intersticiales de rata en cultivo, estimuladas con LH. La inmunocitoquímica ultraestructural ha visualizado a P-450_{sc} en unas cuantas células de la teca, pero el número de estas células que contienen esta enzima aumenta con el tratamiento con PMSG. En las células intersticiales hay una fuerte reacción a esta enzima, sin cambio por la estimulación hormonal.

La androstendiona es el principal esteroide aromatizable C19 producido por las células de la teca interna aisladas. Los niveles mas altos de androstendiona que de testosterona se deben a una deficiencia en 17 β -hidroxiesteroide deshidrogenasa, un hecho que tiene significado en la cooperación esteroideogénica de las células de la teca y de la granulosa. El segundo metabolito 5 α reducido mas abundante es 5 α androstane 3 α 17 β diol que se forma por una reacción reversible catalizada por una aparentemente débil actividad tecal de 17 β hidroxiesteroide deshidrogenasa. La actividad de la 5 α reductasa que es la mas alta antes de entrar a la pubertad disminuye grandemente en los ovarios de ratas adultas. Las rutas alternas del catabolismo de la progesterona, además de la involucradas en la producción de andrógenos también ocurren en las células de la teca.

En las células intersticiales de la rata el principal metabolito C21 es 20 α -hidroxiprogesterona. La producción de este metabolito se incrementa con el tratamiento con LH.

Las células tecales también pueden aromatizar andrógenos y contribuir directamente a la secreción de estrógenos en varios grados dependiendo de la especie y de la etapa folicular. La mayoría de los estudios indican que la actividad de aromatasa (conversión de esteroides C19 a estrógenos) en las células de la teca no es significativamente mayor que en las células de la granulosa (puerco y borrego) o es considerablemente menor que en las células de la granulosa. Hay poca información directa para distinguir las funciones esteroidogénicas de las células intersticiales secundarias de las de la teca interna y en general se asume que las vías de biosíntesis son similares.

Mientras que las vías esteroidogénicas de las células de la teca e intersticiales funcionan primariamente en la producción de novo de los andrógenos, las vías de las células de la granulosa están organizadas principalmente para el metabolismo de esteroides C19 (andrógenos) a estrógenos y para la síntesis de novo de progesterona y sus metabolitos C21. La cooperación entre los comportamientos de la teca y de la granulosa parece ser crucial para el control de las gonadotropinas de la secreción hormonal esteroidea.

Las hormonas esteroideas secretadas por el ovario pertenecen a tres clases principales: progestinas (progestágenos), andrógenos y estrógenos

Estrógenos

Fisiológicamente los estrógenos, estrona y 17 β estradiol son los mas importantes, sus nombres son el reflejo de sus funciones en la inducción de la receptividad sexual (estro) pero juegan papeles importantes en otros aspectos de la fisiología reproductiva. La estrona (3-hidroxi-estr-1,3,5 [10- trien-17-ona) fue el primer esteroide sexual aislado o identificado. El 17- β estradiol (estra-1,3,5 [10- triene-3, 17 β -diol) es aproximadamente 10 veces mas potente que la estrona sobre una base molar, es el esteroide mas activo de todos los producidos por el ovario. Varios derivados hidroxilados de este esteroide C18, los cuales poseen un anillo aromático A, han sido identificados recientemente en líquidos foliculares y tejidos y se cree que son de origen folicular.

Se sabe que los estrógenos tienen un efecto estimulatorio sobre el ovario. Los receptores a estrógenos se han encontrado en células de la granulosa, fracciones nucleares y células luteales.

Hay evidencias de que los estrógenos actúan dentro del ovario para inhibir la producción de andrógenos, los estrógenos probablemente originándose en las células de la granulosa y los andrógenos en las células de la teca ya que el tratamiento de ratas inmaduras con estradiol suprimió la producción de testosterona y de 5 α dihidrotestosterona y la administración concomitante de gonadotropinas no logró superar este efecto inhibitorio de los estrógenos lo cual indica que este efecto no es mediado por una circulación reducida de gonadotropina. De hecho hay una serie de experimentos que indican que los

estrógenos inhiben la síntesis ovárica de andrógenos en un sitio distal a la producción de AMPc probablemente en un paso o pasos enzimáticos en la vía esteroidogénica entre los andrógenos y sus precursores C21. De acuerdo con esta hipótesis los ovarios pretratados con estrógenos de ratas inmaduras *in vivo* han demostrado inhibir la conversión de progesterona marcada a andrógenos (testosterona, androstendiona y androsterona) *in vitro*. En cultivo de células intersticiales de rata se demostró que el estradiol causa directamente una rápida inhibición de las actividades de 17α hidrolasa y C17,20 liasa (181). Hay evidencias que indican que los estrógenos son capaces de regular el metabolismo de andrógenos por una acción directa sobre la 5α reductasa. Se ha demostrado un efecto inhibitorio de estradiol sobre la actividad de 5α reductasa en preparaciones microsomales de ovarios de ratas inmaduras y dado que la concentración mínima efectiva de estradiol requerida para inhibir la actividad de la enzima estaba en el rango medible en el líquido folicular se concluyó que el estradiol puede ser fisiológicamente significativo en la regulación del metabolismo de andrógenos.

La administración de LH a ratas inmaduras demostró que afectaba el metabolismo de la progesterona ovárica de forma idéntica que los estrógenos. Una serie de experimentos sugieren que la acción inhibitoria de LH sobre la síntesis de andrógenos puede estar mediada por la acción de otro esteroide ovárico y que este es el estrógeno. Después del aumento ovulatorio de LH, los niveles de andrógenos en el tejido ovárico, en la sangre venosa del ovario y en el suero aumentan inicialmente y después de varias horas descienden precipitadamente (103).

Este aparente efecto inhibitorio de LH sobre la producción de andrógenos aumenta la posibilidad de que esta inhibición represente un papel fisiológico de los estrógenos en el control intrafolicular de la biosíntesis de andrógenos. Puede ser que el aumento de LH inicialmente estimula a las células de la teca para producir andrógenos que son aromatizados a estrógenos por las células de la granulosa. Los estrógenos entonces inhiben el sistema enzimático 17α hidroxilasa:C-17,20-liasa, limitando con ello la futura síntesis de andrógenos y su uso subsecuente como sustrato para la aromatización. La capacidad de dosis bajas de estradiol para aumentar la producción de progesterona por células de la teca aisladas de bovino puede ser un reflejo de la acumulación de precursores después de la acción inhibitoria de estrógenos. Esta acción puede contribuir a una transición del folículo de una estructura primariamente secretora de estrógenos a una secretora de progesterona iniciado por el aumento de LH.

Otra acción regulatoria intrafolicular de los estrógenos ha sido el establecimiento temprano de su capacidad de aumentar la producción de estrógenos a través de una acción directa sobre las células de la granulosa. Los estrógenos son reguladores fisiológicos de la actividad de aromatasas de las células de la granulosa, la mínima dosis efectiva de estradiol requerida para una respuesta está dentro del rango de estradiol en el fluido de folículos preovulatorios. Los estrógenos pueden funcionar en el ovario o en folículos individuales como amplificadores del producto final para aumentar la aromatasas inducida por FSH (171).

Los estrógenos inhiben la síntesis de progesterona actuando un paso antes en la cascada estimuladora, posiblemente antes de la generación de AMPc. La acción de los estrógenos

parece limitar la conversión de pregnenolona a progesterona, dando por resultado una acumulación de pregnenolona en cultivo. La producción incrementada de pregnenolona en presencia de estrógenos también fue el resultado de una actividad aumentada del rompimiento de la cadena lateral de colesterol y el contenido mitocondrial de P-450 (103).

Andrógenos

Un número de esteroides C 19 no aromatizables, producidos por saturación del anillo A del núcleo esteroideo han sido identificados como andrógenos ováricos de considerable importancia. Los andrógenos ováricos 5α reducidos, como el 5α dihidrotestosterona, 5α androsten-3,17-diona, androsterona y epiandrosterona, y 5α androsten- 3α , 17β diol y sus 3β epímeros.

Con el establecimiento del papel obligatorio de los andrógenos como sustratos para la biosíntesis de andrógenos se olvidaron otras posibles funciones. En estudios posteriores se han encontrado sitios de unión específicos en las células de la granulosa. En los folículos sanos hay una relación inversa entre las concentraciones intrafoliculares de andrógenos y estrógenos. Altas concentraciones de andrógenos y estrógenos han sido asociadas con folículos no ovulares y atrésicos (172). Pero es difícil determinar si la predominancia de los andrógenos sobre los estrógenos es la causa de la atresia o solamente el resultado del proceso. Recientemente se ha encontrado un efecto positivo de los andrógenos sobre el crecimiento folicular. Se ha observado que los antiandrógenos aceleran la atresia en folículos preovulatorios de rata. En un intento por reconciliar las aparentes discrepancias entre los efectos de andrógenos dentro de los folículos de los ovarios es importante notar que la acción antagonista de los andrógenos sobre los eventos foliculares como ha sido implicado en la atresia, se cree afecta solo a aquellos folículos en las etapas preantrales y antrales tempranas.

El efecto facilitador de los andrógenos puede estar reservado para aquellos grandes folículos que ya han entrado a las fases finales del desarrollo.

En cultivo los andrógenos han demostrado estimular la biosíntesis de progesterona en folículos intactos de ovarios de ovejas y vacas y por célula de la granulosa aisladas de puerco, rata y ratón (103). La administración de andrógenos a ratas inmaduras incrementa la acumulación de progesterona por células ováricas aislada *in vitro*. Como tanto los andrógenos aromatizables como los no aromatizables fueron efectivos la respuesta parece ser androgénica mas que dependiente de la aromatización de andrógenos a estrógenos.

Los andrógenos además de tener sus propios efectos estimulatorios aumentan la síntesis de progestinas estimuladas por FSH (184). La potencia de varios andrógenos parece estar correlacionada con la cantidad en que son convertidos a testosterona o DHT.

Dependiendo del modelo animal utilizado los andrógenos han demostrado actuar en sitios pre y post AMPc.

La producción incrementada de esteroides C 21 en presencia de andrógenos no es un reflejo del catabolismo reducido por 5α reductasa aún cuando los andrógenos han sido reportados como reguladores del catabolismo de progesterona a través de la inhibición de 20α hidroxisteroide deshidrogenasa (174). Los andrógenos solos o en combinación con FSH no tienen efecto sobre los niveles de colesterol libre o esterificado en células de la granulosa de rata en cultivo. En estas células los andrógenos y FSH actúan sinérgicamente para aumentar la utilización de lipoproteínas, FSH y testosterona independientemente aumentan la conversión de colesterol a pregnenolona indicando una acción estimuladora sobre la scc de colesterol. El transporte de colesterol a la mitocondria no se afecta por FSH o andrógenos (175).

Los efectos de los andrógenos sobre 3β hidroxisteroide deshidrogenasa son inequívocos. Algunos datos sugieren que los andrógenos actúan sinérgicamente con FSH para aumentar la conversión de pregnenolona a progesterona mientras que otros datos sugieren que los andrógenos no son efectivos.

Hay muy pocos trabajos realizados para conocer los efectos intraováricos de los andrógenos en la esteroidogénesis teçal.

FSH tiene un papel regulador en la secreción ovárica de estrógenos a través de la inducción de actividad de aromatasa en las células de la granulosa de rata. En cultivo se ha demostrado que además de actuar como sustratos para aromatasa estimulada por FSH los andrógenos también aumentan la inducción por FSH de la actividad de la enzima. Los andrógenos aromatizables y los no aromatizables (5α dihidrotes-tosterona y androsterona) fueron efectivos aún cuando los no aromatizables fueron solo 50% potentes en comparación con los aromatizables. Queda claro que la acción de los andrógenos no es dependiente de su conversión a estrógenos. Hay evidencia que sugiere que en el modelo de rata los andrógenos influyen la actividad de aromatasa de las células de la granulosa en un sitio antes de la producción de AMPc. Aún cuando la testosterona aumenta la actividad de aromatasa inducida por FSH no tiene efecto sobre la síntesis de estrógenos inducida por AMPc. Los andrógenos aumentan la respuesta de células de la granulosa en cultivo a AMPc al igual que estimula la unión [125 FSH. (176). La aromatización de testosterona a estradiol por células de la granulosa aisladas de los grandes folículos en los ovarios de ratas en diestro II y proestro es inhibida competitivamente por andrógenos 5α reducidos. Además de las alteraciones de la actividad de aromatasa la biosíntesis folicular de estrógenos puede estar influenciada por la cantidad de sustrato C 19 disponible y la variación en la relación de andrógenos aromatizables a no aromatizables como un resultado de cambios en la actividad 5α reducida. En ovarios de rata y humanos los andrógenos aromatizables se convierten activamente a andrógenos 5α reducidos. Altas concentraciones de estrógenos en el líquido folicular han sido asociadas con folículos antrales sanos y bajos en niveles de estrógenos con folículos en degeneración, las alteraciones en la capacidad de las células de la granulosa para convertir andrógenos a estrógenos puede ser un mecanismo fisiológico para regular las concentraciones de hormonas esteroides intrafoliculares y el desarrollo de los folículos individuales.

Se ha observado un descenso en la actividad de aromatasas después del tratamiento con LH. La actividad incrementada de 5α reductasa podría contribuir a una disminución en la secreción de estradiol que ocurre dramáticamente después del aumento de LH en dos formas:

- a) disminuyendo los niveles intrafoliculares de andrógenos aromatizables a través de una actividad incrementada de 5α reductasa
- b) por niveles intrafoliculares aumentados de andrógenos 5α reducidos que sirven como inhibidores competitivos del sistema enzimático de aromatasas

Progestinas

Pregnenolona, (3β -OH-pregn-5-en-20-ona) es la progestina más importante producida por el folículo debido a su posición clave como precursor de todas las hormonas esteroides. Su producto más abundante C 21 es la progesterona (pregn-4-ene-3,20-diona), producida como un intermediario biosintético por los folículos en todas las etapas del crecimiento, como un producto secretorio final en los periodos peri y postovulatorios. Otro esteroide C 21 de origen folicular incluye la 17α -OH-progesterona (el precursor intermedio de los andrógenos aromatizables), 20α -dihidroprogesterona (20α -hidroxipregn-4-ene-3-ona) y sus epímeros 20β y 17α , 20α y 17α - 20β -pregnanediones. En adición los metabolitos reducidos del anillo A, de cada uno de los compuestos pregn-4-ene, se ha demostrado que son producidos en tejidos ováricos de varias especies (particularmente roedores) bajo ciertas condiciones fisiológicas.

No se sabe si las progestinas tienen un papel directo en la regulación intraovárica de la función ovárica. Algunos investigadores han encontrado que la administración exógena a ratas hipofisectomizadas tratadas con estrógenos de ratas inmaduras no tienen efecto sobre la morfología ovárica mientras que otros presentan evidencia de que la progesterona tiene un efecto inhibidor sobre el desarrollo folicular cuando se les da a ratas intactas. El efecto de la progesterona en estos experimentos puede ser mediado indirectamente por depresión de la secreción de gonadotropinas más que por una inhibición directa a nivel folicular, se ha sugerido que el retardo del crecimiento folicular por progesterona ocurre solo cuando las concentraciones plasmáticas de FSH y LH están significativamente reducidas (103).

En ratas prepúberes, los implantes de progesterona disminuyen las concentraciones séricas de LH y reducen la acumulación de estradiol en folículos aislados pero sorprendentemente facilitan los efectos estimulatorios de un tratamiento con dosis bajas de hCG sobre el crecimiento de pequeños folículos antrales y sobre la síntesis de estrógenos. Se ha sugerido que la progesterona puede facilitar la acción de LH bajo condiciones fisiológicas cuando la LH basal está baja. Aún en presencia de elevada progesterona sérica, la maduración preovulatoria al final de la gestación es apoyada por los aumentos pequeños y sostenidos de LH lo cual sugiere que la progesterona puede no tener un efecto directo sobre la maduración celular del folículo.

En apoyo a la acción directa de la progesterona sobre la regulación ovárica, se han identificado receptores específicos a progesterona en el ovario de rata y subsiguientemente en células de la granulosa de rata.

La progesterona también aumenta la capacidad de las células de la granulosa de rata en cultivo para responder a FSH en la producción de AMPc. La posibilidad de que la acción de progesterona sea mediada por una unión no específica a receptores de andrógenos ha sido considerada pero se demostró que no era así (177).

La secreción aumentada por FSH de estrógenos fue reducida después del tratamiento con progesterona, 20α dihidroprogesterona.

En células de la granulosa aisladas la mañana del proestro de folículos de ratas inmaduras tratadas con PMSG, la progesterona tenía un efecto supresor ligero sobre la síntesis de estradiol. Pero una vez que la actividad de aromatización había sido inducida la síntesis de estradiol era menos sensible a la inhibición por progesterona.

Se ha demostrado un efecto inhibitorio de la progesterona sobre la secreción de estrógenos in vivo, actuando la progesterona a nivel del sistema enzimático de aromataza (103).

Desarrollo folicular durante el ciclo estral de la rata

Se ha propuesto que el aumento secundario de FSH en estro inicia el reclutamiento de los folículos en crecimiento y éstos serán ovulados en el siguiente estro (4 a 5 días después). Otros factores que preceden al aumento secundario de FSH del ciclo inmediato están aparentemente también involucrados en la regulación del desarrollo del folículo. Los estudios de cinética han demostrado que los grandes folículos preovulatorios que son ovulados en respuesta al aumento de LH entran al "pool" de crecimiento 20 días antes. Estos folículos pueden haber sido reclutados por un aumento de gonadotropinas y fueron expuestos a 3 o 4 aumentos consecutivos de gonadotropinas hasta la ovulación.

Parece ser que los folículos primordiales entran al "pool" de crecimiento a una velocidad constante sin que afecte el día del ciclo estral (94). Los folículos que entran al "pool" el día 1 (estro) cuando los niveles de FSH están elevados pueden ser estimulados por gonadotropinas a moverse a etapas más avanzadas en el desarrollo.

Durante los 20 a 30 días de crecimiento los folículos están expuestos a 4 o 5 aumentos consecutivos de LH/FSH en intervalos recurrentes y estos aumentos afectan pequeños folículos en desarrollo. El aumento de LH puede sincronizar el inicio de la síntesis de androstendiona y estradiol durante el desarrollo folicular. La LH parece inhibir la acción de FSH sobre la esteroidogénesis inmediatamente después del aumento pero actúa sinérgicamente con FSH en etapas tardías del desarrollo. La FSH actúa sobre los folículos sincronizados esteroidogénicamente después de su reclutamiento en la población en crecimiento (18).

Para la mayoría de las especies el potencial esteroidogénico de los pequeños folículos preantrales es un enigma.

Los pequeños folículos en crecimiento son influenciados por cambios en las gonadotropinas. Los pequeños folículos preantrales con 1 a 5 capas de células de la granulosa carecen de cubierta teical. En la mañana del proestro hay síntesis de DNA, una segunda síntesis es evidente la mañana del estro que no solo involucra a los pequeños folículos preantrales sino que incluye todas las etapas sanas mas grandes. La capacidad de FSH para aumentar la síntesis de DNA de pequeños folículos preantrales está asociada con un aumento en la actividad de AMPc esto ocurre probablemente también en la rata. Se ha sugerido que en el tercer ciclo antes del ovulatorio, el aumento preovulatorio de FSH determina a los folículos seleccionados para los tres siguientes ciclos (178).

Estro

El aumento de FSH en la rata dura 24 horas (tarde del proestro hasta antes de la noche del estro). La razón del aumento de los niveles de FSH en el estro es el descenso en el proestro tardío de los niveles en la sangre venosa de la actividad semejante a la inhibina coincidente con un descenso en el líquido folicular de los niveles de inhibina y un cese de la secreción de inhibina por las células de la granulosa en cultivo. Existe también una correlación negativa entre el descenso en el número de folículos antrales (debido a la ovulación) y el aumento en los niveles de FSH. Las células de la granulosa de folículos primarios y las de células de la teca de folículos terciarios expresan RNAm de inhibina α , mientras que el RNAm de inhibina β es expresado solo por las células de la granulosa de folículos terciarios. El aumento periovulatorio de gonadotropinas disminuye la expresión génica de la inhibina β y aumenta la inhibina α en las células de la granulosa (179).

Existe una fuerte relación inversa entre los niveles séricos periféricos de FSH y niveles de inhibina en el plasma venoso de la rata. En proestro, en asociación con el aumento de LH, los niveles venosos de inhibina disminuyen indicando que la luteinización temprana altera la capacidad de las célula de la granulosa de folículos maduros para producir inhibina. La hipófisis es liberada de su regulación por retroalimentación, por un descenso en los niveles de inhibina y en seguida en forma inmediata por el aumento secundario de FSH. Un factor estructuralmente relacionado con la inhibina es la sustancia inhibidora mülleriana. En la rata prepuberal el RNAm de la sustancia inhibidora mülleriana es expresado en los folículos preantrales, antrales pequeños, especialmente en las células de la granulosa adyacentes al ovocito pero no en folículos primordiales y los grandes preovulatorios. En la rata las principales células blanco de FSH en estro son los grandes folículos antrales de 350-550 micrómetros de diámetro (180). Estos folículos poseen receptores a LH y FSH, los de FSH están en las células de la granulosa y los de LH están en la teca de los grandes folículos preantrales y sobre las células de la granulosa de folículos antrales.

El mensaje del receptor de FSH es expresado solo en las células de la granulosa de folículos preantrales y antrales de rata mientras que el gene receptor de LH es expresado solo en la teca y en las células intersticiales (181). Una disminución de los receptores

funcionales se puede deber a una combinación de internalización, degradación o inhibición de la expresión del gene receptor .

Evidentemente la FSH induce la esteroidogénesis de las células de la granulosa y aumenta el número de receptores a LH asociados con el desarrollo folicular preovulatorio. En la rata inmadura (intacta o hipofisectomizada) los efectos ováricos locales de estrógenos exógenos aumentan la capacidad de respuesta del ovario a FSH. Se han caracterizado dos tipos de receptores a estrógenos en las células de la granulosa de la rata: un tipo está presente solo en el citosol y no parece estar involucrado en la respuesta genómica; el otro tiene el K_a y especificidad esteroideal típica de los sistemas que unen estrógenos. La liberación de FSH en el estro después (o coincidentemente con) el descenso en la secreción de inhibina estimula el desarrollo folicular. Hay muchas acciones de FSH que aseguran el apropiado desarrollo del folículo en la etapa preovulatoria. La secreción de estradiol estimulada por FSH en las células de la granulosa de rata tienen un periodo lag de cerca de un día *in vitro* coincidiendo con el inicio de la secreción de estradiol en diestro I o II (día 2 o 3). Se sabe que se requiere de FSH y LH para mantener la secreción de estradiol en los folículos en crecimiento. Aún cuando la FSH es capaz de estimular estradiol y aromatasas, estudios *in vitro* en células de la granulosa de ratas tratadas con FSH han demostrado que LH también mantiene la producción de estrógenos (18). Aún cuando FSH y LH son las gonadotropinas primarias para el desarrollo folicular hay actualmente gran cantidad de información para los papeles modulatorios críticos de múltiples factores intraováricos especialmente los factores de crecimiento. Entre los factores de crecimiento, el factor de crecimiento epidermal (EGF), el factor de crecimiento transformante ($TGF-\alpha$), factores de crecimiento semejantes a insulina I y II y el factor de crecimiento básico de fibroblastos (bFGF) son los que han recibido mas atención. En rata por inmunquímica se demostró que el $TGF-\alpha$ está presente solo en las células de la teca /intersticiales y es ahí donde se detecta su RNAm. Se ha demostrado que el tratamiento de ratas inmaduras con FSH aumenta el nivel del mensaje de $TGF-\alpha$ sin cambiar la proteína. No se sabe como puede FSH influenciar las células teca /intersticiales que carecen de receptores a FSH. Se ha identificado una sustancia semejante a EGF en las células teca/intersticiales que después se indentificó como $TGF-\alpha$ (182).

EGF estimula la proliferación de células de la granulosa *in vitro* (183). Se ha demostrado que la síntesis de FSH y la de DNA inducido por AMPc es bloqueada por anticuerpos EGF específicos lo que sugiere que AMPc no participa en la cascada de eventos que conducen a la síntesis de DNA. AMPc también estimula *in vitro* la proliferación de las células de la granulosa y el crecimiento del ovocito en los ovarios primarios de ratón en cultivo en geles de colágena. EGF inhibe la actividad de aromatasas en las células de la granulosa de rata (184). Los sitios de unión de EGF en el ovario de rata están localizados en las células de la teca y de la granulosa de folículos secundarios y terciarios (185).

La proteína IGF I ha sido localizada en el ovocito, células de la granulosa y células teca/intersticiales de los folículos de rata en desarrollo. Los genes IGF-I e IGF-II se expresan en las células de la teca y granulosa. La hipofisectomía de la rata causa una marcada disminución de la inmunoreactividad de IGF-I folicular lo cual sugiere una

posible actividad de regulación de la actividad de IGF-I por las gonadotropinas. El RNAm de IGF-I es detectado en las células de la granulosa de folículos preantrales y antrales pero no en células atrésicas o luteales, lo que sugiere que la expresión de IGF-I se apaga cuando las células de la granulosa se diferencian terminalmente en células luteínicas. En folículos preovulatorios el mensaje de IGF-I se localiza solo en las células de la granulosa antrales y murales (186). IGF-I no tiene un efecto claro en la proliferación de células de la granulosa. IGF-I estimula selectivamente la expresión génica de P-450_{osc} en las células teca/intersticiales y potencia los efectos LH sobre la biosíntesis teca/intersticial. También potencia la biosíntesis de progesterona en células de la granulosa en cultivo. Toda esta evidencia sugiere que IGF-I tiene un papel crucial en modular los efectos de las gonadotropinas en las células foliculares. No se conoce el papel de IGF-II pero se ha reportado su expresión génica en las células de la teca de rata (187).

Las proteínas que unen IGF-I unen y modulan la acción de IGF-I. IGFBP inhibe la toma de timidina tritiada y producción de progesterona y estradiol por células de la granulosa en cultivo. Se le ha adjudicado un papel antigonadotrópico a IGFBP-3 en la rata. El RNAm de esta proteína se ha demostrado solamente en las células teca/intersticiales. La hormona de crecimiento aumenta la expresión del mensaje de IGFBP-3. Aún cuando estos resultados sugieren que una atenuación en la producción de IGFBP-3 es uno de los mecanismos por los que FSH o estrógenos estimulan las funciones del ovario los estudios están incompletos sin probar LH, cuyo blanco primario son las células teca /intersticiales, debido a la presencia de receptores a LH. En humanos y cerdo IGFBP-3 está localizada en las células de la granulosa. El factor de crecimiento básico de fibroblastos (bFGF) atenúa significativamente los receptores a LH inducidos por FSH y la actividad de aromatasa en las células de la granulosa de rata (188). Esta proteína ha sido detectada en las células de la teca de la rata. En cultivo de células teca/intersticiales de rata bFGF atenúa la producción de androstendiona inducida por hCG también es un potente inhibidor de la actividad P-450 17 α en las células de la teca de la rata. Atenúa el efecto inducido por FSH en la subunidad reguladora (RII) de la proteinquinasa AMPc dependiente vía un mecanismo dependiente de proteinquinasa C en células de la granulosa de ratas inmaduras tratadas con dietilestilbestrol y con ello evita la citodiferenciación inducida por FSH. Recientemente se ha propuesto un papel de bFGF en la maduración del ovocito como estimulador de la producción de AMPc en células de la granulosa de rata e induce la expresión del mensaje activador de plasminógeno tisular en el ovario de rata (189), también induce 10-80% de rompimiento de la vesícula germinal en un rango de 0.6 a 333 nmol en ovocitos dentro de folículos e induce la formación de prostaglandinas en los mismos folículos. Por lo tanto bFGF mimetiza ciertas funciones importantes de LH.

Para el desarrollo folicular normal la proliferación celular se debe compensar en algún punto con la diferenciación celular. Debido a la rápida multiplicación de las células de la granulosa es lógico asumir que ciertos factores en el ovario deben contraactuar en la proliferación de los mitógenos ya mencionados y armonizar el desarrollo folicular. Uno de esos factores es el factor de crecimiento transformante β (TGF- β) que es una proteína

de 25 kDa. multifuncional y heterodimérica, que existe en tres isoformas en mamíferos, se localiza en las células de la teca de ratón y de rata (190).

FSH regula selectivamente la actividad de TGF- β II en las células de la granulosa mientras que LH influencia a TGF- β I. En presencia de FSH, TGF- β , estimula la proliferación de las células de la granulosa de rata inmadura en cultivo. Se ha sugerido que la acción de FSH sobre las células de la granulosa de rata es mediada por TGF- β . La forma de acción es que alarga la fase G1 del ciclo mas que mover a las células hacia la fase S. Fases G1 mas largas permiten que más células entren a esta fase desde la Go (191).

Además de la síntesis de DNA, TGF- β también aumenta la diferenciación de las células de la granulosa, estimula la actividad de aromatasa inducida por FSH, induce a los receptores de LH y EGF a la producción de progesterona en las células de la granulosa de rata (191). TGF- β I inhibe la biosíntesis de andrógenos quizás bloqueando la actividad de P-450 17 α (201). TGF- β aumenta la actividad de aromatasa y la acumulación de AMPc en células de la granulosa de rata inmadura tratada con dietilelbestrol en cultivo. Esto sugiere que TGF- β en unión con otros factores de crecimiento proliferativo regulan el proceso de desarrollo del folículo. Las actividades positivas o negativas de los factores de crecimiento dependen en mucho de las gonadotropinas.

Los ovarios de mamífero contienen numerosos macrófagos dentro del intersticio que sintetizan multitud de citoquinas como interleucinas IL y factor de necrosis tumoral alfa (TNF- α) y también factores de crecimiento no citoquinas como bFGF, TGF- α y TGF- β .

En cultivo de células de la granulosa de rata tratadas con dietilelbestrol, y IL-1 pero no IL-2 inhibe significativamente 3', 5'- AMPc inducido por FSH y una reducción asociada de progesterona e inducción al receptor a LH; IL-1 solo no tienen efecto significativo en la diferenciación celular de la granulosa. IL-1 β es mas potente que IL-1- α en suprimir la acción de FSH en células de la granulosa en cultivo. IL-1 regula de una forma dosis dependiente la producción de andrógenos inducida por hCG en células de la granulosa de rata in vitro. IL-6 estimula la acumulación de progesterona por células de la granulosa de rata tratadas con dietilelbestrol in vitro. Los macrófagos además de estar en el estroma también están en la célula de la granulosa pero en menor número (192)

TNF- α inhibe la actividad de aromatasa inducida por FSH en células de la granulosa en cultivo lo cual no se debe a la interferencia de la unión con FSH actividad del receptor o generación de AMPc.

Es claro que la proliferación de las células de la granulosa y de la teca y los eventos subyacentes de la folículoogénesis son regulados en forma critica por una variedad de señales intraováricas. Algunos de estos factores están regulados directamente por gonadotropinas, mientras que otros son modulados por factores de crecimiento intraováricos o por mecanismos autoregulatorios.

Un factor principal en el desarrollo folicular es la proliferación de las células de la granulosa. Aún cuando hormonas como FSH y 17 β estradiol y factores de crecimiento como EGF, y TGF- α inducen la proliferación de las células de la granulosa, eventos intracelulares están íntimamente asociados con la progresión de las células de la granulosa en la fase de síntesis del ciclo y la mitosis. La rápida inducción de protooncogenes c-fos, c-

myc y miembros de la familia jun es la marca de todas las células en proliferación (18, 193).

Diestro

Durante el diestro temprano los niveles séricos de progesterona son elevados en rata y hamster coincidiendo con la secreción luteal de progesterona (194). Los folículos que continúan creciendo durante el diestro de la rata y los niveles de LH empiezan a aumentar. Los estrógenos del líquido folicular son los primeros que se incrementan en el diestro. En células de la granulosa de folículos de rata pequeños y medianos, la FSH y la LH estimulan la formación de AMPc por células de la granulosa de folículos preovulatorios. La LH elevada es probablemente la causa del aumento del desarrollo folicular en la rata. En diestro I los niveles circulantes de LH son mas altos comparados con otros días del ciclo, excepto en la tarde del proestro, los niveles de LH son pulsátiles. Aunque no se sabe por que la LH aumenta en diestro I, se ha hipotetizado que los bajos niveles séricos de progesterona y estradiol son la causa (195). En la rata adulta el descenso de progesterona asociada con la regresión luteal es acompañada por el descenso de los niveles de LH aún cuando el desarrollo folicular y la secreción de estradiol aumente. Los receptores foliculares a LH (hCG) aumentan durante la fase antral temprana y por ello la sensibilidad del folículo a LH puede aumentar dramáticamente.

Se ha postulado que en las ratas ciclando, los folículos mas grandes el día 1 (estro) se pueden convertir en atrésicos al día siguiente y los folículos destinados a ovular 4 días después son derivados de un grupo mas pequeño de folículos presentes en el día 1. Esta hipótesis está basada en la observación de que el número de células de la granulosa de los folículos sanos mas grandes en el día 2 tiene 1200 células en lugar de las 1700 esperadas. La velocidad de proliferación de las células de la granulosa determinada el día 1 indica que los folículos con 1200 células el día 2 serían derivados de folículos con 750 células. Por ello los folículos sanos mas grandes del día 1 no necesariamente dan origen a los folículos que ovulan 3 a 4 días después.

En los días 3 y 4 del ciclo, los folículos continúan su crecimiento bajo la influencia de LH. El ligero aumento de LH es requerido para continuar la maduración folicular, producción de estradiol y aumento de unión de LH al folículo. Se ha sugerido que el descenso en la producción luteal de progesterona regula el tiempo de inicio de la siguiente ovulación.

El cambio después de la luteólisis se ha llamado desviación lúteo folicular debido a la muerte del cuerpo lúteo y al aumento de la dominancia folicular. En el cuarto día del ciclo, la progesterona, testosterona y estrógenos foliculares se incrementan significativamente en el diestro cuando la progesterona sérica disminuye. Se ha propuesto que durante la fase luteal, la progesterona puede ser inhibitoria por una acción directa e indirecta sobre el folículo ya que la secreción de estradiol es deteriorada. En animales intactos no hay evidencia que apoye la acción inhibitoria directa de la progesterona en el ovario; de hecho, la progesterona estimula la capacidad de respuesta a hCG en la rata inmadura. Un efecto inhibitorio a largo plazo de la progesterona sobre la producción de

estradiol por folículos de rata en el proestro ha sido demostrada, pero las cantidades de progesterona requeridas son probablemente farmacológicas (196).

El mecanismo por el cual la prolactina inhibe la producción folicular de estradiol puede involucrar se acción sobre la aromataso o el sistema enzimático P-450 17 α . Como los receptores a prolactina están presentes en las células de la granulosa de folículos de Graaf y sobre células teca/intersticiales ambos sitios pueden ser blancos de la supresión de secreción de estradiol inducida por prolactina.

La prolactina inhibe la síntesis de estradiol *in vitro* pero no de progesterona. La prolactina puede tener un efecto inhibitorio sobre la aromataso de las células de la granulosa (18).

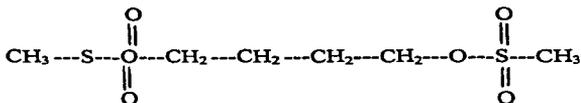
Los folículos de rata son relativamente impenetrables a la atresia durante la mayor parte de su desarrollo sin embargo cuando alcanzan la penúltima etapa de desarrollo (8ª y 9ª generación) mueren a menos que sean expuestas a niveles de FSH por arriba de los niveles basales. La mayoría de los folículos sufren atresia en esta etapa antral temprana. En ausencia de fluctuaciones cíclicas de FSH (lactancia o inmadurez) los folículos continúan progresando a través de las etapas de crecimiento pero todos sufren atresia al alcanzar los 300-400 micrómetros de diámetro. Si en ratas ciclando se elimina el aumento de FSH (anticuerpos, líquido folicular o barbiturato) el crecimiento de los folículos de tamaño antral temprano hacia preovulatorio no ocurre. Los cambios en la concentración de FSH son un requerimiento esencial para la sobrevivencia del folículo mas allá de la etapa antral.

Como ya se mencionó anteriormente las concentraciones de FSH por arriba de las basales van a capacitar al folículo para seguir adelante con su desarrollo y no sufrir atresia en etapa antral temprana. Se ha propuesto que las concentraciones elevadas de FSH inducen cambios en las células de la granulosa que aumentan su sobrevivencia bajo condiciones hipóxicas adversas. Se han descrito muchos efectos específicos de FSH sobre las células de la granulosa, muchos de los cuales incluyen la inducción de enzimas necesarias para aumentar la biosíntesis de esteroides y la adquisición de características que preparan al folículo para la ovulación (62)

Busulfán

El Busulfán, 1,4-butanediol dimetanosulfonato también conocido como bisbulban, Mielosan, Mítosan, Sulbatin o Myleran, fue descubierto en 1953 por Haddow y Timmis (208). Es un agente alquilante bifuncional, derivado del éster del ácido sulfónico es ampliamente utilizado como agente quimioterapéutico en el tratamiento de cáncer, es la droga de elección en problemas mieloproliferativos como leucemias granulocíticas o mielocíticas crónicas, ha sido utilizado como inmunosupresor después del transplante de órganos, en el tratamiento de enfermedades autoinmunes. En insectos ha sido utilizado como esterilizante (198, 199).

Su fórmula desarrollada es:



Su fórmula condensada es $\text{C}_6\text{H}_{14}\text{O}_6\text{S}_2 \text{ CH}_3 \text{ SO}_2\text{O} (\text{CH}_2)_4 \text{O SO}_2 \text{ CH}_3$ constituido por C- 29.26% H- 5.73% O- 38.98 S- 26.04%, se presenta en forma de cristales, tiene un peso molecular 246.31, es soluble en acetona a 25°C y prácticamente insoluble en agua, pero se disuelve lentamente por hidrólisis, su punto de fusión es de 114-118°C.

En relación al metabolismo de esta droga se ha observado una rápida desaparición de este agente de la circulación después de una inyección de Busulfán marcado con 35S o 14C a ratas, ratones, conejos y humanos. En general el nivel de radioactividad en la sangre disminuye en 5 a 10 minutos a menos del 10% de la dosis intravenosa total. Con una dosis oral, los niveles en sangre aumentan solo a 5-6% de la dosis total administrada. Después de una administración intraperitoneal a ratones, los niveles máximos en sangre se alcanzan en aproximadamente 10 minutos.

Los estudios sobre la distribución de los radioisótopos in vivo revelaron una mayor concentración de Busulfán o de sus metabolitos en ciertos tejidos como bazo, médula ósea, hígado, riñón y pulmones.

La vida media de Busulfán a pH 7 en solución acuosa a 37°C es de 10 a 13 horas y en el plasma a 37°C es de 11 a 12 horas. In vivo se ha estimado su tiempo de vida media es de 18 horas (199).

Son muchos los efectos que ejerce el Busulfán sobre el organismo, entre ellos es importante destacar sus efectos citotóxicos sobre una variedad de tejidos y especies animales. En pacientes que reciben tratamiento con Busulfán se ha reportado la inducción de displasia pulmonar, un daño citológico al cervix, páncreas, al tejido intestinal, hematológico y gonadal, alteración en la función exócrina pancreática, insuficiencia adrenal y disfunción hepática. En ratas y ratones se ha reportado daño gastrointestinal y atrofia del timo y bazo, pero solo daños ligeros al tejido linfático y hepático. Su efecto sobre el tejido sanguíneo es uno de los más importantes, actúa principalmente sobre las células granulocíticas, induce leucopenia y trombocitopenia. Se ha reportado también la inducción de hipoplasia de la médula ósea que de hecho es uno de los aspectos funcionalmente importantes en el tratamiento de desordenes mieloproliferativos. Su efecto inmunosupresor ha sido demostrado tanto en humanos

como en animales sin embargo son demasiados sus efectos colaterales como para que pueda ser utilizado como inmunosupresor en humanos.

Experimentos realizados en animales adultos, especialmente en la rata, han demostrado que el Busulfán también induce efectos adversos sobre las glándulas reproductivas (tamaño y peso), las células germinales (producción, maduración y morfología) y sobre la fertilidad. En humanos se ha observado amenorrea en mujeres premenopáusicas y se ha reportado la inhibición de espermatogonias en hombres bajo tratamiento.

Estudios sobre su letalidad han revelado que la LD50 para ratas va de 14 a 25 mg/kg y para ratones es de 30 a 40 mg/kg.

Su teratogenicidad ha sido demostrada en experimentos realizados con ratas, ratones, conejos y pollos. Estos experimentos revelaron que las malformaciones predominantes están a nivel del sistema músculo esquelético, desarrollo de las gónadas, reducción en el tamaño y peso del animal y efectos sobre la fertilidad. Para el caso de los humanos no ha sido establecido claramente su efecto teratogénico ya que los productos fueron reportados como normales al nacimiento sin malformaciones macroscópicas y solo ligeramente bajos de peso.

La carcinogenicidad de Busulfán ha sido reportada por la International Agency for Research on Cancer (IARC) como "suficiente para indicar carcinogenicidad potencial" y ha sido demostrada a través de pruebas genéticas toxicológicas. Experimentos *in vitro* han revelado la transformación celular y los estudios *in vivo* han brindado solo evidencia limitada.

En bacterias, hongos, varias especies de plantas, *Drosophila* y en células de linfoma murino en cultivo se ha demostrado la mutagenicidad del Busulfán. Su efecto es principalmente de inducción de aberraciones cromosómicas. También se han reportado aberraciones cromosómicas en linfocitos humanos *in vivo*, los rompimientos *in vivo* no son al azar y su distribución está asociada a la longitud del cromosoma a diferencia de lo que sucede *in vitro*. En ratas, hamsters y ratones el Busulfán induce aberraciones cromosómicas en células de la médula ósea, intestinales y hepáticas. En ratas y ratones se han reportado aberraciones cromosómicas en células germinales de machos (199).

En lo que se refiere a su mecanismo de acción, se ha establecido que el Busulfán tiene una actividad citotóxica debida a su capacidad para reaccionar con el DNA y algunas proteínas (Jackson 1966). Estudios citoquímicos y autoradiográficos han revelado que además de retardar la velocidad de mitosis, el Busulfán provoca una acumulación de proteínas nucleares causando una hipertrofia nuclear la cual conduce eventualmente a la muerte de la célula (Frederic et al 1959, Bassleer 1966).

Estudios *in vivo* en varios sistemas en proliferación han llevado a la conclusión de que el Busulfán posee cierta selectividad en su actividad citotóxica, atacando en particular a aquellas células que están en etapa de temprana citodiferenciación (Elson et al 1958, Partington et al 1964, Grimes et al 1966). Sin embargo, a pesar de la cantidad de información que existe en relación a la acción de Busulfán, es difícil explicar la aparente selectividad por las células germinales primordiales en embriones jóvenes en los cuales

todas las células están en etapas tempranas de desarrollo y están proliferando activamente.

Teóricamente esta acción destructiva podría originarse por lo menos por tres causas:

- 1.- un efecto citotóxico general sobre todos los tejidos en proliferación entre los cuales aquellos con el mayor número de células resistentes a la droga serían las que estuvieran en mejor posición numérica para compensar las células dañadas
- 2.- las células somáticas y las células germinales primordiales poseen diferentes capacidades de detoxificación y/o de concentración de la droga de tal manera que solo las células germinales primordiales son dañadas irreversiblemente
- 3.- el efecto sobre el ciclo mitótico produce un desacoplamiento de células germinales primordiales y somáticas gonadales que conduce a la muerte de las primeras (200).

Independientemente del uso terapéutico de Busulfán, este fármaco ha sido utilizado para el estudio de la diferenciación gonadal y el desarrollo de las gónadas de diferentes especies animales, precisamente debido a su efecto sobre las células germinales.

Bollag (1953) trató hembras de rata adultas con 3 inyecciones intraperitoneales de 2 mg/kg de Busulfán por un periodo de 4 semanas, sesenta días después los ovarios contenían escasos ovocitos y folículos y después de 80-100 días no se encontraron folículos; al inyectar intraperitonealmente a ratas machos con 2 mg/kg a intervalos de 2 semanas observó que los efectos antiespermatogénicos se presentaban 30 días después y a los 60 días no se encontraron espermátidas o espermatozoides. A los 120 y 150 días los testículos mostraron una total destrucción del epitelio germinal. Posteriormente (1954) inyectó intraperitonealmente 2 mg/kg de Busulfán a ratas gestantes 5 a 7 días antes del parto y encontró que los productos no presentaron diferencias externas ni de peso, 14 meses después del nacimiento los ovarios mostraron una red fibrosa con algunos cordones epiteliales y no se observaron ni folículos ni cuerpos lúteos y los animales fueron todos estériles, el crecimiento y desarrollo de estos animales fue normal hasta la edad de 2 a 3 meses cuando se observó una disminución de peso. La necropsia de estos animales demostró solo anomalías a nivel de las gónadas que eran pequeñas y carecían de elementos germinales (199).

Galton y Till (1956) establecieron que en el embarazo temprano dosis mas altas de Busulfán no interferían con el embarazo y las generaciones F1 y F2 eran aparentemente sanas (199).

Craig et al (1958) reportaron que el Busulfán tenía efectos claros sobre la fertilidad de ratas machos tratadas con una dosis de 10 mg/kg de peso de Busulfán administrado por vía intraperitoneal ya que a las 8 semanas los animales eran estériles, concluyéndose que esto era atribuible a un bloqueo o destrucción en una etapa temprana de la espermatogénesis o a una interferencia selectiva con el desarrollo espermatogonial. Finalmente se llegó a la conclusión de que el Busulfán inhibe selectivamente, por un

mecanismo no totalmente explicado, el desarrollo de la espermatogonia tipo A principalmente pero que todas las demás fases también podían ser afectadas (199). Hemsworth y Jackson (1962) trataron a ratas gestantes con una dosis de 10 mg/kg de Busulfán a intervalos entre el 5° y 20° día de gestación encontrando efectos diversos por lo que concluyeron que el Busulfán produce esterilidad en la rata y determinaron que el periodo en el que las gónadas de ratas muestran su más alta sensibilidad es el día 13 a 16 de la gestación y que el tratamiento entre los 18 y 20 días de vida fetal no tenía efecto en las gónadas analizadas 2 semanas postparto, con lo cual se apoyó la idea de que la destrucción ocurría en la fase migratoria de las células germinales primordiales (199,201, 202).

Heller y Jones (1964), administrando 10 mg/kg i.p. los días 13, 14 y 15 de la gestación encontraron que los productos obtenidos el día 20 de la gestación presentaban ovarios de la mitad del tamaño, histológicamente el ovario constaba de una sola capa de epitelio germinal cuboidal rodeada de una masa de células basofílicas similares con un núcleo elíptico teñido intensamente, solo se observaban pocas mitosis y ninguna célula germinal además de la ausencia de cordones sexuales bien estructurados. En aquellos animales que se mantuvieron hasta los 3 meses se observó que los ovarios eran pequeños no mostraban desarrollo folicular y unos cuantos ovocitos con un anillo de células de la granulosa desordenadas se encontraban en forma aislada (203).

En 1966 Forsberg y Olivercrona administrando una dosis intraperitoneal de Busulfán de 1 mg/100 g de peso los días 7 al 18 del desarrollo demostraron que el Busulfán administrado a los 7 días no ejercía ningún efecto al estudiarse en el día 21 de la gestación, si se administraba a los 9 días el número de ovocitos estaba muy reducido y los cordones sexuales estaban separados por tejido fibroso algunos de los cuales contenían ovocitos y células foliculares y otros solo células foliculares. En aquellas a las que se les administró a los 11 días se observaron solo escasos ovocitos, lo mismo se observó con la administración a los 12 o 13 días, las células foliculares estaban dispuestas en cordones separados por bandas delgadas de tejido fibroso. En el día 13 de la gestación la gónada contenía gran cantidad de células germinales primordiales. La administración intraperitoneal de Busulfán en este día daba por resultado una degeneración de las células germinales primordiales en los siguientes cuatro días (204).

Hemsworth (1969) administrando intraperitonealmente una dosis de 10 mg/kg los días 13, 14, 15, 16 y 20 de la gestación encontró que este fármaco administrado los días 13 y 15 provocaba esterilidad en las crías hembras (205).

Vanhems y Bousquet (1971) administraron a ratas Wistar una dosis de 10 mg/kg de peso el día 15 de la gestación y encontraron a las diferentes edades estudiadas, 21 días de gestación, 1,6,8,12 y 15 días 1, 1,5 y 2 meses que los ovarios estaban muy reducidos y formados principalmente por cordones celulares con disposición radial, en algunos casos pudieron observar escasos folículos que maduraban para formar cuerpos luteos pero de menor tamaño que los de los animales testigo. Al transplantar los ovarios disgenésicos que contaban con escasos folículos a la cápsula superior del riñón de hembras hipofisectomizadas, observaron que éstos eran capaces de responder a gonadotropinas de la hembra reproductora (206).

Merchant et al (1976) administró a ratas gestantes una dosis de 1 mg/100g de peso por vía intraperitoneal los días 11 o 12 de gestación tratando a un grupo con 25 UI de PMS y sacrificándolas a diferentes tiempos. Las observaciones realizadas en los ovarios de estos animales llevaron a concluir que la presencia de las células germinales en los cordones epiteliales al nacimiento es una condición necesaria para la diferenciación estructural de las células somáticas en células sintetizadoras de esteroides y que en aquellos ovarios donde sobreviven células germinales se da la organización de folículos normales quedando claro que el ovocito de alguna manera induce la formación de receptores a gonadotropinas en las células somáticas. Los ovarios totalmente estériles al momento del nacimiento eran incapaces de responder a PMS (207).

Renaud (1977) inyectó una dosis de 0.025 y 0.125 mg/huevo a las 48, 60 y 72 horas de incubación a huevos de pollo, encontrando que la dosis de 0.125 mg provocaba la destrucción de los gonocitos después de 4 días con cambios morfológicos tanto en testículos como ovarios. Los animales que se trataron con dosis mayores durante las etapas tempranas del desarrollo fueron estériles (199).

Richard-Mercier (1977) implantó un cristal de Busulfán (60 µg/100 mg) en una larva del escarabajo Colorado en la primera, segunda y tercera etapa. Las larvas implantadas en la etapa 1 y examinadas 12-14 días después presentaron testículos de menor tamaño y se pudo observar un efecto antimitótico en las espermatogonias secundarias. El número de gonias en ambos sexos se encontró drásticamente reducido (199).

Merchant et al. (1979) inyectaron a ratas intraperitonealmente 10 mg/kg de peso de Busulfán el día 12 de la gestación, sacrificándolas a diferentes horas después de la administración (de 3 a 48 horas) encontrando que las alteraciones se presentaban en forma esporádica 12 horas después pero solamente en aquellas células germinales primordiales rodeadas por células mesenquimales. Los efectos iniciales sobre las células germinales primordiales se veían después de 18 horas y se manifestaban por hipertrofia del nucleólo de algunas células, seguido por una condensación de la cromatina y del material nucleolar, la *pars granular* se separaba de la *pars fibrilar*, la envoltura nuclear se desintegraba formando figuras semejantes a las lamelas anulares y/o tendían a rodearse de formaciones esféricas de alta densidad electrónica que parecían corresponder a las áreas heterocromáticas. Las cisternas del retículo endoplásmico se hacían vesiculares y se arreglaban en grupos compactos unidos por abundantes partículas ribosomales y mitocondrias. Los gránulos que contenían núcleos densos mantenían su identidad pero su diámetro tendía a ser mayor y el complejo de Golgi desaparecía completamente. A las 24 horas había una degeneración masiva pero no simultánea en todas las células germinales primordiales. Se observó gran actividad fagocítica en las células somáticas las cuales no presentaban alteraciones. A las 30, 36 y 48 horas se pudieron observar células germinales primordiales en todas las etapas de degeneración y cada vez en mayor número. El hecho de que aún después de 48 horas se veían células con núcleo hipertrofiado, que es una característica de las etapas iniciales de la degeneración, sugiere que el lapso en el que las células germinales primordiales intracordales sufren el proceso degenerativo es de alrededor de 24 horas (200).

Kasuga y Takahashi (1986) administraron a ratas gestantes 10 mg/kg de peso de Busulfán suspendido en aceite de ajonjolí, el día 15 de la gestación y observaron que al primer día de nacidas muy pocos ovocitos habían sobrevivido y que durante la maduración se formaban algunos folículos que a los 60 días habían desaparecido totalmente del ovario, observándose a los 120 días un ovario con estructuras en forma de cordón que consistía principalmente de fibroblastos y células semejantes a las intersticiales (208).

Pelloux et al (1988) administraron una dosis intraperitoneal de 1 mg/100g de peso a ratas gestantes el día 12 o 18 de la gestación sacrificándolas a los 5 y 10 días. A los 5 días se observó una reducción en el número de ovocitos presentes en las descendientes de madres a las que se les administró el Busulfán el día 12 y a los 10 días había un notable decremento en el porcentaje de folículos primordiales a favor de los primarios que puede ser explicado por el agotamiento de los primordiales. Alrededor de los ovocitos que sobrevivieron se encontraron folículos con múltiples capas de células pero a los 10 días no había folículos antrales. No se observó incremento en el volumen del estroma ovárico a los 10 días. El análisis de la capacidad de síntesis de estrógenos *in vitro* demostró que ésta se encontraba disminuida al igual que las actividades de aromataza y 3 β hidroxisteroide deshidrogenasa (209).

Hallett et al (1991) demostraron que al igual que en ratas, la gónada de codorniz es capaz de diferenciar las células somáticas de testículo u ovario en ausencia de la línea germinal. después del tratamiento con Busulfán (420 μ g/0.05 mL, 210 μ g/mL). La ausencia de folículos y ovocitos sin evidencia de desarrollo folicular en los ovarios de los huevos tratados con 420 μ g/0.05 ml a los 3 días y 10 semanas de edad, indicó que los ovocitos son necesarios para el desarrollo folicular (210).

Aige-Gil et al (1991) demostraron que la aplicación de Busulfán a embriones de gallo a dosis de 1 a 500 μ g a las 48 horas de incubación producía una serie de efectos teratogénicos, pero sí era aplicado con aceite de ajonjolí directamente a la yema se inducía la esterilidad de estos embriones con una eficiencia del 95% con un mínimo de efectos colaterales. Esta técnica permitió el establecimiento de un método de destrucción de las células germinales primordiales que facilitó los estudios de las interacciones célula/estroma en la gónada y permitió la producción de aves transgénicas (211).

Vick et al (1993) inyectaron 25, 50 y 250 μ g de Busulfán en 40 μ l de aceite de ajonjolí en la yema de huevos de gallinas White Leghorn a los 0, 24, 48 y 72 horas de incubación y observaron que el número de células germinales de embriones de 16 días tratados con 50 y 250 μ g era significativamente menor, a estos embriones parcialmente esterilizados se les inyectó una suspensión de la creiente germinal conteniendo células germinales de embriones de Rhode Island Red obteniéndose descendientes fértiles y la mitad de ellos produjo descendientes de las células germinales transferidas en cerca del 35% del total (212).

Hirshfield (1994) administrando diferentes dosis de Busulfán (1, 1.25, 2.5, 5, 10 y 20 mg/kg de peso) en diferentes días de la gestación (12, 13, 15, 15/16, 16, 17, 18, 19 y 21/22), redujo la reserva de folículos primordiales de los ovarios de ratas y encontró una correlación inversa entre el número de folículos primordiales en el ovario al nacimiento y

la proporción en la que entran al "pool" de crecimiento. En las ratas mas severamente afectadas todos los folículos empezaron a crecer muy temprano en la vida del animal por lo que al llegar a la edad adulta casi todos los folículos primordiales se habían agotado, sin embargo el número de grandes folículos antrales permaneció normal hasta que la reserva folicular se agotó totalmente (213).

Bresler (1994) esterilizó parcialmente embriones de gallinas domésticas inyectando Busulfán a embriones de 24 horas de incubación, a los 6 días de incubación se observó una esterilización del 75%. Las gónadas de embriones a los que se les inyectaron células germinales primordiales con el gene lac Z a las 55 horas de incubación mostraron una repoblación de las gónadas produciendo quimeras de la línea germinal (214).

II.- PLANTEAMIENTO DEL PROBLEMA

La presencia de las células germinales en los cordones epiteliales del ovario fetal es una condición necesaria para la diferenciación estructural de las células somáticas en células sintetizadoras de esteroides.

Se sabe que uno de los pasos más críticos en la foliologénesis es la transformación de folículos primordiales a folículos primarios, parece ser que la conversión de las células de la pregranulosa aplanadas a un epitelio cuboidal depende de mensajes aportados por los ovocitos, pero no se conoce la naturaleza de la señal. De hecho varias líneas de evidencia indican que las células de la pregranulosa son incapaces de formar folículos en ausencia de las células germinales.

La síntesis y secreción de las hormonas esteroides ováricas está íntimamente correlacionada con el desarrollo folicular siendo los principales sitios de producción del esteroide las células de la teca, las células intersticiales y las células de la granulosa.

Está demostrado que la administración de Busulfán a ratas gestantes destruye las células germinales primordiales de sus descendientes y consecuentemente impide la formación de los folículos primordiales, formándose una gónada estéril carente de tejido esteroidogénico.

Teniendo en cuenta que la destrucción de la línea germinal con Busulfán a una dosis de 10 mg/kg de peso no es masiva, se podrán encontrar en los ovarios de las crías de ratas tratadas, una cantidad variable de folículos y por lo tanto de tejido esteroidogénico, detectándose en el suero diferentes concentraciones de hormonas esteroides.

La correlación entre los valores hormonales y la estructura del ovario de ratas, hijas de madres tratadas, será un indicador del grado de destrucción de la células germinales y por lo tanto de la diferenciación del tejido esteroidogénico.

III.- HIPOTESIS

Los ovocitos en el ovario de los mamíferos actúan como organizadores de los folículos que son las unidades endocrinas que se desarrollan cíclicamente y cuya regulación depende de factores intra y extraováricos. Por lo tanto, la disminución en el número de ovocitos antes del nacimiento traerá como consecuencia una alteración en la actividad endocrina del ovario.

IV.- OBJETIVO GENERAL

Determinar el efecto de la destrucción de la línea germinal sobre la diferenciación de las células esteroidogénicas y la actividad secretora del ovario de rata.

V.- OBJETIVOS ESPECIFICOS

- 1.- Determinar las concentraciones de las hormonas esteroides en ratas de la cepa Wistar a uno, dos y tres meses de edad.
- 2.- Determinar el efecto de la destrucción parcial de las células germinales sobre la secreción de las hormonas esteroides de las crías de ratas tratadas con Busulfán a uno, dos y tres meses de edad.
- 3.- Correlacionar los niveles hormonales de las tres edades estudiadas con el aspecto histológico y ultraestructural de los ovarios.

VI.- MATERIAL Y METODO

60 ratas hembras de la cepa Wistar sexualmente maduras con un peso promedio de 180 g se colocaron en grupos de cinco con machos de la misma cepa de fertilidad comprobada en condiciones de bioterio con alternancia de luz-oscuridad 12/12 y con agua y alimento *ad libitum*.

Aquellas ratas a las que se les determinó la presencia de tapón vaginal y espermatozoides en el frotis, se les aisló y consideró éste, como el día "1" de la gestación.

A 40 ratas gestantes se les administró por vía intraperitoneal una dosis de 10 mg/kg de peso de Busulfán (Burroughs Wellcome Co. Ltd.) suspendido en 1 ml. de aceite de cártamo el día 14 de la gestación (grupo experimental).

A 20 ratas gestantes se les administró por vía intraperitoneal el mismo volumen de aceite de cártamo (grupo testigo).

Los productos machos se sacrificaron al nacimiento y solamente se conservaron las hembras con las que se formaron los siguientes grupos:

Grupo I ratas hembras crías de madres tratadas (experimental)

Grupo II ratas hembras crías de madres no tratadas (testigo)

Todos los productos permanecieron con sus madres hasta el destete. Posteriormente se agruparon como se indicó y se mantuvieron en condiciones controladas de bioterio con agua y alimento *ad libitum* hasta el momento de su sacrificio 1, 2 y 3 meses después de nacidas.

A las ratas de ambos grupos se les revisó diariamente a partir de la segunda semana de nacidas con el objeto de determinar la edad a la que ocurría la apertura de la vagina.

Los animales se pesaron y sacrificaron por dislocación craneo-cervical a las edades anteriormente indicadas, proceso que se realizó invariablemente entre las 10 y 12 de la mañana. De manera inmediata se obtuvo el volumen total de sangre a través de la aorta y se centrifugó a 1500 r.p.m. durante 10 min. (centrifuga Beckman Modelo TJ-6 serie 340508) para obtener el suero el cual se congeló a - 70°C para la posterior determinación de pregnenolona, progesterona, androstendiona, testosterona, estrona y estradiol por el método de Radioinmunoensayo (RIA) (ANEXO I). Se extirparon ambos ovarios y se fijaron en glutaraldehído al 3% en amortiguador fosfatos pH 7.4 durante 3 horas y postfijaron en tetraóxido de osmio al 1% en agua durante 1 hora. Los ovarios ya fijados se procesaron de acuerdo a las técnicas convencionales de microscopía electrónica de transmisión, se incluyeron en Araldita, se realizaron cortes semifinos que se tiñeron con Paragon y finos que se contrastaron con acetato de uranilo y citrato de plomo para su análisis al microscopio de luz (Nikon HFX-DX) y electrónico de transmisión (Jeol EM 1010) respectivamente.

Para el análisis estadístico se utilizó la prueba de Student-Newman-Keuls.

VII.- RESULTADOS

Número de productos

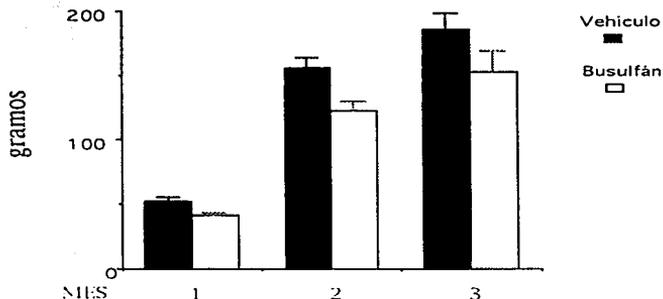
Al analizar el número de productos por rata se observa que las camadas de las ratas tratadas con Busulfán son menores que las de los animales controles. El promedio de productos por camada en las ratas tratadas es de 8.2 ± 0.8 mientras que en las ratas controles fue de 10.5 ± 1.2 , diferencia que es estadísticamente significativa ($p < 0.001$).

Peso Corporal

Al comparar los pesos corporales de los diferentes lotes de ratas se observa que hay una reducción significativa de peso entre las crías de ratas no tratadas de 1 mes de edad cuyo peso es de 52.14g. (SD 2.96) comparado con el de las crías de ratas tratadas con Busulfán cuyo peso promedio disminuye a 41.22g. (SD 2.22). Esta diferencia es estadísticamente significativa ($p < 0.0001$). El porcentaje de disminución de peso es de 20.94%.

A los 2 meses de edad se observa el mismo patrón de reducción entre las crías de ratas no tratadas y las de ratas tratadas con Busulfán, la reducción es de 155.71g. (SD 8.38) a 121.91g. (SD 7.29). Esta diferencia es estadísticamente significativa ($p < 0.0001$). El porcentaje de disminución de peso es de 21.70%.

A la edad de 3 meses la reducción de peso entre las crías de ratas no tratadas y las crías de ratas tratadas es de 186.2g. (SD 12.16) a 152.75g. (SD 16.65). Esta diferencia es estadísticamente significativa ($p < 0.0001$). El porcentaje de disminución de peso es de 17.96%. (Gráfica 1)



Gráfica 1. Pesos corporales de crías de ratas no tratadas y tratadas con 10 mg/kg de peso de Busulfán el día 14 de la gestación expresados en gr.

Inicio de la pubertad

El inicio de la pubertad en las ratas está determinado por la apertura de la vagina, las observaciones realizadas diariamente a partir de la segunda semana de nacidas revelan que en las crías de ratas no tratadas, la apertura de la vagina ocurre a los 35.2 ± 1.2 días, mientras que en las crías de ratas tratadas ocurre a los 41.2 ± 0.9 días.

Determinaciones hormonales

El análisis de las determinaciones hormonales de las crías de ratas no tratadas demostró que las concentraciones de pregnenolona y estrona se incrementaron con la edad del animal. Los valores de progesterona, androstendiona, testosterona y estradiol disminuyeron significativamente a los dos meses de edad aumentando nuevamente a los 3 meses de edad ($p < 0.0001$). (Tabla I, Gráficas 2-7)

	Pregnenolona	Progesterona	Androstendiona	Testosterona	Estrona	Estradiol
1mes	144.86	114.3	41.3	51.1	4.1	12.0
2meses	148.3	93.9	23.1	25.4	4.3	9.1
3 meses	159.3	140.4	42.0	76.0	7.5	14.8

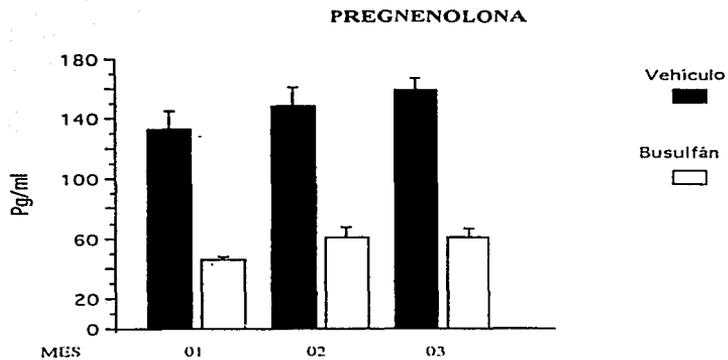
Tabla I. Concentraciones hormonales promedio de crías de ratas no tratadas expresadas en pg/ml

Para el caso de las crías de ratas tratadas con una dosis única de 10 mg/kg de peso de Busulfán administrada por vía intraperitoneal el día 14 de la gestación, se observa un incremento de los valores de las hormonas asociado con una mayor edad que es significativo en todos los meses para estradiol, androstendiona y testosterona ($p < 0.0001$) pero no para pregnenolona, progesterona y estrona de los dos a los tres meses. (Tabla II Gráficas 2-7)

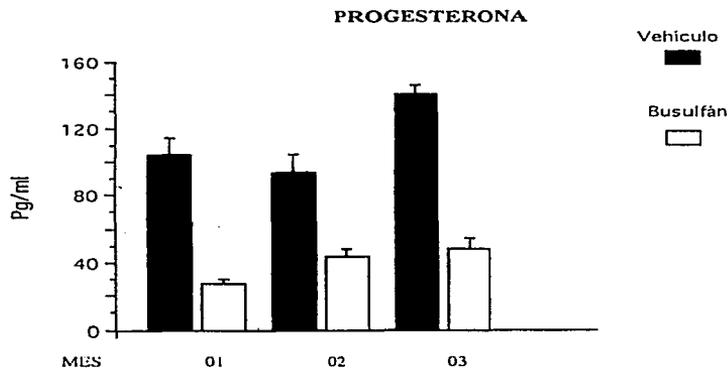
Al comparar los valores hormonales de las crías de ratas tratadas con los de las no tratadas se observó, que con excepción de la estrona, las concentraciones circulantes de las demás hormonas de las crías de ratas tratadas son significativamente menores ($p < 0.001$) en todas las edades. Para el caso de la estrona se encontró que a los dos meses de edad las ratas hijas de madres tratadas y no tratadas presentan concentraciones semejantes de la hormona circulante, sin embargo, a los tres meses de edad la diferencia entre las concentraciones hormonales de las crías de ratas tratadas y no tratadas es significativamente diferente, siendo mayor en las crías de ratas no tratadas.

	Pregnenolona	Progesterona	Androstendiona	Testosterona	Estrona	Estradiol
1mes	46.4	28.2	3.5	7.9	0.2	0.9
2meses	60.3	43.3	11.6	15.9	4.0	5.9
3meses	61.0	48.1	20.8	28.8	4.8	7.2

Tabla II. Concentraciones hormonales promedio de las crías de ratas tratadas con 10 mg/kg de peso de Busulfán el día 14 de la gestación expresadas en pg/ml

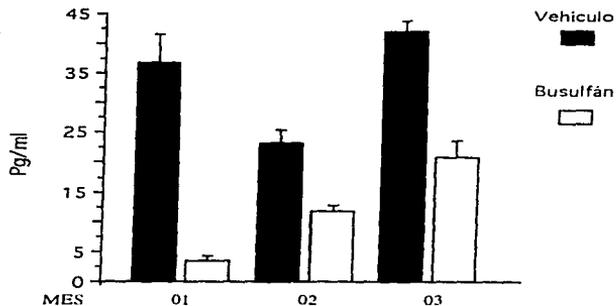


Gráfica 2.- Concentraciones de pregnenolona de crías de ratas no tratadas y tratadas con Busulfán determinadas a 1, 2 meses y 3 meses de edad.



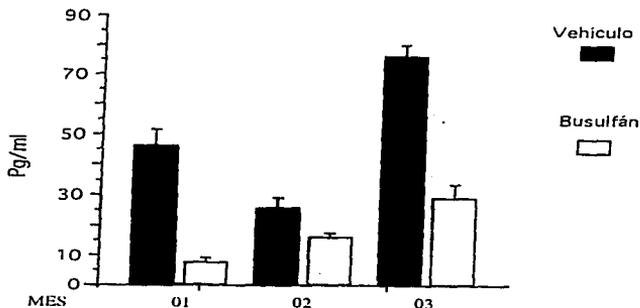
Gráfica 3. Concentraciones de progesterona de crías de ratas no tratadas y tratadas con Busulfán determinadas a 1, 2 y 3 meses de edad

ANDROSTENDIONA

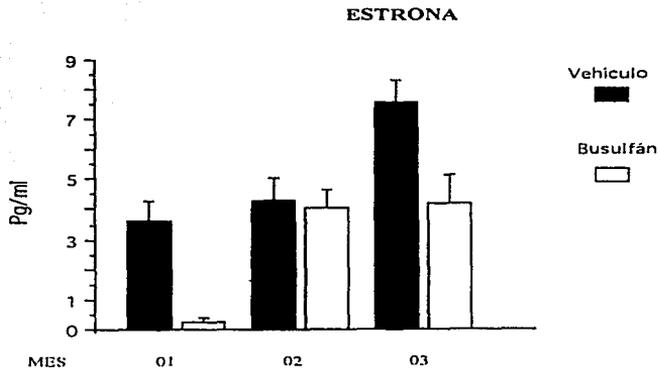


Gráfica 4. Concentraciones de androstendiona de crías de ratas no tratadas y tratadas con Busulfán determinadas a 1, 2 y 3 meses de edad.

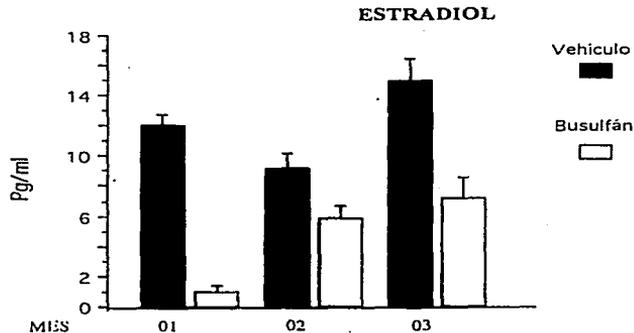
TESTOSTERONA



Gráfica 5. Concentraciones de testosterona en crías de ratas no tratadas y tratadas con Busulfán determinadas a 1, 2 y 3 meses de edad



Gráfica 6. Concentraciones de estrona de crías de ratas no tratadas y tratadas con Busulfán determinadas a 1, 2 y 3 meses de edad.



Gráfica 7. Concentraciones de estradiol de crías de ratas no tratadas y tratadas con Busulfán determinadas a 1, 2 y 3 meses de edad.

Microscopía de luz

Al analizar la estructura histológica del ovario de las crías de ratas de madres tratadas con Busulfán a una dosis de 10 mg/kg de peso el día 14 de la gestación se observa que el grado en que el Busulfán destruye la línea germinal varía de un organismo otro. A las diferentes edades analizadas la estructura ovárica es semejante. Los ovarios están limitados por un epitelio superficial cuboidal, en aquellos con mayor daño se observan cordones epiteliales carentes de ovocitos y en tejido intersticial no se identifican células sintetizadoras de esteroides (Fig. 1A). En los ovarios en los que la destrucción de la línea germinal fue menos severa se encuentran cordones con células esteroidogénicas. En el tejido intersticial también se observan células diferenciadas de tipo esteroidogénico como lo indica la presencia de gran cantidad de vesículas lipídicas (Fig. 1B).

Microscopía electrónica

A nivel ultraestructural se observa que los ovarios de las crías de ratas de madres tratadas con Busulfán el día 14 de la gestación analizados a los 1, 2 y 3 meses de edad que habían sido afectados mas severamente presentan cordones epiteliales estériles con células epiteliales con numerosas mitocondrias pequeñas. Las células epiteliales están unidas estrechamente por uniones "gap" y los cordones están limitados por una lámina basal delgada alrededor de la cual se deposita abundante colágena, (Fig. 2). El estroma está formado principalmente por fibroblastos (Fig. 3). En algunos ovarios, en los que sobrevivieron algunas células germinales, se observan cordones epiteliales limitados por lámina basal y rodeados por colágena. En el tejido intersticial se pueden encontrar células esteroidogénicas como lo indica la presencia de abundante retículo endoplásmico liso, vesículas lipídicas y mitocondrias con crestas tubulares, se observa el complejo de Golgi bien desarrollado así como retículo endoplásmico rugoso (Fig. 4). Las mitocondrias de algunas de estas células presentan un aspecto pleomórfico y están hipertrofiadas (Fig. 5).

Figura 1A. Micrografía del ovario de rata de tres meses de edad, cría de rata tratada con Busulfán el día 14 de la gestación. Los cordones epiteliales estériles (CE) están rodeados por estroma (E) que no presenta características esteroidogénicas. (200X)

Figura 1B. Micrografía del ovario de rata de tres meses de edad, cría de rata tratada con Busulfán el día 14 de la gestación. Tanto en los cordones epiteliales (CE) como en el estroma (E) se observan células de tipo esteroidogénico con gran cantidad de vesículas lipídicas (VL). (200X)

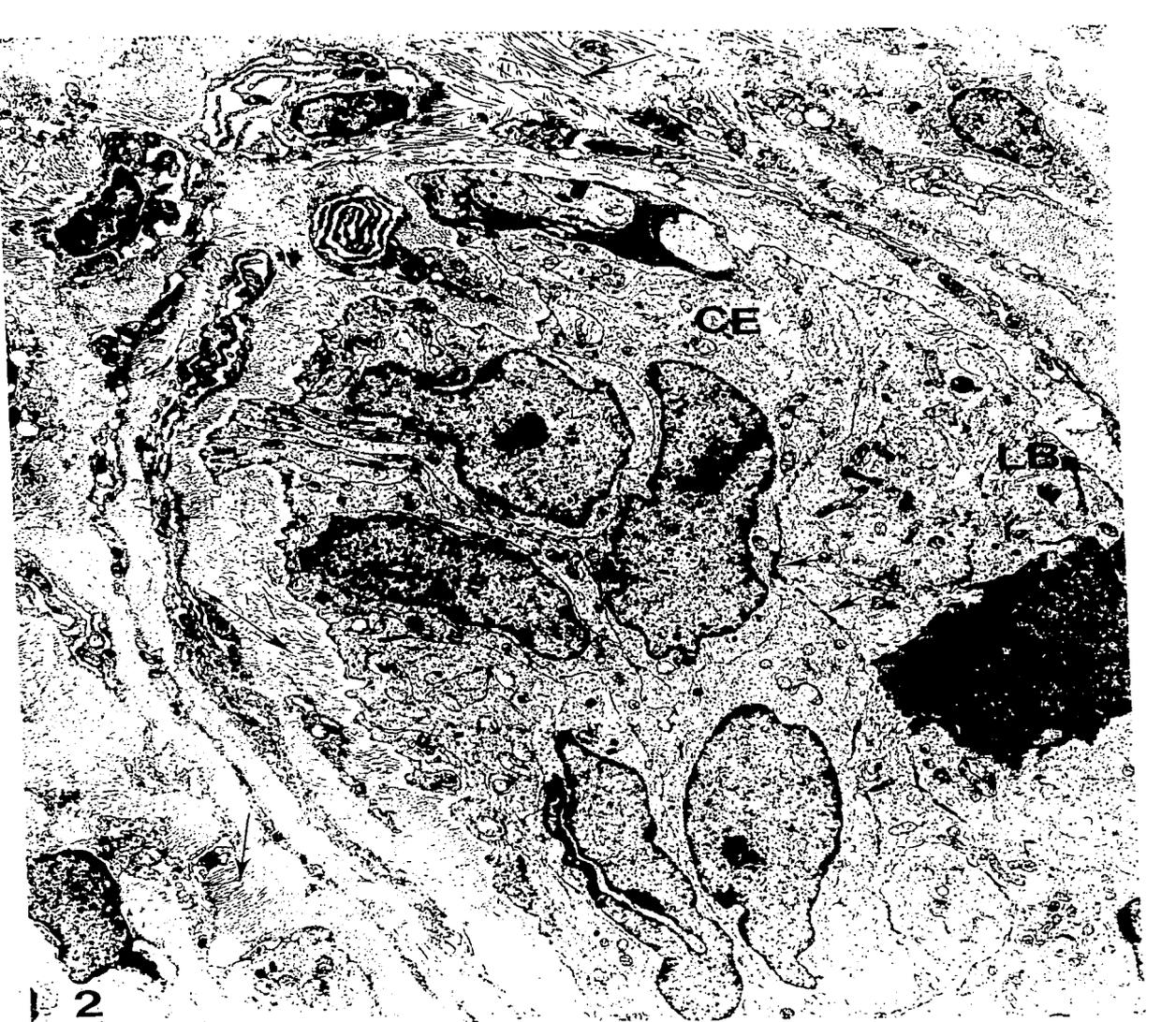
Figura 2. Ultramicrografía del ovario de rata de 2 meses de edad, cría de rata tratada con Busulfán el día 14 de la gestación. Cordón epitelial estéril (CE) conteniendo células epiteliales unidas estrechamente por uniones "gap" (flechas cortas), limitados por lámina basal (LB) y rodeados por abundante colágena (flechas largas). (6400X)

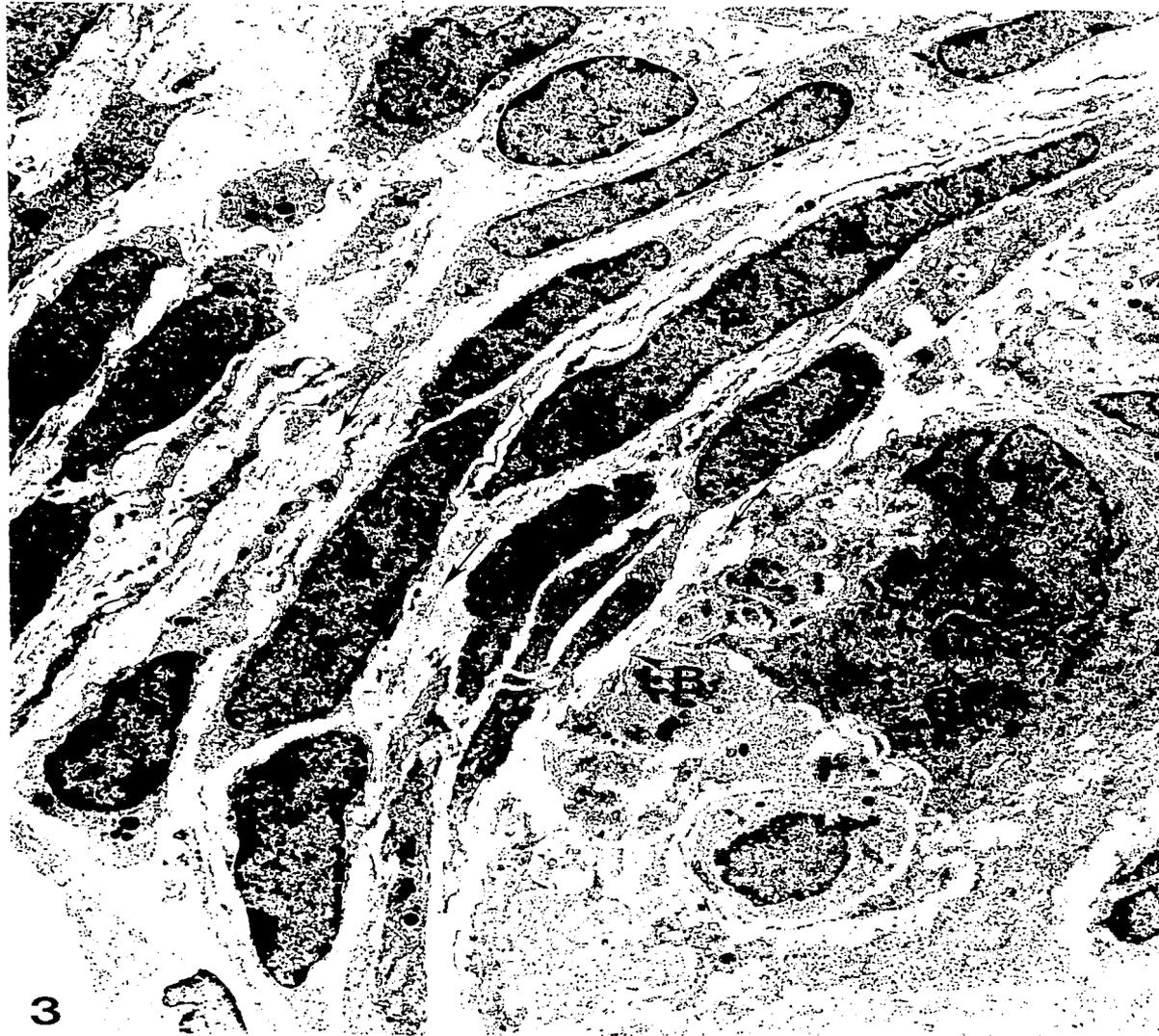
Figura 3. Ultramicrografía del ovario de rata de 3 meses de edad, cría de rata tratada con Busulfán el día 14 de la gestación. Cordón epitelial (CE) limitado por lámina basal (LB). Se observa colágena alrededor del cordón y entre los fibroblastos (flechas). El estroma está formado principalmente por células semejantes a fibroblastos (F). (6400X)

Figura 4. Ultramicrografía del ovario de rata de 2 meses de edad, cría de rata tratada con Busulfán el día 14 de la gestación. Cordón epitelial (CE) limitado por lámina basal (LB). Se observa colágena alrededor del cordón (flecha). Estroma con células diferenciadas de tipo esteroidogénico, mitocondrias con crestas tubulares (M), abundante retículo endoplásmico liso (REL), complejo de Golgi bien desarrollado (CG) y gran cantidad de vesículas lipídicas (VL). (6400X)

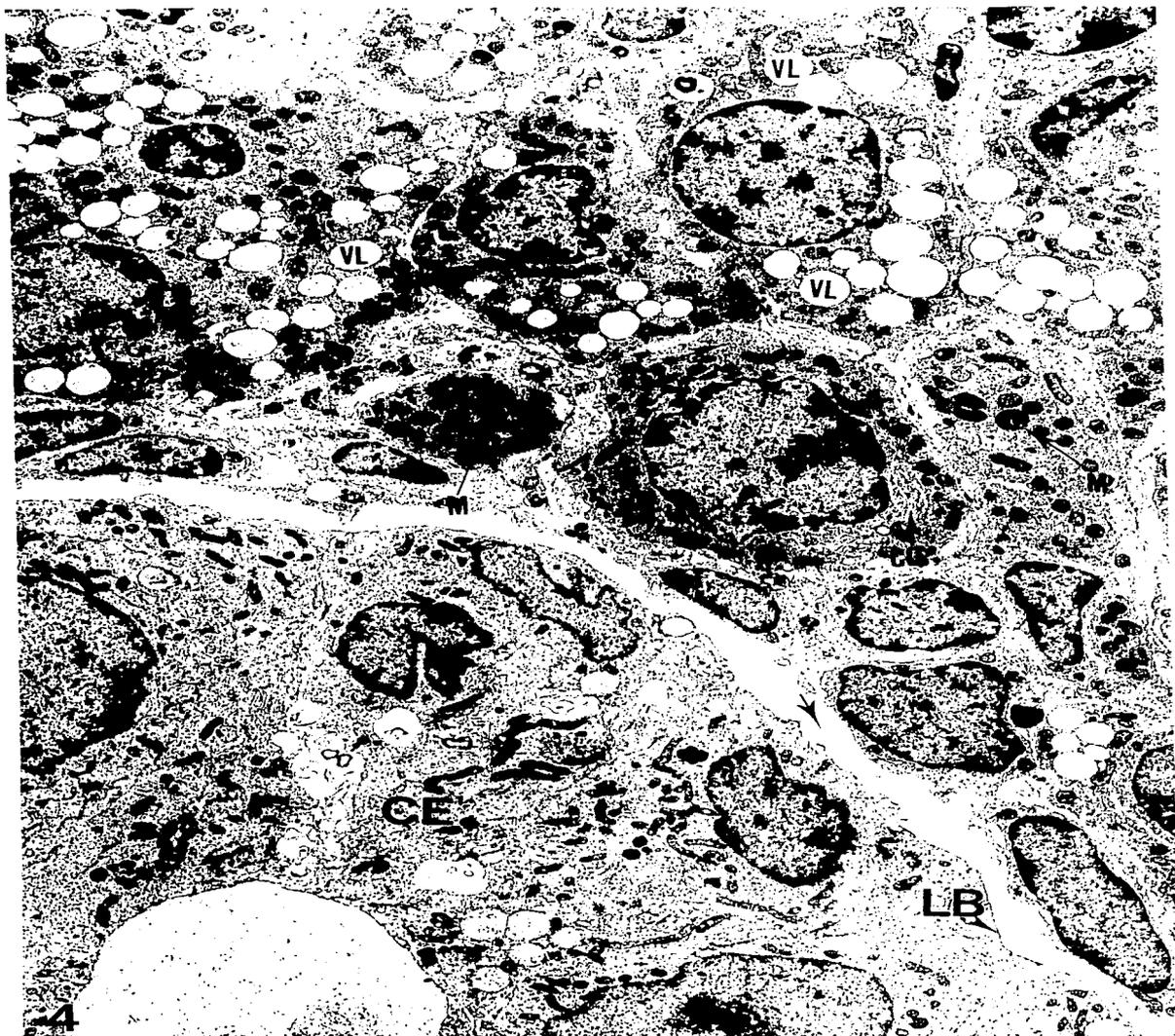
Figura 5. Ultramicrografía del ovario de rata de 3 meses de edad, cría de rata tratada con Busulfán el día 14 de la gestación. Células del estroma con abundante retículo endoplásmico liso (REL), retículo endoplásmico rugoso (RER), mitocondrias hipertrofiadas con crestas tubulares (M). (6400X)

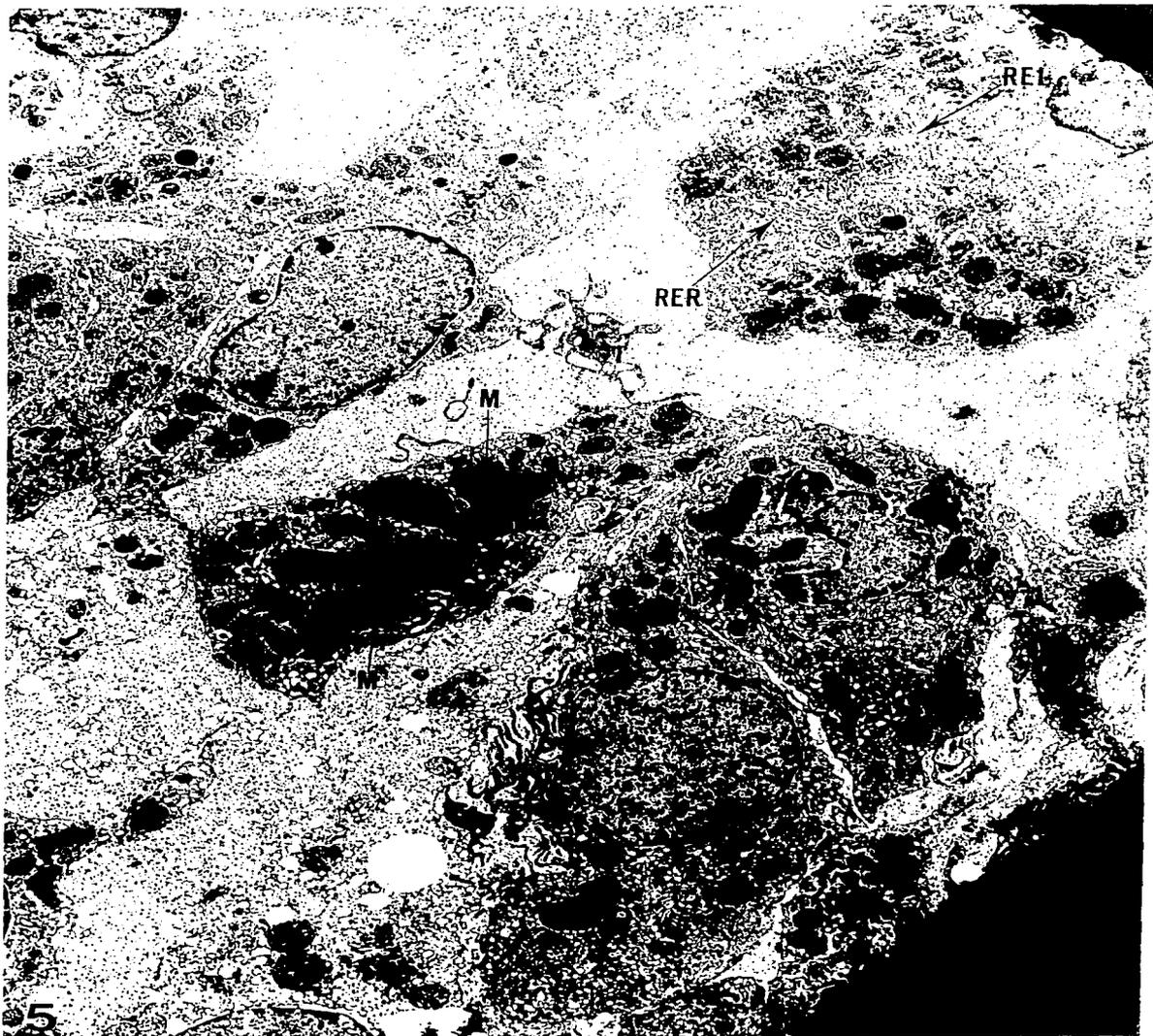






3





VII.- DISCUSION

La histogénesis del ovario incluye dos eventos importantes que son la transformación de la gran actividad mitótica de las ovogonias al estado quiescente de los ovocitos y la organización de las células somáticas en folículos. La relación temporal entre estos dos eventos varía en las diferentes especies y el cese de la proliferación de las ovogonias y la entrada a la meiosis son eventos altamente sincronizados. Las ovogonias se transforman en ovocitos cuando dejan de dividirse y entran a la meiosis progresando por las primeras fases de ésta, deteniéndose en diploténa. En la rata las primeras células meióticas se observan a los 17.5 días (Beaumont y Mandl 1962). Coincidente con la entrada a la meiosis un gran número de células germinales sufren atresia, en la rata existen 4 ondas de degeneración que reducen el número de células germinales de 75000 que hay el día 18.5 de la gestación a solo 27000 para el día 2 postparto (Beaumont y Mandl 1962). El mayor grado de degeneración ocurre en la etapa que precede a la cigótena y continuará en la vida postnatal, por ello el número de ovocitos en los ovarios al nacer está en función de la duración de la proliferación de las ovogonias, velocidad de proliferación y del grado de atresia.

En la gónada en diferenciación, las células somáticas se distribuyen entre las células germinales que inicialmente están formando nidos y posteriormente se organizan en cordones, continúan proliferando durante todo el periodo embrionario rodeando gradualmente a los ovocitos en forma individual y formando los folículos primordiales cuyo tiempo de aparición varía de una especie a otra. Las opiniones en cuanto a la aparición de los folículos primordiales en la rata varían pero aparentemente ocurre después del primer día postparto (213).

De acuerdo a Gurdon (1987) la comisión de las células germinales debe involucrar una inducción instructiva, el tejido que responde debe recibir una señal específica que le indique hacia qué dirección se debe diferenciar. La evidencia sugiere que las interacciones locales entre las células gonadales y el ovocito pueden ser la fuente de estas influencias inductivas que determinan la vía de diferenciación de las células que lo rodean.

El hecho de que en el ratón inmaduro, las células de la rete que rodean a los ovocitos presenten pocas gotas de lípidos y retículo endoplásmico rugoso y poca actividad enzimática en contraste con las que están alejadas de los ovocitos que tienen una alta actividad enzimática apoya la hipótesis de que existe una influencia inhibitoria de los ovocitos en ciertos pasos de la esteroidogénesis (216).

Actualmente existen sólidas evidencias que sugieren que la formación del folículo está controlada por interacciones célula-célula y que los ovocitos son los más importantes organizadores de las células somáticas en el ovario y que la ausencia de éstos evita la histogénesis de éste. De hecho existe evidencia sólida que establece que las células somáticas de la gónada controlan la maduración de las células germinales (Thibault 1977, Channing 1982). Las uniones "gap" que existen entre las células germinales y las somáticas proveen la base morfológica para el transporte de sustancias reguladoras desde las células somáticas y la posibilidad de que las células germinales regulen las funciones

endocrinas de las células somáticas está apoyado por el hecho de que hay una intensa síntesis de RNA en los ovocitos en maduración. Estudios realizados por Kasuga y Takagashi (1986) revelan que en ausencia de ovocitos el estroma tiene una apariencia de cordones semejante a la de los ovarios embrionarios lo que indica que la formación de cordones en el ovario no requiere de la presencia de células germinales, pero que las células germinales se requieren para la progresión de cordones a folículos (Merchant 1975). De hecho las células germinales que pierden su camino y llegan a las glándulas adrenales se diferencian a ovocitos (aún en machos) e inducen a las células adrenales a asumir la organización característica de las células de la granulosa en los folículos primordiales (Francavilla y Zamboni 1985). De ello se puede concluir que los sitios de reconocimiento de la superficie celular juegan un papel muy importante en el mecanismo por el cual el ovocito dirige el ensamblaje del folículo. Sin embargo aún cuando las señales inductivas primarias que dirigen a las células tronco y la histogénesis ovárica parecen originarse por interacciones ováricas no se pueden descartar otras influencias hormonales (62).

Un aspecto importante que debe considerarse es que una vez que ha ocurrido la diferenciación de los folículos primordiales algunos de ellos inician inmediatamente su crecimiento mientras que otros permanecen quiescentes por meses. Estas variaciones en los tiempos de quiescencia tienen grandes implicaciones para la regulación del desarrollo folicular a lo largo de la vida del organismo.

Poco se sabe de los factores que liberan a los folículos primarios de su estado quiescente y estimulan su entrada al proceso de crecimiento. A través de gran cantidad de trabajos se han propuesto a la fecha dos hipótesis para intentar explicar qué desencadena el inicio del crecimiento de los folículos primordiales. Una hipótesis propone que la salida de los folículos primordiales de la reserva es independiente de influencias externas y que es una característica preprogramada del ovario. La reserva de folículos primordiales que no están creciendo puede ser considerada como una población en reposo que posee todas las posibilidades para su utilización y específicamente para que inicie su crecimiento. Estos parámetros parecen ser cepa específicos. Tal modelo predice que los folículos individuales empiezan a crecer de una manera estocástica, el número de folículos que empiezan a crecer en cualquier periodo de tiempo está determinado por el tamaño total de la reserva de folículos primordiales. Si el tamaño de la reserva se reduce experimentalmente como en el caso de la hemicastración, el número total de folículos de la reserva disminuirá, pero la proporción de la reserva total que empieza a crecer por unidad de tiempo será constante (215).

La otra hipótesis sostiene que la salida de folículos de la reserva es regulada por factores globales o locales. Se ha propuesto, hipotéticamente, que factores locales provenientes de folículos atrésicos o en crecimiento podrían afectar el inicio del crecimiento folicular, de hecho algunos autores sostienen que la salida de los folículos primordiales de la reserva quiescente está regulada por gonadotropinas (215). Si fuera cierto que factores globales o locales regulan el inicio del crecimiento folicular a través de un mecanismo de retroalimentación verdadera, entonces la reducción del tamaño de la reserva de folículos primordiales debería conducir a un aumento compensatorio en la proporción de folículos

que empiezan a crecer a partir del resto de la reserva de folículos primordiales. Estos autores sostienen que el reclutamiento de los folículos primordiales está influenciado por el tamaño total de la reserva de folículos que están en reposo y sugieren que cualquier disminución en el tamaño de la reserva se acompañará por la correspondiente reducción en el número de folículos primordiales que entran al proceso de crecimiento lo cual significa que hay una correlación directa entre el tamaño de la reserva de folículos primordiales y la velocidad a la que entran al proceso de crecimiento (219). Krarup, Pedersen y Faber (1969) concluyeron que la disminución en el número de ovocitos pequeños por sí misma causa un aumento en la fracción de ellos que inicia el crecimiento, lo cual significa que hay una correlación inversa entre el tamaño de la reserva de folículos primordiales y la velocidad de movimiento hacia el proceso de crecimiento (220).

Otro aspecto que ha sido estudiado sin que hasta la fecha exista una explicación definitiva es la "elección" de los folículos primordiales que entrarán al proceso de crecimiento. Se ha sugerido que un factor determinante es el tiempo en el que se formaron los folículos primordiales y se ha hipotetizado que puede haber gradientes en el ovario fetal durante la diferenciación de los ovocitos que provocarán diferencias en la frecuencia de quiasmas a lo largo de la "línea de producción" en la que los ovocitos formados mas temprano serán los que sean ovulados primero (Henderson y Edwards 1968). Otra hipótesis propone que no todos los folículos primordiales se forman de igual manera, difieren en cuanto a los linajes celulares que forman sus células de la granulosa y con respecto al tiempo en el que el ovocito inició la meiosis. Cada folículo primordial presentará una combinación única de estas características al momento de ser ensamblado. La proporción en la que se encuentren las diferentes poblaciones celulares determinará la longitud de la quiescencia, variable crítica que afecta la velocidad a la cual los folículos se mueven hacia el proceso de crecimiento y será la responsable de las diferencias en la capacidad de respuesta a las gonadotropinas y a otros factores reguladores durante el desarrollo folicular ya que cada población tiene un umbral diferente para entrar al ciclo celular (215). Recientemente Hirschfield (1994) destruyendo la línea germinal de ratas con diferentes dosis de Busulfán administrado en diferentes días de la gestación encontró que en los ovarios parcialmente esterilizados todos los folículos sobrevivientes empiezan a crecer en forma temprana y que en los ovarios esterilizados en forma mas severa la reserva de folículos primordiales casi se había acabado cerca de la pubertad. Los resultados obtenidos sugieren que debe haber alguna retroalimentación o función de "censo" que afecta la velocidad a la cual los folículos primordiales entran al proceso de crecimiento. La deficiencia en los folículos primordiales es una condición exacerbada, mientras menos folículos queden más rápidamente se acabarán. En la vida posterior hay una relación inversa entre el tamaño de la reserva de folículos primordiales y la activación de éstos, este fenómeno podría ser un componente importante del mecanismo que mantiene la ciclicidad regular y el número de óvulos hasta el final de la vida fértil (215).

Muchos de los estudios encaminados a conocer el papel de las células germinales en la diferenciación del ovario, han tomado como modelo a la selectividad que tiene el Busulfán para destruir células germinales.

El efecto de este fármaco sobre la línea germinal está ampliamente documentado; existen gran cantidad de trabajos que han reportado las características estructurales de las gónadas de las ratas tratadas durante su etapa fetal con Busulfán (Hemsworth y Jackson 1963, Heller y Jones 1964, Forsberg y Olivecrona 1966, Merchant 1975, Reddoch et al 1986, Kasuga y Takahashi 1986, Pelloux et al 1988, Hirshfield 1994).

Se ha demostrado también, que la sensibilidad de las células germinales a este fármaco varía con el tiempo y se incrementa después de la implantación siendo su acción mayor en la etapa en la que las células germinales primordiales llegan al ovario en desarrollo. Algunos autores (Franchi, Forsberg 1966, Merchant 1975) concuerdan con la opinión de que el máximo efecto sobre las células germinales se encuentra entre los días 11 al 15 que es cuando ocurre la migración y el inicio de la máxima actividad proliferativa de estas células, sin embargo, otros investigadores consideran un rango que va de los 13 a los 16 días (Hemsworth 1963, Heller 1964) etapa que cubre parte de la fase migratoria y el inicio de la máxima proliferación que va del día 14 al 17 (Baker 1971). Posteriormente en el desarrollo, cuando las ovogonias entran a la profase de la primera división de la meiosis, las células germinales, ya como ovocitos, son insensibles a la acción del Busulfán.

Asimismo, ha quedado totalmente demostrado que el Busulfán detiene la mitosis y este proceso es necesario para mantener el número de células germinales (208).

Se sabe que el establecimiento de la gónada indiferenciada y su diferenciación sexual se puede llevar a cabo en ausencia de la línea germinal, pero su presencia es una condición necesaria para el establecimiento de los folículos y la diferenciación estructural de las células sintetizadoras de esteroides.

No obstante y a pesar del papel determinante de la presencia de las células germinales en la diferenciación de los folículos ováricos, pocos estudios se han realizado para conocer su efecto sobre la función endocrina del ovario de ratas tratadas con Busulfán (207,208,220).

En este trabajo se trató de determinar el efecto de la reducción en el número de células germinales sobre la diferenciación de las células somáticas a células esteroidogénicas del ovario de ratas tratadas con 10 mg/kg de peso el día 14 de la gestación, etapa en la que se está llevando a cabo la máxima proliferación de las células germinales, ya en la gónada fetal.

Un primer hallazgo fue que el número de productos de ratas tratadas era menor que el de las ratas controles. La disminución en el número de los productos se redujo de 10.5 en ratas hijas de madres no tratadas a 8.2 en ratas hijas de madres tratadas. Heller y Jones (1964) reportan que administrando la misma dosis de Busulfán los días 13 y 14 de la gestación hay una reducción en el número de productos que es de 9 en ratas controles y de 7.1 en las ratas tratadas (203). Sin embargo Reddoch y colaboradores (1986) con la

misma dosis de Busulfán administrada el día 13 de la gestación no reportan disminución en el número de productos por camada (221).

Los efectos del Busulfán no solo se manifestaron en la reducción en el número de productos sino también en el peso de éstos.

Los resultados obtenidos en este trabajo revelaron que las ratas hijas de madres tratadas con Busulfán presentaban una reducción significativa del peso corporal. Al mes de nacidas la reducción fue de 20.94 %, a los 2 meses fue de 21.94 % y a los 3 meses de 17.96 %, resultados que son apoyados por los reportados por Hemsworth y Jackson (1963) administrando la misma dosis de Busulfán el día 15 de la gestación encontraron que a los 6 meses de edad las ratas hijas de madres tratadas presentaban una reducción del 15 % del peso normal (202). Heller y Jones (1964) con la misma dosis de Busulfán administrada los días 13 y 14 o 13 y 15 de la gestación encontraron a los 20 días de gestación una disminución en el peso de los fetos de madres tratadas de 36.25 %, a los 3 meses de edad los animales tratados también fueron de menor peso que los controles siendo la diferencia de 25.97 % (203).

Pelloux y colaboradores (1988) con la misma dosis administrada el día 12 de la gestación reportan que a los 5 días de nacidas las ratas hijas de madres tratadas presentaban una reducción de peso del 9.3 % y a los 10 días la reducción era del 5.9 %, diferencia que no es significativa (208).

Reddoch y colaboradores (1986) administrando Busulfán el día 13 de la gestación encontraron una disminución significativa del peso a los 6, 8, 10, 12 y 14 días postparto (221).

Kasuga y Takahashi (1986) reportaron que los animales tratados el día 15 de la gestación con la misma dosis de Busulfán no presentaban cambios en el peso (208).

Hirshfield (1994) con una dosis de 10 mg/kg de peso de Busulfán administrada el día 12 de la gestación reportó que al nacimiento las ratas presentaban una reducción significativa de peso siendo ésta del 17.85 % (213).

La reducción en el peso de los productos de madres tratadas podría explicarse por la reducción en las concentraciones de hormonas esteroideas que juegan un papel importante en el aumento de peso de los organismos pero no podría descartarse la posibilidad de que el Busulfán esté afectando también diversas células del organismo (221).

El análisis macroscópico de los ovarios de ratas hijas de madres tratadas reveló una importante reducción en el tamaño de éstos a la mitad del tamaño de los ovarios de los animales no tratados. Datos semejantes fueron reportados por Hemsworth y Jackson (1963) que administraron el Busulfán los días 13 o 15 de gestación y encontraron una reducción sustancial del tamaño de los ovarios a los seis meses de edad (202). Heller y Jones (1964) quienes administrando 10 mg/kg de peso de Busulfán los días 13 y 14 o 13 y 15 observaron que a los 20 días de gestación los ovarios de las ratas tratadas eran de la mitad del tamaño de los normales (203). Forsberg y Olivecrona (1966) con la misma dosis de Busulfán administrada los días 12 o 13 y analizados a los 21 días de gestación y

a los 90 y 100 días de edad, encontraron también que los ovarios estaban microscópicamente reducidos (204) y lo mismo reportan Vanhems y Bousquet (1971) quienes administrando el Busulfán el día 15 de la gestación, encontraron que a los 21 días de gestación y a los 1, 6, 8, 12, 15 días, 1 mes, mes y medio y 2 meses, los ovarios eran de tamaño muy reducido, cerca de la dieziseisava parte de uno normal (206). Reddoch y colaboradores (1986) administrando el Busulfán el día 13 encontraron que a los 6 y 10 días de nacidas los ovarios de las ratas tratadas eran de tamaño significativamente menor que los de las controles (221). Kasuga y Takahashi (1986) administrando el Busulfán el día 15 de la gestación encuentran disminución en el tamaño de los ovarios de ratas tratadas al día de nacidas, a los 60 y 120 días (208). Pelloux y colaboradores (1988) reportaron que con la administración de Busulfán a los 12 días de gestación hay una significativa reducción del tamaño de los ovarios (209). Es importante hacer notar que la reducción del tamaño de los ovarios y consecuentemente del peso de éstos, reportada por todos los autores que han trabajado esta línea de investigación, y que concuerda con los datos obtenidos en este trabajo, no puede ser explicada solo por la reducción del número de células germinales, y en etapas de desarrollo mas avanzadas probablemente se deba a la disminución en el número de los grandes folículos de von Graaf, cuerpos lúteos y estroma.

Una de las primeras manifestaciones de actividad estrogénica del ovario es la apertura de la vagina hecho que indica el inicio de la madurez sexual de las ratas. Las observaciones realizadas en este trabajo en cuanto a la edad en la que ocurre la apertura de la vagina revelaron un retraso de 6 ± 0.9 días en los animales tratados. Heller y Jones (1964) reportan que la apertura de la vagina de ratas tratadas con Busulfán los días 13, 14 y 14, 15 de la vida fetal ocurre en el rango normal de 4.5 a 6 semanas (203). En concordancia con los resultados de este trabajo, Merchant (1975) encuentra que existe una correlación entre la cantidad de tejido esteroideo de los ovarios y el grado de respuesta del tracto genital, ya que las ratas, cuyas madres fueron tratadas el día 12 de la gestación con una dosis de 10 mg/kg de peso de Busulfán, y que tenían ovarios totalmente indiferenciados presentan un tracto genital infantil y continuaban con la vagina cerrada al tercer mes de nacidas (50). Kasuga y Takahashi (1986), por el contrario reportan que en ratas a las que se les administró la misma dosis de Busulfán el día 15 de la gestación la apertura vaginal ocurre una semana antes en los animales tratados que en los controles (208). Sin embargo, si se parte del hecho de que la respuesta del tracto genital está en función de la concentración de hormonas esteroideas, específicamente del estradiol, el retraso en la apertura de la vagina encontrado en este trabajo se explica por la diferencia significativa que existe en las concentraciones de esta hormona en los animales tratados, lo cual también es apoyado por los trabajos de Mandel (1956) que encontró que si la destrucción de los folículos irradiados dos semanas después del nacimiento era completa no quedaba actividad estrogénica y solo si persistían algunos folículos ocurrían períodos de estro a intervalos irregulares y había una clara respuesta en los tejidos blanco de estrógenos. Al irradiar ovarios adultos siempre había cierta actividad estrogénica por lo que concluyó que la presencia de los ovocitos es necesaria durante una etapa crítica del desarrollo para

inducir a las células foliculares y para que éstas respondan a la estimulación gonadotrópica, después de este punto son capaces de responder aún en ausencia de ovocitos (222). Beaumont (1961) encontró que después de la irradiación *in utero* de ratas y ratones, había folículos de tamaño mediano y grandes lo que indicaba que aquellos ovocitos que habían sobrevivido al tratamiento eran capaces de crecer y de organizar a su alrededor capas de células de la granulosa que eran funcionalmente normales y capaces de responder a gonadotropinas (223). Pugliatti y Allegra (1966) también encontraron una clara correlación entre la cantidad de tejido luteinizado que quedaba después del tratamiento con Busulfán y el desarrollo de los órganos blanco de estrógenos (224).

El adecuado funcionamiento del ovario depende de una serie de factores como son las interacciones entre las células intersticiales y los folículos, el desarrollo coincidente de las células de la granulosa y las intersticiales al igual que de las células de la granulosa y del ovocito todo esto dependiente de un adecuado balance de las hormonas hipofisarias. Estudios realizados por Sokka y Huhtaniemi (1990) revelan que la primera etapa de la diferenciación ovárica es independiente de la presencia de gonadotropinas ya que en la rata los receptores ováricos a estas hormonas aparecen hasta la primera semana de vida postnatal aún cuando las primeras células de la hipófisis positivas a gonadotropinas aparecen el día 16 a LH y el 17 a FSH de la gestación justo antes de que se inicie la meiosis. Son mas bien factores parácrinos los que regulan el desarrollo morfológico y endocrino del ovario antes de que éste sea dependiente de gonadotropinas, la dependencia clara del ovario a gonadotropinas se inicia entre los días 7 y 10 de vida postnatal y la biosíntesis esteroidea se inicia hasta la segunda semana de vida postnatal (225).

Trabajos recientes han demostrado que FSH y LH no solo regulan el crecimiento de los folículos medianos y grandes sino que también controlan el reclutamiento de los folículos primordiales para que entren al proceso de crecimiento así como la proliferación de pequeños folículos preantrales. Las acciones de FSH y LH en el desarrollo folicular y la esteroidogénesis están mediados por receptores específicos. Los receptores a FSH están localizados en la membrana plasmática de las células de la granulosa de folículos preantrales y antrales y los de LH en la teca, en las células intersticiales y en las murales de la granulosa de grandes folículos antrales. FSH juega un papel fundamental en el desarrollo gonadal, diferenciación y maduración vía sus acciones reguladoras sobre las células de la granulosa. El mecanismo de acción de FSH incluye la unión de FSH a los receptores FSH específicos de la membrana plasmática y la activación subsecuente de adenilciclase que conduce a un aumento en la expresión génica de los receptores de LH y a la síntesis *de novo* de enzimas esteroidogénicas, especialmente la aromatasas citocromo P 450, lo que da por resultado un aumento en la conversión de androstenediona a estradiol. Como la androstenediona es producida en la teca bajo la influencia de LH, ambas FSH y LH son esenciales para la biosíntesis de estrógenos.

Wang y Greenfield (1993), en ratones hipofisectomizados, demostraron que la FSH es esencial para estimular los primeros pasos del desarrollo folicular y el crecimiento continuado hacia etapas preovulatorias, reducir la velocidad de atresia e inducir sus

propios receptores y los de LH/hCG en las células de la granulosa, pero no en otros comportamientos ováricos, no se conocen efectos de FSH sobre las células tecales. La acción de LH sobre la aromataza ovárica está mediada vía la testosterona y andrógenos 5 reducidos provocando amplificación de la respuesta de AMPc mediadas por FSH. Los efectos de LH sobre el crecimiento folicular y diferenciación pueden ser mediados por la LH actuando sobre el tejido techal e intersticial para inducir la producción de AMPc, progesterona, andrógenos y algunos factores tipo proteínas como el factor de crecimiento transformante α (TGF α), el factor de crecimiento epidermal (EGF), el factor de crecimiento semejante a insulina I (IGF-I) productos que a su vez estimulan a las células de la granulosa para sintetizar receptores a FSH (226).

En roedores otras dos hormonas hipofisarias juegan un papel importante en el control de la secreción de esteroides, la prolactina y la hormona de crecimiento. Dependiendo del nivel de la prolactina, ésta puede inhibir o apoyar el efecto estimulatorio de LH sobre la esteroidogénesis ovárica a través de la modulación del número de receptores a LH. Está involucrada en iniciar la luteinización de las células de la granulosa, mantener el nivel de síntesis de progesterona por las células de la granulosa e inhibir la actividad de la enzima que cataboliza a la progesterona, la 20α hidroxisteroide deshidrogenasa. Los receptores específicos a prolactina en las células de la granulosa aparecen tardíamente en el desarrollo y se han demostrado efectos estimulatorios sobre la esteroidogénesis en ovarios prepuberales. Hay evidencias de que participa en la inducción y mantenimiento de los receptores a LH sobre las células luteales en etapas gestacionales tardías. Tiene un efecto inhibitorio sobre la secreción de estrógenos en folículos preantrales y preovulatorios ya que tiene una acción inhibitoria sobre la inducción de FSH de la actividad de aromataza. La hormona del crecimiento facilita las acciones de FSH por un mecanismo que involucra la producción del factor de crecimiento semejante a insulina I (IGF-I) (103, 227).

En este estudio no se realizaron determinaciones de hormonas gonadotrópicas pero el hecho de haber encontrado tejido esteroidogénico y secreción, aunque disminuida, de las diferentes hormonas ováricas sugiere que el eje hipotálamo-hipófisis-gónada era funcional. Este aspecto es apoyado por los estudios de Vanhems y Bousquet (1971) quienes después de transplantar a la cápsula del riñón, de hembras castradas, ovarios disgenésicos de ratas cuyas madres fueron tratadas con Busulfán el día 15 de la gestación, encontraron que si en éstos había escasos folículos éstos eran capaces de responder al estímulo con hormonas hipofisarias de las hembras receptoras diferenciándose pequeños cuerpos amarillos (206). El trabajo de Merchant (1976) demostró que en aquellos ovarios donde sobreviven células germinales da la organización de folículos normales y éstos son capaces de responder al estímulo con PMS concluyendo que el ovocito de alguna manera induce la formación de receptores a gonadotropinas en las células somáticas (207). Ahora bien, el programa preciso de la expresión de las enzimas esteroidogénicas en las células de la teca, de la glándula intersticial, de la granulosa y en las células luteales es responsable del patrón fisiológico de la secreción de esteroides que se presenta durante el ciclo estral. En la Figura 6 se presenta en forma esquematizada y simplificada cómo se

lleva a cabo el control de la secreción de estas hormonas y las enzimas que participan en su metabolismo.

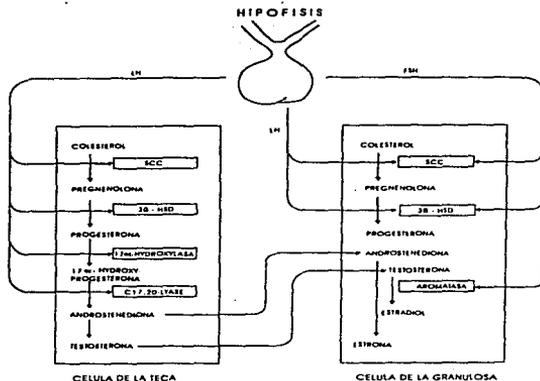


Figura 6. Control de la secreción de las hormonas esteroideas ováricas (227)

La pregnenolona es la progestina más importante producida por el folículo debido a su posición clave como precursor de todas las hormonas esteroideas. Su producto más importante es la progesterona producida como un intermediario biosintético por los folículos en todas las etapas de crecimiento. En la rata el cuerpo lúteo secreta como principales esteroideas la progesterona y la 20 α hidroxipreg-4-en-3 ona (20 α -OHP) y la relación de estas dos hormonas es un indicador del estado fisiológico del cuerpo lúteo. Estudios realizados por De Greef y Zeilmaker demostraron que en la rata no existe un efecto compensatorio en cuanto a la secreción de progesterona por los cuerpos lúteos restantes cuando se realiza una ovariectomía unilateral y demostraron que la contribución por cuerpo lúteo a la secreción de progesterona es mayor cuando hay menor número de cuerpos lúteos formados. Se debe aclarar que las concentraciones circulantes de progesterona representan tanto la secreción ovárica como adrenal y que hay evidencia de la que la progesterona tanto ovárica como adrenal tiene ritmos diurnos y que la máxima secreción ocurre entre las 10 y 11 de la mañana. Se sabe también que tanto los folículos antrales pequeños como los preovulatorios poseen la capacidad de producir grandes cantidades de progesterona mediado por AMPc pero solo los folículos preovulatorios poseen la capacidad de convertir progesterona a andrógenos y posteriormente a estradiol y que ni la actividad de aromataasa de las células de la granulosa ni la actividad de la 17 cetosteroide reductasa son limitantes para la síntesis de estradiol de los pequeños folículos antrales (228).

Bogovich y Richards (1982) demostraron, trabajando con ratas, que la limitada capacidad de los folículos antrales pequeños para sintetizar estradiol radica en su incapacidad de convertir progesterona en andrógenos. Específicamente, ni la 17α hidroxilasa (que cataliza la conversión de progesterona a 17α hidroxiprogesterona) ni la C17-20 liasa (que cataliza la conversión de 17α hidroxiprogesterona a androstendiona) son muy activas en pequeños folículos antrales. Estos autores concluyen que LH actúa específicamente sobre las células tecaes para regular las actividades de 17α hidroxilasa y C17-20 liasa. Aparentemente los cambios en la esteroidogénesis no dependen del aumento de la actividad del receptor, lo que no se sabe es si el aumento en las actividades de 17α hidroxilasa y de C17-20 liasa representan una activación o una síntesis *de novo* de proteínas tecaes. En resumen, la limitada habilidad de los folículos antrales pequeños para producir andrógenos y por lo tanto estradiol reside no solo en la síntesis de progesterona sino en la baja actividad de las dos enzimas tecaes. Los requerimientos específicos de aumento de LH en el suero para iniciar el desarrollo folicular preovulatorio involucra la regulación de la función tecal y una capacidad esteroidogénica aumentada, este requerimiento de mayor actividad de LH para el desarrollo preovulatorio actúa en parte regulando estas dos actividades en las células de la teca (229).

Las células de la teca son el principal sitio de síntesis de andrógenos. En la rata el aumento en la síntesis de androstendiona está asociada con el crecimiento de los folículos preovulatorios y está regulada principalmente por la estimulación que provoca LH de las actividades de 17α hidroxilasa y C17-20 liasa mas que por la estimulación de la síntesis de progesterona o por una reducción en actividad de 5α reductasa. Los estudios realizados por Richards, Hedin y Caston (1986) en ratas demostraron que las células de la teca de folículos preovulatorios sufren pronunciados cambios funcionales en respuesta al aumento de LH/hCG, cambios que son claros indicadores de luteinización. El aumento de LH/hCG indujo un aumento en la producción de progesterona por las células de la teca. El aumento en la síntesis de progesterona puede estar asociada con un aumento en el contenido de la enzima citocromo P450 scc que se sabe está incrementada en el cuerpo lúteo, de igual manera pueden estar involucrados cambios en el contenido/síntesis de receptores para proteínas de alta densidad o baja densidad al igual que cambios en la toma de colesterol de lipoproteínas circulantes (123).

Al desarrollarse los folículos ováricos, las células de la granulosa empiezan a secretar 17β estradiol, función que es controlada por FSH que interactúa con los receptores de la membrana plasmática de las células de la granulosa que activa la adenilciclasa y subsecuentemente aumenta los niveles intracelulares de AMPc. Estudios recientes demuestran que AMPc activa la proteincinasa A y estimula y/o activa una proteína unida a DNA. La síntesis de estradiol por el folículo preovulatorio en desarrollo es una condición necesaria para la diferenciación de las células de la granulosa al igual que para disparar el aumento de LH. En la rata los pequeños folículos antrales producen cantidades reducidas de estradiol a pesar de la presencia de un sistema de aromataasa activo en las células de la granulosa que pueden convertir andrógenos exógenos a estradiol.

Teniendo en cuenta que las células de la teca son los sitios principales de síntesis de andrógenos Hedin y colaboradores (1987) propusieron que la síntesis de estradiol por folículos preovulatorios era dependiente de la capacidad de las células de la teca para sintetizar andrógenos aromatizables en respuesta a ligeras variaciones en las concentraciones de LH. Se ha demostrado que LH regula la biosíntesis de andrógenos en las células de la teca de las ratas estimulando la conversión de progesterona a androstendiona vía una sola enzima, la citocromo P450 que contiene las actividades de 17 α hidroxilasa y 17-20 liasa, la P450 17 α (230).

Se sabe que el estradiol es necesario para que maduren las células de la granulosa y para que lleven a cabo la luteinización morfológica y funcional así como para que se mantenga el cuerpo lúteo en las ratas por lo que el estradiol u otra sustancia intrafolicular debe marcar a las células de la teca para que sean capaces de responder al aumento de LH. Las células de la teca al igual que las de la granulosa se diferencian morfológica y funcionalmente durante el crecimiento folicular y aumentan su capacidad de responder a LH. De igual manera demuestran que las células de la teca y de la granulosa luteinizadas son muy similares en su capacidad para mantener la producción de progesterona en ausencia de LH (123).

Otro tipo celular que debe ser considerado por su importante papel esteroidegénico son las células intersticiales cuyo desarrollo y diferenciación están relacionados con el crecimiento folicular y la atresia ya que durante la atresia folicular, las células de la teca dan origen a las células intersticiales por lo que al igual que las de la teca tienen la capacidad de sintetizar *de novo* esteroides. Sin embargo es poco conocido el mecanismo por el cual los productos secretorios de estas células son transportados y liberados, aparentemente la difusión es el mecanismo predominante lo cual es apoyado por la presencia de microvelosidades. El desarrollo periódico de células intersticiales y la diferenciación simultánea de las células de la teca interna alrededor de los folículos normales de mamíferos está relacionada con la progresiva elevación de hormonas esteroideas que finalmente regulan la pubertad, la actividad cíclica y la ovulación (123).

En este estudio se demostró que las concentraciones hormonales de pregnenolona, progesterona, androstendiona, testosterona y estradiol de las crías de ratas tratadas con Busulfán, se redujeron en forma estadísticamente significativa en todas las edades. En el caso de la estrona, la reducción fue significativa al mes y a los 3 meses de edad, no así a los 2 meses de edad en que la reducción fue solo del 6.9%.

Reddoch et al (1986) estudiaron la capacidad de los ovarios de crías de ratas tratadas el día 13 de la gestación con Busulfán para secretar AMPc y esteroides en respuesta a un estímulo con gonadotropinas para lo cual realizaron incubaciones cortas de los ovarios de 6, 8 10, 12 y 14 días de nacidas. Los resultados obtenidos de las incubaciones de ovarios de ratas controles revelaron que tanto la FSH (500 ng/ml) como la LH (100 ng/ml) estimulaban la acumulación de AMPc, progesterona, androstendiona y estradiol en el medio en todas las edades estudiadas. Para el caso de los ovarios de crías de ratas tratadas la acumulación de AMPc y esteroides no fue estimulada significativamente a

ninguna de las edades estudiadas. Concluyendo estos autores que solo los ovarios en los que sobrevivían algunos ovocitos al tratamiento eran capaces de organizar folículos esteroideogénicamente competentes (221).

Kasuga y Takahashi (1986) con el objeto de conocer la función endocrina de las gónadas con un número reducido de células germinales administraron Busulfán el día 15 de la gestación y encontraron que cuando se les administraba a ratas tratadas de 4 a 5 meses de edad una dosis de 10 U.I. de hCG había un aumento en la concentración de progesterona a las 12 horas y después regresaba a sus niveles basales mientras que el estradiol disminuía 24 horas después de la inyección, sin embargo, los cambios eran solo transitorios. Sabiendo que una dosis ovulatoria de hCG disminuye la actividad de la 17 α hidrolasa y la C 17-20 liasa en los folículos preovulatorios que induce una disminución aguda de los niveles de estradiol asociados con un aumento de los niveles de progesterona, los cambios hormonales en las ratas tratadas sugieren que la inhibición de la actividad de la enzima es incompleta. Con el objeto de comprobar la capacidad de conversión de progesterona a andrógenos o estrógenos hicieron homogenados de los ovarios de ratas tratadas de 110 días de edad, agregándoles progesterona radioactiva. Se determinó la conversión después de 30 minutos de incubación encontrando que la fracción de estradiol fue significativamente mayor en las ratas tratadas que en las controles. Estos datos aunados al hecho de que la apertura vaginal ocurrió una semana antes en las ratas tratadas que en las controles sugieren que el ovario con un número menor de células germinales inicia en forma temprana la producción de estradiol con menos dependencia de la estimulación con gonadotropinas (208).

En este trabajo no se encontró el aumento en la síntesis de estradiol reportada por Kasuga y Takahashi y la disminución en las concentraciones de estradiol fue significativa a todas las edades estudiadas.

Pelloux y colaboradores (1988) administrando Busulfán el día 12 encontraron que los ovarios de ratas de 5 días de nacidas colocados en cultivo no producían estrona y estradiol ni en presencia o ausencia de LH. A los 10 días en condiciones basales las concentraciones de estradiol eran significativamente menores que las de los animales controles y no se detectaba estrona. Sin embargo, había un efecto estimulador de LH en la síntesis de ambas hormonas siendo las concentraciones de éstas iguales a las de los controles si se correlacionaban con el volumen ovárico. Al analizar la actividad de la aromatasas encontraron que su actividad estaba muy reducida en los ovarios de ratas tratadas ya que era solo del 2.5 %, la actividad podía ser estimulada con FSH y dAMPc y alcanzaba o sobrepasaba los valores de los controles, si se correlacionaba con los volúmenes ováricos lo cual era indicador de la presencia de receptores funcionales. FSH y dAMPc no estimulaban la actividad en los animales controles. La actividad de la 3 β hidroxisteroide deshidrogenasa fue marcadamente menor en los ovarios de ratas tratadas que en los de las controles. Estos autores concluyen que la reducción en la síntesis de estrógenos podría afectar el desarrollo del ovario ya que los folículos no podrían aumentar su diámetro (209). Los resultados obtenidos en este trabajo concuerdan con los reportados por estos autores en cuanto a la reducción en las concentraciones tanto de estrona como de estradiol y se correlacionan con el hecho de que el tamaño de los

ovarios de las crías de ratas tratadas eran de la mitad del tamaño del de las crías de ratas no tratadas.

Al hacer el análisis microscópico del ovario de las ratas tratadas se observa que a las diferentes edades estudiadas la estructura ovárica era semejante. La destrucción de la línea germinal había sido parcial. Al microscopio de luz se observa que los ovarios con mayor daño están formados por cordones epiteliales estériles rodeados de tejido intersticial en el que no se identifican células con características esteroidogénicas. En aquellos ovarios en los que sobrevivieron algunas células germinales, éstas fueron capaces de inducir la diferenciación de células esteroidogénicas que presentan las estructuras celulares características de este tipo de células como lo indica la presencia de gran cantidad de vesículas lipídicas las cuales se podían observar tanto en el estroma como dentro de los cordones. Al microscopio electrónico se observó, en los ovarios más afectados, que las células epiteliales contenidas en los cordones estaban unidas estrechamente por uniones "gap", limitados por una delgada lámina basal alrededor de la cual se depositaba abundante colágena, el estroma estaba formado principalmente por fibroblastos entre los cuales también se observaba el depósito de colágena. En aquellos ovarios en los que sobrevivieron algunas células germinales se observaban cordones epiteliales limitados por lámina basal rodeados por colágena, en el estroma se observaron células diferenciadas de tipo esteroidogénico con numerosas vesículas lipídicas, abundante retículo endoplásmico liso, retículo endoplásmico rugoso, gran cantidad de mitocondrias con crestas tubulares, algunas de las mitocondrias estaban hipertrofiadas lo cual era señal de su gran actividad y participación en la esteroidogénesis.

Hemsworth y Jackson (1963) con una dosis de 10 mg/kg de peso de Busulfán administrada los días 13, 14, 15, 16 y 20 de la gestación encontraron que la administración a los 13 y 15 días producía esterilidad a los cuatro meses pero no describen la estructura histológica del ovario (202).

Heller y Jones (1964) administrando una dosis de 10 mg/kg de Busulfán los días 13 y 14 o 13 y 15 observaron que a los 20 días de gestación los ovarios estaban formados por un epitelio germinal cuboidal rodeado por una masa de células similares basófilas con un núcleo elíptico teñido intensamente, había pocas mitosis y casi no había células germinales ni cordones sexuales bien organizados. En aquellas ratas que se sacrificaron hasta los 3 meses de edad no había desarrollo folicular y se observaban pocos ovocitos rodeadas por un anillo de células de la granulosa desordenadas, había considerable luteinización del estroma y en todas las ratas excepto una se identificó una estructura semejante a un cuerpo lúteo desordenado (203).

Forsberg y Olivecrona (1966) administrando una dosis de 1 mg/ 100 gr de Busulfán a través de una incisión en la pared abdominal los días 7,9,11,12,13 y 18 de la gestación, demostraron que con la administración el día 9 los ovarios analizados el día 21 de la gestación presentaban un número de ovocitos altamente reducido, los cordones sexuales estaban separados por tejido fibroso, muchos de los ovarios contenían ovocitos y células foliculares y en otros solo se observaban células foliculares. Los ovarios de los animales tratados el día 11 estaban formados por células foliculares en cordones que se

entrelazaban, separados por delgadas franjas de tejido fibroso, se observaban pocos ovocitos dispersos y en dos casos había pequeños nidos de ovocitos. Con la administración a los 12 o 13 días solo se observaban unos cuantos ovocitos dispersos y el resto de la estructura era semejante a la del tratamiento anterior. A los 90 o 100 días de edad se observaba una luteinización muy pronunciada, la presencia de muchos cuerpos lúteos típicos y atípicos, en el centro de los atípicos se presentaba una luz con un contenido fluido rodeado por capas de células foliculares y en la periferia células luteinizadas, algunos folículos dispersos en diferentes grados de maduración hasta folículos de von Graaf (204).

Vanhems y Bousquet (1971) reportan que los ovarios, de crías de ratas tratadas el día 15 de la gestación con 10 mg/kg de peso de Busulfán, analizados a los 21 de gestación, al 1,6,8,12 y 15 días y 1, 1.5 y 2 meses, están formados por cordones con células redondas alrededor de las cuales se observan células fusiformes transversas, los cordones tenían una disposición radial en forma de dedo. En algunos ejemplares encontraron estructuras semejantes a folículos aunque de menor tamaño que eran capaces de madurar y transformarse en cuerpos lúteos (206).

Merchant (1975) administró una dosis de 1 mg/100 g de peso de Busulfán el día 11 o 12 de la gestación y encontró que la estructura de los ovarios en los que no sobrevivieron células germinales se modificaba ligeramente durante el primer mes de desarrollo, poseían un epitelio superficial cuboidal continuo con los cordones epiteliales internos, la cantidad de estroma estaba incrementada y había un crecimiento moderado del ovario al final de este periodo y se observaban abundantes células cebadas especialmente en los cordones epiteliales. Al microscopio electrónico observó que las células epiteliales presentaban pequeñas mitocondrias, abundantes polirribosomas y un retículo endoplásmico bien desarrollado. Los cordones epiteliales estaban rodeados por una lámina basal continua y las células estaban estrechamente asociadas. El estroma estaba formado esencialmente por células semejantes a fibroblastos, fibras de colágena y células de músculo liso dispersas, no se observaron células sintetizadoras de esteroides que normalmente se presentan a partir del 10° día de desarrollo. En una alta proporción de ratas tratadas sobrevivieron un número variado de células germinales que fueron capaces de organizar folículos con apariencia normal encontrándose a partir de la tercera semana tejido intersticial abundante y altamente diferenciado entre los folículos sobrevivientes. Al segundo mes de vida en aquellos ovarios en los que se habían formado folículos se encontró que habían sufrido atresia a diferentes tiempos de tal manera que al tercer mes ya no había folículos y en su lugar había una masa de tejido luteal cuya estructura al microscopio electrónico indicaba una alta actividad sintetizadora de esteroides (50).

Reddoch y colaboradores (1986) con la administración intraperitoneal de una dosis de 10 mg/kg de peso de Busulfán el día 13 de la gestación encontraron, el día 6 de vida postnatal, que aquellos ovarios en que se había destruido la línea germinal exitosamente estaban formados por cordones anastomóticos de células, semeando células de la granulosa que estaban en continuidad con el epitelio germinal y rodeadas por estroma indiferenciado. Estas células contenían núcleos débilmente teñidos que poseían un nucleólo prominente localizado centralmente. En los cordones y en el estroma se

observaban gran cantidad de células cebadas en varias etapas de degranulación, había grandes vacuolas en los cordones lo cual sugería que los remanentes de las células cebadas habían sido fagocitados por las células de los cordones. Pocos ovocitos sobrevivieron el tratamiento y la mayoría de éstos permanecían dentro de los cordones formando folículos mal definidos aparentemente sin recubrimiento de la teca a pesar de la frecuente presencia de múltiples capas de células foliculares. A los 14 días de vida los ovarios de las ratas tratadas tenían menor cantidad de células cebadas y en algunas ratas en las que habían sobrevivido algunos ovocitos éstos organizaron folículos que parecían ser normales. En estos casos se observaban células de la teca y de tejido intersticial observándose figuras mitóticas tanto en los cordones como en el estroma (221).

Kasuga y Takahashi (1986) administraron el día 15 de la gestación una dosis de 10 mg/kg de Busulfán y encontraron que al día de nacidas solo se observaban pocos ovocitos en el ovario. Durante la maduración se formaron algunos folículos en el ovario pero a los 60 días todas las células germinales y los folículos habían desaparecido. A los 120 días el ovario tenía una estructura en forma de cordones que consistía principalmente de fibroblastos y células morfológicamente semejantes a las intersticiales (208).

Pelloux y colaboradores (1988) administrando una dosis de 10 mg/kg de peso de Busulfán el día 12 o 18 encontraron que con la administración a los 12 días de gestación el ovario de las ratas sacrificadas a los 5 días de nacidas tenían un número de ovocitos considerablemente reducido pero la foliculogénesis ocurría alrededor de los ovocitos sobrevivientes. A los 10 días de nacidas los ovarios mostraban una pérdida notable del porcentaje de folículos primordiales a favor de los primarios. No observaron folículos antrales y reportaron que el promedio de folículos primarios en los ovarios tratados era de 157 ± 37 mientras que en los controles era de 3427 ± 604 . A los 10 días en estos animales no se observó aumento de volumen del estroma (209).

Hirshfield (1994) administrando una dosis de 10 mg/kg de peso de Busulfán el día 15 de la gestación encontró que al nacimiento los cordones epiteliales casi carecían de ovocitos, a los 5 días de nacidas muchos de los ovocitos sobrevivientes habían sido encerrados en folículos aunque la estructura semejante a cordones se conservaba en las regiones que carecían de ovocitos. A los 20 días se observaban folículos preantrales pequeños y medianos pero ya no había folículos primordiales. En las ratas severamente esterilizadas casi todos los ovocitos habían entrado al proceso de crecimiento. A los 59 días los ovarios tenían muy pocos folículos, sin embargo tenían la misma cantidad de folículos antrales grandes que los controles, en algunos ovarios solo se encontraban grandes folículos antrales. Uno de los productos severamente afectados tenía numerosas estructuras luteales y dos folículos en la etapa preantral tardía (213).

Los resultados obtenidos en este trabajo revelan que existe una correlación directa entre la reducción del tejido esteroideogénico diferenciado en los ovarios de crías de ratas tratadas con Busulfán y la disminución de las concentraciones séricas de hormonas esteroides detectadas, reducción que ejerce su efecto en el peso de los organismos y en el inicio de la pubertad.

Este estudio confirma que la presencia de células germinales primordiales en los cordones epiteliales es una condición necesaria para la diferenciación estructural de las células somáticas a células sintetizadoras de esteroides. La presencia de células con características esteroideogénicas indica que las células germinales que fueron capaces de sobrevivir al tratamiento con Busulfán son capaces de organizar folículos y de inducir la diferenciación de células esteroideogénicas. En aquellos ovarios en los que no sobrevivieron células germinales se observó la ausencia de células con características esteroideogénicas lo cual quedó claramente de manifiesto en la reducción significativa de las concentraciones hormonales.

IX.- CONCLUSIONES

- 1.- El Busulfán, administrado a ratas Wistar, a una dosis de 10 mg/kg de peso el día 14 de la gestación no produce una destrucción masiva de la línea germinal.
- 2.- Las células germinales sobrevivientes son capaces de organizar folículos primordiales y por lo tanto de inducir la diferenciación de células somáticas a células esteroideogénicas.
- 3.- El tejido esteroideogénico diferenciado en los ovarios de las crías de ratas tratadas, aunque en menor cantidad, presenta una ultraestructura que indica que es capaz de llevar a cabo la síntesis de hormonas esteroides.
- 4.- Como consecuencia de una disminución en la cantidad de tejido esteroideogénico diferenciado las concentraciones de hormonas esteroides ováricas, pregnenolona, progesterona, androstendiona, testosterona y estradiol se reducen en forma estadísticamente significativa a todas las edades. La estrona se reduce en forma significativa a 1 y 3 meses pero a los 2 meses la reducción es solo del 6.9%.
- 5.- Como consecuencia de la reducción en las concentraciones de estas hormonas se presenta una reducción significativa del peso corporal de las crías de ratas tratadas a 1, 2 y 3 meses de edad así como un retraso en el inicio de la pubertad.
- 6.- La reducción en la concentración de las hormonas esteroides es el resultado del menor número de folículos que se diferencian y que por lo tanto inducen la diferenciación de menor cantidad de tejido esteroideogénico intersticial y como consecuencia provoca el trastorno del desarrollo postnatal normal del ovario.

X.- BIBLIOGRAFÍA

- 1.- Short, R.V. The discovery of the ovaries. En: *The Ovary*. Vol. I Zuckerman, L. and Weir, B.J. eds. Academic Press. New York. 1977; 1-39
- 2.- Wassarman, P.M. Albertini, D.F. The mammalian ovum. En: *The physiology of reproduction*. 2nd Ed. Knobil, E. and Neill, J.D.eds. Raven Press. New York. 1994; 79-122
- 3.- Byskov, A.G. Hoyer, P.E. Embryology of mammalian gonads and ducts. En: *The physiology of reproduction*. 2nd De. Knobil, E. and Neill, J.d: eds. Raven Press. New York. 1994;
- 4.- Zuckerman, S. Baker, T.G. The developmente of the ovary and the process of oo genesis. En: *The Ovary Vol.I* Academic Press. New York. 1977; 42-67
- 5.- De Felici, M. Dolci, S. Pesce, M. Cellular and molecular aspects of mouse primordial germ cell migration and proliferation in culture. *Int.J. Dev. Biol.* 1992; 36:205-213
- 6.- Witschi, E. Migration of the germ cells of human embryos from the yolksac to the primitive gonadal fold. *Contrib. Embryol.* 1948; 32:67-80
- 7.- Gardener, R.L., Rossant, J. Investigation of the fate of 4.5 day postcoitum mouse inner cell mass cells by blastocyst injection. *J. Embryol. Exp. Morphol.* 1979; 52: 141-152
- 8.- Hahnel, A.C. Eddy E.M. Cell surface markers of mouse primordial germ cells defined by two monoclonal antibodies. *Gamete Res.* 1986; 15:25-34
- 9.- Snow, M.H.L. Monk, M. Emergence and migration of mouse primordial germ cells En: *Current problems in germ cell diferentiation*. Mc Laren, A. Wylie, C.C. eds. Cambridge University Press. 1983; 115-135
- 10.- McMahon, A. et al. Random X-chromosome inactivation in females primordial germ cells in the mouse. *J. Embryol. Exp. Morphol.* 1981; 64:251-258
- 11.- Soriano, P., Jaenisch, R. Retroviruses as probes for mammalian development: allocation el cells to the somatic and germ cell lineages. *Cell* 1986; 46:19-29
- 12.- Zamboni, L. Merchant, H. The fine morphology of mouse primordial germ cells in extragonadal locations. *Am. J. Anat.* 1973; 137:299-335

- 13.- Alvarez-Buylla, A. Merchant-Larios, H. Mouse primordial germ cell use fibronectin as a substrate for migration. *Exp. Cell. Res.* 1986; 165:362-368
- 14.- Ffrench-Constant, C. et al. Response to fibronectin of mouse primordial germ cells before during and after migration. *Development* 1991; 113:1365-1373
- 15.- Fazel, A.R. et al. Presence of a unique glycoconjugate on the surface of rat primordial germ cells during migration. *Cell. Differ.* 1987; 21:199-211
- 16.- Fazel, A.R. Spicer, S.S. Glycoconjugate unique to migrating germ cells differs with genera. *Anat. rec.* 1990; 228:177-184
- 17.- Rogulska, R. et al. Behaviour of mouse primodial germ cells in the chick embryo. *J. Embryol. Exp. Morphol.* 1971; 25:155-164
- 18.- Greenwald, G.S. Roy, S.K. Follicular development and its control. En: *The physiology of reproduction*. Knobil, E. Neill, J.D. eds. Raven Press, New York. 1994 629-723
- 19.- Cattanach, B.M: Beechey, C.V. Autosomal and X-chromosome imprinting. *Development* 1990; (Suppl):63-72
- 20.- Monk, M. Grant, M. Preferential X-chromosome inactivation, DNA methylation and imprinting. *Development* 1990; (Suppl):55-62
- 21.- Migeon, B.R., Jelalian, K. Evidence for two active X chromosomes in germ cells of female before meiotic entry. *Nature* 1977; 269:242-243
- 22.- Gartner, S.M: et al Ontogeny of X-chromosome inactivation in the female germ line. *Exp. Cell. Res.* 1975; 91:454-457
- 23.- Gartner, S.M. et al. Cytological evidence for an inactive X chromosome in murine oogonia. *Cytogenet. Cell. Genet.* 1980; 28:203-207
- 24.- Andina, R.J: A study of X chromosome regulation during oogenesis in the mouse. *Exp. Cell. Res.* 1978; 111:211-218
- 25.- Monk, M. Methylation and the X chromosome. *Bioessays* 1986; 4:204-208
- 26.- Grant, M et al. Methylation of CpG sites of two X-linked genes coincides with X-inactivation in the female mouse embryo but not in the germ line. *Nature* 1992; 2:161-166

- 27.- Byskov, A.G. Does the rete ovarii act as a trigger for the onset of meiosis? *Nature* 1974; 252:396-397
- 28.- Witshi, E. Embryogenesis of the adrenal and reproductive glands. *Recent Prog. Horm. Res.* 1951; 6:1-23
- 29.- Pelliniemi, L.J. Ultrastructure of gonadal ridge in male and female pig embryos. *Anat. Embryol.* 1975; 147:19-34
- 30.- Wartenberg, H. Development of the early human ovary and role of the mesonefros in the differentiation of the cortex. *Anat. Embryol.* 1982; 165:253-280
- 31.- Wartenberg, H. The influence of the mesonefric blastema on gonadal development and sexual differentiation. En: *Development and function of reproductive organs.* Byskov, A.G. and Peters, H. eds. Amsterdam. Excerpta Medica 1981; 3-12
- 32.- Byskov, A.G. The role of the *rete ovarii* in the meiosis and follicle formation in the cat, mink and ferret. *J. Reprod. Fertil.* 1975; 45:210-219
- 33.- Burns, P.K. Role of hormones in the differentiation of sex. En: *Sex and internal secretions.* Young, W.C. ed. Williams & Wilkins. Baltimore. 1961;76-160
- 34.- Vigier, B. et al. Production of anti-müllerian hormone: another homology between Sertoli and granulosa cells. *Endocrinology* 1984; 114:1315-1320
- 35.- Takahashi, M. The ontogeny of müllerian inhibiting substance in granulosa cells of the bovine ovarian follicle. *Biol. Reprod.* 1986; 35:447-453
- 36.- Moller, C.J. et al. NCAM in developing mouse gonads and ducts. *Anat. Embryol.* 1991; 184:541-548
- 37.- Byskov, A.G. The anatomy and ultrastructure of the rete system in the fetal mouse ovary. *Biol. Reprod.* 1978; 19:720-735
- 38.- Crisp, T.M. Organization of the ovarian follicle and events in its biology: oogenesis ovulation or atresia. *Mutation Res.* 1992; 296:89-106
- 39.- Poloni, P.E. Pairing of X and Y chromosomes, non inactivation of X-linked genes and the maleness factor. *Hum. Genet.* 1982; 60:207-211
- 40.- ----- Genetic basis for the determination of sex. *Philos. Trans. R. Soc. London (Biol.)* 1970; 259:3-13

- 41.- Eicher, E.M. Washburn, L.L. Genetic control of primary sex determination in mice. *Annu. Rev. Genet.* 1986; 20:327-360
- 42.- McLaren, A. Sex determination in mammals. *Trends. Genet.* 1988; 4:153-157
- 43.- Wachtel, S.S. Koo, G.C. H-Y antigen in gonadal differentiation. En: *Mechanism of sex differentiation in animals and man.* Austin, C.R. Edwards, R.G. eds. Academic Press, London. 1981; 225-229
- 44.- Simpson, E. et al. Separation of the genetic loci for the H-Y antigen and for the testis determination of human Y chromosome. *Nature* 1987; 326:876-878
- 45.- Bogan, J.S. Page, D.C. Ovary? Testis? A mammalian dilemma. *Cell* 1994; 76:603-607
- 46.- Zwingman, T. et al. Transcription of the sex-determining region genes *Sry* and *Zfy* in the mouse preimplantation embryo. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 1993; 90:814-817
- 47.- Eicher, E.M. Autosomal genes involved in mammalian primary sex determination. *Philos. Trans. R. Soc. London. B.* 1988; 322:109-118
- 48.- Burgoyne, P.S. Role of mammalian Y chromosome in sex determination. *Philos. Trans. R. Soc. London. B.* 1988; 322:63-72
- 49.- George, F.W. Wilson, J.D. Sex determination and differentiation. En: *The physiology of reproduction.* Knobil, E. and Neill, J.D. ed. Raven Press. New York. 1994; 3-28
- 50.- Merchant, H. Rat gonadal and ovarian organogenesis with and without germ cells. *Dev. Biol.* 1975; 44:1-21
- 51.- McCarrey, J.R. Chick gonadal differentiation following excision of primordial germ cells. *Dev. Biol.* 1978; 66:256-265
- 52.- Merchant-Larios, H. Ovarian Differentiation. En: *The vertebrate ovary.* Jones, R.E. de. Plenum Publishing Corp. 1978; 47-81
- 53.- Byskov, A.G. Regulation of meiosis in mammals. *Biol. Anim. Biochim. Biophys.* 1979; 19:1251-1261
- 54.- Baker, T. Oogenesis and ovarian development. En: *Reproductive Biology.*

- Balin H. Glassers eds. Amsterdam. Excerpta Medica 1972; 398-437
- 55.- Franchi, L. et al. The development of the ovary and the process of oogenesis. En: The ovary. Vol. I Zuckerman, S. de. Academic Press. New York. 1962:1-88
 - 56.- La Marca, M. Wassarman, P. Program of early development in the mammal: Changes in absolute rates of synthesis of ribosomal proteins during oogenesis and early embryogenesis in the mouse. Dev. Biol. 1979; 73:103-119
 - 57.- La Marca, M Wassarman, P. Relationship between rates of synthesis and intracellular distribution of ribosomal proteins during oogenesis in the mouse. Dev. Biol. 1984; 102:525-530
 - 58.- Larsen W. et al. A dramatic loss of cumulus cell gap junctions is correlated with germinal vesicle breakdown in rat oocytes. Dev. Biol 1986; 113:517-521
 - 59.- Lawrence, T. et al. Transmission of hormonal stimulation by cell-to-cell communication. Nature 1978; 272:501-506
 - 60.- Gilula, N. et al. Cell to cell communication and ovulation. J. Cell. Biol. 1978; 78: 58-75
 - 61.- Byskov, A.G. et al. Role of second messengers in early differentiation of gonads sex ducts. En: Growth factors and the ovary. Hirshfield, AN de. Plenum Press New York 1989:23-32
 - 62.- Hirshfield, A.N. Development of follicles in the mammalian ovary. Int. Rev. Citol. 1990; 124:43-101
 - 63.- Bakken, A. Mc Clanahan, M. Patterns of RNA synthesis in early meiotic prophase oocytes from fetal mouse ovaries. Chromosoma 1978; 67:21-40
 - 64.- Krarup, T et al. Regulation of oocytes growth in the mouse ovary. Nature 1969; 224:187-188
 - 65.- Pedersen, T. Follicle growth in the immature mouse ovary. Acta Endocrinol. (Kbh) 1969; 62:117-132
 - 66.- Anderson, E. et al. Correlative microscopical analysis of differentiating ovarian follicles of mammals. J. Morphol. 1978; 156:339-366
 - 67.- Blandau, R. Growth of the ovarian follicles and ovulation. Prog. Gynecol. 1970; 5:58-76

- 68.- Mattson, B. A. Albertini, D.F. Oogenesis: Chromatin and microtubule dynamics during meiotic prophase. *Mol. Reprod. Dev.* 1990; 25:374-383
- 69.- Chouinard, L. A light and electron-microscope study of the oocyte nucleus during development of the antral follicle in the prepuberal mouse. *J. Cell Sci.* 1975; 17: 589-615
- 70.- Oakberg, E. Relationship between stage of follicular development and RNA synthesis in the mouse oocyte. *Mutat. Res.* 1968; 6:155-165
- 71.- Stern, S. et al. Mitochondria and early development of the mouse. *J. Exp. Zool.* 1971; 176:179-192
- 72.- Wassarman, P. Josefowicz, W. Oocyte development in the mouse: An ultrastructural comparison of oocytes isolated at various stages of growth and meiotic competence. *J. Morphol.* 1978; 156:209-235
- 73.- Gulyas, B. Cortical granules of mammalian eggs. *Int. Rev. Cytol.* 1980; 63:357-392
- 74.- Wassarman, P. Mortillo, S. Structure of the mouse egg extracellular coat. *Int. Rev. Cytol.* 1991; 130:85-110
- 75.- Bachvarova, R. Moy, K. Autoradiographic studies on the distribution of labeled maternal RNA in early mouse embryos. *J. Exp. Zool.* 1985; 285:67-76
- 76.- Fourcroy, J. RNA synthesis in immature mouse oocyte development. *J. Exp. Zool.* 1982; 219:257-266
- 77.- Cascio, S. Wassarman, P. Program of early development in the mammal: Synthesis of mitochondrial proteins during oogenesis and early embryogenesis in the mouse. *Dev. Biol.* 1981; 83:166-172
- 78.- Florman, H. Wassarman, P. O-linked oligosaccharides of mouse egg ZP3 account for its sperm receptor activity. *Cell.* 1985; 41:313-324
- 79.- Schultz, R. et al. Program of early development in the mammal: Changes in the patterns and absolute rates of tubulin and total protein synthesis during oocyte growth in the mouse. *Dev. Biol.* 1979; 73:120-133
- 80.- Byskov, A.G. The anatomy and ultrastructure of the rete system in the fetal mouse ovary. *Biol. Reprod.* 1978; 19:720-735

- 81.- Sorensen, R. Wassarman, P. Relationship between growth and meiotic maturation of the mouse oocyte. *Dev. Biol.* 1976; 50:531-536
- 82.- Canipari, R. et al. Early programming and maturation competence in mouse oogenesis. *Dev. Biol.* 1984; 102:519-524
- 83.- Sorensen, R. et al. Active maturation-promoting factor is present in mature mouse oocytes. *J. Cell. Biol.* 1985; 100:1637-1640
- 84.- Wickramasinghe, D. et al. Meiotic competence acquisition is associated with the appearance of M-phase characteristics in growing mouse oocytes. *Dev. Biol.* 1991 143:162-172
- 85.- Szollosi, D. et al. The nuclear envelope: Its breakdown and fate in mammalian oögonia and oocytes. *Anat. Rec.* 1972; 174:325-340
- 86.- Ducibella, T. et al. Quantitative changes in cortical granule number and distribution in the mouse oocyte during meiotic maturation. *Dev. Biol.* 1988; 130:184-197
- 87.- Ducibella, T. et al. Precocious loss of cortical granules during mouse oocyte meiotic maturation and correlation with egg-induced modification of zona pellucida. *Dev. Biol.* 1990; 137:46-55
- 88.- Calarco, P. et al. Germinal vesicle break down in the mouse oocyte. *J. Cell. Sci.* 1972; 10:369-385
- 89.- Messinger, S.M. Albertini, D.F. Centrosome and microtubule dynamics during meiotic progression in the mouse oocyte. *J. Cell. Sci.* 1991; 100:289-298
- 90.- Zamboni, L. Ultrastructure of mammalian oocyte and ova. *Biol. Reprod. (Suppl)* 1970; 2:44-63
- 91.- Tsafiri, A. Oocyte maturation in mammals. En: *The vertebrate ovary.* Jones, R. ed. Plenum Press. New York, 1978; 409-442
- 92.- McGaughey, R.W. et al. Ultrastructural correlates of meiotic maturation in mammalian oocytes. *J. Electron Microsc. Tech.* 1990; 16:257-280
- 93.- Lieberman, M.E. Oöcytic meiosis in cultured rat follicles during inhibition of steroidogenesis. *Acta Endocrinol.* 83:151-157
- 94.- Byskov, A.G. Regulation of initiation of meiosis in fetal gonads. *J. Androl. (Suppl)* 1978; 2:29-39

- 95.- Schultz, R. et al. Regulation of mouse oocyte meiotic maturation: Implication of a decrease in oocyte cAMP and protein dephosphorylation in commitment to resume meiosis. *Dev. Biol.* 1983; 97:264-273
- 96.- Murray, A. Kirschner, M. What controls the cell cycle? *Sci. Am.* 1991; 264(3): 56-63
- 97.- Eppig, J. et al. Inhibition of oocyte maturation in the mouse: Participation of cAMP steroid hormones, and a putative maturation-inhibitory factor. *Dev. Biol.* 1983; 100 39-49
- 98.- Borrislaeger, E. et al. Regulation of mouse oocyte maturation: Involvement of cyclic AMP phosphodiesterase and calmoduline. *Dev. Biol.* 1984; 105:488-499
- 99.- Dekel, N. et al. Modulation of cell-to-cell communication in the cumulus-oocyte complex and the regulation of oocyte maturation by LH. *Dev. Biol.* 1981; 80:356-362
- 100.- Tsafirri, A. et al. The role of oocyte maturation inhibitor in follicular regulation of oocyte maturation. *J. Reprod. Fertil.* 1982; 64:541-551
- 101.- La Marca, M. Wassarman, P. Relationship between rates of synthesis and intracellular distribution of ribosomal proteins during oogenesis in the mouse. *Dev. Biol.* 1984; 102:525-530
- 102.- Larsen, W. et al. A dramatic loss of cumulus cell gap junctions is correlated with germinal vesicle breakdown in rat oocytes. *Dev. Biol.* 1986; 113:517-521
- 103.- Gore-Langton, R. Armstrong, D.T. Follicular steroidogenesis and its control. En: *The physiology of reproduction* 2nd. ed. Knobil, E. and Neill, J.D. eds. Raven Press. New York. 1994; 571-627
- 104.- Byskov, A.G. et al. Influence of ovarian surface epithelium and rete ovarii on follicle formation. *J. Anat.* 123:77-86
- 105.- Merchant-Larios, H. Chimal-Monroy, J. The ontogeny of primordial follicles in the mouse ovary. *Dev. Ultr. Reprod.* 1989; 55-63
- 106.- Ireland, J.J. Control of follicular growth and development. *J. Reprod. Fertil.* 1987;34 (Suppl):39-54
- 107.- Makabe, S. et al. Migration of germ cells, development of the ovary, and folliculo-

- genesis. En: *Ultrastructure of the ovary*. Familiari, G. de. Kluwer Academic Publisher. London. 1991; 1-27
- 108.- Byskov, A.G. et al. Influence of ovarian surface epithelium and rete ovarii on follicle formation. *J. Anat.* 1977; 123:77-86
- 109.- Stein, L.E. Anderson, E.H. A qualitative and quantitative study of rete ovarii development in the fetal rat: correlation with the onset of meiosis and follicle cell appearance. *Anat. Rec.* 1979; 193:197-211
- 110.- Hoyer, P.E. Byskov, A.G. A quantitative cytochemical study of 3β - hydroxysteroid dehydrogenase activity in the rete system of the immature mouse ovary. En: *Development and function of reproductive organs*. Byskov, A.G. and Peters, H. eds. *Excerpta Medica* 1981; 216-224
- 111.- Buccione, P. et al. Interactions between somatic cells and germ cells throughout mammalian oogenesis. *Biol. Reprod.* 1990; 43:543-547
- 112.- Merchant, L. Zamboni, L. Fine morphology of extragonadal germ cells in the mouse. En: *The development and maturation of the ovary and its function*. Peters, H. de. *Excerpta Medica*
- 113.- Edwards, R.G. et al. Normal and abnormal follicular growth in mouse, rat and human ovaries. *J. Reprod. Fertil.* 1977; 51:237-263
- 114.- Takaoka, H. et al. Granulosa-cell growth factor in oocyte and its transport systems. *Acta. Obstet. Gynaecol. Jpn.* 1985; 37:92-98
- 115.- Fortune, J.E. Ovarian follicular growth and development in mammals. *Biol. Reprod* 1994; 50:225-232
- 116.- diZerega, G.S. et al. Identification of protein (s) secreted by the pre-ovulatory ovary which suppresses the follicle response to gonadotropins. *J. Clin. Endocrinol. Metab.* 1982; 54:1091-1096
- 117.- Zeleznik, A.J. Kubik, C.J. Ovarian responses in macaques to pulsatile infusion of follicle-stimulating (FSH) and luteinizing hormone; increased sensitivity of the maturing follicle to FSH. *Endocrinology* 1986; 119:2025-2032
- 118.- Zeleznik, A.J. Dynamics of primate follicular growth. A physiologic perspective. En: *The ovary*. Adashi, E. Y. Leung, P.C.K. eds. Raven Press. New York. 1993; 41-55

- 119.- Richards, J.S. et al. Ovarian follicular development: from physiology to molecular biology. *Rec. Prog. Horm. Res.* 1987; 43:231-276
- 120.- Deanesley, R. Origins and development of interstitial tissue in ovaries in rabbit and guinea pig. *J. Anat.* 1972; 113:251-260
- 121.- Longscope, C. et al. Steroid secretion by the postmenopausal ovary. *Am. J. Obstet. Gynecol.* 1980; 564-568
- 122.- Richards, J.S. Bogovich, K. Effects of human chorionic gonadotropin and progesterone on follicular development in the immature rat. *Endocrinology* 1982; 111:1429-1439
- 123.- Richards, J.S. et al. Differentiation of Rat Ovarian Thecal Cells: Evidence for Functional Luteinization. *Endocrinology* 1986; 118:1660-1668
- 124.- Magoffin, D.A. Erickson, G.F. Primary culture of differentiating ovarian androgen-producing cells in defined medium. *J. Biol. Chem.* 1982; 257:4507-4513
- 125.- Uilenbroek, J.T.J. van der Linden, R. Changes in gonadotrophin binding to rat ovaries during sexual maturation. *Acta Endocrinol. (Copenh)* 1983; 104:413-419
- 126.- Dennefors, B.L. et al. Steroid production and responsiveness to gonadotrophin in - isolated stromal tissue of human menopausal ovaries. *Am. J. Obstet. Gynecol.* 1980 136:997-1002
- 127.- Erickson, G.F. et al. The ovarian androgen producing cells: a review of structure/function relationships. *Endocr. Rev.* 1985; 6:371-399
- 128.- Johnson, D.C. Hoversland, R.C. Oestradiol synthesis by granulosa cells from immature rats treated with pregnant mare's serum gonadotrophin. *Acta Endocrinol. (Copenh)* 1983; 104:74-79
- 129.- Nimrod, A. et al. A specific FSH receptor in rat granulosa cells: properties of binding in vitro. *Endocrinology* 1976; 98:56-64
- 130.- Fortune, J.E. Armstrong, D.T. Hormonal control of 17β estradiol biosynthesis in proestrous rat follicles: estradiol production by isolated theca versus granulosa cells. *Endocrinology* 1978; 102:227-235
- 131.- Magoffin, D.A. Erickson, G.F. Primary culture of differentiating ovarian androgen-producing cells in defined medium. *J. Biol. Chem.* 1982; 257:4507-4513

- 132.- Quattnopani, S.L. Weisz, J. Conversion of progesterone to estrone and estradiol in vitro by the ovary of the infantile rat in relation to the development of its interstitial tissue. *Endocrinology* 1973; 53:1269-1276
- 133.- Peluso, J.J. et al. Development of gonadotropin-binding sites in the immature rat ovary. *J. Reprod. Fertil.* 1976; 47:55-58
- 134.- Goldring, N.B. Orly, J. Concerted metabolism of steroid hormones produced by cocultured ovarian cell types. *J. Biol. Chem.* 1985; 260:913-920
- 135.- Richards, J.S. Maturation of ovarian follicles: actions and interactions of pituitary and ovarian hormones on follicular cell differentiation. *Physiol. Rev.* 1980; 60:51-89
- 136.- Bjersing, L. Ovarian histochemistry. En: *The ovary Vol.I* Zuckerman, S. and Wier, B.J. eds. Academic Press. New York. 1977; 303-391
- 137.- Sheela Rani, C.S. Follicle-stimulating hormone induction of luteinizing hormone receptor in cultured rat granulosa cells: an examination of the need for steroids in the induction process. *Endocrinology* 1981; 108:1379-1385
- 138.- Bogovich, K. et al. Obligatory role of LH in the initiation of preovulatory follicular growth in the pregnant rat: specific effects of human chorionic gonadotropin and -follicle stimulating hormone on LH receptors and steroidogenesis in theca, granulosa and luteal cells. *Endocrinology* 1981; 109:860-867
- 139.- Peluso, J.J. et al. Follicle-stimulating hormone and insulin regulation of 17β -estradiol and granulosa cell proliferation within immature rat ovaries maintained in perfusion culture. *Endocrinology* 1991; 128:191-196
- 140.- Gosden, R.G. Telfer, E. Numbers of follicles and oocytes in mammalian ovaries and their allometric relationship. *J. Zool. (Lond)* 1987; 211:169-175
- 141.- Leung, P.C.K. Armstrong, D.T. Further evidence in support of a short-loop feedback action of estrogen on ovarian androgen production. *Life Sci.* 1980; 27:415-420
- 142.- Lau, I.F. et al. Prostaglandin F and ovulation in mice. *J. Reprod. Fertil.* 1974; 40:467-469
- 143.- LeMairie, W.J. Mechanism of mammalian ovulation. *Sterooids.* 1989; 54:455-469
- 144.- Beers, W.H. et al. Ovarian plasminogen activator: relationship to ovulation and hormonal regulation. *Cell.* 1975; 6:387-394

- 145.- Eppig, J. FSH stimulates hyaluronic acid synthesis by oocyte-cumulus cell complexes from mouse preovulatory follicles. *Nature* 1979; 281:483-484
- 146.- Wallach, E.E. Investigation of mammalian ovulation with an in vitro perfused rabbit ovary preparation. *Am. J. Obstet. Gynecol.* 1978; 132:728-738
- 147.- Byskov, A.G.S. Cell kinetic studies of follicular atresia in the mouse ovary. *J. Reprod. Fertil.* 1974; 37:277-285
- 148.- Parfenof, V.G. et al. Human antral follicles: oocyte nucleus and the karyosphere formation (electron microscopic and autoradiographic data) *Gamete Res.* 1989; 22:210-231
- 149.- Dhanasekaran, N. Mougdal, N.R. Biochemical and histological validation of a model to study follicular atresia in rats. *Endocrinol. Exp.* 1989; 23:155-166
- 150.- Adashi, E.Y. The potential relevance of cytokines to ovarian physiology: the emerging role of resident ovarian cells of the white blood cell series. *Endocrinol. Rev.* 1990; 11:454-464
- 151.- Bortolussi, M.R. et al. Changes in the organization of the extracellular matrix in ovarian follicles during the preovulatory phase and atresia. An immunofluorescence study. *Basic Appl. Histochem.* 1989; 53:31-38
- 152.- Mukhopadhyay, A.K. et al. The relationship between Prorenin levels in follicular fluid and follicular atresia in bovine ovaries. *Endocrinology* 1991; 129:2367-2375
- 153.- Hughes, Jr. C.M. Gorospe, W.C. Biochemical identification of apoptosis (programmed cell death) in granulosa cells: evidence for a potential mechanism underlying follicular atresia. *Endocrinology* 1991; 129:2415-2422
- 154.- Schwall, R. Erickson, G.F. Functional and morphological changes in rat theca cells during atresia. En: *Dynamics of ovarian function.* Schwartz, N.B. and Hunzicker-Dunn, M. eds. Raven Press. New York. 1981; 29-34
- 155.- Hsueh A.J., Jones P.B. et al. Intraovarian mechanisms in the hormonal control of granulosa cells differentiation in rats. *J Reprod Fertil* 1983; 69: 325-342.
- 156.- Hsueh, A.J., Liw Y, Cajanders S, et al. Gonadotropin-Releasing Hormone induces Ovulation in Hypophysectomized Rats: Studies on Ovarian Tissue-Type plasminogen Activator Activity. Messenger Ribonucleic Acid content and Cellular Localization. *Endocrinology* 1988; 122:1486-1495

- 157.- Keyes, P.L. Wiltbank, M.C. Endocrine regulation of the corpus luteum. *Ann. Rev. Physiol.* 1988; 50:465-482
- 158.- Savard, K. The biochemistry of the corpus luteum. *Biol. Reprod.* 1973; 8:183-202
- 159.- Keyes, P.L. et al. The corpus luteum. *Int. Rev. Physiol.* 1983; 27:57-97
- 160.- Rothchild, Y. The regulation of the mammalian corpus luteum. *Recent. Prog. Horm. Res.* 1981; 37:183-298
- 161.- Menon, M. Lipoprotein augmentation of human chorionic gonadotropin and prolactin stimulated progesterone synthesis by rat luteal cells. *J. Steroid. Biochem.* 1985;22:79-84
- 162.- Keyes, P.L. et al. The roles of prolactin and testosterone in the development and function of granulosa lutein tissue in the rat. *Biol. Reprod* 1987; 37:699-707
- 163.- Perkins, S.N. et al. Properties of β -adrenergic receptors on porcine corpora lutea and granulosa cells. *Endocrinology* 1986; 118:998-1005
- 164.- Unsicker, K. Qualitative and quantitative studies on the innervation of the corpus luteum of rat and pig. *Cell. Tissue Res.* 1974; 152:513-524
- 165.- Azmi, T.I. O'Shea, J.D. Mechanism of deletion of endothelial cells during regression of the corpus luteum. *Lab. Invest.* 1984; 51:206-217
- 166.- Hansel, W. Dowd, J.P. New concepts of the control of corpus luteum function. *J. Reprod. Fertil.* 1986; 78:755-768
- 167.- Strauss III, J.F. et al. Cholesterol metabolism by ovarian tissue. *Adv. Lipid Res.* 1986; 78:655-663
- 168.- Gwynne, J.T. Strauss III, J.F. The role of lipoproteins in steroidogenesis and cholesterol metabolism in steroidogenic glands. *Endocr. Rev.* 1982; 3:299-329
- 169.- Lieberman, S. et al. A heuristic proposal for understanding steroidogenic processes. *Endocr. Rev.* 1984; 5:128-148
- 170.- Magoffin, D.A. Erickson, G.F. Direct inhibitory effects of estrogen on LH-stimulated androgen synthesis by ovarian cells cultured in defined medium. *Mol. Cell. Endocrinol.* 1982; 28:81-89
- 171.- Adashi, E.Y. Hsueh, A.J.W. Estrogens augment the stimulation of ovarian aromatase activity by follicle-stimulating hormone in cultured rat granulosa cells. *J. Biol.*

Chem. 1982; 257:6077-6083

- 172.- Carson, R.S. et al. Estradiol, testosterone and androstenedione in ovine follicular fluid during growth and atresia of ovarian follicles. *Biol. Reprod.* 1981; 24:105-113
- 173.- Welsh, Jr. J.H. et al. Androgen regulation of progesterin biosynthetic enzymes in FSH treated rat granulosa cells in vitro. *Steroids.* 1982; 40:691-700
- 174.- Moon, Y.S. et al. Alterations of 20 α hydroxysteroid dehydrogenase activity in cultured rat granulosa cells by follicle-stimulating hormone and testosterone. *Biol. Reprod.* 1985; 32:998-1009
- 175.- Nimrod, A. On the synergistic action of androgen and FSH on progesterin secretion by cultured rat granulosa cells. Cellular and mitochondrial cholesterol metabolism. *Mol. Cell. Endocrinol.* 1981; 21:51-62
- 176.- Daniel, S.A.J. Armstrong, D.T. Site of action of androgens on follicle-stimulating hormone-induced aromatase activity in cultured rat granulosa cells. *Endocrinology* 1984; 114:1975-1982
- 177.- Hsueh, A.J.W. et al. Hormonal regulation of differentiation of cultured ovarian granulosa cells. *Endocr. Rev.* 1984; 5:76-127
- 178.- Insler, V. et al. Role of midcycle FSH surge in follicular development. *Gynecol. Obstet. Invest.* 1990; 30:228-233
- 179.- Meunier, H. et al. Rapid changes in the expression of inhibin α , β A- and β B-sub units in ovarian cell types during rat estrous cycle. *Mol. Endocrinol.* 1988; 2:1352-1363
- 180.- Peluso, J.J. England-Charlesworth, C. Development of pre-ovulatory follicles and oocytes during oestrous cycle of mature and aged rats. *Acta Endocrinol.* 1982; 100: 434-443
- 181.- Camp, T.A. et al. Cellular localization and hormonal regulation of follicle-stimulating hormone and luteinizing hormone receptor messenger RNAs in the rat ovary. *Mol. Endocrinol.* 1991; 5:1405-1417
- 182.- Skinner, M.K. Ovarian thecal/interstitial cells produce an epidermal growth factor-like substance. *Endocrinology* 1987; 121:1892-1899
- 183.- Bendell, J.J. Dorrington, J.H. Epidermal growth factor influences growth and differentiation of rat granulosa cells. *Endocrinology* 1990; 127:533-540

- 184.- Hsueh, A.J.W. et al. Inhibition of ovarian and testicular steroidogenesis by epidermal growth factor. *Endocrinology* 1981; 108:2002-2004
- 185.- Chabot, J.G. et al. Distribution of epidermal growth factor receptors in the rat ovary. *Mol. Cell. Endocrinol.* 1986; 44:99-108
- 186.- Anderson, Y. et al. Localization of IGF-I in adult rats: immunohistochemical studies. *Acta Physiol. Scand.* 1986; 126:311-312
- 187.- Hernández, E.R. Rat ovarian insulin-like growth factor II gene expression is theca interstitial cell-exclusive: hormonal regulation and receptor distribution. *Endocrinology* 1990; 127:3249-3251
- 188.- Baird, A. et al. Molecular characterization of fibroblast growth factor: distribution and biological activities in various tissues. *Recent. Prog. Horm. Res.* 1986; 42: 143-205
- 189.- LaPol, P.S. et al. Basic fibroblast growth factor induction of granulosa cell tissue-type plasminogen activator expression and oocyte maturation: potential role as a paracrine ovarian hormone. *Endocrinology* 1990; 127:2804-2811
- 190.- Hernández, E.R. et al. Transforming growth factor- β 1 inhibits ovarian androgen production: gene expression, cellular localization, mechanism (s) and site (s) of action. *Endocrinology* 1990; 127:2804-2811
- 191.- Dorrington, J.H. et al. Transforming growth factor β and follicle stimulating hormone promote rat granulosa cell proliferation. *Endocrinology* 1988; 123:353-359
- 192.- Hurwitz, A. Cytokine-mediated regulation of ovarian function: interleukin-1 inhibits gonadotrophin-induced androgen synthesis. *Endocrinology* 1991; 129:3427-3429
- 193.- Studzinski, G.P. et al. Participation of c-myc protein in DNA synthesis of human cells. *Science* 1986; 234:467-470
- 194.- Page, R.D. Butcher, R.L. Follicular and plasma patterns of steroids in young and old rats during normal and prolonged estrous cycles. *Biol. Reprod.* 1982; 27:383-392
- 195.- Goodman, R.L. Daniel, K. Modulation of pulsatile luteinizing hormone secretion by ovarian steroids in the rat. *Biol. Reprod.* 1985; 32:217-225
- 196.- Fortune, J.E. Vincent, S.E. Progesterone inhibits the induction of aromatase activity in rat granulosa cells in vitro. *Biol. Reprod.* 1983; 28:1078-1089

- 197.- Haddow, A. Timmis, G.M. Myleran in chronic myeloid leukemia. Chemical constitution and biological action. The Lancet 1953; 1:207-208
- 198.- The Merck Index. Merck and Co. Inc. USA. pp. 229.
- 199.- Bishop, J.B. Wasson, J.S. Toxicological review of busulfan (myleran). Mutat. Res. 1986; 168:15-45
- 200.- Merchant-Larios, H., Coello, J. The effect of busulfan on rat primordial germ cells at the ultrastructural level. Cell. Differ. 1979; 8:145-155
- 201.- Hemsworth, B.N. Jackson, H. Effect of busulfan on the developing gonad of the male rat. J. Reprod. Fertil. 1963; 5:187-194
- 202.- Hemsworth, B.N. Jackson, H. Effect of busulfan on the developing gonad of the the ovary. J. Reprod. Fertil. 1963; 6:629-633
- 203.- Heller, R.H. Jones, H.W. Production of ovarian dysgenesis in the rat and human by busulphan. Curr. Invest. 1964; 89:414-420
- 204.- Forsberg, J.G. Olivecrona, H. The effect of prenatally administred Busulphan on rat gonads. Biol. Neonat. 1966; 10: 180-192
- 205.- Merchant - Larios, H. The role of germ cells in the morphogenesis and cytodifferentiation of the rat ovary. Progr. Differ. Res. 1976; 453-462
- 206.- Kasuga, F. Takahashi, M. The endocrine function of rat gonads with reduced number of germ cells following Busulphan treatment. Endocrinol. Japon. 1986; 33(1):105-115
- 207.- Pelloux, M. et al. Effects of busulfan on ovarian folliculogenesis, steroidogenesis and anti-müllerian activity of rat neonates. Acta Endocrin. 1988; 118: 218-226
- 208.- Hallett, J. et al. The effects of busulfan on gonadal differentiation and development in japanese quail (*Coturnix coturnix japonica*). Poultry Science 1990; 70: 1619-1623
- 209.- Aige-Gil, A. Simkiss, K. Sterilisation of avian embryos with busulphan. Res. Vet. Sci. 1991; 50(2):139-144
- 210.- Vick, L et al. Germ-line chimaeras can produce both strains of fowl with high efficiency after partial sterilization. J. Reprod. Fertil. 1993; 98(2):637-641

- 211.- Hirshfield, A.N. Relationship between the supply of primordial follicles and the onset of follicular growth in rats. *Biol. Reprod.* 1994; 50(2):421-428
- 212.- Bresler, M. et al. Manipulations of germ-cell populations in the gonad of the fowl. *Br. Poult. Sci.* 1994; 35(2):241-247
- 213.- Hirshfield, A.N. Heterogeneity of cell populations that contribute to the formation of primordial follicles in rats. *Biol. Reprod.* 1992; 47:466-472
- 214.- Bryskov, A.G. Origin and differentiation of the endocrine cells of the ovary. *J. Reprod. Fertil.* 1985; 75:299-306
- 215.- Edwards, R.G. et al. Normal and abnormal follicular growth in mouse, rat and human ovaries. *J. Reprod. Fertil.* 1977; 51:237-263
- 216.- Tsafiriri, A. Braw, R.H. Experimental approaches to atresia in mammals. *Oxford Reviews of Reprod. Biol.* 1984; 6:226-265
- 217.- Cran, D.G. Moor, R.M. The development of oocytes and ovarian follicles of mammals. *Sci. Prog.* 1980; 66:371-383
- 218.- Krarup, T. et al. Regulation of oocyte growth in the mouse ovary. *Nature* 1969; 224:187-188
- 219.- Reddoch, R. et al. Lack of ovarian responsiveness to gonadotropic hormones in infant rats sterilized with Busulfan. *Endocrinology* 1986; 119:879-886
- 220.- Mandl, J. Zuckerman, S. The reactivity of the X-irradiated ovary of the rat. *J. Endocrinol.* 1956;13:243
- 221.- Beaumont, M.H. Radiosensitivity of oogonia and oocytes in the fetal rat. *Int. J. Rad. Biol.* 1961; 61: 59-72
- 222.- Pugliatti, V. Allegra, P.S. Determination of gonadal changes in the albino rat by means of cytostatic treatment given during intrauterine life. 3. Morphological and functional postpuberal aspects of the gonads. *Riv. Anat. Pat. Oncol.* 1966; 29:758
- 223.- Sokka, T. Huhtaniemi, Y. Ontogeny of gonadotrophin receptors and gonadotropin-stimulated cyclic AMP production in neonatal rat ovary. *J. Endocrin.* 1990; 127: 297-303

- 224.- Wang, X.N. Greenwald, G. Hypophysectomy of the cyclic mouse II. Effects of follicle-stimulating hormone (FSH) and luteinizing hormone on folliculogenesis, FSH and human chorionic gonadotropin receptors, and steroidogenesis. *Biol. Reprod.* 1993; 48:595-605
- 225.- Ojeda, S.R. Female reproductive function. En: *Textbook of Endocrine Physiology* Griffith, J.E. Ojeda, S.R. eds. Oxford University Press, New York. 1992; 134-168
- 226.- DeGreef, J. Zeilmaker, G.H. Blood progesterone levels in pseudopregnant rats: Effects of partial removal of luteal tissue. *Endocrinology* 1974; 95:565-571
- 227.- Bogovich, K. Richards, J. Androgen biosynthesis in developing ovarian follicles: evidence that luteinizing hormone regulates thecal 17α -hydroxylase and C17-20-lyase activities. *Endocrinology* 1982; 111:1201-1208
- 228.- Hedin, L. et al. Changes in content of cytochrome P450 17α , cytochrome P450c, and 3-hydroxy-3-methylglutaryl CoA reductase in developing rat ovarian follicles and corpora lutea: Correlation with theca cell steroidogenesis. *Biol. Reprod.* 1987; 37:211-223

XI.- ANEXO

Radioinmunoensayo

La determinación cuantitativa de los andrógenos consta de varias etapas: preparación, trazadores, extracción, separación y radioinmunoanálisis

1. Preparación.- incluye procedimientos previos al manejo de los esteroides. El primer paso es hacer un protocolo en el que se describe el seguimiento de los pasos involucrados. Se hace una lista en numeración corrida que corresponden a la clave o identificación de la muestra. Se forman lotes de 8, las que llevarán los números que tengan como último dígito del 2 al 9 dejando los dígitos terminales 1 y 0 para los llamados blancos de método (tubos en los que no habrá esteroides, por lo que al final deberán tener una concentración de 0) En el caso de controles de calidad se agregarán por quintuplicado 5 tubos a los que se les agregarán cantidades conocidas de esteroides (25 y 250 pg), mismos que deberán ser recuperados al final del procedimiento.

2. Trazadores.- en tubos de centrifuga con tapón (de vidrio, fondo cónico, 15 ml. de capacidad) se colocan 100 microlitros de soluciones etanólicas de cada uno de los esteroides a determinar que contienen aproximadamente mil cuentas por minuto (cpm) asimismo se colocan en viales por separado, idénticas alícuotas, éstas últimas servirán como controles de referencia en la evaluación de pérdida de material durante los procedimientos siguientes. Después de la colocación de los trazadores se agrega la muestra, 1 ml de suero de rata y se agita 5 seg. para asegurar la incorporación de los trazadores al resto de los componentes del suero (la presencia de 30 microlitros de etanol no modifica en forma notable la solubilidad de los componentes normales del suero; en todo caso, dada la miscibilidad del etanol con el agua, la estabilidad de los componentes poco solubles-lípidos sería incrementada)

3. Extracción.- no obstante la naturaleza lipídica de los esteroides, éstos se encuentran disueltos en el suero, tanto por la capacidad propia del poder de disolución de los esteroides y el agua, como por la presencia y efectos del resto de los componentes serios. Ya que los esteroides están disueltos en el suero sanguíneo, se requiere extraerlos. Al tubo de extracción ya preparado se le agregan 5 ml. de éter dietílico (disolvente orgánico de polaridad adecuada para la extracción de los esteroides e inmiscibles en agua) se pone el tapón de vidrio y se agitan en un agitador por vibración, procurando que el remolino llegue hasta el tapón, ya que la fluidez del éter le permite salir entre las paredes del tapón y del tubo, la posible fuga del éter se ve favorecida por el incremento en la presión interna debida a la rápida evaporación del disolvente orgánico. La agitación se debe realizar

durante 1 minuto y debe permitir la formación de pequeñas gotas de éter en el suero y de suero en el éter; después de agitados los tubos deberán permanecer en reposo para que se separen las dos fases y que la separación entre ellas sea clara (la fase acuosa más densa queda bajo la fase orgánica). La fase acuosa se congela colocando los tubos en un baño de acetona con hielo seco, las propiedades de las fases permiten que la fase acuosa se congele en un solo cuerpo sólido mientras que en la fase orgánica sólo se forman pequeños núcleos de cristalización, cuando las fases se han separado completamente pueden quedar pequeños fragmentos de agua congelada, suspendida en el éter líquido. La fase orgánica se decantada a tubos de centrífuga (de vidrio, de fondo cónico, de 15 ml. de capacidad), ya que la mayor parte del éter permanece líquido y que los pocos cristales de éter sólido formados se funden rápidamente a la temperatura ambiente, 18-22°C, se recupera casi la totalidad del disolvente de extracción, quedando remanentes en los tubos entre 100 y 200 microlitros (2-4%); no se debe permitir que se pierda más del 10% , 0.5 mililitros. La fase orgánica se evapora hasta la sequedad en horno a 30°C y presión reducida de 0.1 atm ya que el proceso de evaporación en particular del éter etílico enfría los tubos, se debe evitar que se condense el agua en el interior de los tubos, por efecto de la temperatura y de reducir la presión, el éter empieza a ebullición; se deberán tomar medidas pertinentes a fin de evitar la contaminación de las muestras entre sí y de la pérdida de material. Ya evaporado cualquier líquido contenido en los tubos, se puede proceder a la separación de los esteroides.

4. Separación.- entre los múltiples procedimientos cromatográficos aplicables a los esteroides se eligió la cromatografía de capa fina de sílica-gel. Se utilizaron cromatoplaques de sílica gel G-60 F.254, con espesor de 0.25 milímetros sobre un soporte de vidrio de 20x20 cm (merck). En uno de los lados de la cromatoplaque se marcó con un lápiz una línea a 2 cm del borde que servirá de origen para el sistema; sobre la línea de origen se marcan 10 líneas de 1 cm de longitud, separadas entre sí por espacios de 0.5 cm, procurando que todas ellas queden en la zona central de la línea de origen, hacia los extremos, a dos centímetros de las muestras y a 1.5 cm del borde lateral se marcan las zonas de los estándares cromatográficos. El primero y el último de cada cromatoplaque serán blancos y las muestras quedarán al centro.

De nuevo con un lápiz se marca debajo cada zona de 1 cm, el número del tubo correspondiente. Se hace la transferencia del extracto etéreo a la correspondiente zona de aplicación, primero se agregan de 6 a 7 gotas de una mezcla de éter dietílico-metanol (9:1), sobre las paredes del tubo que contiene el extracto, de manera que el líquido disuelva y concentre el extracto en el fondo del tubo. Después, el extracto disuelto es transferido con una pipeta Pasteur con la punta adelgazada como un capilar; de manera que la solución pase a la sílica sin raspar la superficie de la misma; la zona de aplicación no deberá extenderse por más de dos milímetros de la línea de origen por lo que la operación de transferencia deberá repetirse cuantas veces sea necesario, para hacer que la totalidad del extracto sea colocado en la línea de origen. Después de transferir el remanente de las primeras gotas del disolvente, se repetirá la operación con 4 a 5 gotas de la misma mezcla y se hará una tercera limpieza de los tubos con 2 a 3 gotas de la misma solución antes

mencionada y haciendo la transferencia en cada caso con toda precaución.. Cuando todos los extractos han sido transferidos a las correspondientes áreas de aplicación, se aplican los estándares de cromatografía de soluciones de los esteroides séricos. Las soluciones de los estándares tienen una concentración de 1 mg/ml. La aplicación de los estándares servirá para la localización e identificación de las áreas de desarrollo de cada esteroide; l aplicación de los estándares cromatográficos se realiza con una jeringa de Hamilton en forma de un círculo de no mas de 2 mm de diámetro, con el centro en la línea de origen. Las cromatoplas se colocan en las cámaras con los disolventes para el desarrollo y separación de los esteroides, por pares, con la línea de origen hacia abajo y la superficie de sílica hacia el centro, pero recargados contra las paredes de la cámara cromatográfica, se colocan en la cámara que contiene 100ml. de benceno puro, las cámaras se tapan y se agregan pesos sobre las tapas de manera que los vapores del disolvente no puedan salir de l cámara, ya que de ser así la atmósfera no estaría saturada e impediría el avance del disolvente. El movimiento del disolvente es ascendente por lo que al pasar por la línea de origen se inicia el proceso de competencia, entre la fuerza de disolución de los esteroides hacia el disolvente; dado que la adsorción de los esteroides depende de la polaridad de los mismos, se requerirá de disolventes o mezcla de disolventes con la polaridad adecuada para hacer migrar a los distintos esteroides, permitiéndoles manifestar las pequeñas diferencias de polaridad relativa entre ellos. El primer sistema vencejo 100% solo mueve a los esteroides de polaridad menor y solo algunos milímetros (5-10 mm), pero si mueve a compuestos menos polares como colesterol y ácidos grasos de cadena larga, saturadas e insaturadas, lo que en principio limpia la muestra de posibles interferentes, que se encuentran como componentes normales del suero. El disolvente se deja llegar hasta el borde superior (90-120 min), se destapa la cámara, sin tocar la sílica, se sacan las cromatoplas, sin gotear el exceso de disolvente sobre la otra placa. Las placas se dejan en posición horizontal sobre una mesa para facilitar la evaporación del disolvente, la cámara se vacía y seca con l ayuda de un ventilador de mano. A la cámara se ole agregan aproximadamente 100-125 ml. de la mezcla benceno-acetato de etilo 7:3: los cromatoplas ya secas de benceno se vuelven a introducir a la cámara , se deja llegar el disolvente hasta el borde superior y siguiendo los mismos pasos se colocan en el tercer sistema de benceno-metanol 9:1. Es importante señalar que la polaridad de los disolventes (puros y/o mezclas) es cada vez mayor) El resultado de los tres sistemas cromatográficos se revela al colocar la cromatoplas bajo la luz ultravioleta (UV) de 254 nm, el componente F.254 en la cromatoplas permite que la luz ultravioleta haga aparecer a la sílica con una fluorescencia verdosa, en aquellos lugares en donde exista algo con capacidad de absorber esta longitud de onda, impedirá que la luz ultravioleta llegue al campo fluorescente y será observado como una zona morada o violeta.. La luz UV de 254 es característicamente absorbida por sistemas de dobles enlaces conjugados de átomos de carbono o bien de sistemas alfa-ceto insaturados, por lo que los esteroides de la serie A delta 3 cetona pueden absorber este tipo de longitud de onda, la testosterona y la androstendiona tienen sistema A delta 3 cetona en su estructura por lo que dos microgramos de esteroide estándar se observan fácilmente sobre el fondo verdoso de la cromatoplas; con lápiz se marcan los contornos de las áreas de desarrollo de ambos

estándares, en los dos lados de la cromatoplaque se hace notar que las áreas paralelas en las zonas de muestra no se observa ninguna mancha morada ya que las cantidades de A y T de las muestras son varios órdenes de magnitud menores a la de los estándares. Dado que la 5- α -dihidrotestosterona no posee la característica para absorber la luz UV, se revela por la formación de un compuesto colorido al realizar la reacción de Zimmerman, se agrega metadinitrobenzeno en medio alcalino con una pipeta Pasteur en una línea recta que una las áreas reveladas de Ay T, se calienta con una pistola de aire y la dihidrotestosterona reacciona formando una línea de color rosado que cambia a morado, se marcan los límites superior e inferior de la línea coloreada.

Revelados los tres esteroides estándares, se marcan las áreas paralelas trazando líneas horizontales desde el borde superior del estándar más alto y desde el borde inferior del estándar más bajo, para cada esteroide implicando así una gran zona en la que deberían poder localizarse los mismos esteroides pero de las muestras, se marcan así mismo líneas verticales, los límites izquierdo y derecho de cada zona de aplicación quedando así una cuadrícula en la que se localizan las áreas de desarrollo de cada esteroide para cada muestra. A estas zonas se les raspa la sílica en la que se encuentran adsorbidos los esteroides utilizando para ello una navaja, el polvo y los fragmentos de sílica desprendidos son adsorbidos mediante vacío hacia la pipeta Pasteur, la que ha sido previamente empacada con fibra de vidrio, formándose así una pequeña columna de sílica que contiene solo uno de los esteroides, la operación es repetida utilizando muchas pipetas empacadas como áreas de ocupación de los esteroides a determinar. Los esteroides contenidos en cada pequeña columna de sílica son eluidos con 1.2 ml de la mezcla de disolventes, éter dietílico metanol (9:1) hacia tubos de vidrio de 10x75 mm en los que se colectan aproximadamente 1050-1100 microlitros, la elución se realiza en forma rápida en grupos de 10 tubos e inmediatamente los tubos se agitan de 1 a 2 segundos en el agitador por vibración procurando no sacar el líquido, se toman dos alícuotas de 500 microlitros, la primera se coloca en tubos de ensayo de 10x75 mm y la segunda en viales de conteo, ambos marcados previamente con el código de muestra y esteroide correspondiente. Las dos alícuotas se evaporan a sequedad, la de los tubos para radioinmunoanálisis, las muestras de los viales son para la evaluación de las pérdidas de material radioactivo agregado en la etapa de preparación, a estos viales de preparación y los controles correspondientes se les añaden 5 ml de líquido de centelleo Fluor (tolueno- ^{3}H -POPOP), se tapan y se agitan suavemente, se evalúa el contenido de radioactividad presente en cada nivel contando los centelleos en un espectrofotómetro de centelleo Packard 3390, durante periodos de 10 min.

5. Radioinmunoanálisis.- la determinación cuantitativa por radioinmunoanálisis, se basa en el análisis por saturación, en el que la molécula demuestra tener capacidad de unirse a S con cierta afinidad, la molécula P en determinada concentración es saturada con una población de S*, y si se coloca en un medio con diversas concentraciones de S, podrían formarse dos tipos de complejos: PS y PS*, dado que la unión P y S o P y S* no es definitiva se establecerá un equilibrio en donde habrá los dos tipos de complejo, pero la proporción de cada uno de ellos dependerá de las concentraciones relativas de S y S*, en

el radioinmunoanálisis, P es un anticuerpo y S es un esteroide ya sea androstendiona, testosterona o dihidrotestosterona y S* es un esteroide idéntico pero marcado radioactivamente (3H).

En tubos de ensayo de vidrio de 10x75 mm marcados como curva, se agregan cantidades de 0, 5, 10, 25, 50, 100, 250, 500, 1000 y 50000 pg e un esteroide, A (androstendiona), T (testosterona) o DHT (dihidrotestosterona), tomando alícuotas por triplicado de soluciones etanilicas de concentración conocida, el disolvente se evapora a sequedad. Se prepara una solución que contiene S*, con cantidad suficiente para dar 5000 cpm en cada 500 microlitros de solución (solución en amortiguador fosfatos = 15 M con 0.1% de gelatina y 0.1% de azida de sodio), a la cual se agrega el suero de conejo que contiene los anticuerpos antiesteroides específicos (T, 1:10000; A, 1:7500 y DHT, 1:10000). De esta mezcla de ensayo, se agregan 500 microlitros de cada tubo de curva o muestra y se dejan en incubación a 4°C durante 18-20 hrs. tiempo en el que se ha establecido el equilibrio. Para separar el S y el S* libres remanentes de los complejos PS y PS*, se añaden 200 microlitros de una suspensión de carbón activado y Dextron T-70 (625-62.5 mg %), se agitan y se hacen sedimentar las partículas de carbón por centrifugación a 1500 g durante 10 min. a 4°C; los complejos PS y PS* quedan ahora adsorbidos con las partículas de carbono, el sobrenadante se decanta a viales de conteo, a los que se les agregan 5 ml de líquido de centelleo Instagel, se tapan y se agitan vigorosamente. El Instagel se agrega por la gran dificultad de evaporar 700 microlitros de agua, éste tiene un detergente por lo que puede incorporar el agua y formar una sola fase, haciendo posible el conteo de radioactividad. Se evalúa el contenido de radioactividad tanto de la curva como de las muestras.

Se realizan una serie de cálculos para obtener el dato de concentración de esteroides en las muestras.

Con los datos de la curva se calcula el porcentaje de unión neto, tomando como 100% la cantidad de cuentas de esteroides radiactivos, unido a la dosis de 0 pg de esteroide no radioactivo y después de restar la llamada unión inespecífica (las cuentas obtenidas en los tubos de 50000 pg, en un exceso de masa que debería desplazar a todo el esteroide radioactivo unido) Así a cada punto de la curva se le calcula su % de unión neto el cual se expresa en su transformación Log_et. Como función del logaritmo de la cantidad de masa agregada para que nos de una recta de pendiente negativa de la que se calcula su ecuación. Ya sea en forma manual o mecánicamente los % de unión neta de cada muestra, se interpreta en la curva patrón obteniendo la respectiva cantidad de masa. Dado que al final de la etapa de separación se tomaron dos alícuotas iguales, la cantidad de trazador recuperado expresado como el % del total agregado al inicio, es equivalente a la cantidad de masa de esteroide remanente o contenida en la alícuota del tubo, por lo que se hace la corrección correspondiente y se obtiene la cantidad de masa de esteroide inicial; conociendo la alícuota da muestra tomada, la cantidad de esteroide inicial se transforma a términos de concentración pg/ml de cada esteroide y de cada muestra.