

31960

329.



UNIVERSIDAD NACIONAL AUTONOMA DE MEXICO

ESCUELA NACIONAL DE ESTUDIOS PROFESIONALES IZTACALA

DIVISION DE ESTUDIOS DE POSGRADO

IMPLICACION DE LA MUERTE CELULAR PROGRAMADA DURANTE LA SUPEROVULACION CON GONADOTROPINA DEL SUERO DE YEGUA GESTANTE (PMSG) EN LA RATA.

T E S I S

QUE PARA OBTENER EL GRADO DE MAESTRO EN BIOLOGIA DE LA REPRODUCCION PRESENTA M.V.Z. CLARA ORTEGA CAMARILLO

DIRECTOR DE TESIS: DR. OMAR HERNANDEZ PEREZ

IZTACALA, EDO. DE MEXICO

257572

1998



TESIS CON FALLA DE ORIGEN



## **UNAM – Dirección General de Bibliotecas Tesis Digitales Restricciones de uso**

### **DERECHOS RESERVADOS © PROHIBIDA SU REPRODUCCIÓN TOTAL O PARCIAL**

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

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

ESTA TESIS FUE REALIZADA EN EL LABORATORIO DE BIOQUIMICA MOLECULAR BAJO LA DIRECCION DEL DR. OMAR HERNANDEZ PEREZ.

PERTENECIENTE A LA UNIDAD DE INVESTIGACION MEDICA EN BIOQUIMICA DEL HOSPITAL DE ESPECIALIDADES DEL CENTRO MEDICO NACIONAL SIGLO XXI. JEFE DE LA UNIDAD: DR. JUAN JOSE HICKS GOMEZ.

**JURADO**

**PRESIDENTE**

DR. OMAR HERNANDEZ PEREZ

**VOCAL**

DRA. PATRICIA RAMOS MORALES

**SECRETARIO**

M en C. ANA MARIA ROSALES TORRES

**SUPLENTE**

DR. JAVIER VALENCIA MENDEZ

**SUPLENTE**

M en C. JUDITH TELLEZ MARTINEZ.

**AL DR. JUAN JOSE HICKS GOMEZ**  
**POR EL APOYO Y LAS FACILIDADES OTORGADAS**

A MIS COMPAÑEROS: CECILIA, CONSUELO, GENOVEVA, MARGARITA,  
MARCELA, GISELA, GRACIELA, ROSITA, REBECA, ROCIO, RAFAEL, JOSE  
LUIS. ALBERTO, ALFONSO, JESUS, OSWALDO, POR LA AYUDA  
INCONDICIONAL QUE SIEMPRE ME HAN BRINDADO.

**A MIS PADRES,  
HERMANOS Y  
SOBRINOS**

**A MIS AMIGOS**

## INDICE

	pags
<b>I. RESUMEN</b>	2
<b>II. INTRODUCCION</b>	4
1 Desarrollo folicular	4
2 Desarrollo folicular durante el ciclo estral	13
3 <i>Atresia folicular</i>	17
4 Superovulación	35
<b>III. PLANTEAMIENTO DEL PROBLEMA</b>	45
<b>IV. HIPOTESIS Y OBJETIVOS</b>	46
<b>V. MATERIAL Y METODO</b>	
1 Obtención de la muestra	47
2 Procesamiento de la muestra	47
3 Respuesta ovulatoria	47
4 Citometría de flujo	48
5. Análisis de datos	49
<b>VI. RESULTADOS</b>	
1. Respuesta ovulatoria	56
2 Citometría	59
<b>VII. DISCUSION</b>	66
<b>VIII. BIBLIOGRAFIA</b>	73

## Resumen:

En la mayoría de los mamíferos incluido el humano, el número de folículos que logran alcanzar el estado de desarrollo preovulatorio, es menor al 1% de los presentes en el ovario al momento del nacimiento, el resto presenta, durante toda la vida reproductiva del animal, cambios degenerativos o atresia, así por ejemplo en el humano más del 99% y en el ratón cerca del 77% de los ovocitos nunca son ovulados. Los cambios degenerativos del folículo pueden ocurrir en cualquiera de las etapas del desarrollo folicular, por lo que este evento se considera una parte integral de la fisiología ovárica normal (Greenwald 1994) Recientemente se ha propuesto a la apoptois como el mecanismo por el cual las células foliculares (granulosa) mueren durante la atresia (Tilly et al., 1992). Esta propuesta se deriva del hecho de que en los folículos atrésicos se ha demostrado que el DNA de las células de la granulosa se degrada bajo un patrón nucleosomal Se ha demostrado también la activación de una endonucleasa dependiente de  $Ca^{+2}$  y  $Mg^{+2}$  en el ovario de ratas tratadas con PMSG y hCG (Greenwald 1994, Tilly et al., 1992), ambos eventos fisiológicos previos son característicos de la apoptósisis. La PMSG es una hormona utilizada frecuentemente para inducir el crecimiento folicular y la ovulación de un número mayor de ovocitos, sin embargo los ovocitos recuperados presentan alteraciones bioquímicas y morfológicas que no permiten su fecundación y su desarrollo embrionario normal Con el propósito de entender los diferentes mecanismos que ocurren durante la superovulación, nosotros estudiamos el efecto de dos dosis superovulatorias de PMSG y diferentes tiempos de exposición hormonal sobre la respuesta ovulatoria y la presencia y el progreso de la apoptósisis en las células de la granulosa de los folículos de la rata. **Metodología:** Se utilizaron ratas hembras prepúberes (27 d), Sprague dowley a las cuales se les administró vía subcutánea 4, 20 y 40 UI de PMSG en 0.2 ml de solución salina Los animales se sacrificaron a las 48, 60 y 72h posteriores a la aplicación de la hormona y se cuantificaron los siguientes parámetros: % ovulación, el número de ovocitos recuperados del ámpula del oviducto así como el % de ovocitos con alteraciones morfológicas aparentes (fragmentación y contracción del citoplasma así como la ausencia del cúmulo oophorus) La recuperación de los folículos  $>400 \mu m$  se realizó a las 52, 58 y 70h posteriores al tratamiento, las células de la granulosa se recuperaron por punción del folículo y lavados repetidos de los sacos con PBS pH 7.4 Para el análisis citométrico las

células se filtraron a través de una malla de 35  $\mu\text{m}$ , se tiñeron con yoduro de propidio y se analizaron en un citómetro de flujo Beckton Facsort. El análisis de los datos se realizó con el programa denominado Lysis II considerando los parámetros de dispersión lateral de la luz (FSC) y dispersión antero posterior de la luz (SSC) y de la fluorescencia producida por el yoduro de propidio entre 565 y 605 nm **Resultados:** La dosis fisiológica (4 UI) de PMSG estimuló la ovulación solamente en el 78% de los animales a las 72 h posteriores al tratamiento, con un número adecuado de ovocitos normales ( $11 \pm 4$ ). Con las dosis hiperovulatorias se logra el 100% de ovulación desde las 60 h con un número de ovocitos ovulados significativamente mayor  $37 \pm 14$  para 20 UI y  $45 \pm 5$  para 40 UI a las 72 h. Las alteraciones morfológicas con ambas dosis superovulatorias al mismo tiempo de recuperación se presentan en un alto porcentaje (63 y 60%). Nuestros resultados del análisis por citometría de flujo muestran que aún a dosis fisiológicas (4UI) existe un alto porcentaje de células muertas tanto por necrosis ( $50.02 \pm 9.77$ ) como por apoptosis ( $33.69 \pm 4.48$ ). Cuando los animales se trataron con una dosis superovulatoria a las 52 h el porcentaje de células necróticas fue de  $33.1 \pm 3.86\%$  y de  $27.7 \pm 5.43\%$  para ambas dosis. A las 70 h se observó un aumento importante que llegó al  $52.58 \pm 4.5\%$  y de  $54.1 \pm 8.9\%$  con 20 y 40 UI de PMSG respectivamente. En cuanto al porcentaje de células muertas por apoptosis los valores fueron del  $58.53 \pm 8.1$  y  $56.8 \pm 7.12$  a las 52 y 58 h respectivamente. Mientras que a las 70 h se observó una disminución ( $33.78 \pm 7.89\%$  y  $28.31 \pm 7.68\%$ ) con ambas dosis superovulatorias. **Conclusión:** Las dosis superovulatorias de PMSG inducen probablemente el crecimiento y la ovulación de folículos que estaban destinados o que ya estaban en el proceso de atresia. Es posible también que la PMSG puede estar activando el programa de muerte intrínseco en las células de la granulosa.

## INTRODUCCION:

### Desarrollo folicular

Desde el punto de vista embriológico la gonada se forma por la interacción de 2 tipos celulares células somáticas de origen mesodérmico y células germinales primordiales, que se originan en el ectodermo primitivo. Las células germinales primordiales (CGP) cuyo destino es formar los gametos, pueden distinguirse de las células somáticas que las rodean por su gran tamaño, su alta actividad de fosfatasa alcalina (Liang, et al, 1992) su citoplasma más claro, sus núcleos grandes y redondos, y su alto contenido de glucógeno. Se pueden encontrar, en el ratón, al final del primer tercio de la gestación como un grupo de 15 a 75 células en el saco vitelino, posteriormente migran a través del endodermo del intestino posterior, por el mesenterio, llegando hasta la cresta genital, hacia el día 11-12 de la vida embrionaria en el ratón y alrededor del día 35 de la vida embrionaria en el humano. El desplazamiento de las células germinales parece estar dado por movimientos celulares activos asociados con la emisión de pseudopodos que propician movimientos amiboideos o por un movimiento de tipo laminar realizado por las células del intestino sobre las cuales se deslizan (Donovan et al , 1986). Algunos autores sugieren que las células somáticas de la cresta genital poseen y/o emiten señales que atraen y retienen a las células germinales, estas señales pueden estar mediadas por agentes quimiotácticos esteroidales o por interacciones celulares con la matriz extracelular de las células germinales primordiales con fibronectina (Alvarez-Bylla et al , 1986), también se ha propuesto que el factor de crecimiento transformante (TGF- $\beta$ ) producido por la gonada primordial participa en la atracción quimiotáctica para las CGP (Clark et al, 1975; Godin et al , 1991). Durante su migración las CGP presentan una gran actividad mitótica, por lo que su número aumenta dramáticamente, de tal manera que para el día en que alcanzan la gonada indiferenciada se pueden observar hasta 25 000 CGP en el ratón. Esta gran actividad de división celular culmina con la conversión de las CGP a oogonias, las cuales ya se encuentran en los cordones sexuales prosiguiendo con el proceso de división acelerada. La oogonia tiene características morfológicas propias y una elevada frecuencia de divisiones mitóticas (Wassarman et al, 1994)

Después de que las CGP colonizan la región urogenital se inicia un proceso de proliferación de las células somáticas mesenquimatosas y del epitelio celómico. Posteriormente hay una reorganización de los tejidos. a) el tejido estromal que contiene a las células germinales primordiales rodeadas por células derivadas de la rete ovarii, precursoras de las células de la granulosa, de origen mesonéfrico y b) el tejido estromal que dará origen a tejido conectivo, vascular e intersticial esteroideogénico (células de la teca interna) (Ruiz 1988)

La conversión de oogonias a ovocitos primarios, se presenta cuando se inicia el proceso de reducción cromosómica o meiosis hasta llegar a un punto específico de la meiosis llamado *diploteno*, se ha propuesto que las células mesonéfricas producen una sustancia inductora de la meiosis, la naturaleza de esta sustancia no se conoce pero es probable que involucre un sistema de segundos mensajeros. Antes de completar la reducción del material genético reaparecen la membrana nuclear y el nucleolo, el proceso se detiene y la célula entra en una profase meiótica prolongada (*dictioteno*), entonces el ovocito es rodeado por una capa escasa de células pregranulosas. La conversión de oogonia a ovocito primario depende del contacto célula germinal - célula somática (Greenwald et al, 1994)

Aunque el proceso de reducción cromosómico se ha detenido, el crecimiento de los ovocitos continúa, tanto a nivel citoplásmico como nuclear, dichos ovocitos adquieren un gran tamaño (10-30  $\mu\text{m}$  en el ratón) un núcleo vesiculoso, al cual se le denomina "vesícula germinal" (Schwartz 1982) Durante la fase de máximo crecimiento el ovocito aumenta de 20 a 80  $\mu\text{m}$ ; este período dura aproximadamente 2 semanas en el ratón y se caracteriza por un aumento en la tasa de la actividad transcripcional y en la acumulación de macromoléculas, incluyendo proteínas como la tubulina (Paynton et al., 1988), la actina (Bachvarova et al., 1989<sup>a</sup>; Bachvarova et al., 1989<sup>b</sup>) y la lactato deshidrogenasa (Roller et al, 1989). También aumenta el número de ribosomas, mitocondrias, gránulos corticales y el número de sáculos del aparato de Golgi (Hussein et al., 1975). Además durante esta fase se sintetizan y secretan las glicoproteínas que van a formar la capa extracelular o zona pelúcida (Liang et al., 1990). Durante esta etapa, los ovocitos se siguen manteniendo en arresto meiótico (*dictioteno*) Una vez que el ovocito ha completado su crecimiento, se diferencia morfológica y bioquímicamente adquiriendo la

capacidad para terminar la meiosis (Hirshfield 1991), proceso que se caracteriza por la fragmentación y desaparición de la membrana nuclear y la dispersión del contenido del núcleo, fenómeno conocido como "Ruptura de la vesícula germinal" (Schultz and Wassarman 1977). El tiempo que los ovocitos permanecen detenidos en dictioteno, así como la naturaleza del estímulo que los induce a reiniciar la meiosis, son especie-específicos y dicho estímulo ocurre momentos antes de la ovulación (Wassarman, 1978) Durante el reinicio de la meiosis, los cromosomas se condensan en cromosomas bivalentes que se aparean, se separan y completan la primera división meiótica, concluyendo con la emisión del primer cuerpo polar. Cuando el ovocito es ovulado este se encuentra en metafase II y completa la segunda meiosis en el momento de la fecundación (Paynton et al , 1990, Moor et al 1981)

**Folículo Primordial.** Inmediatamente después de que se forma el ovocito, es rodeado por una capa de células epiteliales aplanadas, estableciéndose el folículo primordial. Estos folículos se localizan en la corteza ovárica en una zona localizada a poca distancia de la superficie y se encuentran rodeados por células estromales semejantes a fibroblastos las cuales se aposentan sobre una matriz rica en colágena. Una capa de células de la pregranulosa a veces incompleta rodea, al ovocito, son células de forma rectangular y planas, o cuboidales con un núcleo grande, muy sinuoso con grandes agregaciones de heterocromatina. Su citoplasma es escaso y moderadamente denso, con un gran número de ribosomas. Ocasionalmente contienen un aparato de Golgi bien desarrollado. Pueden observarse algunas mitocondrias de tamaño generalmente pequeño y de forma redonda aunque algunas otras son de forma alargada, con pocas crestas laminares y con un poco de material electrodenso. Las células pregranulosas contienen microvellosidades sobre los bordes celulares que llenan completamente los espacios intercelulares entre ellas y el ovocito. La capa simple de células de la pregranulosa semejante a "una hilera de ladrillos" descansa sobre una membrana o lámina basal delgada y pobremente definida, compuesta de un material amorfo de una electrodensidad media. Las membranas de estas células se encuentran íntimamente unidas a través de uniones fuertes en numerosos puntos. Durante los estadios tempranos del desarrollo folicular el contacto celular entre las células de la granulosa se caracteriza por la adquisición de uniones que incluyen desmosomas cortos, adherencias zonales y uniones comunicantes, sin embargo, durante el crecimiento folicular hay cambios en la naturaleza

del contacto célula-célula, las adherencias zonales y los desmosomas se van perdiendo y las uniones comunicantes aumentan en número y en tamaño. Las uniones comunicantes son agregados de canales transmembranales, que poseen un polo hidrofílico, a través de los cuales más del 85% de los nutrientes del citoplasma de una célula pasan a la otra y de las células del cumulus hasta el ovocito, a excepción de los aminoácidos no polares como la leucina y la valina que deben ser captados directamente por el ovocito. Estas interrelaciones metabólicas constituyen el fenómeno conocido como acoplamiento metabólico o cooperación fisiológica entre las células comunicadas (Wiesen et al., 1993; Wassarman et al., 1994).

La presencia y funcionamiento de estas uniones se mantiene durante todo el proceso de crecimiento folicular, disminuyendo lentamente hasta desaparecer al aproximarse la ovulación (Rosado et al., 1991; Wassarman et al., 1994). La comunicación entre las células de la granulosa y el ovocito vía uniones comunicantes puede ser crucial durante la selección folicular, así como para la transducción de señales y el paso de segundos mensajeros tales como el AMPc y el  $Ca^{+2}$  de una célula a otra lo que permite que la respuesta folicular a los estímulos hormonales sea coordinada y sincrónica durante las etapas de crecimiento, ovulación y atresia folicular (Wiesen 1993, Heller et al., 1981)

**Folículo Preantral:** Conforme las células de la granulosa progresan y sintetizan receptores a la hormona luteinizante (LH) y a la hormona foliculo estimulante (FSH), se desarrolla el estadio preantral (Maruo et al., 1993). Comúnmente los folículos preantrales tienen una forma redonda u ovalada, varían en tamaño dependiendo de la magnitud del desarrollo de las capas de la granulosa (2-12 células de profundidad). En los folículos grandes aparecen espacios intercelulares pequeños e irregulares, probablemente producidos por la secreción y acumulación de líquido folicular, que constituyen una característica distintiva de este estadio. En este estadio los folículos grandes presentan una zona pelúcida bien desarrollada (Greenwald 1994).

La estructura de las células de la granulosa en este momento del desarrollo folicular no tiene mayor complicación pero adquieren una apariencia multifocal. Son células grandes, cuboidales o poligonales con un núcleo grande que ocupa gran parte del área celular. En los folículos pequeños, las células están fuertemente empaquetadas, mientras que en los

foliculos grandes hay espacios intercelulares pequeños e irregulares llenos de microvellosidades y con un material amorfo de electrodensidad media, presumiblemente líquido folicular precipitado. Uniones fuertes se observan en diversos puntos entre las membranas celulares. El núcleo ya no es sinuoso, tiene un contorno liso y la heterocromatina está finamente dispersa, ocasionalmente se observa una estructura nucleada bien formada, el citoplasma es más abundante y la cantidad de ribosomas es menor que el de las células de la pregranulosa de los foliculos primordiales. Las mitocondrias son pleomórficas, están llenas de material electrodensito y poseen crestas laminares. También contienen túbulos y vesículas pequeñas de retículo endoplásmico rugoso y algunas están distendidas dentro de las cisternas, las cuales contienen material amorfo de una electrodensidad moderada similar al líquido folicular, probablemente sean vesículas secretoras. En muchas células también se ha observado el aparato de Golgi (Bomssel et al., 1979; JoAnnes 1980)

Las capas celulares que formarán las tecas comienzan a organizarse a partir de células estromales, que rodean al folículo, algunas de las cuales sufren cambios mínimos en su forma, mientras que otras pueden adquirir una forma epiteloide con un núcleo grande vesicular y con un citoplasma abundante que ocasionalmente contiene pequeñas vacuolas de lípidos (Bomssel et al , 1979)

Hasta este momento el crecimiento folicular es independiente de gonadotropinas ocurriendo en respuesta a estímulos desconocidos y puede observarse a través de toda la vida reproductiva de la hembra (Greenwald et al, 1994).

**Foliculo Antral:** Solo pocos foliculos antrales, en comparación con los primordiales y preantrales, están presentes en el ovario en cualquier fase del ciclo estral. El efecto sinérgico de la FSH y el estradiol, sobre la mitosis contribuye a la producción de líquido folicular (Dorrington et al, 1993), el cual se acumula en el espacio intercelular de la granulosa formando una cavidad: el antro folicular, produciéndose de esta manera el estadio antral.

El líquido folicular provee un medio con el cual el ovocito y las células de la granulosa que lo rodean pueden ser alimentadas en un ambiente endocrino único para cada folículo

(JoAnnes 1980). Los folículos maduros, intactos tienen una capa de la granulosa cohesiva de grandes células poligonales, con núcleos grandes pálidos y un nucleolo prominente. La ultraestructura de las células de la granulosa de estos folículos es esencialmente igual a la que se describe para las células de los folículos preantrales, sin embargo, la proliferación del retículo endoplásmico liso es mayor, con numerosas vesículas pequeñas (Bomsel et al, 1979). En este momento una parte de las células de la granulosa se han separado del resto para rodear al ovocito y formar el cumulus oophorus (Hirshfield 1991). Estas células muestran un índice mitótico mayor (3 veces) comparado con el de las células que se encuentran rodeando al antro y aun mayor en comparación con el de las células periféricas (Wassarman et al., 1994).

Diversas investigaciones han demostrado que las células de la granulosa no constituyen un tejido homogéneo desde el punto de vista morfológico y aun más importante, desde el punto de vista bioquímico, sino que por el contrario muestran una especialización regional que las hace especialmente interesantes (Amsterdam et al., 1992). Las células de la granulosa de folículos intactos poseen una notable heterogeneidad bioquímica y morfológica entre las diferentes capas celulares con respecto a su proximidad con el ovocito y con la capa basamental (que separa a las células de la teca de las células de la granulosa). Esta heterogeneidad incluye el contenido de receptores a LH y la concentración de enzimas esteroidogénicas que es mayor en la capa de la granulosa adyacente a la capa basamental (Amsterdam et al., 1992, Heller et al., 1981).

**Folículo Preovulatorio o de De Graff:** La formación del folículo preovulatorio incluye un aumento en el número de células de la granulosa, la adquisición de inclusiones lipídicas, vacuolización y vascularización de las células de la teca interna tomando el folículo una apariencia hiperémica (Bomsel et al., 1979). Cuando se presenta la oleada de LH que induce la ovulación, ocurren cambios en la actividad proliferativa y esteroidogénica de las células del folículo preovulatorio (Greenwald 1994, Hirshfield 1991). Entre el pico de estradiol y la oleada preovulatoria de LH, estos folículos experimentan importantes transformaciones morfológicas de forma progresiva, tales como desorganización, pérdida de la capa basamental, la adquisición de una forma redonda, aumento del diámetro de las células de la granulosa así como del núcleo de las mismas, las células de la granulosa desarrollan la expresión de receptores a gonadotropinas, y la reprogramación para el

aumento en la síntesis de esteroides, principalmente progesterona y en la síntesis de prostaglandinas, esenciales para la ruptura folicular. Aunque morfológicamente estas células no exhiben la hipertrofia típica de las células lúteas, sí muestran cierta similitud. Estudios sobre las funciones membranales, síntesis de proteínas, fosforilación y apariencia ultra-estructural indican que los ovocitos en la primera fase del desarrollo son similares a los ovocitos de folículos antrales no estimulados, poco después de la oleada de LH, ocurren cambios principalmente en la vesícula germinal y en el compartimento somático del folículo (Moor et al., 1985).

El reinicio de la meiosis en el ovocito y la luteinización de las células de la granulosa, son cambios que ocurren entre el pico de LH y la ovulación (Greenwald 1994). Uno de los eventos de mayor importancia en esta etapa es la terminación de la comunicación entre el ovocito y las células del cumulus debida a la retracción masiva de las uniones comunicantes, que funciona principalmente como un disparador del reinicio de la meiosis y de la ruptura folicular (Espey and Lipner 1994). Además permite la disociación física del complejo cumulus-ovocito de la capa de la granulosa restante en preparación para la ovulación. Las uniones comunicantes permiten el paso del AMPc proveniente de las células foliculares al ovocito, inhibiendo su maduración, por lo que se ha propuesto que la meiosis se reinicia al interrumpirse la transferencia directa de AMPc al ovocito, por el efecto que tienen las gonadotropinas sobre las uniones comunicantes (Wiesen et al., 1993). Sin embargo otras investigaciones describen que la reducción del acoplamiento metabólico intercelular producido por la LH, no parece ser el disparador para el reinicio de la meiosis, ya que se ha observado que el inicio de la maduración del ovocito precede a la terminación de la comunicación intercelular que es inducida por la LH (Moor 1981; Eppig, 1983). La elevación de la producción de AMPc en las células del cumulus no provoca un aumento notable de la concentración de AMPc en el ovocito. Esto parece indicar que el AMPc de las células del cumulus no es transferido directamente al ovocito. Sin embargo existe una correlación entre la elevación de los niveles de AMPc en las células de la granulosa y el retraso en la maduración del ovocito. Para explicar la inhibición de la meiosis en el ratón, se ha propuesto que el incremento en los niveles de AMPc en las células del cumulus activa en éstas las síntesis de un inhibidor putativo, llamado inhibidor de la maduración (OMI), el cual es subsecuentemente transmitido al ovocito a través de

las uniones comunicantes inhibiendo la maduración del ovocito y el rompimiento de la vesícula germinal (Eppig, 1983; Freter et al., 1984; Rosales et al. 1989).

Posteriormente el restablecimiento de la comunicación a través de los diferentes tipos de uniones entre las células del cuerpo lúteo ocurre en los estados tempranos de la luteinización (Wassarman et al, 1994), la presencia de las uniones comunicantes en las células lúteas durante el ciclo reproductivo se ha observado particularmente en la rata. Aparentemente las hormonas gonadotrópicas amplifican, modulan y/o inducen la formación de las uniones comunicantes, por lo tanto, la aparición de estas uniones podría ser dependiente de los niveles intracelulares de AMPc (Niswender and Nett 1994).

En un estudio en el que se analizaron por citometría de flujo, células de la granulosa obtenidas de folículos humanos o de ratas tratadas con dietilbestrol o con PMSG se observaron poblaciones de diferentes tamaños, hecho que posteriormente se comprobó con microscopia electrónica y de luz, estas células también mostraron diferencias en la actividad esteroidogénica cuando se cultivaron con FSH y androstenediona y en la concentración de gránulos lipídicos (Wassarman 1994). Las características ultraestructurales de las células de la granulosa de los folículos grandes preovulatorios muestran algunas estructuras asociadas con la esteroidogénesis (Bjersing 1978). Las células periféricas de la granulosa contienen mitocondrias más voluminosas, retículo endoplásmico liso aumentado y mayor concentración de gránulos de lípidos (Espey 1978). Las células de la granulosa más cercanas a la capa basamental tienen una forma alargada y son columnares. El resto de las capas muestran una estructura densa de células polédricas. Las células del cumulus tienen mayor cantidad de retículo endoplásmico rugoso (indicativo de síntesis de proteínas) (Hussein et al, 1975).

También se ha demostrado por pruebas citoquímicas que en la rata, existen diferencias entre las células de la granulosa de la periferia (murales), las células de la granulosa periantrales (las células que dan forma al antro folicular) y las células de la granulosa que forman el cumulus oophorus. En la rata se encontró que estas diferencias están relacionadas en las diferentes etapas del ciclo estral: durante el proestro, las células de la granulosa periféricas (2/3 partes) son células pseudoestratificadas hasta las células que se encuentran cerca de la membrana basamental, (característica de los folículos

destinados a ovular), por el contrario, el resto de la capa de la granulosa consiste de células estratificadas y redondas, de núcleos igualmente redondos. Cuando el folículo en crecimiento alcanza las 400  $\mu$  de diámetro pueden observarse las primeras células pseudoestratificadas. La permeabilidad lisosomal, es mayor en las células de la granulosa periféricas, seguida por las periantrales y finalmente por las células del cumulus (Amsterdam et al, 1992)

Entre las características fisiológicas distintivas de las células de la granulosa se ha observado una pequeña diferencia durante el estro y el diestro temprano en cuanto a la actividad de algunas enzimas, como la 3-(-Hidroxi-esteroide-deshidrogenasa (3-(-HDS), entre las células periféricas, periantrales y del cumulus, en el diestro tardío y en el momento en que se presenta el proestro la actividad de la 3-(-HDS) es hasta 3 veces mayor en las células de la granulosa periféricas, ésta es la región de mayor actividad esteroidogénica del folículo. Otra enzima para la cual también se ha demostrado una diferencia regional, es la glucosa-6-fosfato deshidrogenasa que esta asociada con la biosíntesis de esteroides (Wassarman 1994).

## **Desarrollo folicular durante el ciclo estral**

La vida reproductiva de la gran mayoría de los animales domésticos esta regida por la presentación del ciclo estral en el que la ovulación y el estro (conducta sexual y aceptación del macho) son procesos sincronizados que se presentan a intervalos regulares. El acontecimiento central del estro es la ovulación, que en la mayoría de las hembras ocurre espontáneamente (ratas, hámsters, bovinos, ovinos, caprinos, cerdos, primates), a excepción de la gata y la coneja que ovulan tras el estímulo que supone la cópula (ovulación inducida), al estimularse una vía neural capaz de activar la liberación de LH (Freeman 1994, Ramírez 1994).

La presentación del ciclo estral está bajo regulación neuroendocrina del eje hipotálamo-hipófisis-ovario y depende de la secreción en el momento adecuado de FSH y LH por la hipófisis anterior en respuesta a los pulsos de la hormona liberadora de gonadotropinas (GnRH) que a su vez está regulado por los niveles de estradiol y de progesterona. La secreción pulsátil de GnRH es de suma importancia para establecer el ciclo estral, para la liberación de las gonadotropinas con la frecuencia y el pulso apropiado, en cambio la secreción en forma constante de GnRH evita la liberación de FSH y de LH en forma cíclica (Sorrentino et al., 1972). La participación e interacción de factores liberadores hipotalámicos de gonadotropinas (GnRH), las propias gonadotropinas hipofisarias (LH y FSH), con las hormonas esteroideas y otros péptidos sintetizados por el folículo ovárico rigen cada una de las fases del ciclo estral y el reclutamiento folicular (Ramírez 1994).

La duración del ciclo estral varía de una especie a otra. De acuerdo a los eventos endocrinológicos y de comportamiento folicular en los roedores y otras especies mayores (rata, hamster, bovinos, ovinos, caprinos), se ha dividido en 4 fases que son estro, metaestro, diestro y proestro, eventos que han sido ampliamente descritos por varios autores sin embargo, los mecanismos fisiológicos que controlan el reclutamiento, la selección, la dominancia y la atresia folicular aun no están completamente comprendidos (Freeman, 1994)

La importancia del ciclo estral radica en que es en este evento donde se producen las fases finales del desarrollo folicular, que se caracteriza por un aumento en la proliferación

celular y en el número de receptores hormonales (gonadotropinas y esteroides) de tal manera que estos folículos están capacitados para responder a los niveles hormonales en cada una de las fases y pueden ser reclutados dentro del grupo de folículos en fase de crecimiento. Posteriormente mediante un proceso de selección uno, o algunos, de estos folículos adquiere(n) un papel de predominancia sobre el resto que se caracteriza por tener una tasa de crecimiento más rápida y posiblemente por ejercer un efecto supresor sobre los folículos restantes. Este folículo continúa su desarrollo a lo largo del ciclo sin que esto signifique que su destino final sea la ovulación, ya que en algún momento puede tomar el camino de la atresia, este proceso puede repetirse más de una vez durante el ciclo, hecho que se conoce como "oleadas" de crecimiento (Koering 1991), el número de oleadas que se presentan puede determinarse en el caso del bovino, en base a los cambios cíclicos de la concentración de estradiol en la vena ovárica, tomando como base estos cambios se ha propuesto que en esta especie, ocurren de 2 a 3 oleadas de crecimiento folicular (Irelan y Roche 1983).

La selección del o de los folículos dominantes es un proceso natural, que previene el crecimiento y desarrollo de múltiples folículos en especies como el bovino y el humano; el ovario de estas especies se caracteriza típicamente por la presencia de un folículo dominante por ciclo, que resulta en una sola ovulación. Sin embargo, los estudios sobre los eventos de la selección del (los) folículo(s) dominante(s) no han logrado todavía explicar satisfactoriamente el proceso de selección folicular, como tampoco se entiende todavía cabalmente el mecanismo por el cual se propicia el crecimiento selectivo del grupo de folículos a partir de los cuales se selecciona el folículo dominante, este grupo de folículos antrales se origina de los folículos primordiales, que son reclutados constantemente (Koering 1991).

En cada oleada de crecimiento, independientemente del número, existe un folículo que ejerce cierta dominancia sobre los folículos que lo rodean, si este folículo se vuelve atrésico, entonces de la segunda oleada surge otro folículo dominante, los factores que determinan qué folículo tomará la delantera, qué hará que continúe su crecimiento hasta la ovulación o bien que inicie el proceso de atresia, son aún motivo de estudio. Por esta razón, algunos autores han propuesto, la posibilidad de que la actividad folicular pudiera ser un proceso continuo de crecimiento y degeneración del folículo dominante. Una vez

que ocurre la regresión del cuerpo lúteo, del folículo dominante anterior, el siguiente folículo dominante presente, bajo la influencia de la oleada de LH ovulatoria, inicia el crecimiento preovulatorio (Adams 1993).

También se ha descrito que una descarga de FSH precede necesariamente el surgimiento de cada oleada de crecimiento folicular. Por otro lado, aunque el mecanismo responsable de la supresión del crecimiento de nuevos folículos durante el lapso de tiempo entre el surgimiento de una oleada y otra se desconoce aun, se ha propuesto que la falla continua en el desarrollo folicular es el reflejo de niveles excesivamente bajos de FSH, los cuales además se han asociado desde un punto de vista temporal con el mecanismo de selección del folículo dominante (Adams 1993).

En el humano, se ha observado que el aumento en los niveles de FSH, durante la fase lútea tardía, (aproximadamente 1 día antes de la menstruación), induce el reclutamiento de folículos. Posteriormente entre el día 5 y 7 del ciclo el proceso de selección que lleva a la presencia de un folículo dominante culmina y el folículo elegido continua madurando hasta el momento en que se presenta la ovulación (Lobo 1994). Durante la fase antral, aumenta también la producción de estradiol, favoreciendo la proliferación celular de la granulosa y el aumento en el número de receptores a FSH. Por otro lado el estradiol promueve que la concentración de FSH caiga a niveles mínimos por un mecanismo de retroalimentación negativa muy sensible y detiene el desarrollo de otros folículos. Existen evidencias, por lo menos en la cerda, de la producción de proteínas reguladoras del crecimiento folicular (FRP), producidas por el folículo dominante que contrarrestan los bajos niveles de estrógenos sintetizados por los folículos antrales subordinados que están en desarrollo. Estas proteínas son secretadas por las células de la granulosa y especialmente por los folículos medianos (3-6 mm). Se ha observado que las FRP actúan como un factor atretogénico local que se sintetiza por las células de la granulosa pero no por las células de la teca (Wasserman 1994).

El folículo dominante tiene una sensibilidad muy alta a FSH gracias al sistema amplificador FSH-E2 esta sensibilidad permite que el folículo dominante continúe su desarrollo hasta alcanzar el estado preovulatorio. Este proceso de desarrollo continúa a pesar de que el estradiol induce la disminución de los niveles de FSH circulante durante la

segunda mitad de la fase folicular. El crecimiento del folículo dominante implica un aumento en la vascularización de la teca, lo que facilita que, a pesar de los niveles menguantes de FSH, el folículo dominante tenga un mayor acceso a la estimulación producida por esta hormona, que los otros folículos antrales (Adams 1993)

Por otro lado, existen reportes que demuestran que la LH aumenta el desarrollo folicular en la rata (Goodman and Daniel 1985; Greenwald 1977). En experimentos en los cuales se aplica un antagonista del factor liberador de LH (LHRH) durante el diestro temprano, se observa que 8 h después de este tratamiento se modifica la amplitud más no la frecuencia de la oleada de LH, evento que se ha relacionado con el aumento en el porcentaje de folículos antrales con atresia inicial (Devorshak-Harvey et al., 1989). Durante el estadio antral temprano del desarrollo folicular el número de receptores a LH se incrementa notablemente propiciando que la sensibilidad del folículo a LH aumente dramáticamente. Es sorprendente el número tan grande de folículos preantrales que se mueven de un estadio de desarrollo a otro, así como es sorprendente que la gran mayoría se vuelvan atrésicos, lo que sugiere que una alteración en la relación FSH:LH puede ser la causante de este proceso (Wassarman, 1994).

El papel del folículo dominante como inhibidor del crecimiento de otros folículos se observa en experimentos en los cuales todos los folículos presentes en el ovario son destruidos por radiaciones a excepción del folículo dominante, 4 días después se reemplazan estos folículos por otros pequeños lo que indica que el folículo dominante no inhibe el crecimiento de los folículos en estadios tempranos del desarrollo. También se ha dicho que el folículo dominante de la oleada de crecimiento nunca alcanza la madurez presumiblemente por las altas concentraciones de progesterona secretadas por el cuerpo lúteo, sin embargo cuando se induce la lisis del cuerpo lúteo con  $\text{PGF2}\alpha$ , el folículo dominante continúa su desarrollo y en el 80% de los animales que ovularon durante las 48 a 72 h posteriores a la aplicación de la  $\text{PGF2}\alpha$  el folículo dominante ovuló (Adams 1993, Grant 1989).

## Atresia

Aunque el ovario de los mamíferos contiene al nacimiento cientos de miles de ovocitos, el número de descendientes que puede tener una hembra es relativamente pequeño. Esto se debe a que solo uno, o unos pocos, de los folículos que forman parte del grupo ovulatorio en cada ciclo, experimentan crecimiento, maduración y son ovulados. Pero en la mayoría de las especies un porcentaje muy alto de los folículos presentes en los ovarios en el momento del nacimiento o bien durante toda su vida reproductiva presentan cambios degenerativos o atresia, a medida que el animal envejece. Así, por ejemplo, en el humano más del 99% y en el ratón cerca del 77% de los folículos nunca son ovulados. Los cambios degenerativos del folículo pueden ocurrir en cualquiera de las etapas del desarrollo folicular, por lo que este evento se considera una parte integral de la función ovárica normal (Greenwald et al., 1994). En el mamífero, estos cambios degenerativos ocurren incluso en la vida embrionaria, que acontece con una disminución en el número de células germinales, entre las características de la atresia se incluye la degeneración y desprendimiento de la capa de la granulosa, la presencia de núcleos picnóticos en estas células y un aumento en la producción de progesterona con una concomitante disminución en la producción de estrógenos (Hughes y Gorospe 1991). En la mayoría de los folículos antrales las células de la granulosa muestran evidencias de degeneración que pueden variar desde cambios moderados difícilmente detectables por el microscopio de luz hasta células de la granulosa totalmente degeneradas, las cuales pueden estar flotando en el líquido folicular (Hussein 1975)

Como ya se ha mencionado, la atresia puede presentarse en cualquiera de las etapas del crecimiento y la diferenciación folicular, este proceso degenerativo reduce de manera muy eficiente el número de folículos ováricos. La atresia cursa a través de una serie de estadios más o menos bien diferenciados, las modificaciones en la morfología folicular dependen del grado de atresia en que se encuentre. Desde el punto de vista histológico se ha propuesto una clasificación en 5 grados que contempla, a los folículos no atrésicos (A1) hasta los folículos completamente colapsados en los que el ovocito ha desaparecido (Byskow 1974; Carson et al., 1979). Existe otra clasificación, que toma como base únicamente los cambios morfológicos gruesos, propuesta por diferentes autores en

diferentes especies, en la oveja (Hay et al., 1976, Moor et al., 1978), en la vaca (Henderson et al., 1984) y en la cabra (Rosales et al., 1990)

El mecanismo por el cual se precipita la iniciación del fenómeno de atresia es todavía motivo de estudio, sin embargo se han propuesto diversas teorías

a) - Deficiencias circulatorias y nutricionales

Una de las propuestas consiste en que la atresia se debe a la disminución en el aporte de nutrientes y substratos debida a una disminución en el aporte sanguíneo. Sin embargo, los estudios realizados muestran que esta disminución del aporte sanguíneo se presenta *solamente en los estadios más avanzados de la atresia y no ha sido posible demostrarlo en los momentos iniciales de este proceso* (Greenwald 1994).

b).- Sistema inmunológico

La presencia de células del sistema inmune (linfocitos citotóxicos), permite proponer la posibilidad de que algunos fenómenos inmunológicos participen en este proceso. Se ha sugerido que la destrucción de la granulosa, causa la liberación de factores inmunológicos e inflamatorios, tales como el complemento, con lo cual ocurre una mayor destrucción celular, también se han encontrado linfocitos T citotóxicos en etapas intermedias de la atresia folicular, lo que aumenta la posibilidad de que la atresia involucre la participación de algunos fenómenos inmunológicos (Rosado et al., 1991)

c) - Sistema Renina-Angiotensina

La identificación de algunas moléculas pertenecientes al sistema renina-angiotensina tales como el angiotensinógeno, la prorenina, la renina y las angiotensinas I y II en el líquido folicular humano permite suponer que estas moléculas participan en la regulación de la atresia. Las observaciones demuestran que la angiotensina II estimula la mitosis en las células de la granulosa y la producción de líquido folicular, gracias a su papel modulador en el balance hidrolítico, además estimula la producción de andrógenos y la angiogénesis en las células de la teca, por lo que un aporte inadecuado de este *metabolito podría ser un factor determinante en el inicio de la atresia* (Rosado et al., 1991)

d) - Incapacidad de crecimiento y de remodelación tisular.

Enzimas lisosomales. Los lisosomas participan en algunos aspectos de la fisiología ovárica, incluyendo el crecimiento y el desarrollo del propio ovario, el crecimiento, el desarrollo y atresia folicular (Wise, 1987), la ovulación y la regresión del cuerpo amarillo (Morales et al., 1983). Se ha demostrado que tanto la LH como la hCG promueven la labilización de los lisosomas ováricos, lo cual induce la liberación de las enzimas lisosomales por arriba de los niveles basales. También se ha descrito que estas hormonas son capaces de inducir un aumento tardío tanto del número de lisosomas como de la actividad total de las enzimas hidrolasas celulares (Elfont et al., 1977). Los lisosomas pueden participar en el metabolismo de las hormonas esteroides (Elfont et al., 1977) y en el de las gonadotropinas (Guilligan et al., 1986), mecanismos que involucran la degradación del complejo hormona-receptor y, por lo tanto, ayudan a regular la acción de estas hormonas (Szego 1976). En un estudio realizado por Ballesteros (1992), en folículos ováricos de cabra, con el objeto de conocer los mecanismos bioquímicos que regulan el crecimiento folicular miden la actividad de 3 enzimas lisosomales (fosfatasa ácida, B-glucoronidasa y aril-sulfatasa) en los compartimientos incluyendo el líquido de folículos no atrésicos. Encuentran que la actividad específica de las 3 enzimas lisosomales, en el líquido de los folículos no atrésicos, disminuye con el tamaño folicular. Cuando realizaron el estudio en folículos atrésicos > 6mm la actividad de la  $\beta$ -glucosaminidasa aumenta notablemente, mientras que la actividad de fosfatasa ácida y la aril sulfatasa disminuye. Por lo que proponen que la actividad de estas enzimas y su distribución tisular desempeñan un papel fundamental en el proceso de atresia (Ballesteros et al., 1992).

Enzimas Proteolíticas La participación de algunas enzimas proteolíticas en la actividad folicular se propuso en base a experimentos en los que se observa que la adición de éstas a tejido ovárico *in vitro* aumenta la actividad de adenilato ciclasa, efecto semejante al causado por las gonadotropinas, lo que permite suponer que la actividad de algunas enzimas, principalmente serino-proteasas, podría desempeñar un papel importante en la síntesis de AMPc en respuesta al estímulo dado por las gonadotropinas. Los estudios realizados por Rosales et al , (1990) demostraron la presencia de un inhibidor de la actividad serino-proteasa, cuya concentración en el líquido folicular está inversamente relacionada con el tamaño folicular y directamente con el grado de atresia, también

demuestran la actividad tripsinoide presente en el líquido folicular, en las células de la granulosa y en las células de la teca, siendo mayor en los folículos no atrésicos mayores de 6mm. Basados en estos resultados, Rosales et al (1990), proponen que la actividad antiproteolítica es uno de los cambios bioquímicos iniciales durante el proceso de atresia y por lo tanto causante de la degeneración, inhibición del contacto intracelular, desprendimiento celular y la liberación del ovocito, que representa el paso final de la atresia.

Enzimas hidrolíticas. Las metaloproteinasas son un grupo importante de enzimas hidrolíticas que participan en la degradación de la matriz intersticial durante los procesos de remodelación tisular por lo que pueden ser necesarias durante el crecimiento y la maduración folicular. En un trabajo realizado por García et al., (1997) en el que estudian la actividad de la colagenasa, gelatinasa y pz-peptidasa durante el crecimiento, maduración y atresia de folículos antrales de cabra y se encontró que la actividad de pz-peptidasa disminuye en las células de la teca de los folículos atrésicos de 3-6 mm y en las células de la granulosa de folículos atrésicos >6 mm. La actividad intersticial de colagenasa fue similar en las células de la teca y en las células de la granulosa pero disminuye en el líquido folicular de los folículos no atrésicos. En los folículos atrésicos, la actividad de colagenasa disminuye en las células de la teca y en la granulosa pero aumenta en el líquido folicular. La actividad de gelatinasa presentó grandes variaciones de acuerdo al grado de atresia, sin embargo observan que en los folículos de 3-6 mm y en los >6 mm la actividad aumentó. Por lo que concluyen que la actividad necesaria para la remodelación de tejido consiste de un complejo multienzimático de enzimas foliculares. Este sistema puede estar regulado desde los inicios de la maduración hasta el momento de la ruptura folicular para la ovulación. Algunas modificaciones de este sistema pueden participar en la regulación del proceso por el cual la maduración normal y la atresia finalmente conduzcan al número apropiado de folículos ovulatorios en cada especie.

e).- Factores de Crecimiento.

En los últimos años la participación de los factores de crecimiento en el desarrollo folicular ha tomado gran importancia, ya que se ha demostrado que el folículo no sólo es sitio de acción de estos factores sino que sintetiza y produce muchos de ellos como: los factores de crecimiento insulinoideos I y II (IGF-I y II), el factor de crecimiento epidermal (EGF), los

factores de crecimiento transformantes (TGF- $\alpha$  y TGF- $\beta$ ) y otros factores (Greenwald 1994). Los estudios realizados *in vitro* en cultivos celulares, demuestran que estos factores ejercen una gran variedad de efectos diferentes a la inducción del crecimiento (quimiotaxis, diferenciación y sobrevivencia celular etc.,) muchos de los cuales parecen ser contradictorios. Estos factores de crecimiento parecen además participar en la regulación y/o potencialización de la acción de las gonadotropinas y hormonas esteroides, particularmente durante la dinámica folicular (*maduración, ovulación y atresia folicular*). Existen evidencias de la participación de estos factores, especialmente del EGF, TGF $\alpha$  y del FGFb, en la inhibición de la muerte celular programada de las células foliculares, considerando que la apoptosis (ver más abajo) es el mecanismo molecular que sustenta la atresia folicular es factible pensar que dichos factores son inhibidores o por lo menos reguladores de la atresia (Dekel 1985; Fujinata et al., 1994).

Investigaciones en las cuales las células de la granulosa son cultivadas con EGF, TGF $\alpha$  o FGFb demuestran que estos factores inhiben el inicio espontáneo del rompimiento apoptótico del DNA; mientras que el tratamiento con IGF-I, insulina, TGF $\alpha$  o con el factor de necrosis tumoral (TNF), no tuvo efecto alguno. Igualmente la activación de la proteína cinasa A o C con fosfocolina o con mirislato, 13 acetato de forbol fue incapaz de prevenir el inicio de la fragmentación del DNA, sin embargo la presencia de un inhibidor de la tirosina cinasa (genisteína) bloqueó completamente la capacidad de los factores EGF, TGF $\alpha$  o el FGFb, para suprimir la apoptosis en las células de la granulosa. Es posible proponer que la acción parácrina del EGF/TGF $\alpha$  provenientes de la teca o la activación autócrina del FGFb sintetizado por las células de la granulosa previenen la apoptosis de estas células, a través de un mecanismo que incrementa la actividad de tirosina-cinasa (Tilly et al., 1992<sup>a</sup>). También se ha propuesto la participación del IGF-I en la selección de aquellos folículos que ovularán, bien directamente o actuando sobre los folículos que desarrollarán el fenómeno de atresia. Este factor de crecimiento insulinoide probablemente actúa como regulador en la captación de colesterol y por lo tanto en la síntesis de las enzimas esteroideogénicas (Erickson et al., 1989). También se ha mostrado que este factor de crecimiento estimula la biosíntesis de glicosaminoglicanos (GAGS), principalmente de heparan sulfato y sobre la síntesis de dermatan sulfato inducido por la FSH al actuar como un "factor de sulfatación" a nivel de células de la granulosa (Adashi et

al ,1989) La participación de los GAGS en la fisiología ovárica, esta comprobada por su capacidad reguladora de la actividad de FSH y LH. Dado que los GAGS inhiben la fijación y utilización de las lipoproteínas de baja densidad (LDL), podrían actuar previniendo la captación de colesterol por las células foliculares, limitando así el aporte del sustrato disponible para la biosíntesis de esteroides. También se ha sugerido su participación en la formación del antro y en la atresia folicular, estos hallazgos sustentan la posibilidad de que el IGF-I de las células de la granulosa participe en el crecimiento como en la degeneración de los folículos en desarrollo (Adashi et al.,1989).

f) - Cambios en los patrones de producción de hormonas

*Durante el proceso de degeneración de las células de la teca y de la granulosa se producen alteraciones en la esteroidogénesis. Por ejemplo se ha visto que las células de la granulosa de folículos humanos atrésicos pierden su capacidad para producir estradiol, estrona y progesterona, lo cual se ha relacionado con la ausencia de receptores para FSH (McNatty 1979). En un experimento en el cual las células de la teca de folículos humanos sanos y atrésicos se incubaron durante 15 h con 5 y 10 ng de LH/ml se observó un aumento significativo en la producción de progesterona, testosterona y DHT en los folículos atrésicos en cantidades similares, mientras que los niveles de estrona y estradiol permanecieron bajos (McNatty 1979). Resultados similares con folículos porcinos demuestran que los folículos atrésicos producen menos estradiol y considerablemente más androstenediona, testosterona y DHT que los folículos sanos, hecho que se refleja en las bajas concentraciones de estradiol en el líquido de los folículos atrésicos. La producción de estradiol por las células de la granulosa en presencia o ausencia de cantidades equimolares de testosterona o androstenediona es mayor en folículos sanos que en los atrésicos, siendo la producción de testosterona y androstenediona idéntica en la teca normal y en la atrésica. Estos resultados permiten concluir que la disminución en la actividad de las enzimas aromatasas de las células de la granulosa es una de las primeras funciones que se afectan durante la atresia (Maxson 1985), estas investigaciones coinciden con las descritas para el humano (McNatty 1979)*

Otro trabajo en el que se evaluó la presencia de receptores a gonadotropinas en los folículos atrésicos de ovino demuestra que la unión de las gonadotropinas marcadas con  $^{125}$  en cultivo no es diferente a la que se presenta en los folículos sanos, sino hasta

estadios muy avanzados de atresia, por lo que se propone que la disminución en la unión de las gonadotropinas marcadas conforme la atresia progresa es más una consecuencia que una causa de degeneración folicular. En un estudio en el que se clasificaron los folículos en 3 grupos de acuerdo a la presencia o ausencia de alteraciones atrésicas, relacionadas con el número de células que contenían y a su capacidad esteroidogénica, fueron perfundidos *in vitro* con LH. Los folículos clasificados como normales, aumentaron su producción de AMPc, testosterona y androstenediona, los folículos clasificados como atrésicos tempranos también aumentaron la secreción de AMPc y progesterona pero no de andrógenos, y finalmente los folículos clasificados como atrésicos, no aumentaron la producción de AMPc ni de esteroides, concluyendo que la ausencia de receptores para las gonadotropinas no es la causa principal de las alteraciones que se presentan en la esteroidogénesis durante la atresia folicular (Carson 1979)

En otro trabajo se indujo atresia folicular, utilizando barbitúricos durante el proestro de hámsters con ciclos estrales normales los folículos recuperados e incubados en presencia de LH producen más progesterona y menor cantidad de androstenediona y estradiol que los folículos en proestro normal. Cuando los folículos en cultivo son suplementados con un precursor de androstenediona, los estrógenos se mantienen en niveles altos, lo que indica que la secreción de estradiol no puede atribuirse a la disminución en el sistema de aromatización sino a una deficiencia en el suplemento de andrógenos (Greenwald 1994). La cuantificación de las enzimas esteroidogénicas muestran que en el primer día del tratamiento con pentobarbital hay una reducción significativa de la C17 $\alpha$ -20-liasa y la C17 $\alpha$ -hidroxilasa y como consecuencia una disminución en el aporte de andrógenos aromatizables para el día 2, siendo este uno de los primeros marcadores de la atresia (Uilenbroek 1984). Cuando se induce atresia a los folículos de roedores se observa una disminución en el perfil de esteroides como efecto primario, debido a un decremento en la secreción de andrógenos por las células de la teca este evento precede a la pérdida de la actividad de aromatización en las células de la granulosa. La disminución en la secreción de estrógenos en los folículos antrales restringe, presumiblemente, la mitosis en las células de la granulosa y por lo tanto, el crecimiento folicular (Greenwald 1994). En los roedores el balance apropiado entre la estimulación de LH, la producción de androstenediona y la aromatización es necesaria para promover la formación de estrógenos y la prevención de la atresia. Sin embargo en otras especies como el humano

y los ovinos, la presencia de niveles altos de andrógenos en el líquido de los folículos atrésicos puede no ser la causa sino representar simplemente *la acumulación de grandes cantidades de precursores* a causa de una deficiencia en el sistema de aromatización (Greenwald 1994)

g) - Participación del fenómeno de Apoptosis

Dadas las características morfológicas presentes en los folículos atrésicos vistos por microscopía electrónica como. vacuolización y aumento del tamaño de las mitocondrias de las células de la granulosa, el ovocito presenta importante vacuolización y disminución de las microvellosidades, condensación y *retracción de la zona pelúcida*. En la década de los 80's se aceptaba que la atresia constituía un proceso de muerte celular por necrosis (Rosado et al , 1991), sin embargo estudios recientes proponen la participación de otro tipo de muerte celular en el fenómeno de la atresia, la apoptosis (Tilly 1992<sup>b</sup>, Hurwitz and Adashi 1992).

La degeneración de las células de la granulosa en estados avanzados de atresia tiene características muy similares a las de la muerte celular apoptótica. Los folículos obtenidos de *ratas prepúberes tratadas con PMSG muestran características histológicas clásicas de la atresia* 4 días después del tratamiento, pero también presentan fragmentación del DNA en nucleosomas, característico de la apoptosis. En los últimos años los avances acerca de los eventos que ocurren durante el inicio de la atresia folicular, se han facilitado por la *identificación bioquímica de la apoptosis en las células de la granulosa de folículos degenerados en las aves, cerdos, roedores y monos* (Tilly 1992<sup>b</sup>)

Estudios bioquímicos recientes parecen indicar que la muerte celular apoptótica es el *mecanismo molecular por el cual degeneran las células de la granulosa y de la teca de los folículos durante la atresia* (Tilly et al., 1992<sup>b</sup>) En algunas especies (aves, cerdos, ratas), se ha demostrado que la fragmentación del DNA característica de la apoptosis se presenta en las células de la granulosa y de la teca obtenidas de folículos inicialmente atrésicos, *descubrimiento que coincide con la detección y activación de una endonucleasa dependiente de Ca<sup>+2</sup> y Mg<sup>+2</sup> en el ovario de ratas tratadas con PMSG y hCG* (Greenwald et al., 1994; Tilly et al., 1992<sup>b</sup>).

En la mayoría de los organismos el control homeostático del número de células es el resultado de un balance dinámico entre la proliferación y la muerte celular. El proceso de proliferación ha recibido mayor atención en los pasados 20 años y mucho menos énfasis se ha hecho sobre los eventos bioquímicos que ocurren antes y durante la muerte celular. En los organismos mayores la muerte celular se ha clasificado dentro de tres categorías)

1 - La necrosis que ocurre como resultado del daño masivo en el tejido y es precedida de la liberación masiva de enzimas lisosomales, este proceso es fundamentalmente debido a deficiencias en los sistemas de aporte nutricional, respiratorio o circulatorio. La necrosis es una consecuencia de injuria celular por condiciones dañinas y sustancias tóxicas, caracterizada por la pérdida accidental de la estructura celular, edema como resultado de los cambios en la permeabilidad de la membrana celular y finalmente ruptura celular, lo que puede dañar a las células adyacentes induciendo además infiltración de células inmunes e inflamación. Una característica distintiva de la atresia es que durante este proceso se afecta un grupo contiguo de células, no es necesaria la síntesis de ARNm ni de síntesis de nuevas proteínas, la necrosis tampoco implica gasto de energía ya que las células que han muerto por este proceso tienen niveles bajos de ATP (Hsueh AJ et al , 1994).

Una célula que ha muerto por necrosis presenta características morfológicas y bioquímicas distintivas, los cambios tempranos incluyen un aumento del citoplasma y de los organelos, específicamente la mitocondria, y cambios ligeros en el núcleo. Estos cambios conducen finalmente a la disolución de la membrana plasmática y como consecuencia el contenido celular es liberado hacia el espacio extracelular. Los cambios morfológicos incluyen la pérdida del control sobre la permeabilidad selectiva de la membrana plasmática, debida principalmente a la desaparición temprana del mecanismo activo de intercambio iónico y por daño directo de la membrana o bien por la disminución secundaria de la energía celular, como consecuencia ocurren cambios en el fluido celular y la célula se hincha. El aumento de calcio citosólico libre ( $Ca^{*2}$ ) causa la activación de fosfolipasas membranales que degradan los fosfolipidos presentes en la membrana causando una brusca interrupción de la membrana. Por otro lado la liberación de enzimas lisosomales causa una rápida aceleración de la desintegración celular en los estados tardios de la necrosis. El ADN es expuesto a la acción de la deoxirribonucleasa en

fragmentos de diferente tamaño Durante la necrosis se afecta comúnmente grupos de células continuas y una respuesta inflamatoria en el tejido viable adyacente por la liberación de restos celulares (Schwartzman, 1993).

2 - La muerte celular programada, se refiere a la situación en la cual las células están programadas para morir en un momento determinado de su evolución fisiológica. Tal es el caso de la muerte que ocurre durante el desarrollo del sistema nervioso o de algunos órganos durante la metamorfosis de ciertos insectos, la diferenciación terminal de tejidos especializados como la piel, el intestino y los eritrocitos (White 1993).

3 - La apoptosis es un proceso activo de autodestrucción celular que requiere la expresión de un número determinado de genes. Este proceso fue originalmente reconocido y descrito por Wyllie que implementó el término de apoptosis para describir la secuencia de eventos que conducen a la muerte celular en una gran variedad de sistemas, en especial para distinguir esta forma de muerte celular de la necrosis (cuadro I)

La muerte celular fisiológica puede ser un proceso activo de autodestrucción por las células, que requiere energía, activación de enzimas y en su momento de la expresión y activación de nuevos genes específicos "suicidas" o "líticos" en el genoma que degradan el DNA (Zeleznik et al., 1989). En los últimos años, desafortunadamente, se ha venido utilizando los términos de muerte celular programada y apoptosis como sinónimos uno del otro, por el hecho de que en ambos casos participa un programa genético, lo que resulta confuso, en la muerte celular programada el programa genético es un reloj específicamente de tiempo para el suicidio, mientras que el programa genético de la apoptosis especifica las armas y/o los medios para el suicidio instantáneo que será producido por cambios en los mecanismos de regulación y estímulo del funcionamiento celular. La maquinaria básica para que se presente la apoptosis aparentemente se encuentra en todas las células del mamífero, pero la activación del programa suicida esta regulada por una gran variedad de señales de origen igualmente diferente en el medio intra y extra celular (Gerschenson y Rotello, 1992; Tilly et al., 1992<sup>b</sup>).

Cuadro I.- DIFERENCIAS ENTRE APOPTÓSIS Y NECROSIS.

CARACTERÍSTICA	APOPTÓSIS	NECROSIS
Estímulo	Fisiológico	Patológico
Ocurrencia	Células individuales	Grupo de células
Reversibilidad	No ( cuando hay cambios morfológicos)	Si
Organelos citoplasmicos	Edema tardío	Edema temprano
Act. de enzimas lisosomales	No	Si
Núcleo	Fragmentación (cariorraxis)	Desaparece (cariolisis)
Cromatina nuclear	Compactación y formación de masas densas	Agrupamientos <i>sin forma</i>
Rompimiento del DNA	Internucleosomal	Fortuito
Celula	Formación de cuerpos apoptóticos	Desintegración
Fagocitosis por otras células	Presente	Ausente
Exudado inflamatorio	Ausente	Presente
Formación de cicatriz	Ausente	Presente

Gerschenson and Rotello 1992

La apoptosis es un proceso que se encuentra bajo control genético y puede ser iniciado por un reloj interno o por agentes extracelulares como hormonas, citocinas, células asesinas y una gran variedad de agentes químicos, físicos y vírales. Durante la apoptosis se requiere la síntesis *de novo* de algunas proteínas, estudios genéticos en el nemátodo *Caenorhabditis elegans* y en la mosca *Drosophila melanogaster* han permitido aislar genes que son específicamente requeridos para la inducción de la apoptosis (Steller 1995). La muerte celular programada en el *C. elegans* puede ser dividida en cuatro estadios: a) la decisión de morir, b) la muerte de la célula, c) la fagocitosis y d) la degradación de la célula muerta. Se ha identificado un grupo de genes que participan en los 2 primeros estadios de la muerte celular programada, 3 genes que regulan la ejecución de estas células: el *ced-3* y el *ced-4* que son necesarios para la muerte y el *ced-9* que se ha identificado como protector de las células que pueden sobrevivir y como un bloqueador de la muerte celular (Hengartner et al., 1992). La fagocitosis de las células muertas por células vecinas o macrófagos requiere de dos grupos de genes: el primero compuesto de *ced-1*, *ced-6*, *ced-7*, *ced-8* y el segundo por *ced-2*, *ced-5* y *ced-10*. Los productos del *mic-1* controlan la actividad de la nucleasa necesaria para la degradación del DNA de la célula fagocitada. La degradación de la célula fagocitada requiere de la función del gen *nuc-1*. El englobamiento de la célula apoptótica requiere de los dos grupos de genes. La mayoría sino es que todas las células animales tienen la capacidad

de autodestruirse por la activación de un programa suicida intrínseco de la célula (White, 1993)

En las células de los mamíferos se han identificado activadores y supresores de la apoptosis, uno de los activadores de la apoptosis, es el producto del gen supresor tumoral p53 el cual se ha visto que es responsable de dirigir la apoptosis en algunos sistemas, lo que permite pensar que la apoptosis es la defensa celular del cáncer (White, 1993), sin embargo el p53 no regula todas las formas de apoptosis, por lo que existen dos más, una dependiente de p53 y otra independiente de p53 (Kastan et al., 1992) Además se ha demostrado que la p53 suprime la muerte celular en insectos, nemátodos y mamíferos Esta proteína puede actuar incrementando la actividad protectora o bien bloqueando las proteasas semejantes a la cisteína proteasa (ICE), una enzima que regula la conversión de la interleucina 1 $\beta$ , u otras proteínas efectoras de muerte (Wang et al , 1994, Miura et al , 1993). Otros genes asociados con la proliferación celular tales como C-myc, son capaces de inducir apoptosis cuando son expresados anormalmente (Bisomette, 1992; Yuan 1996)

La lista de agentes que pueden causar apoptosis crece rápidamente, por lo que se especula que los diferentes tipos celulares pueden estimularse para entrar en un proceso de decisión entre la vida y la muerte por múltiples vías, así por ejemplo. la información del linaje celular, daño por radiaciones, infecciones virales, factores de supervivencia celular, interacciones celulares y hormonas (Steller, 1995), pueden activar o inhibir la muerte, además de que una misma señal puede actuar de manera contraria en otros tejidos, aunque la presentación de este programa resulta en la mayoría de la veces benéfico, una activación inapropiada o a destiempo puede causar o contribuir a una gran variedad de enfermedades (White, 1993; Greenwald y Shyamal, 1994; Zeleznik et al., 1989), por ejemplo la pérdida de hormonas resulta en la atrofia de los órganos hormono-dependientes como la próstata, corteza adrenal, endometrio, regresión de la glándula mamaria después de la lactación y la atresia folicular. Los estudios *in vitro* del epitelio uterino demuestran que la apoptosis y la proliferación celular están reguladas por una acción inversa y coordinada de progesterona y del factor de crecimiento transformante (TGF), por lo que puede pensarse, que aparentemente, la apoptosis resulta de un

estímulo que dispara la síntesis de novo de proteínas intracelulares, que pueden ser letales para la propia célula (Gerschenson, 1992).

Durante la apoptosis ocurren tres eventos claves

a) - La condensación de la cromatina nuclear en fragmentos de 180-200 pb y el rompimiento de las interacciones celulares.

b) - La formación de un número pequeño de cuerpos apoptóticos, algunos de los cuales contienen fragmentos del núcleo y organelos intactos como mitocondrias y lisosomas, motivo por el cual la célula adquiere una estructura más compleja. Este proceso es aparentemente dependiente del tamaño celular y ocurre más rápido que la condensación celular. La presencia de algunos epitopes en la superficie de los cuerpos apoptóticos es necesaria para el reconocimiento por las células nuevas y por los macrófagos.

c) - El paso final de este proceso es la fagocitosis de los cuerpos apoptóticos por células normales vecinas y macrófagos para su degradación subsecuente por los lisosomas de las células receptoras. La inducción de la apoptosis no es sincrónica, ya que es posible que células en diferentes estados de apoptosis puedan encontrarse en un mismo tejido

Originalmente la apoptosis se caracterizó en base a los cambios morfológicos que ocurren en las células muertas, estudios adicionales en estas células reportan un evento clave asociado con la apoptosis que es la fragmentación internucleosomal del DNA nuclear (Tilly 1992<sup>b</sup>). El primer signo visible de la apoptosis es la condensación de la cromatina nuclear de la célula afectada y el rompimiento de las interacciones celulares, así la célula que experimenta apoptosis se aísla de las células vecinas. La condensación de la cromatina requiere de la activación de una endonucleasa dependiente de  $\text{Ca}^{+2}$  y  $\text{Mg}^{+2}$  que degrada el DNA nuclear para producir el típico núcleo hipercondensado (la degeneración del DNA con la generación de fragmentos múltiples de 180-200 pb), de los cuerpos apoptóticos. La condensación del citoplasma se caracteriza por la interrupción del contacto desmosomal entre las células y el citoesqueleto de la célula afectada, que resulta en la condensación de los filamentos intermedios que rodean al núcleo y la formación de ampollas en la superficie celular (Dive 1992)

La activación de la endonucleasa ocurre, aparentemente, en todos los sistemas en los cuales se ha identificado la apoptosis, no requiere la transcripción génica o síntesis de proteínas, pero aparentemente involucra la expresión de una proteína preexistente. Esta endonucleasa no está presente en células indiferenciadas, pero se expresa después de que la diferenciación celular ha terminado, también está presente pero inactiva en células que aún no mueren y se activa posiblemente por cambios en la concentración de  $\text{Ca}^{+2}$  o  $\text{Mg}^{+2}$  intracelular, previos a, o durante los estados iniciales de la muerte celular (Zeleznik et al., 1989). El aumento de otras actividades enzimáticas durante la regresión de tejidos hormono-dependientes ya se ha demostrado, tal es el caso de la catépsina D, t-PA y algunas otras proteasas que aparentemente son responsables de la degradación del citoesqueleto y otros componentes del citoplasma, las enzimas necesarias para la liberación de la célula de sus vecinos y de la membrana basal como las colagenasas y probablemente algunas otras metaloproteinasas, RNAsas que degradan tanto al ARN mensajero como al ribosoma, es necesario aclarar que no todas las enzimas están presentes en todos los tejidos en los que ocurre la apoptosis (Gerschenson 1992).

Durante la maduración final, las células de la granulosa no solamente adquieren la maquinaria para la expresión del fenotipo funcional, sino también endonucleasas endógenas que pueden servir como herramientas para su propia destrucción. Los folículos preovulatorios sanos (inducidos por la administración de PMSG a ratas inmaduras) tienen cantidades considerables de endonucleasas que se pueden activar por  $\text{Ca}^{+2}$  (Zeleznik et al., 1989). La activación de estas endonucleasas puede ser el mecanismo que conduzca a la atresia folicular, lo que sugiere que la precipitación de este evento es la causa de muerte en las células de la granulosa. Se ha propuesto que el aumento en los niveles de FSH, induce cambios metabólicos en las células de la granulosa que conducen a una disminución en el aporte de oxígeno y a su vez una alteración en la homeostasis del  $\text{Ca}^{+2}$  intracelular, causando finalmente la muerte (Hirshfield 1991).

Actualmente es posible distinguir si una célula muere por apoptosis o por necrosis, por sus alteraciones morfológicas y por el patrón de degradación de su DNA, mediante electroforesis en geles de agarosa (Tilly 1991). El estudio de los procesos involucrados en la apoptosis utilizando la técnica de citometría de flujo, permite la identificación y la

separación de subpoblaciones celulares (Chrest 1995) El uso de diferentes *fluorocromos*, como el bromuro de etidio, el anaranjado de acridina, el yoduro de propidio o el *colorante* Hoescht 33342 (bis-bencimida) que se intercalan en el DNA del genoma celular *permiten* cuantificar la fluorescencia emitida por cada colorante en un *fluorómetro de flujo* (Hirshfield et al., 1988) Este es un método rápido y sensible con el cual es posible *cuantificar* y discriminar células vivas, apoptóticas y necróticas en base a los cambios en el *diametro celular*, la granularidad interna, la permeabilidad de la membrana y la *conformación del DNA*. Las células apoptóticas pueden clasificarse analizando los valores de algunos *parámetros* basados en la manera como la célula dispersa un haz de rayos luminosos que *inciden directamente* sobre ella. La luz puede ser dispersada en sentido antero posterior, lo que ha sido llamado por los investigadores "forward scattered light" (FCS) cuyo valor se *relaciona directamente* con el tamaño y el índice de refracción de cada célula, y en sentido *perpendicular al haz luminoso*, "side scattered light" (SSC), que se relaciona directamente con la *complejidad interna* de la célula (Dive et al., 1992) (Fig 1) Se ha encontrado que una *célula apoptótica* presenta una relación de dispersión caracterizada por bajo FSC y alto SSC (Dive et al., 1992, Chrest et. al., 1993), y que las células vivas correspondientes presentan una *relación de dispersión* de la luz caracterizada por un FSC alto y SSC bajo, lo que significa que las células clasificadas como apoptóticas son células pequeñas con un alto grado de complejidad y que las células vivas son mayores y con un menor grado de complejidad (Dive et al., 1992).

El citómetro de flujo mide las propiedades ópticas de las células, cuando éstas son expuestas de manera individual a un rayo láser, las células previamente tratadas y teñidas con algún colorante, son llevadas en fila suspendidas en un fluido a través del foco; donde un destello procedente de una fuente de iluminación las incide. Las células se encuentran suspendidas en una solución isotónica, con un alto grado de pureza y en una concentración desde  $5 \times 10^5$  hasta  $2 \times 10^7$  células por mililitro. El funcionamiento de la celda de flujo enfoca la corriente para que la muestra pase a través del punto focal del rayo láser de forma uniforme. En el momento en que la célula pasa a través del foco, la luz incidente es dispersada de acuerdo a las propiedades de la célula o bien, cuando la célula ha sido marcada convenientemente, la luz incidente excita la producción de fluorescencia por el marcador utilizado. Esto es captado por un sistema de lentes y filtrado antes de alcanzar el fotomultiplicador fotodetector. El fotodetector convierte

cuantitativamente el rayo de luz en una señal electrónica, que es digitalizada por un convertidor *digital-análogo en un número entero* (integrador) que es almacenado electrónicamente. Los datos pueden ser recabados posteriormente para su análisis (Haynes 1988 y Watson and Erba 1994)

El citómetro de flujo puede medir simultáneamente 5 parámetros para cada célula: FSC, SSC y 3 regiones espectrales de emisión de fluorescencia FL. Estos parámetros se miden simultáneamente, en cada célula, de forma individual. El número de células que pueden analizarse por éste método es de aproximadamente 500 a 4000 células por segundo (Watson and Erba 1994) Por cada evento que pasa a través del láser, el citómetro de flujo asigna un valor relativo a FSC, SSC y FL, tomando en cuenta: la cantidad y dirección de la dispersión de la luz incidente y la emisión de fluorescencia (Haynes, 1988)

Fluorescencia (FL) - Es la luz absorbida y emitida por los fluorocromos unidos a la célula excitada por el rayo láser. Los fluorocromos unidos a las células absorben la luz láser y liberan energía por la vibración y disipación de calor y por la emisión de fotones a una longitud mayor. Constituye un proceso de absorción y re-emisión de luz. Las células se tiñen con un fluorocromo específico que se fija o intercala en el DNA y se excita con una fuente de luz láser a 488 nm (400 mW) y la fluorescencia roja se mide a 590 nm, de tal manera que las células apoptóticas son menos fluorescentes porque tienen menor cantidad de DNA que las células normales

Dispersión lateral de la luz (SSC). Es la luz incidente que es refractada o reflejada en un ángulo mayor y que es proporcional a la granularidad y/o complejidad celular, se detecta y mide a 90°, es decir de manera perpendicular a la dirección del rayo de la luz láser. En una célula los procesos ópticos, dependen del tamaño total, el índice de refracción del medio, el número de interfaces dieléctricas dentro de la célula (granularidad), más el tamaño, la longitud de onda y el ángulo de observación. El patrón de luz dispersada por células intactas es extremadamente complejo, sin embargo, bajo condiciones específicas, puede dar información acerca del tamaño y algunos otros datos acerca de la morfología celular. El carácter de la luz dispersada es tal que las señales en un ángulo muy amplio son fuertemente influenciadas por la refracción de las estructuras pequeñas (granularidad) y así las células del mismo tamaño pueden ser diferenciadas siempre y

cuando posean propiedades diferentes de refracción interna. Las células con muchas estructuras internas tales como los granulocitos pueden tener una dispersión luminosa considerablemente mayor que los linfocitos.

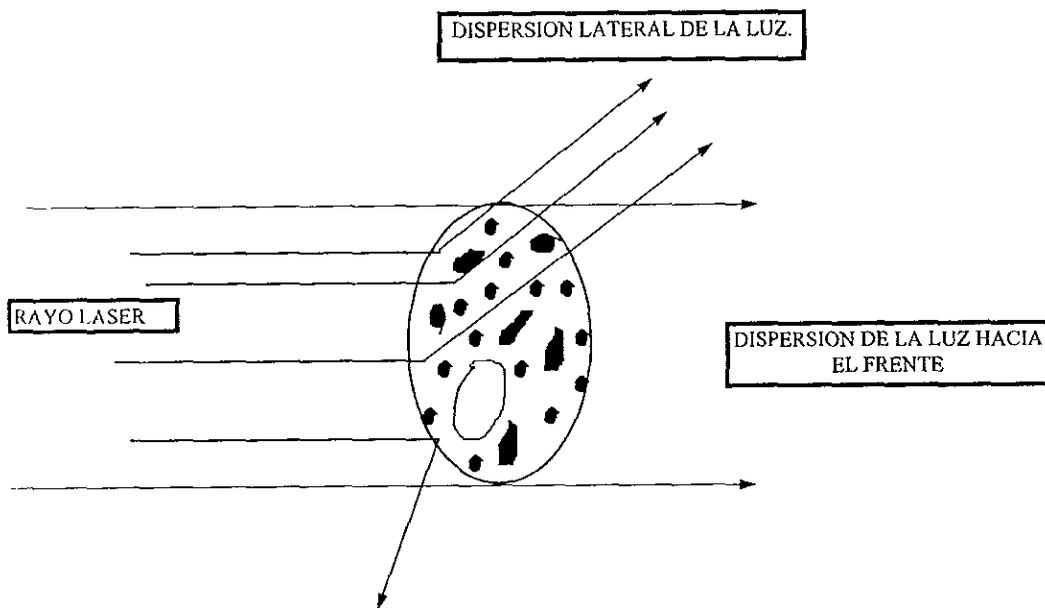


Fig. 1. Dispersión de los rayos láser cuando entran en contacto con la célula

Análisis de datos: Se utiliza el programa llamado Lysis, éste programa mide los parámetros morfológicos de las células (tamaño y granularidad) y la viabilidad celular por la fluorescencia que emiten los fluorocromos previamente unidos a la célula (integración del fluorocromo a la cadena de DNA) esto depende de la integridad de la membrana celular (Haynes 1988; Watson et al , 1994)

Dispersión antero posterior (FSC). Es la luz incidente que es difractada en un ángulo entre 1 y 10°. Esta es *proporcional* al área superficial de la célula y es detectada por el eje del rayo láser en la dirección antero-posterior. Como ya se dijo anteriormente, este tipo de dispersión luminosa es *proporcional al tamaño de la partícula*, sin embargo, deben tomarse en consideración la posición exacta del detector en relación a la partícula, el ángulo de colección de la luz, el tipo de cambio de flujo y el sistema de focos utilizados, la longitud de onda láser y el poder de iluminación, así como la cantidad total de luz dispersada que puede ser recibida por el detector pueden modificar éste parámetro.

## Superovulación

Con el propósito de aumentar el número de ovocitos en cada ciclo estrual y de esta manera el número de productos tanto de los animales domésticos como de animales de experimentación, se han desarrollado diversas técnicas para estimular el crecimiento y desarrollo folicular que culmine con la ovulación de un número mayor al normal de ovocitos que se puedan fecundar *in vitro* o *in vivo* y ser transferidos a hembras receptoras en programas de mejoramiento genético y transferencia de embriones.

La superovulación se define como un aumento en el número de ovocitos que son ovulados en un ciclo estral dado, cuando dicho número se compara con el número normal en cada ciclo ovulatorio. Esta hiperrespuesta puede producirse en el animal por la administración exógena de gonadotropinas. Esta técnica es de uso común y muy importante ya que además de cumplir con el propósito de aumentar el número de descendientes por individuo, ha permitido conocer más sobre los mecanismos del desarrollo, crecimiento, maduración folicular y funcionamiento del ovocito, lo que ha favorecido la aplicación de los programas de reproducción asistida en humanos y animales. Para inducir la superovulación, se han utilizado las hormonas: foliculoestimulante (FSH), luteinizante (LH), gonadotropina coriónica humana (HCG) y la gonadotropina del suero de yegua gestante (PMSG), ahora nombrada gonadotropina coriónica equina (eCG). La selección del tratamiento a utilizar para este propósito depende de algunos factores como son: disposición del producto, la eficiencia, los efectos colaterales y el costo. La utilización de gonadotropinas puras homólogas (FSH, LH) es sin duda la mejor opción, sin embargo, tienen el inconveniente de producir una reacción inmunológica de memoria que provoca que cada vez que se usa, se tenga que aumentar la dosis. Existen otros métodos para la inducción de una respuesta superovulatoria o simplemente de la ovulación, que se han utilizado en animales de laboratorio y en el humano como son: el factor liberador de gonadotropinas (GnRH) y la gonadotropina de la mujer menopaúsica (HMG) (cuadro II) (Wassarman et al, 1994).

## Cuadro II: METODOS UTILIZADOS PARA INDUCIR SUPEROVULACION

- 1 Administración de gonadotropina coriónica equina (PMSG) a animales domésticos y de laboratorio.
- 2 *Hormona* estimulante del folículo y hormona luteinizante (FSH y LH)
- 3 Citrato de clomífeno
- 4 Administración pulsátil del factor liberador de gonadotropinas (GnRH)
- 5 *Gonadotropina menopáusica humana (humano)*

Greenwald 1994.

La PMSG, es una hormona no hipofisaria, es una glicoproteína producida por las vellosidades coriónicas formadas por las células trofoblásticas presentes en la yegua gestante, en el momento de la implantación por lo que se considera de origen fetal. Esta gonadotropina tiene un alto contenido de ácido siálico (13%) que le confiere una vida media larga (aprox. 20 h comparada con la vida media de la FSH que es de sólo 2 h). Su actividad es principalmente parecida a la de la FSH y en menor proporción a la de la LH (Armstrong 1983)

Dos características principales de la PMSG son las que contribuyen a su eficiencia como un factor capaz de estimular eficazmente el crecimiento folicular.

a).- su larga vida biológica, atribuible como ya se dijo a su alto contenido de ácido siálico

b).- su capacidad para aumentar la actividad del complejo enzimático encargado de escindir la cadena lateral del colesterol, la colesterol esterasa y del citocromo P<sub>450</sub>, cuando se inyecta a ratas inmaduras (Leaver and Boyd 1981), lo cual redundó en un aumento general en la esteroidogénesis en el conejo (Younglai, 1984), el hámster (Matson 1981) y otras especies domésticas. Sin embargo, la vía por la cual las gonadotropinas estimulan el desarrollo folicular y el aumento en el número de ovocitos producidos en una ovulación aún no se ha esclarecido completamente

Algunos autores han establecido que los folículos pueden ser "rescatados" de la atresia (Tsafirri et al., 1984), sin embargo es necesario aclarar el concepto de "rescate de la atresia", ya que puede ser interpretado por lo menos de dos maneras diferentes, lo que indica la existencia de mecanismos alternos que determinan el número de folículos que se desarrollan. La administración de PMSG causa un aumento del número de folículos que inician el proceso de crecimiento y maduración, por encima del proceso normal. Estos folículos pueden provenir del grupo de folículos sanos pequeños (folículos de reserva), que no forman parte del grupo ovulatorio del ciclo actual, porque son muy inmaduros y tampoco contribuyen al grupo ovulatorio del ciclo subsecuente porque para entonces ya se encontrarían en estadios muy avanzados de desarrollo como para ser retenidos por 4 días más. En ausencia de PMSG, estos folículos están destinados a degenerar, en este sentido la PMSG "rescata" a estos folículos, porque los aparta del camino de la atresia. Un término menos ambiguo para esta acción hipotética de la PMSG puede ser "prevención de la atresia". La otra alternativa, es que los folículos deriven del grupo que ya comenzó a degenerar. El tratamiento hormonal puede realmente revertir el proceso de desintegración y regresar al folículo a la vía ovulatoria (Tsafirri et al., 1984), dicho sea de otra manera, la PMSG puede "revertir la atresia" (Hirshfield 1989). De tal manera que la superovulación contempla dos posibilidades:

a) - Observaciones *in vitro* sugieren que la atresia no es un proceso coordinado que involucre la muerte concertada de todas las células de la granulosa. La viabilidad residual de algunas de estas células de folículos atrésicos sugiere la posibilidad de que los folículos puedan ser rescatados de la atresia y retornar al grupo ovulatorio (Hirshfield 1989). Los tratamientos superovulatorios pueden revertir el proceso de desintegración folicular y re-encaminar a los folículos al proceso normal de ovulación.

La administración de FSH en concentraciones mayores a las normales (superovulación), es capaz de rescatar folículos antrales en estados tempranos de atresia y capacita a los folículos para que completen los pasos finales de la diferenciación dándoles de esta manera su potencial para la ovulación. Estas conclusiones se basan en los resultados de estudios *in vivo* e *in vitro*, que demuestran que el número de folículos dentro del grupo preovulatorio que inician el proceso de reclutamiento folicular es significativamente mayor que el número de folículos reclutados cuando los valores basales de FSH son los

habituales. En base a lo anterior se ha sugerido que la FSH es capaz de inducir cambios metabólicos en las células de la granulosa que facilitan el intercambio de gases y de nutrientes mediante un aumento en las uniones comunicantes, o bien la inducción de vías metabólicas alternas que favorecen la maduración folicular (Hirshfield 1991).

Estas observaciones han permitido a algunos investigadores especular acerca del papel de la hipoxia en el inicio y desarrollo de la atresia, suponiendo que ocurra a causa de la privación de substratos debida a cambios en la microcirculación tecal. Además la hipoxia parece estar involucrada en otros tipos de muerte celular durante el desarrollo, por ejemplo, durante la metamorfosis de los insectos. Además la hipoxia lleva a la pérdida de la homeóstasis del  $Ca^{2+}$  intracelular por una sobrecarga de  $Ca^{2+}$  en la mitocondria, daño irreversible a los organelos y finalmente la muerte celular (Hirshfield 1991).

Por otro lado la PMSG altera rápida y dramáticamente la morfología ovárica. La cavidad antral de los folículos sanos y atrésicos aumenta substancialmente de tamaño. Con dosis altas de PMSG, se ha observado también que disminuye el número de cuerpos apoptóticos en las capas de la granulosa de los folículos atrésicos. Estos cambios podrían indicar que los folículos atrésicos aparentemente pueden reactivarse y reasumir su crecimiento normal. Sin embargo, el aumento del diámetro folicular parece ser consecuencia del edema del antro, y no refleja un crecimiento verdadero. El bajo índice mitótico de los folículos "rescatados" indica que las células de la granulosa no proliferan y esto sugiere que tales folículos pueden estar moribundos, a pesar de que la cinética de disolución necrótica esté alterada por la presencia de dosis altas de PMSG. Además se ha observado que la mayoría de los ovocitos provenientes de estos folículos "rescatados" presentan cambios degenerativos (Hirshfield et al., 1989). Algunos resultados importantes publicados por Braw y Tsafri (1980), indican que la PMSG estimula a las células de la granulosa de los folículos atrésicos a fagocitar células moribundas y por lo tanto rescatar a los folículos de estadios de atresia tempranos.

b) - Otras investigaciones realizadas en bovinos también apoyan la idea del reclutamiento folicular y concluyen que el aumento en el número de folículos sanos preantrales y antrales tempranos después del tratamiento con PMSG se debe principalmente al reclutamiento de un mayor número de folículos, más que a una disminución de la atresia.

Estudios realizados con vacas ovariectomizadas unilateralmente en el día 7 y tratadas inmediatamente con PMSG y a las cuales se les extirpó el ovario restante  $148 \pm 23$  h después del inicio de la oleada endógena de LH demostraron que la ovariectomía unilateral no afectó el número de folículos normales preantrales y antrales tempranos ni el número de folículos atrésicos. Después del tratamiento con PMSG, en el ovario restante, aumentó significativamente el número de folículos preantrales y de los folículos con una formación incipiente de la cavidad antral mientras que el número de folículos antrales no se afectó. En las dos primeras categorías de folículos aquí mencionadas, la PMSG aumentó el índice mitótico aproximadamente al doble; pero no se observaron cambios en dicho índice en los folículos normales o en estadios tempranos de atresia (Monniaux, 1984).

Aunque en muchas especies las gonadotropinas estimulan a los folículos a crecer, previenen y/o revierten la atresia *in vitro*, este efecto no se ha observado en ratones *in vivo*. Se ha demostrado que los folículos ovinos atrésicos experimentan regeneración morfológica cuando se cultivan con gonadotropinas. En ausencia de PMSG todos los folículos en crecimiento excepto 1 o 2 destinados a ovular se vuelven atrésicos (Dhondt 1979). El aumento en el número de folículos grandes después del tratamiento con PMSG se lleva a cabo por el reclutamiento y/o la reducción de la atresia folicular. Cuando en cuerpos lúteos recientes se encuentran presentes abundantes células picnóticas, se considera que estos cuerpos lúteos fueron rescatados de estados tempranos de atresia (Monniaux 1984).

A pesar de las ventajas obvias que se pueden obtener al contar con un número mayor de ovocitos tanto en los programas de reproducción asistida como en la transferencia de embriones, algunos estudios parecen indicar que las dosis superovulatorias de hormonas provocan daños en la capacidad de los ovocitos para ser fecundados normalmente, lo que se refleja en una disminución de la proporción de ovocitos fertilizados (Walton EA et al., 1983). También se han mencionado fracasos en la implantación (Armstrong y Evans, 1983; Miller y Armstrong, 1981<sup>b</sup>, 1982) y la inducción de una frecuencia alta de anomalías en los embriones recuperados (Miller y Armstrong, 1981<sup>a</sup>; Yun et al., 1988), tanto de animales domésticos (Armstrong y Evans, 1983; Evans, 1980), como de animales de laboratorio (Adams, 1960; Beaumont y Smith, 1975). Sin embargo aún no se

ha demostrado si estas alteraciones son resultado de modificaciones en la maduración del ovocito que ocurren antes o después de la ovulación (Miller y Armstrong, 1981<sup>a,b</sup>; Yun et al., 1989)

Una dosis fisiológica de PMSG (4-8 UI), estimula el crecimiento y la ovulación de un número de ovocitos semejante al que se obtiene en un ciclo estral normal (12 -15 ovocitos por rata), produciendo una gestación normal (Nutl et al., 1975; Miller y Armstrong, 1981<sup>a,b</sup>, Yun et al., 1989, Baños et al 1996). En contraste, con dosis altas de PMSG (16 -40 UI) que induce una falla progresiva en los estadios tempranos de la gestación (Yun et al., 1989).

Los estudios sobre superovulación en ratas inmaduras hipofisectomizadas sugieren que la liberación endógena de LH se produce 53-57 h después de la administración de PMSG (Hillensjo et al., 1974, Sorrentino et al., 1972) Sin embargo, en otra investigación se demostró que puede haber ovulaciones a partir de las 24 h posteriores a la aplicación de la PMSG. En dicho estudio se inyectaron ratas inmaduras de 28 días con dosis de 4, 20 y 40 UI de PMSG y los animales se sacrificaron cada 6 o 12 h. Se determinaron las concentraciones de hormonas esteroides en sangre y en el homogeneizado de ovario, y la ovulación se confirmó contando el número de ovocitos presentes en el oviducto. Las dosis superovulatorias de PMSG (20 o 40 UI) indujeron una primera oleada de ovulación alrededor de las 24 a las 36 h y una segunda oleada entre las 48 y las 72 h dependiendo de la dosis administrada. El número de ovocitos que se recuperaron en la primera ovulación fue similar al que se obtiene en una ovulación normal (aprox. 15 ovocitos por rata), pero en la segunda el número aumentó a más de 58 ovocitos por rata (Yun et al., 1987).

La disminución de la fecundidad se relaciona directamente con las dosis de gonadotrofinas que se administran. La administración de dosis consideradas como fisiológicas de PMSG (4 a 8 UI) a ratas prepúberes producen ovocitos que al ser fecundados son capaces de desarrollarse normalmente sin que haya pérdidas embrionarias o fetales significativas (Nutl et al., 1975); sin embargo, se han observado algunas anomalías embrionarias sobre todo al principio de la gestación (Miller y Armstrong, 1981<sup>b</sup>), con dosis de 20 UI, las cuales se acentúan con dosis mayores (40 UI) (Yun et al., 1987)

En estudios realizados sobre superovulación se observó que con dosis de 16 UI de PMSG se produjo una ovulación normal, pero la implantación se retardó en el 30% de los animales, lo cual indujo una disminución en el número de animales que llevaron sus gestaciones a término. Cuando se administraron 40 UI de PMSG, los ovocitos ovulados fueron inmaduros y con menos células en el cumulus que los ovocitos normales. Además los ovocitos, de estos animales, que se recuperaron al tercer día después de que se produjo la superovulación fueron ovocitos anormales, los cuales a pesar de ser fertilizados fueron incapaces de llevar a cabo normalmente el proceso de implantación, ya que 5 días después de ser colocados dentro de la cavidad uterina no se observaron signos de implantación (Miller y Armstrong 1981<sup>b</sup>, Champlin et al , 1987)

Como una de las causas probables de las anomalías embrionarias se mencionan las de origen cromosómico. En el humano, se ha observado un aumento significativo en el número de trisomías en los fetos abortados de mujeres a quienes se les había inducido superovulación en comparación con las mujeres no tratadas (Boué y Boué, 1973). En el ratón el tratamiento con gonadotropinas produjo un aumento significativo en el número de fetos deformes (Elbling 1973) En otro trabajo en el que se utilizaron ratonas tratadas con dosis de 5 y 10 UI de PMSG, se observó una relación dosis-respuesta en la incidencia de poliploidías, principalmente triploidías en los embriones. Es posible que estas anomalías se produjeran como resultado de polispermia, indicando la presencia de algunos defectos en la zona pelúcida de los ovocitos superovulados (Mauddlin y Fraser en 1977). Sin embargo, recientemente se ha señalado que los ovocitos recuperados de ratas superovuladas son igualmente capaces de desarrollarse y que las fallas para mantener la gestación que se han reportado en estudios previos no son atribuibles a defectos en el ovocito (Walton 1983)

Se sabe que las dosis superovulatorias de PMSG provocan, 36 h después del tratamiento, un aumento marcado en las concentraciones séricas y ováricas de esteroides, principalmente de andrógenos. Este aumento se ha considerado como un factor de la mayor importancia relacionado con la presencia de ovocitos anormales. Cuando se administró un antiandrógeno (flutamida) después del tratamiento con PMSG se mejoró parcialmente el potencial de desarrollo de los ovocitos después de la

fecundación (Miller y Armstrong 1981a Walton y Armstrong 1981) La concentración de progesterona aumentó en todos los animales después de la inyección de PMSG sin que exista relación alguna entre este aumento y el número de ovulaciones. Los niveles de estradiol aumentaron 24 horas postratamiento los cuales persistieron aún después de que ocurrió la ovulación, este aumento postovulatorio de estradiol y la presencia de folículos grandes podrían ser la consecuencia de un efecto a largo plazo de la PMSG residual en el suero de los animales tratados. Se sabe que entre el 40 y el 60% de la dosis original de PMSG persiste en la circulación hasta después de 72h de la aplicación (Saumande 1980) Este hecho, aunado a su actividad predominante de FSH, pueden ser las causas responsables de la activación prematura de algunos ovocitos (Moor et al., 1985, Sasamoto et al., 1972)

El mecanismo por el cual la PMSG altera la esteroidogénesis folicular *in vivo* se desconoce aun, pero es posible que la actividad de LH, que presenta esta hormona, active la teca interna de los folículos reclutados para el crecimiento y aumente la síntesis de los precursores de andrógenos, el aumento en los niveles de estradiol en el líquido folicular que se observa 48 h después del tratamiento con PMSG puede ser resultado de un incremento en la conversión de dichos andrógenos a estrógenos por un aumento en la actividad del sistema de aromatasas en las células de la granulosa. Durante el crecimiento folicular los estrógenos estimulan un aumento en el número de receptores a LH y en las concentraciones intrafoliculares de progesterona 18 horas después del tratamiento con PMSG (Kumar 1992).

La importancia de los esteroides en la maduración de los ovocitos del mamífero ha sido muy notable, modificaciones en el patrón de esteroides del folículo preovulatorio del ovino durante la maduración *in vitro*, puede provocar anomalías citoplásmicas y nucleares en el ovocito que modifican su conducta durante el proceso de fertilización (Kumar., 1992). Las alteraciones en la esteroidogénesis folicular inducen la ovulación de muchos ovocitos que se encuentran dentro de folículos totalmente desarrollados, pero con apariencia histológica de atrésicos y que en ciclos normales no tendrían la oportunidad de ovular. Además, debe considerarse que el tratamiento superovulatorio puede inducir la ovulación de ovocitos que no han llegado al estadio de maduración adecuado para ser fertilizados (Miller y Armstrong, 1981a). Estos dos grupos, probablemente contribuyen a la

producción de las anomalías encontradas como consecuencia de la superovulación (Yun et al., 1987)

Tanto el aumento de los niveles de estrógenos durante la fase folicular y la fase lútea temprana, como el aumento en la actividad de las aromatasas inducido por la FSH en las células de la granulosa, conducen a una elevación en la concentración de estrógenos y a un estímulo del desarrollo folicular. La elevación prematura de la LH da como resultado una disminución de la actividad mitótica en las células de la granulosa y un aumento en los niveles intrafolículos de andrógenos y finalmente lleva a la atresia folicular. En base a esto se ha propuesto que el mejoramiento en la relación FSH/LH pudiera aumentar el número y la calidad de los ovocitos obtenidos por técnicas de superovulación (Doyle 1991).

La PMSG estimula la condensación prematura de la cromatina de los ovocitos de las cabras *in vivo* sin el rompimiento de la vesícula germinal, pero el mecanismo de acción no es muy claro. Se ha propuesto que la condensación de la cromatina puede requerir solo una activación parcial del factor promotor de la maduración (MPF) del ovocito, mientras que el rompimiento de la membrana nuclear requiere la actividad completa de este factor. Por lo tanto se ha propuesto que la actividad semejante a LH que presenta la PMSG puede activar parcialmente el MPF y por lo tanto inducir la condensación de la cromatina sin que se produzcan otros cambios importantes para la maduración normal del ovocito. Esta anomalía aparentemente ocurre en el momento de la maduración nuclear, aproximadamente 48 h después del tratamiento con PMSG en ovinos y bovinos, característica que no se ha observado en los animales sin estimular (Kumar 1992)

Otros estudios en ratas describen que cuando se utilizan dosis de 20 y 40 UI de PMSG se observa un aumento en el porcentaje de ovocitos anormales con signos visibles de degeneración (contracción del citoplasma, fragmentación, partenogénesis) el cual aumenta de una manera dosis dependiente de tal forma que con 20 UI el porcentaje mayor de anomalías (35%) se observó a las 72 h mientras que con 40 UI se observó un 60% de anomalías. Estudios subsecuentes sobre las características morfológicas de la maduración del núcleo en ovocitos de ratas inmaduras tratadas con 4 UI (testigo) y 20 UI (animales superovulados) de PMSG, sugieren que la PMSG induce ovulaciones

atípicas con una maduración nuclear prematura o asincrónica (Yun et al , 1987 y 1989; Moor, 1985).

La variabilidad de la respuesta a los tratamientos para estimular la ovulación cualitativa y cuantitativa es un factor limitante en el desarrollo de las prácticas de transferencia de embriones en el ganado. Por otro lado la exposición continua a PMSG puede ocasionar un choque anafiláctico, motivo por el cual se hace necesaria la neutralización del efecto de la PMSG con la utilización de anticuerpos monoclonales para disminuir tal riesgo. Además se ha observado que la respuesta ovulatoria de vacas tratadas con PMSG aumenta cuando se aplica un antisuero contra esta gonadotropina en el día del estro (Bevers 198, Dhondt, 1978, Saumade 1984).

### **Planteamiento del problema:**

Hasta el momento actual el mecanismo por el cual la PMSG produce superovulación no esta completamente claro. Los estudios antes mencionados indican que el aumento en el numero de folículos que forman parte del grupo ovulatorio en respuesta a los tratamientos superovulatorios con PMSG pueden deberse a la *prevención o reversión de la atresia folicular*. Puesto que los estudios recientes sugieren que un factor determinante en la iniciación y progreso del fenómeno de atresia folicular depende de la muerte por apoptosis de las células de la granulosa, es posible postular que la PMSG podría actuar mediante la modificación del proceso de la muerte celular apoptótica. Este mismo mecanismo de acción podría provocar que *folículos fisiológicamente destinados a experimentar el fenómeno de atresia sean rescatados de este proceso y lleguen a ser ovulados*, pero muestren cambios morfo-bioquímicos importantes que impedirán su fecundación adecuada, su implantación eficiente y/o su desarrollo embrionario posterior.

En este trabajo se estudió el efecto que *tienen diferentes dosis hiperoovulatorias de PMSG* (4, 20 y 40 UI) sobre la respuesta ovulatoria de ratas prepúberes a diferentes tiempos de acción (48, 60 y 72 h postratamiento), posteriormente, con la finalidad de entender un poco más los diferentes procesos celulares que participan en el proceso de la superovulación sobre la presencia y desarrollo del proceso de apoptosis en las células de la granulosa de los folículos de rata, se utilizaron las mismas dosis (4, 20 y 40 UI) de PMSG pero a tiempos diferentes, con el propósito de recuperar los folículos preovulatorios (52, 58 y 70 h) después del tratamiento hormonal, utilizando para tal fin, las técnicas de citometría de flujo recientemente descritas

## HIPOTESIS

La dosis de PMSG así como el tiempo de exposición a esta hormona tienen impacto sobre el patrón de muerte que presentan las células de la granulosa de los folículos ováricos de ratas prepúberes

## OBJETIVOS

Determinar la respuesta ovulatoria de ratas prepúberes tratadas con dosis superovulatorias (20 y 40 UI) de PMSG a diferentes tiempos de exposición hormonal.

Estudiar si el tratamiento de ratas prepúberes con PMSG disminuye el porcentaje de células de la granulosa muertas por apoptosis utilizando los parámetros de tamaño y complejidad celular (FSC y SSC), en el citómetro de flujo obtenidos con el programa Lysis

II

## **Material y Métodos:**

### **Obtención de las muestras:**

Se utilizaron ratas hembras Sprague Dawley de 27 días de edad con un peso entre 70 a 80 g, mantenidas bajo un régimen de 12 h de luz y 12 h de oscuridad y a una temperatura controlada de 20 - 25 °C. Los animales fueron alimentados a base de alimento comercial de Purina y agua *ad libitum*. Se formaron grupos de 6 ratas a los cuales se les administró PMSG (Folligon, Intervet Internacional (México)), por vía subcutánea (s.c) en 0.2 ml de solución de NaCl en diferentes dosis de acuerdo al siguiente esquema:

Grupo A: 4 UI (dosis considerada como fisiológica (Yun et al , 1987; Baños et al , 1996)

Grupo B: 20 UI (dosis superovulatoria intermedia)

Grupo C: 40 UI (dosis superovulatoria).

Las ratas se sacrificaron por dislocación cervical después de la aplicación de la PMSG, a diferentes tiempos: 48, 60 y 72 horas, la ovulación se confirmó contando los ovocitos presentes en el oviducto.

### **Procesamiento de la muestra:**

Los oviductos se mantuvieron hidratados en amortiguador de fosfatos-solución salina durante todo el tiempo, se examinaron bajo un microscopio estereoscópico (American optical instrument company) con fuente de iluminación eléctrica y un aumento 120x.

### **Respuesta ovulatoria:**

La masa de ovocitos se recuperó por punción del ápula (región más translúcida) del oviducto (Fig 1). Posteriormente, las células del cumulus se disgregaron por la exposición durante 10 minutos a hialuronidasa (0.2% Sigma) para facilitar la recuperación de los ovocitos. Una vez obtenidos, se contaron bajo el microscopio de disección. Para

cuantificar la aparición de ovocitos anormales, se hizo un estudio microscópico, más detallado el cual se realizó bajo un microscopio de mayor resolución (microscopio de contraste de fases), en donde se analizaron los cambios morfológicos del ovocito, observando la presencia de contracción del citoplasma, fragmentación, partenogénesis, u otros cambios degenerativos y se consideraron ovocitos normales cuando presentaron las siguientes características. presencia de cumulus oophorus y sin contracción citoplásmica, así como la ausencia de fragmentaciones.

### **Citometría de flujo:**

De los resultados obtenidos de esta serie de experimentos, con una recuperación reproducible de los folículos preovulatorios normales, se decidió puncionar los folículos de los ovarios obtenidos 2 h antes del tiempo en que ocurre la ovulación de los ovocitos fundamentalmente sanos. Los experimentos subsecuentes se realizaron formando grupos en las mismas condiciones que las descritas anteriormente, con la modificación de que fueron sacrificados a las 52, 58 y 70 h después de la aplicación de la gonadotropina

Los ovarios de estas ratas se extirparon dentro de un período no mayor de 30' después del sacrificio, se separaron los folículos mayores de 400  $\mu\text{m}$ , una vez obtenidos, los folículos se pincharon con una aguja calibre 25 x 16 mm, en un tubo eppendorf de 0.5 ml el cual contenía en todos los casos 50  $\mu\text{l}$  de amortiguador de fosfatos pH 7.4, posteriormente se centrifugaron a 250 x g a 4° C para obtener las células de la granulosa (Rosales et al., 1990, Ballesteros et al., 1992) (Fig 2).

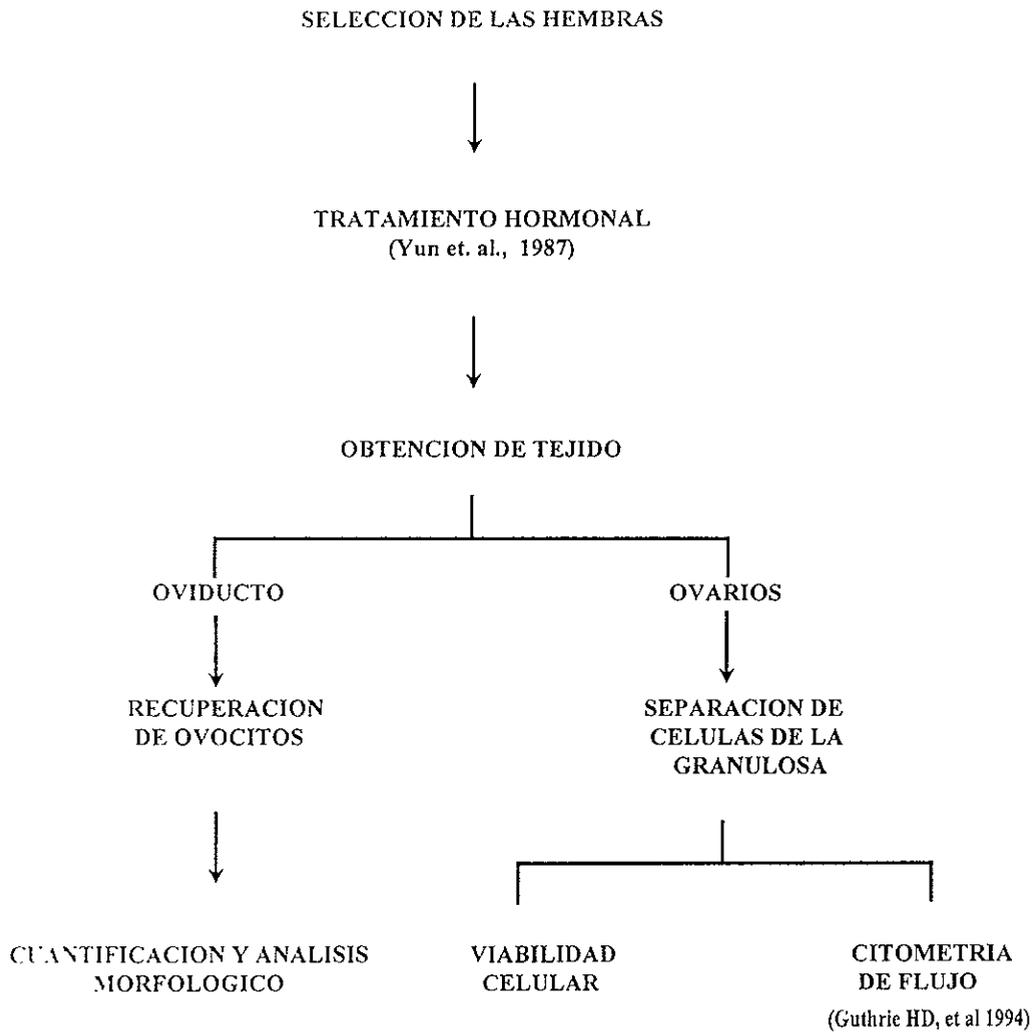
El paquete celular se resuspendió en 500  $\mu\text{l}$  de PBS pH 7.4 y se filtró a través de una malla de 35  $\mu\text{m}$ , finalmente, se lavó el tubo eppendorf con 500  $\mu\text{l}$  más de PBS que contenía el paquete celular, para obtener un volumen final de 1000  $\mu\text{l}$ , a este mismo volumen se adicionaron 10  $\mu\text{l}$  de RNasa más 10  $\mu\text{l}$  (50  $\mu\text{g}$ ) de Ioduro de Propidio y se incubó la muestra durante 10' a 4° en ausencia de luz (Fig. 3) La fluorescencia del Ioduro de propidio se midió entre 565 y 605 nm. La células se analizaron (adquirieron) en un citómetro de flujo Beckton Facsort, Mountain view, CA y el análisis de datos se realizó en un programa estándar de computadora (Lysis II) El número de células en cada caso fue

de 10,000 células. Los parámetros utilizados fueron dispersión lateral de la luz (Forward Scatter (FCS)) medida en una escala lineal y dispersión antero posterior de la luz (Side Scatter (SSC)) con una escala logarítmica, la fluorescencia que se consideró para el análisis se fijó en el número 2 de la escala.

Antes de iniciar el análisis en el citómetro de flujo, se tomó una alícuota (10 µl) de la muestra de células de la granulosa, para cuantificar la viabilidad celular mediante la prueba de exclusión de azul tripan.

### **Análisis de los datos:**

Para el análisis de los datos de las células de la granulosa de los 3 tratamientos se obtuvieron en su relación Forward contra Side scatter, así como la fluorescencia 2 (FL2 High). Para obtener los parámetros con los cuales se adquirieron, anteriormente todos los tratamientos, el citómetro se ajustó con células de la granulosa de ratas tratadas con 4 UI de PMSG donde se supone que existe una gran proporción de células vivas. Con el dato de FL2 se demostró que efectivamente correspondieran a células vivas de tal manera que se fijaron cuadrantes en las pantallas de cada adquisición, con valores de 224, 24.58 iguales para FL2/FSC y para SSC/FSC, por lo que la pantalla quedó dividida en cuatro cuadrantes: Lado superior izquierdo (UL), lado superior derecho (UR), lado inferior izquierdo (LL), y lado inferior derecho (LR). El análisis estadístico se realizó utilizando una prueba paramétrica de comparaciones múltiples (ANOVA) si este análisis dio una significancia estadística ( $p < 0.01$ ) entonces se utilizó la prueba de Student-Newman-Keuls para hacer la comparación entre grupos. El análisis estadístico se realizó utilizando el programa para computadora SigmaStat 2.0 del paquete Jandel Scientific.



# RECUPERACION DE OVOCITOS

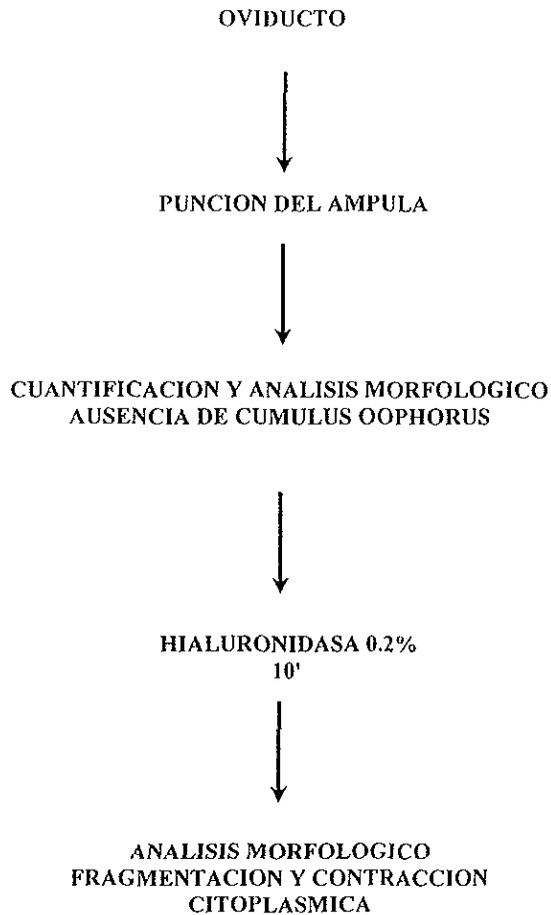


Fig. 1

# OBTENCION DE CELULAS DE LA GRANULOSA

## OVARIOS

DISECCION DE LOS FOLICULOS  
PUNCION  
CENTRIFUGACION 200 x 10' A 4°

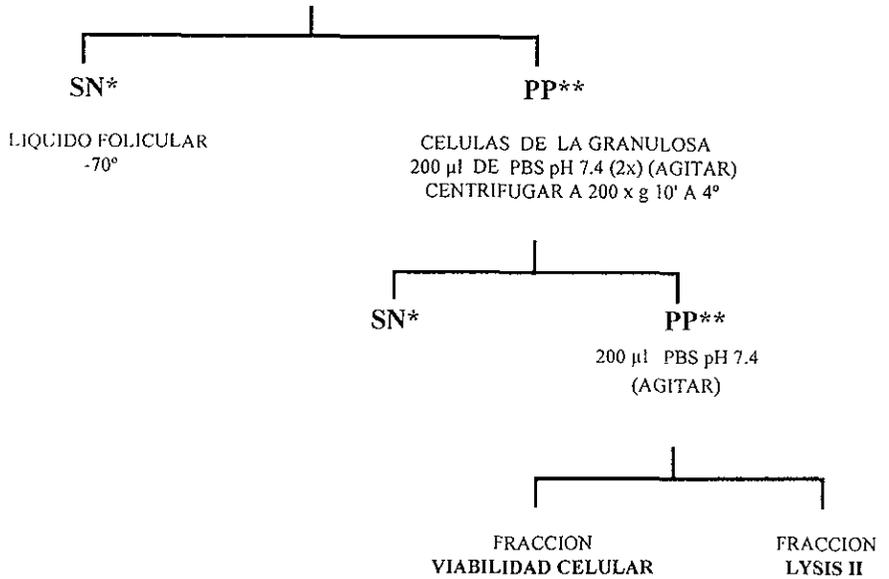


Fig. 2

\*\*Precipitado

\*Sobrenadante

## CITOMETRIA DE FLUJO (Lysis II)

(Guthrie HD, et al., 1994)

### Reactivos

*PBS pH 7.4: NaCl <sub>2</sub>	140.0 mM (Baker)
KCl	2.1 mM (Baker)
Na <sub>2</sub> HPO <sub>4</sub>	8.1 mM (Merck)
KH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub>	1.5 mM (Baker)

\*RNasa (Sigma)

\*Ioduro de Propidio 50µg en 10 µl (Sigma)

### Equipo.

\*Microscopio estereoscópico (American óptica instrument company) con fuente de iluminación eléctrica y un aumento 120x.

\*Centrifuga Avanti TM 30 Beckman

\*Potenciometro Beckman expandomatic SS-2

\*Citometro de Flujo FACS (Becton Bickinson, Mountain view, CA) equipado con una lámpara láser de argón de 488nm.

### Cristalería

\*Pipetas automáticas de 20, 100 y 1000 µl

\*Tubos eppendorf de 500µl

\*Puntas para pipetas de 20, 100 y 1000 µl

\*Tubos de 5ml para FACS

\*Filtro con malla de 35 µm

# CITOMETRIA DE FLUJO

(LYSIS II)

(Guthrie HD, et al 1994)

PAQUETE CELULAR  
500  $\mu$ l de PBS pH 7.4



FILTRAR A TRAVES DE UNA MALLA DE 35  $\mu$ m



VOL. FINAL DE 1000  $\mu$ l  
ADICIONAR 10  $\mu$ l DE RNasa  
10  $\mu$ l DE IODURO DE PROPIDIO



INCUBAR 10' A 4°  
EN AUSENCIA DE LUZ



ANALISIS POR CITOMETRIA DE FLUJO

Fig. 3

## VIABILIDAD CELULAR

### Reactivos

*PBS pH 7.4: NaCl <sub>2</sub>	140.0 mM (Baker)
KCl	2.1 mM (Baker)
Na <sub>2</sub> HPO <sub>4</sub>	8.1 mM (Merck)
KH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub>	1.5 mM (Baker)

\*Azul de Tripan 0.4% (Sigma)

### Equipo

\*Cámara de Neubauer (Hausser).

\*Microscopio de contraste (Reichert Austria)

## Resultados

### Respuesta ovulatoria:

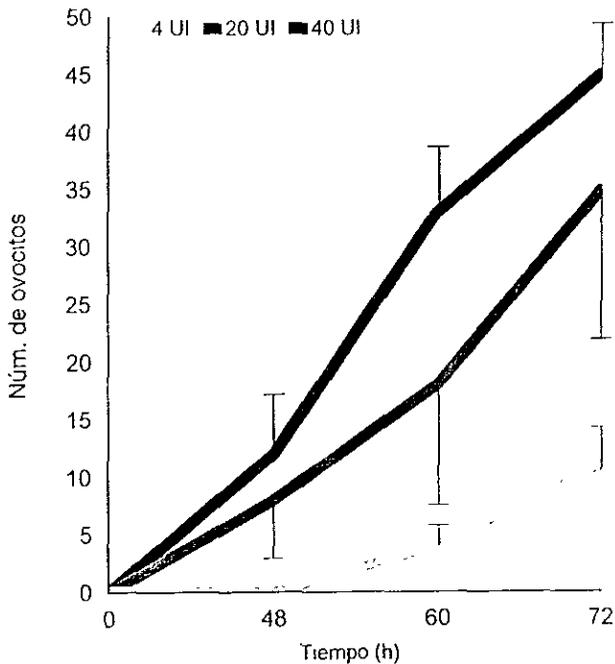
La tabla I presenta los resultados de la respuesta ovulatoria de ratas Sprague Dawley tratadas con una dosis de 4 UI considerada como fisiológica y 2 dosis superovulatorias, 20 y 40 UI de PMSG. Cuando se utilizó la dosis fisiológica de PMSG (4 UI) el porcentaje de ratas que respondieron con ovulación fue del  $23 \pm 8\%$  a las 60 h y del  $78 \pm 13\%$  a las 72 h posteriores al tratamiento, mientras que las ratas que recibieron dosis superovulatorias de PMSG (20 y 40 UI), tuvieron respuesta desde las 48h posteriores al tratamiento, siendo de  $53 \pm 9$  y  $61 \pm 16\%$  respectivamente y esta respuesta aumentó conforme al tiempo de exposición hormonal y a la dosis, de tal manera que con 20 UI se alcanzó el 100% de ovulación hasta las 72 h, mientras que con 40 UI este porcentaje se alcanzó a las 60 h. El número de ovocitos recuperados en cada tratamiento estuvo también positivamente relacionado con la dosis y el tiempo de exposición a la hormona.

**TABLA I. EFECTO DE DIFERENTES DOSIS DE PMSG EN LA TASA DE OVULACION Y LA CALIDAD DE LOS OVOCITOS DE RATAS SPRAGUE DOWLEY PREPUBERES.**

TRATAMIENTO	TIEMPO DESPUES DEL TRATAMIENTO CON PMSG.			
	48h	60h	72h	
4 UI DE PMSG	% Ovulación	0	$23 \pm 8$	$78 \pm 13$
	No. ovocitos	0	$4 \pm 2$	$11 \pm 4$
	% ovocitos anormales	0	0	0
20 UI DE PMSG	% Ovulación	$53 \pm 9$	$73 \pm 14$	100
	No. ovocitos	$8 \pm 5$	$18 \pm 10$	$35 \pm 14$
	% ovocitos anormales	37	33	63
40 UI DE PMSG	% Ovulación	$61 \pm 16$	100	100
	No. ovocitos	$12 \pm 5$	$33 \pm 6$	$45 \pm 5$
	% ovocitos anormales	25	24	60

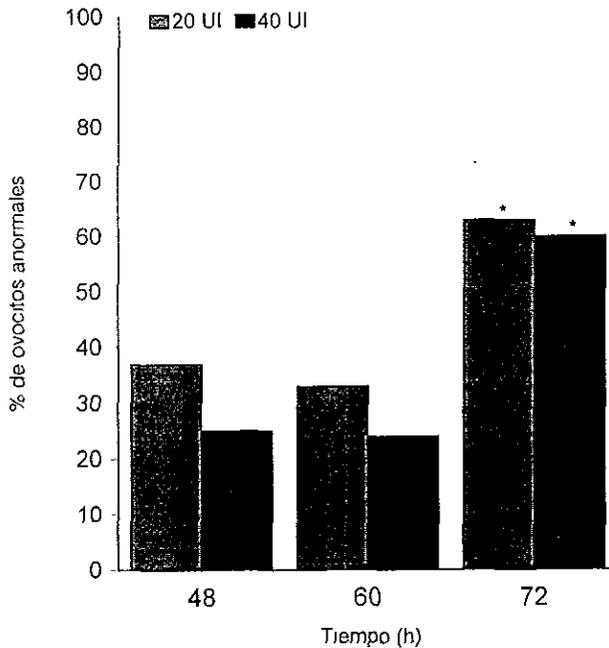
Los valores indican el  $X \pm DS$  de los resultados de 10 experimentos de 6 animales

Como se puede apreciar en la gráfica 1, el número de ovocitos recuperados cuando se utilizó la dosis fisiológica (4 UI) de PMSG, es de  $11 \pm 4$  a las 72 h que corresponde al número promedio de ovocitos ovulados durante un ciclo estral normal. Por el contrario cuando se utilizan dosis superovulatorias (20 y 40 UI) de PMSG el número de ovocitos recuperados fue significativamente diferente ( $p < 0.01$ ), con ambas dosis siendo de  $35 \pm 14$  y  $45 \pm 5$  respectivamente comparado con la dosis fisiológica (4 UI). Con 20 UI de PMSG el número de ovocitos ovulados presentó importantes variaciones que no fueron significativamente diferentes con 40 UI de PMSG.



Gráfica 1: Número de ovocitos recuperados del oviducto de ratas tratadas con 4, 20 y 40 UI de PMSG, a diferentes tiempos de exposición hormonal. Los valores representan el  $X \pm DS$  con un valor de  $p < 0.01$  comparada con 4 UI de PMSG.

Sin embargo, así como aumenta el número de ovocitos ovulados, también aumenta el porcentaje de ovocitos con signos morfológicos de degeneración (contracción del citoplasma, fragmentación y ausencia de cumulus ophorus) Gráfica 2 La dosis fisiológica de 4 UI no causa alteraciones en los ovocitos recuperados independientemente del tiempo de exposición hormonal Cuando se utilizan dosis superovulatorias de PMSG (20 y 40 UI) se producen alteraciones morfológicas en los ovocitos desde las primeras 48h superando el 60% a las 72 h posteriores al tratamiento con ambas dosis superovulatorias. Se puede observar que aunque la dosis determina la presencia de ovocitos anormales no hubo diferencias significativas entre 20 y 40 UI de PMSG, lo que quiere decir que el efecto de la PMSG sobre la presencia de ovocitos anormales fue tiempo dependiente ( $p < 0.01$ )



Gráfica 2 Porcentaje de ovocitos anormales recuperados del oviducto de ratas superovuladas a diferentes tiempos de exposición hormonal con 20 y 40 UI de PMSG \* Los porcentajes de ovocitos anormales a las 70 h fueron significativamente diferentes con un valor de  $p < 0.01$  con respecto a los demás tiempos.

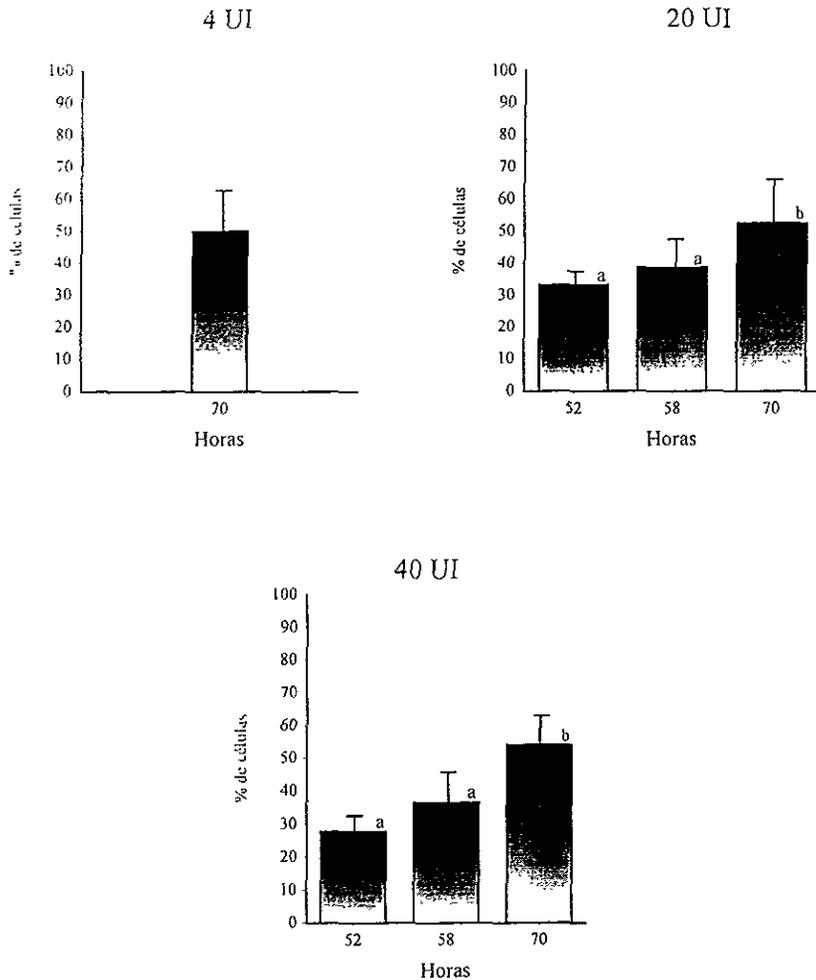
En la tabla II, se muestran los resultados del estudio citométrico de las células de la granulosa obtenidas de los folículos >400 µm recuperados a las 52, 58 y 70 h después de la aplicación de una dosis fisiológica (4 UI) y dos dosis superovulatorias (20 y 40 UI) de PMSG. Es importante recordar que para este caso los datos fueron analizados por la relación tamaño (FSC) contra complejidad (SSC) de cada célula y cada pantalla con esta relación se dividió en 4 cuadrantes lo que da 4 relaciones distintas: las células del cuadrante inferior izquierdo que son aquellas con bajo FSC y bajo valor de SSC que representan a células pequeñas normales; y las células del cuadrante inferior derecho que son células grandes normales, las células que se acumularon en los cuadrantes superiores corresponden a células muertas, las células pequeñas con alto valor de SSC corresponden a las apoptóticas y las del cuadrante superior derecho que tienen alto SSC y alto FSC a las células necróticas. Representados en las gráficas 5,6, y 7 para cada uno de los tiempos.

**TABLA II: EFECTO DE LA DOSIS DE PMSG Y EL TIEMPO DE EXPOSICION A ESTA HORMONA SOBRE EL TIPO DE MUERTE QUE PRESENTAN LAS CELULAS DE LA GRANULOSA DE FOLICULOS DE RATA.**

TIEMPO (h)	DOSIS DE PMSG U.I./RATA		
	4	20	40
<b>NECROSIS</b> (alto FSC+ alto SSC)			
52	0	33.13 ± 3.86	27.70 ± 5.43
58	0	38.47 ± 6.72	36.43 ± 6.09
70	50.02 ± 9.77	52.58 ± 12.65	54.11 ± 8.89
<b>APOPTÓISIS</b> (bajo FSC+alto SSC)			
52	0	58.53 ± 8.10	56.80 ± 7.12
58	0	54.49 ± 6.17	54.17 ± 6.22
70	33.69 ± 4.48	33.78 ± 7.89	28.31 ± 7.68

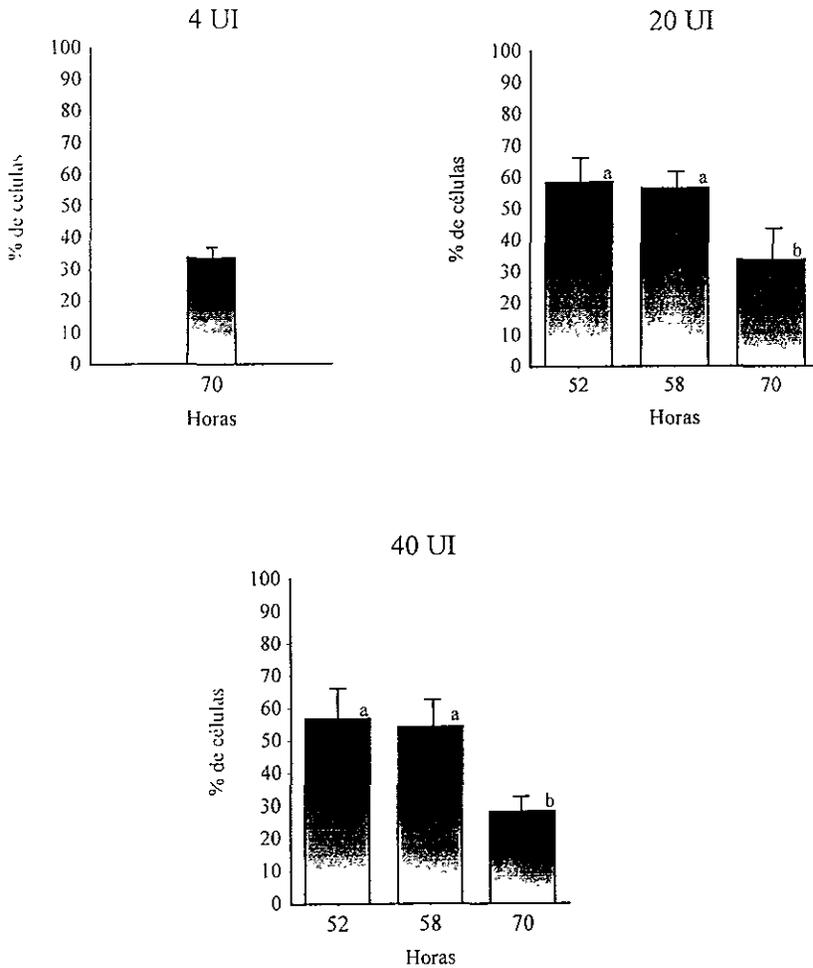
Los valores indican el X ± DS de los resultados de 10 experimentos de 6 animales

# NECROSIS



Gráfica 3. Efecto de la PMSG sobre el porcentaje de células necróticas. En el eje de las Y se gráfica el promedio  $\pm$  D.S. del porcentaje de células que sufrieron necrosis y en el de las X tiempo al que se recuperaron los folículos después de la aplicación de la hormonas (h). No hubo diferencias significativas entre las dosis, mientras que las letras diferentes significa que existe diferencia significativa ( $p < 0.001$ ) entre el efecto del tiempo de recuperación sobre este tipo de muerte.

# APOPTOSIS



Gráfica 4 Efecto de la PMSG sobre el porcentaje de células apoptóticas. En el eje de las Y se gráfica el promedio  $\pm$  D.S. del porcentaje de células que sufrieron apoptosis y en el de las X el tiempo al cual se recuperaron los folículos después de la aplicación de la hormona (h). No hubo diferencias significativas entre las dosis, mientras que las letras diferentes significa que sí existe esta diferencia significativa ( $p < 0.001$ ) El tiempo en este caso tiene un efecto inverso: a mayor tiempo menor porcentaje de células apoptóticas

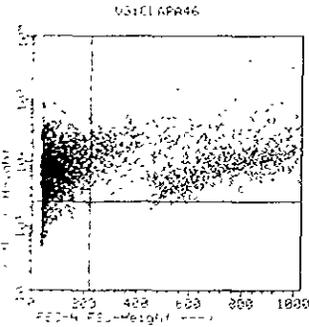
Si se separan los datos de acuerdo al patrón de muerte que presentan las células de la granulosa, en la gráfica 3 podemos observar que el  $50 \pm 9.77\%$  de las células recuperadas de folículos de ratas tratadas con 4 UI de PMSG mostraron un patrón citométrico característico de necrosis, es decir células grandes y complejas cuando se recuperaron a las 70 h después del tratamiento. Las células recuperadas de los folículos obtenidos de ratas superovuladas con dosis de 20 y 40 UI de PMSG, mostraron características de necrosis en el  $33.1 \pm 3.86\%$  y  $27.7 \pm 5.46\%$  de las células para ambos casos respectivamente, a las 52 h posteriores al tratamiento, mismas que aumentaron significativamente ( $p < 0.001$ ), conforme aumento el tiempo de exposición hormonal de tal manera que las 70 h fue de  $52.58 \pm 4.5$  y  $54.1 \pm 8.9\%$  con 20 y 40 UI de PMSG respectivamente. No se observó un efecto estadísticamente significativo de la dosis sobre el tipo de muerte, sin embargo el factor tiempo si fue significativamente diferente ( $p < 0.001$ ) en los tres horarios estudiados.

Los datos de las células que mostraron características citométricas de apoptosis se presentan en la gráfica 4. El  $33.69 \pm 4.48\%$  de las células de folículos recuperados de los animales que recibieron 4 UI de PMSG mostraron valores de bajo FSC y alto SSC células pequeñas y complejas que corresponden a las células apoptóticas. Un alto porcentaje ( $58.53 \pm 8.10\%$  y  $56.80 \pm 7.12\%$ ) de células de los animales tratados con dosis superovulatorias de PMSG (20 y 40 UI) respectivamente mostraron apoptosis a las 52 h posteriores al tratamiento, este porcentaje disminuyó significativamente ( $p < 0.001$ ), conforme aumentó el tiempo de exposición hormonal. A las 70 h se observó un  $33.78 \pm 7.89\%$  y  $28.31 \pm 7.68\%$  con 20 y 40 UI respectivamente de células apoptóticas.

25-JUL-97

TIME: 10:18:49

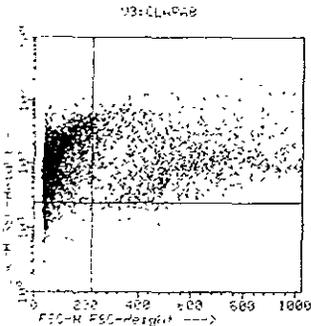
Arithmetic/Linear



U3:CLARA46

----- Quad Stats -----  
File: U3:CLARA46 Sample: 20 UI >400 002  
Date: 11/9/95 Ungated Sample  
Selected Preference: Arithmetic/Linear  
Parameters: FSC-H(LIN),SSC-H(LOG) Quad Location: 224,24.58  
Total= 10000 Gated= 10000

Quad	Events	% Gated	% Total	Xmean	Ymean
1 UL	6056	60.56	60.56	20.51	198.56
2 UR	3945	39.45	39.45	163.29	253.80
3 LL	848	8.48	8.48	15.31	16.17
4 LR	51	0.51	0.51	107.55	28.58



U3:CLARA8

----- Quad Stats -----  
File: U3:CLARA8 Sample: 40 UI >400 003  
Date: 10/11/95 Ungated Sample  
Selected Preference: Arithmetic/Linear  
Parameters: FSC-H(LIN),SSC-H(LOG) Quad Location: 224,24.58  
Total= 18000 Gated= 18000

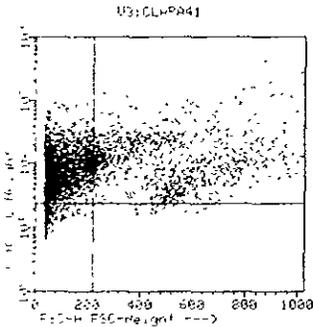
Quad	Events	% Gated	% Total	Xmean	Ymean
1 UL	5688	56.80	56.80	28.83	148.56
2 UR	3009	30.09	30.09	149.66	331.09
3 LL	1186	11.86	11.86	16.17	7.81
4 LR	125	1.25	1.25	99.04	19.26

Gráfica 5 Representa el comportamiento clasico de las celulas de la granulosa de los folículos de ratas tratadas con 20 UI (arriba) y 40 UI (abajo), recuperados a las 52h posteriores al tratamiento, observado durante el análisis citométrico. se muestra el porcentaje de células en cada uno de los cuadrantes, en su relacion FSC y SSC

25-JUL-97

Time: 10:39:45

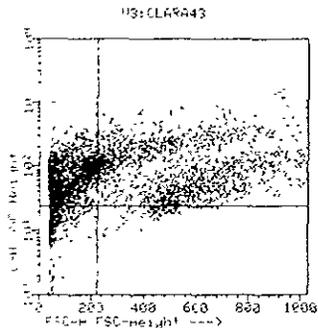
Arithmetic/Linear



U3:CLARA41

----- Quad Stats -----  
File: U3:CLARA41 Sample: 20 UI >400 002  
Date: 11/ 9/95 Ungated Sample  
Selected Preference: Arithmetic/Linear  
Parameters: FSC-H(LIN),SSC-H(LOG) Quad Location: 224,24.58  
Total= 10000 Gated= 10000

Quad	Events	% Gated	% Total	Xmean	Ymean
1 UL	5955	59.55	59.55	23.39	109.27
2 UR	2992	29.92	29.92	141.57	392.10
3 LL	914	9.14	9.14	15.54	16.93
4 LR	139	1.39	1.39	114.61	19.46



U3:CLARA43

----- Quad Stats -----  
File: U3:CLARA43 Sample: 40 UI >400 004  
Date: 11/ 9/95 Ungated Sample  
Selected Preference: Arithmetic/Linear  
Parameters: FSC-H(LIN),SSC-H(LOG) Quad Location: 224,24.58  
Total= 10000 Gated= 10000

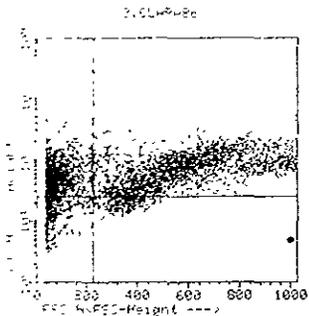
Quad	Events	% Gated	% Total	Xmean	Ymean
1 UL	4311	43.11	43.11	25.62	81.26
2 UR	3831	38.31	38.31	144.36	224.28
3 LL	1539	15.39	15.39	16.47	14.89
4 LR	328	3.28	3.28	109.34	19.33

Gráfica 6. Representa el comportamiento clásico de las células de la granulosa de los folículos de ratas tratadas con 20 UI (arriba) y 40 UI (abajo), recuperados a las 58h posteriores al tratamiento, observado durante el análisis citométrico, se muestra el porcentaje de células en cada uno de los cuadrantes, en su relación FSC y SSC

25-JUL-97

11:03:01

Arithmetic/Linear

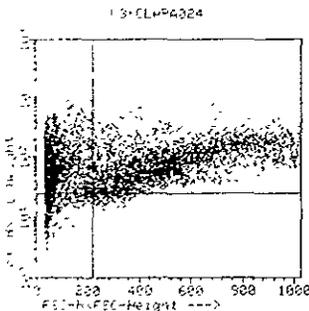


U3:CLARA06

----- Quad Stats -----

File: U3:CLARA06 Sample: 4 UI >400 003  
 Date: 9/20/95 Ungated Sample  
 Selected Preference: Arithmetic/Linear  
 Parameters: FSC-H(LIN),SSC-H(LOG) Quad Location: 224,24.58  
 Total= 10000 Gated= 10000

Quad	Events	% Gated	% Total	Xmean	Ymean
1 UL	2271	28.71	28.71	21.43	35.44
2 UR	5123	51.23	51.23	156.20	135.02
3 LL	1347	13.47	13.47	17.70	14.78
4 LR	659	6.59	6.59	67.80	19.01

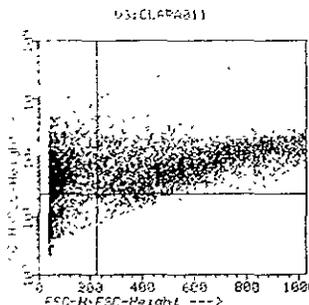


U3:CLARA024

----- Quad Stats -----

File: U3:CLARA024 Sample: .20UI >400 002  
 Date: 7/21/95 Ungated Sample  
 Selected Preference: Arithmetic/Linear  
 Parameters: FSC-H(LIN),SSC-H(LOG) Quad Location: 224,24.58  
 Total= 10000 Gated= 10000

Quad	Events	% Gated	% Total	Xmean	Ymean
1 UL	3332	33.32	33.32	22.27	131.30
2 UR	5483	54.83	54.83	146.91	161.29
3 LL	921	9.21	9.21	20.58	14.74
4 LR	264	2.64	2.64	76.00	20.30



U3:CLARA011

----- Quad Stats -----

File: U3:CLARA011 Sample: 11 40UI 0 001  
 Date: 7/3/95 Ungated Sample  
 Selected Preference: Arithmetic/Linear  
 Parameters: FSC-H(LIN),SSC-H(LOG) Quad Location: 224,24.58  
 Total= 10000 Gated= 10000

Quad	Events	% Gated	% Total	Xmean	Ymean
1 UL	3240	32.40	32.40	21.39	94.72
2 UR	5138	51.38	51.38	157.66	140.24
3 LL	1292	12.92	12.92	17.88	12.41
4 LR	330	3.30	3.30	98.09	18.60

Gráfica 7 Representa el comportamiento clásico de las células de la granulosa de los folículos de ratas tratadas con 4 UI (arriba), 20 UI (medio) y 40 UI (abajo) de PMSG, recuperados a las 70h después del tratamiento, durante el análisis citométrico, se muestra el porcentaje de células en cada uno de los cuadrantes, en su relación FSC/SSC.

## Discusión:

La aplicación de PMSG como inductor de la ovulación, es una práctica de uso común, sobre todo cuando se realizan estudios morfológicos y moleculares del desarrollo folicular y en mejora de los procesos reproductivos. La dosis de PMSG puede seleccionarse con el objeto de lograr un aumento en el número de ovocitos liberados en cada ciclo estral (superovulación) (Hirshfield 1991). Sin embargo, se ha observado que la administración de PMSG da como resultado un porcentaje alto de ovocitos con alteraciones morfológicas lo cual impide su adecuada fecundación o bien, en caso de ser fertilizados con frecuencia su desarrollo embrionario es incompleto (Miller et al., 1981<sup>b</sup>).

La administración de 4 UI de PMSG es considerada como la dosis fisiológica a la cual el total de los ovocitos ovulados son normales (Yun et al., 1987, 1989; Miller et al., 1981<sup>b</sup>). En este estudio se observó que cuando se administran dosis superovulatorias de PMSG (20 y 40 UI) en ratas prepúberes, el porcentaje de alteraciones morfológicas de los ovocitos está directamente relacionado con la dosis y el tiempo de exposición a la hormona (Tabla I; gráfica 1 y 2). Las anomalías ovocíticas (contracción citoplásmica, fragmentación, partenogénesis y ausencia del cumulus oophorus), aparecen a partir de las primeras 48 h (37 y 25% con 20 y 40 UI de PMSG respectivamente), aumentando significativamente el porcentaje de anomalías conforme al tiempo de exposición hormonal alcanzando el 62% a las 72 h con ambas dosis. Nuestros resultados coinciden con los descritos por Yun et al., (1987, 1989), quienes encuentran que al aumentar la dosis de PMSG el número de ovocitos recuperados es mayor, con un alto porcentaje de ovocitos anormales en una relación dosis-dependiente (Yun et al., 1987 y 1989).

Uno de los efectos inducidos por la PMSG es el aumento de la esteroidogénesis folicular. En ratas inmaduras superovuladas, se observa un aumento en la secreción de las hormonas esteroideas ováricas (principalmente estradiol) antes de la ovulación (Miller 1981<sup>b</sup>), por lo que se ha propuesto que este aumento estimula la maduración anormal de los ovocitos que se encuentran en folículos inicialmente atrésicos, y/o de ovocitos que no tienen la edad adecuada para ovular (Moor et al., 1985). Otro hallazgo que apoya nuestros datos es que la PMSG, al igual que la FSH, induce un aumento en el número de uniones comunicantes, lo que permite el intercambio de gases y nutrientes produciendo una

maduración folicular rápida e inadecuada (Hirshfield 1991). Este mismo grupo de investigación informa que durante la superovulación se estimula el funcionamiento de vías metabólicas alternas que favorecen las condiciones anaerobias, causando un daño irreversible en los organelos y una alteración en la homeostasis del  $\text{Ca}^{2+}$  intracelular, lo que podría estar relacionado con la activación de ciertas endonucleasas que conducen finalmente hacia la muerte celular (Hirshfield 1991).

Hasta hace algunos años, se aceptaba de manera general que el proceso conocido como necrosis era la causa fundamental de la muerte de los componentes celulares del foliculo durante la atresia, debido a que las características morfológicas correspondían a muerte por necrosis (Rosales et al., 1989, Rosado et al 1991) La identificación de otro tipo de muerte celular, conocido como apoptósis con características bioquímicas y morfológicas diferentes a la necrosis, permite revalorar la muerte celular del foliculo y proponer que la apoptósis es la muerte celular a través de la cual degeneran las células de la granulosa durante la atresia (Hughes et al., 1991).

Estudios recientes han permitido cambiar, el concepto sobre los procesos que participan en el fenómeno de la atresia folicular. Algunos autores sugieren que la atresia constituye un ejemplo de apoptósis (Guthrie et al., 1994), mientras que otros señalan la participación de fenómenos degenerativos característicos de la necrosis (Rosado et al., 1991, Ballesteros et al., 1992, García et al 1997).

Nosotros proponemos apoyados en nuestros resultados, que durante la atresia hay una participación activa e importante de los dos procesos mencionados en el párrafo anterior. Los cambios asociados con la atresia se inician aparentemente en las células de la granulosa, en las cuales al igual que otros tipos celulares que experimentan el fenómeno de apoptósis, se observa que durante las etapas finales de la diferenciación celular, se activan endonucleasas dependientes de  $\text{Ca}^{2+}$  y  $\text{Mg}^{2+}$  ocasionando la fragmentación internucleosomal del DNA, siendo ésta, una de las principales características de la apoptósis (Tilly et al., 1992<sup>b</sup>; Jolly et al 1994, Blondin et al., 1996). En algunos casos, antes de que se activen las enzimas endonucleasas, es posible encontrar un aumento de enzimas lisosomales en el liquido folicular y en el interior de las células de la granulosa, lo

que podría indicar la participación de un proceso de necrosis en las etapas tempranas de la atresia folicular (Ballesteros et al , 1992)

La citometría de flujo permite discriminar y cuantificar células vivas, células en proceso de apoptosis y células necróticas. La técnica se fundamenta en las diferencias de tamaño y la complejidad entre células necróticas y células apoptóticas, así como en la fluorescencia emitida por la adición de un fluorocromo (ioduro de propidio), que se une al DNA e indica, en células que no han sido fijadas, que la membrana celular ha sido dañada (Dive et al , 1992)

Nuestros resultados del estudio citométrico de las células de la granulosa de ratas superovuladas con las diferentes dosis empleadas demuestran la presencia tanto de apoptosis como de necrosis. En el grupo A que corresponde a 4 UI de PMSG, las células obtenidas a las 70 h, se observó que el  $33.69 \pm 4.48\%$  de las células de la granulosa mostraban características citométricas de apoptosis, bajo FSC/alto SSC y un  $50.0 \pm 9.77\%$  de las células mostraron características de necrosis, alto FSC/alto SSC (Tabla II, gráficas 3 y 4). Lo anterior indica que aún con dosis fisiológicas de PMSG existe una alta incidencia de muerte celular en los folículos ováricos y que la necrosis es el tipo de muerte que predomina en esas condiciones. Evidencias recientes (Jolly et al., 1994; Blondin et al., 1996) han demostrado la fragmentación internucleosomal del DNA en células de la granulosa de folículos morfológicamente sanos; lo que sugiere que la apoptosis ocurre en estadios muy tempranos de la atresia, aún cuando no se hayan detectado cambios morfológicos o bioquímicos aparentes. Si bien, nosotros comprobamos la presencia de apoptosis a dosis fisiológicas, también detectamos que la necrosis es el tipo de muerte más frecuente bajo estas condiciones. Los resultados de nuestro trabajo también demuestran que el uso de PMSG en dosis de 20 y 40 UI tiene un efecto importante sobre el tipo de muerte celular que sufren las células de la granulosa, y que el tiempo de exposición a la hormona es el factor que determina el tipo de muerte. Cuando se administraron dosis de 20 y 40 UI y los tiempos de recuperación de los folículos fueron de 52 y 58 h, predominó la muerte por apoptosis siendo muy similares los porcentajes para los dos horarios y las dos dosis, sin que se observaran diferencias estadísticamente significativas. De estos resultados podemos deducir que uno de los efectos tempranos de la PMSG es activar el programa genético de la apoptosis en las

celulas de la granulosa, probablemente ocasionado por la PMSG al inducir la síntesis de proteínas disparadoras de la apoptosis, la cual requiere además de la síntesis de ARN la producción proteínas para que se presente.

Es posible que existan señales intrafoliculares que induzcan la actividad de endonucleasas y ocurra la fragmentación del DNA en las células de la granulosa y de la teca antes de que se presenten cambios morfológicos y funcionales asociados con la atresia. Las alteraciones del DNA intrafolicular pueden resultar en la reducción de la transcripción de genes ováricos específicos que codifiquen proteínas necesarias para el mantenimiento de la integridad folicular e inicien una cascada de eventos que concluyan con la muerte general del folículo (Tilly et al, 1992<sup>b</sup>) En trabajos realizados con Timocitos a los que se les indujo apoptosis con glucocorticoides, se observó un aumento en 7 transcriptos por lo que proponen que por lo menos 6 nuevas proteínas se expresan antes de que haya transcurrido una hora del tratamiento, y demuestran que la apoptosis se bloquea por la presencia de inhibidores de la síntesis de ARNm y de proteínas. Sin embargo, esto no constituye un fenómeno universal, ya que la apoptosis es un proceso asincrónico en el que las células se encuentran en diferentes momentos del proceso y/o poseen diferentes mecanismos para la inducción de la apoptosis (Steller 1995; White 1993, Gerscheson 1992)

En nuestros datos las células de la granulosa de los folículos de las ratas tratadas con 20 y 40 UI de PMSG mostraron para ambas dosis un patrón de muerte celular en el que se observa un aumento en el porcentaje de necrosis, semejante al de las células recuperadas a este tiempo pero con dosis fisiológicas (4 UI) de la hormona, en donde la necrosis predomina sobre la apoptosis. La fagocitosis de las células apoptóticas requiere la participación de un proceso de digestión celular semejante a la necrosis, es posible proponer que en este caso, el tipo de muerte que predomina durante el proceso de atresia folicular es la necrosis, como una consecuencia del proceso apoptótico. Este comportamiento puede estar relacionado con la actividad de algunas enzimas lisosomales, responsables de los procesos inflamatorios, se ha observado un aumento en la actividad de fosfatasa ácida en las células de la granulosa de folículos que presentan cambios degenerativos (Kleiman 1987). Estas investigaciones coinciden con el trabajo de Baños (1996), en el que demuestra que las dosis superovulatorias de PMSG inducen

modificaciones importantes en la fisiología lisosomal que regula los cambios bioquímicos que acompañan el crecimiento y la maduración folicular (*ibid supra*). Nuestros resultados indican que la dosis es importante disparadora de la apoptosis cuando se pasa de una dosis fisiológica de 4 a 20 UI de PMSG, sin embargo entre 20 y 40 UI ya no se observa un efecto importante o al menos la diferencia no es estadísticamente significativa, por lo que en este caso el factor determinante en el patrón de muerte que siguen las células de la granulosa es el tiempo de exposición a la hormona más que la dosis.

El grupo de Yun (1987) publicó el efecto de diferentes dosis de PMSG sobre la integridad funcional del foliculo. Sugiere que las alteraciones en el medio intrafolicular pueden ser determinantes en la presentación de las anomalías del ovocito, principalmente aquellas relacionadas con las concentraciones de hormonas esteroides, indicando que de estas la más importante pudieran ser los andrógenos. En efecto, existe una correlación positiva entre los niveles de andrógenos y el porcentaje de ovocitos anormales. Con la aplicación de 20 UI de PMSG se encontró que el máximo en la secreción de andrógenos se produjo a las 60 h, mientras que después de la inyección de 40 UI de PMSG se tuvieron valores muy altos de andrógenos a las 52 h. Las relaciones tiempo/dosis/concentración de andrógenos precisadas por Yun y su grupo de trabajo (1987), entre los diferentes tratamientos, coinciden con los nuestros, en los tiempos en los cuales se presenta la disminución en el porcentaje de viabilidad de las células de la granulosa. Esto parece apoyar el hecho de que la PMSG es una hormona que en dosis superovulatorias induce la ovulación de folículos que ya habían comenzado el proceso de atresia (Brawn y Tsafirí, 1980).

Es claro que las gonadotropinas y sus receptores juegan un papel importante en la determinación de las células que permanecerán funcionales y de las que están destinadas a morir. Sabemos que las hormonas sexuales son importantes reguladores del proceso de atresia, sin embargo sigue existiendo la interrogante acerca de cuales son los mecanismos que determinan que un foliculo pierda receptores a gonadotropinas y al mismo tiempo su capacidad para aromatizar y por lo tanto sea encaminado directamente hacia la atresia. Uno de los primeros eventos de la atresia, es la pérdida de la capacidad de las células de la granulosa para aromatizar y poder transformar andrógenos a estrógenos, esta pérdida del sistema de enzimas aromatasas ha sido comprobada ya en

varias especies domésticas como son los porcinos (Maxson et al., 1985), bovinos (Henderson et al., 1984) y ovinos (Carson et al., 1979), aunque esta actividad también está disminuida en folículos pequeños (<5 mm) de los bovinos (McNatty et al. 1979).

La presencia de fragmentación internucleosomal del DNA en folículos clasificados morfológicamente como atrésicos esta relacionada con una disminución significativa de la concentración de estradiol en el líquido folicular comparado con las concentraciones de folículos sanos del mismo tamaño (Mc Natty et al., 1979; Jolly et al., 1994). La muerte celular de las células de la granulosa por apoptosis, está regulada *in vivo* por estrógenos y andrógenos. La ausencia de estrógenos en animales hipofisectomizados ocasionó un aumento del DNA fragmentado siguiendo un comportamiento tiempo dependiente y el tratamiento de estos animales con benzoato de estradiol previno la fragmentación del DNA. Los andrógenos tienen acción antagónica a la de los estrógenos por lo tanto son capaces de producir apoptosis en células de la granulosa (Billig et al 1993), sin embargo el mecanismo por el cual los estrógenos desarrollan su acción antiatrésica aun no se conoce, aunque es posible predecir que se deba a que estas hormonas esteroides participan en la regulación de la endonucleasa dependiente de  $Ca^{2+}$  y  $Mg^{2+}$ . Sin embargo la regulación hormonal de la actividad de endonucleasa parece ser tejido dependiente ya que los mismos esteroides pueden mostrar acciones opuestas en tejidos diferentes (Cho-Chung 1978; Rocco et al., 1992; Wyllie 1980; Compton and Cidlowski 1986).

Aún no es claro si los cambios en el patrón de secreción hormonal son causa o consecuencia de la atresia, de cualquier manera lo que es un hecho es que en la atresia folicular la muerte celular apoptótica es fundamental en el proceso de degeneración del folículo. Nuestros resultados parecen indicar que las dosis superovulatorias de PMSG muy probablemente induzcan al crecimiento y la ovulación de folículos que estaban destinados o ya estaban en el proceso de la atresia como ha sido sugerido por algunos otros autores (Tsafiri y Brawn 1984). Esto también explicaría el alto porcentaje de ovocitos con alteraciones que son ovulados después de la estimulación con gonadotropinas, por que si bien es cierto que el ovocito es cronológicamente una de las últimas células que se dañan durante el proceso de la atresia (Byskow et al., 1974, Carson et al., 1979), es muy probable que el estímulo hormonal en la hiperovulación solo magnifique y/o adelante los daños a esta célula.

De acuerdo con nuestros resultados los folículos bajo tratamiento superovulatorio inician su *estimulación hormonal* con un nivel muy alto de células muertas, ocasionado principalmente por necrosis. Esto sugiere que la PMSG activa el programa de muerte en las células de la granulosa. Al respecto Yun et al, (1987) encuentran que 20 UI de PMSG obtienen un número importante de ovocitos ovulados a las 60 h posteriores al tratamiento, mientras que cuando se administra la dosis de 40 UI el mejor rendimiento en el número de ovocitos fue a las 72 h. Sin embargo, transcurridas las primeras 12 h del tratamiento se observan ovocitos ovulados, lo cual indica que existe una gran dinámica de los folículos estimulados con PMSG y que el inicio del crecimiento celular no es al mismo tiempo y con la misma velocidad.

## Bibliografía:

- Adams CE. (1960) Prenatal mortality in the rabbit *Oryctolagus cuniculus*. *J. reprod fertil* 1 36- 44
- Adams GP, Kot K, Smith CA and Ginther OJ (1993) Selection of a dominant follicle and suppression of follicular growth in heifers. *Anim reprod. sci* 30 259 - 271
- Adashi YE, Resnick C, Hernandez ER, Marjorie E, Svoboda EH, Clemmons DR, Lund PK and Van WJJ (1989) Rodent studies on the potential relevance of insulin-like growth factor (IGF-I) to ovarian physiology in growth factors and the ovary. *Serono symposium USA editado por An Hirschfield N Y Eppinget-Verlag* 1989 pag 95 - 105.
- Alvarez-Bylla A and Merchant-Larios H. (1986). Mouse primordial germ cells use fibronectin as a substrate for migration. *Exp. cell res* 165: 362-368
- Amsterdam A, Plehn-Dujowich D and Suh BS. (1992). Structure-function relationships during differentiation of normal and oncogene - transformed granulosa cells. *Biol. reprod* 46 513 - 522
- Armstrong DT, Evans G (1983) Factors influencing success of embryo transfer in sheep and goats. *Theriogenology* 19 31 - 42
- Bachvarova R, Cohen EM, De Leon V, Tokunaga K, Sakiyama S and Paynton BV (1989<sup>a</sup>) Amounts and modulation of actin mRNAs oocytes and embryos. *Dev.* 106: 561-565.
- Bachvarova R, Cohen EM, De Leon V, Tokunaga K, Sakiyama S and Paynton BV (1989<sup>b</sup>). Amounts and modulation of actin mRNA during meiotic maturation of mouse oocytes. *Dev. Biol* 108: 325-331
- Bagchi MK, Tsai MJ, O'Malley BW, Tsai SY. (1992) Analysis of the mechanism of steroid hormone receptor dependent gene activation in cell-free system. *Endocrin rev* 13: 525 - 535
- Ballesteros LM, Rosales AM, Rosado A, Hernández-Pérez O (1992) Activity, compartmentalization and subcellular distribution of lysosomal enzymes during follicular maturation on the goat. *Animal reprod sci* 27 129-139
- Baños EM, Rosales AM, Ballesteros LM, Hernández-Pérez O, Rosado A (1996) Changes in Lysosomal enzyme activities in pre-ovulatory follicles and endometrium of PMSG superovulated rats. *Archives medical res* 27 (1): 49-55
- Beaumont HM, Smith AF (1975) Embryonic mortality during the pre and post-implantation periods of pregnancy in immature mice after superovulation. *J reprod fertil* 45 437 - 448
- Bevens MM, Dieleman SJ, Tol DM, Blankenstein DM and Broek J. (1989) Changes in pulsatile secretion patterns of LH, FSH, progesterone, androstenedione and oestradiol in cows after superovulation with PMSG. *J reprod fert.* 87 745 - 754.
- Billing H, Furuta I and Hsueh AJW. (1993). Estrogens inhibit and androgens enhance ovarian granulosa cell apoptosis. *Endocrinol* 133: 2204 - 2211
- Billing H, Furuta I and Hsueh AJW. (1994) Gonadotropin-releasing hormone directly induces apoptotic cell death in the rat ovary. Biochemical and in situ detection of deoxyribonucleic acid fragmentation in granulosa cells. *Endocrinol.* 134 245 - 252.

Bissonnette RP, Echeverri A, Mahboubi A and Green D. (1992). Apoptotic cell death induced by c-myc is inhibited by bcl-2. *Nature* 359: 552 - 554

Blondin P, Dufour M. and Sirard MA (1996) Analysis of atresia in bovine follicles using different methods: flow cytometry, enzyme-linked immunosorbent assay, and classic histology. *Biol. Reprod.* 54: 631 - 637

Ejersing L (1978) *Maturation, morphology and endocrine function of the follicular wall in mammals*. In Jones R E de *The vertebrate ovary*. NY Plenum Press. pg. 181-214

Bomsel-Helmreich O, Gougeon A, Thebault A, Saltarelli D, Milgrom E, Frydman R, and Papiernik E. (1979) Healthy and atretic human follicles in the preovulatory phase: differences in evolution of follicular morphology and steroid content of follicular fluid. *J. Clin. Endocrinol. Metab.* 48: 686 - 694

Boue JG and Boue A (1973). Increased frequency of chromosomal anomalies in abortions after induced ovulation. *Lancet* 1: 679

Braw RH and Tsafirri A (1980). Effect of PMSG on follicular atresia in the mouse ovary. *J. Reprod. Fert.* 59: 267 - 272.

Byscow AGS (1974) Cell kinetics of follicular atresia in the mouse ovary. *J. Reprod. Fert.* 37: 277 - 285

Carson RS, Findlay JK, Burger HG, and Trounson AO (1979) Gonadotropin receptors of the ovine ovarian follicle during follicular growth and atresia. *Biol. Reprod.* 21: 75 - 87

Clark JM and Eddy EM (1975) Fine structure observations on the origin and associations of primordial germ cells of the mouse. *Dev. Biol.* 47: 130 - 155

Champlin AK, Kuzia SJ, Rice BA, Mobraaten L E (1987) Cell surface characteristics of blastocyst from spontaneously ovulating and gonadotropin-treated mice. *Biol. Reprod.* 36: 439 - 444.

Cho-chung YS, Clarke IJ, (1978) Interaction of cyclic AMP and estrogen in tumor growth control. In Sharma R, Criss WE (de) *Endocrine control of neoplasia*. Raven Press, NY. pg. 335-346

Chrest JF, Buchholz AM, Kim HJ, Kwon TK and Nordin AA. (1993). Identification and quantitation of apoptotic cells following anti-CD3 activation of murine Go T cells. *Cytometry* 14: 883 - 890

Compton MM, Cidlowski JA. (1986). Rapid in vitro effects of glucocorticoids on the integrity of rat lymphocyte genomic deoxyribonucleic acid. *Endocrinol.* 118: 38 - 45

Dekel NS (1985). Epidermal growth factor induces maturation of rat follicle enclosed oocytes. *Endocrinol.* 116: 406 - 409

Devorshak-Harvey E, Bona-Gallo, Gallo RV (1989) Ovarian regulation of pulsatile luteinizing hormone secretion during late gestation in the rat. *J. Neuroendocrinol.* 1: 257 - 264

Dive C, Gregory CD, Phipps DJ, Evans DL, Milner AE and Wyllie AH (1992) Analysis and discrimination of necrosis and apoptosis (programmed cell death) by multiparameter flow cytometry. *Biochem. Biophys. Acta* 1133: 275 - 285.

Doyle MB, Thornton LK, Seifer BD and Decherney AH. (1991) Induction of ovulation for IVF and its effect on the luteal phase. *Annals NY Acad. Sc.* 626: 217 - 227

Dhondt D, Bouters R, Spincemalle J, Coryn M, Vandeplassche M. (1978) The control of superovulation in the bovine with a PMSG-antiserum. *Theriogenology* 9, 529 - 534

Dorrington JH, Bendell JJ and Khan S. (1993) Interactions between FSH, estradiol-17 $\beta$  (regulate growth and differentiation in the rat gonad). *J steroid biochem molec. biol.* 44 441 - 447

Donovan P.J., Stott D., Cairns L.A., Heasman J. And Wylie C.C. (1986) Migratory and postmigratory mouse primordial germ cells behave differently in culture. *Cell* 44. 831-838

Fibling L. (1973) Doses gonadotropin induced ovulation in mouse cause malformations in the offspring. *Nature* 246.37 - 39

Eifont EA, Roszka JP and Dimino MJ. (1992). Cytochemical studies of acid phosphatase in ovarian follicles. A suggested role for lysosomes in steroidogenesis. *Biol. reprod.* 17 787 - 795

Eppig J, Freter R, Ward-Bayle P, Schultz R. (1983). Inhibition of oocyte maturation in the mouse. Participation of cAMP, steroid hormones, and a putative maturation-inhibitor factor. *Dev. biol.* 100 39 - 49

Frickson GF, Garzo VG, Magoffin DA. (1989) Insulin-like growth factor-I regulates aromatase activity in human granulosa and granulosa luteal cells. *J. endocrinol. metab.* 68 717 - 724

Espey L.L. (1978) *Ovulation en Jones R.E. de The vertebrate ovary.* NY Plenum Press

Espey L.L. and Lipner H. (1994). *Ovulation en Physiology of reproduction* 2da. ed. editado por Knobil E and Neill J.D. Raven Press, Ltd, NY Pg 725-780

Evans G, Robinson T.J. (1980). The control of fertility in sheep. *Endocrine and ovarian response to progestagen-PMSG treatment in the breeding season and in anestrus.* *J. agric. camb.* 94 69 - 88.

Freeman M.E. (1994) *The neuroendocrine control of the ovarian cycle of the rat en Physiology of reproduction* 2da. ed. editado por Knobil E and Neill J.D. Raven Press, Ltd, NY pg 613 - 658

Freter R, Schultz R. (1984) Regulation of murine oocyte maturation: evidence for a gonadotrophin-induced, cAMP-dependent reduction in a maturation inhibitor. *J. cell. biol.* 98 1119 - 1128

Fujinata H, Yamoto M, Shikone T and Nakano R. (1994). FSH and LH up-regulate epidermal growth factor receptor in rat granulosa cells. *J. endocrinol.* 140 171 - 177.

García R., Ballesteros L.M., Hernández-Pérez O., Rosales A.M., Espinosa R., Soto H., Díaz de León, L. and Rosado A. (1997) Metalloproteinase activity during growth, maturation and atresia in the ovarian follicles of the goat. *Anim. reprod. sci.* 47 211 - 228.

Gerschenson L.E. and Rotello R.J. (1992) Apoptosis a different type of cell death. *Faseb j.* 6 2450 - 2454

Goodman R.L., Daniel K. (1985) Modulation of pulsatile luteinizing hormone secretion by ovarian steroids in the rat. *Biol. reprod.* 32 217-225

Godin I., Wylie C.C. (1991) TGF- $\beta$  inhibits proliferation and has a chemotropic effect on mouse primordial germ cells in culture. *Development* 113 1451-1457

- Grant SA, Hunter MG, and Foxcroft GF. (1989) Morphological and biochemical characteristics during ovarian follicular development in the pig. *J reprod fertil* 86: 171 - 183
- Greenwald SG (1977) Exogenous progesterone influence on ovulation and hormone levels in the cyclic hamster. *J endocrinol* 73: 151-155.
- Greenwald SG and Shyamal K R. (1994). Follicular development and its control in *Physiology of reproduction 2da ed editado por Knobil E and Neill JD*. Raven Press, Ltd, NY pg 629 -
- Guitligan A, Turner A and Vaitukaites JL. (1986) Divergent metabolism of human chorionic gonadotropin subunits within rat ovarian lysosomes. *Biochem biophys res comm* 134: 1197 - 1203
- Guthrie HD, Welch GR, Cooper BS, Zakaria AD and Johnson LA (1994) Flow cytometric determination of degraded deoxyribonucleic acid in granulosa cells to identify atretic follicles during preovulatory maturation in the pig. *Biol reprod* 50: 1303 - 1311.
- Hagino N and Goldzieher JW (1970) Effect of timing and quality of estrogen on gonadotrophin-induced ovulation in immature rats. *Endocrinology* 86: 29 - 33
- Hay MF, Cran DG, and Moor RM., (1976). Structural changes occurring during atresia in ovarian follicles. *Cell tissue res* 169: 515 - 529.
- Haynes JL. (1988). Principles of flow cytometry. *Cytometry supplement* 17: 7 -17
- Heller DT, Cahill DM and Schultz RM. (1981) Biochemical studies of mammalian oogenesis: metabolic cooperativity between granulosa cells and growing mouse oocytes. *Dev Biol* 84: 45 - 54.
- Henderson KM, Kieboom LE, McNatty KP, Lun S, Heath D. (1984) (125) hCG binding to bovine thecal tissue from healthy and atretic antral follicles. *Mol. cell endocrinol* 34: 91 - 98
- Henderson KM, Kieboom LE, McNatty KP, Lun S, Heath D (1985). Gonadotropin-stimulated cytol cycle AMP production by granulosa cells from Boorrola X Rommey ewes with and without a fecundity gene. *J reprod fertil* 75: 111 - 120
- Hengartner MO, Ellis RE and Hovitz HR (1992) *Caenorhabditis elegans* gene ced-9 protects cells from programmed cell death. *Nature* 356: 494 - 499
- Hickey GJ, Chen S, Besman MJ, Shively JE, Hall PF, Gaddy-Kurten D and JoAnne SR (1988). Hormonal regulation, tissue distribution, and content of aromatase cytochrome P450 messenger ribonucleic acid and enzyme in rat ovarian follicles and corpora lutea. relationship to estradiol biosynthesis. *Endocrinol* 122: 1426 - 1436.
- Hillensjo T, Barnea A, Nilsson L, Herlitz H, Ahren K (1974) Temporal relationship between serum LH levels and oocyte maturation in prepuberal rat injected with pregnant mare gonadotrophin. *Endocrinology* 95: 1762 - 1766
- Hirshfield AN, Flickinger GL and Ben-Rafael Z (1988). Flow cytometric analysis of granulosa cell proliferation in rats. *J reprod fert* 84: 231 - 238.
- Hirshfield AN (1989). Rescue of follicles in vitro and vivo. *Biol reprod* 40: 181 - 190
- Hirshfield AN. (1991) Development of follicles in the mammalian ovary. *Int rev cytol* 124: 43 - 101

Hsueh WJW, Billing H and Tsafiri A (1994) Ovarian follicle atresia: A hormonally controlled apoptotic process. *Endocrine rev.* 15: 707 - 724

Hughes FM Jr and Gospe WC (1991). Biochemical identification of apoptosis (programmed cell death) in granulosa cells: evidence for a potential mechanism underlying follicular atresia. *Endocrinol* 129: 2415 - 2422

Huschtscha LI, Jeitner TM, Andersson CE, Barter WA and Tattersall HN (1994) Identification of apoptotic and necrotic human leukemic cells by flow cytometry. *Experimental cell res* 212: 161 - 165

Hurwitz A and Adashi YE. (1992) Ovarian follicular atresia as an apoptotic process: a paradigm for programmed cell death in *endocrine tissues*. *Mol cell endocrinol* 84: 19 - 23

Hussein A, Facog RM and Brinson AO (1975) Preovulatory granulosa cells and steroidogenesis: An ultrastructural study in the rhesus monkey. *Obstet gynecol* 47: 562 - 568

Ireland JJ and Roche JF (1983) Development of antral follicles in heifers: changes in steroids in follicular fluid and receptors for gonadotropins. *Endocrinol* 112: 150 - 156

JoAnnes R (1980) Maturation of ovarian follicles: Actions and interactions of pituitary and ovarian hormones on follicular cell differentiation. *Physiology rev* 60: 51 - 78

Jolly PD, Tisdall DJ, Heath DA, Lun S and McNatty KP (1994) Apoptosis in bovine granulosa cells in relation to steroid synthesis, cyclic adenosine 3',5'-monophosphate response to follicle stimulating hormone and luteinizing hormone, and follicular atresia. *Biol. reprod.* 51: 934 - 944

Kastan MB, Zhan QWS, El-Deiry F, Carrier T, Jacks WW, Walsh BS, Plunkett B, Vogelstein and Fornace AJ (1992) A mammalian cell cycle checkpoint pathway utilizing p53 and GADD45 is defective in ataxia-telangiectasia. *Cell* 13: 587 - 597

Kane B A (1995). Redefining cell death. *American journal of pathology* 146: 1-15

Kerr JFR, Winterford CM and Harmon BV. (1994) *Apoptosis: its significance in cancer and cancer therapy*. *Cancer* 73: 2013 - 2026.

Kleiman D, Insler V, Leiberman JR, Glezerman MG, Albotiano S, Potashnik G and Meizner I. (1987) Acid phosphatase levels in follicular fluids following induction of ovulation in vitro fertilization patients. *J in vitro fertil Embryo transfer* 4: 181 - 184

Koering JM, Danforth RD and Hodgen DG. (1991) Early folliculogenesis in primate ovaries: testing the role of estrogen. *Biol. reprod.* 45: 890 - 897.

Kumar J, Osborn JC, Cameron Awn and Trounson AO (1992) Follicular steroidogenesis and oocyte maturation after superovulation of goats (*Capraa hircus*) with gonadotrophins. *J reprod fert* 95: 371 - 378

Leaver HA, Boyd Gs (1981) Action of gonadotrophin hormones on cholesterol side-chain cleavage and cholesterol ester hydrolase in the ovary of the immature rat. *J reprod fert* 63: 101-108

Lennon SV, Martin SJ and Cotter TG. (1991) Dose dependent induction of apoptosis in human tumor cell lines by widely diverging stimuli. *Cell prolifer* 24: 203 - 214

- Liang LF, Chamow SM and Dean J.(1990) Oocyte-specific expression of mouse zp-2  
Developmental regulation of the zona pellucida genes Mol cell biol 10 1507-1515
- Liang LF and Dean J (1992) Oocyte developmental. Molecular biology of the zona pellucida  
Vitamins and Hormones 47 115- 159
- Lobo RA (1991) The menstrual cycle en Infertility, contraception and reproductive endocrinology  
Editado por Lobo RA, Mishel DR and Devajan V 3ª ed Hamilton printing company pg 104 - 110.
- McNatty KP, Makris A, DeGrazia C, Osathonondh R and Ryan KJ (1979) The production of  
progesterone, androgens, and estrogens by granulosa cells, thecal tissue, and stromal tissue from  
human ovaries in vitro J clin endocrinol met 49 687 - 699
- Maudlin I, Fraser LR (1977).The effects of PMSG dose on the incidence of chromosomal anomalies  
in mouse embryos fertilized *in vitro* J. reprod. fertil. 50 275  
280
- Maruo T, Ladines-Llave CA, Samoto T, Matsuo H, Manalo A, Ito H and Mochizuki M (1993)  
Expression of epidermal growth factor and its receptor in the human ovary during follicular growth  
and regression Endocrinol 132: 924 - 931
- Matson PI Tyler JPP , Collins WP. (1981) Follicular steroid content and oocyte meiotic status after  
PMSG stimulation of immature hamsters J reprod fert 67: 443-452
- Maxson WS, Haney AF, Schomberg DW ( 1985). Steroidogenesis in porcine atretic follicles loss of  
aromatase activity in isolated granulosa and theca. Biol reprod 33 495 - 501
- Miller BG, Armstrong DT (1981a) Effect of superovulatory dose of pregnant mare serum  
gonadotropin on ovarian function, serum estradiol and progesterone levels and early embryo  
development immature rats Biol reprod. 25 261 - 271.
- Miller BG, Armstrong DT. (1981b). Superovulatory doses of pregnant mare serum gonadotropin  
cause delayed implantation and fertility immature rats. Biol. reprod. 25:253 - 260
- Miller BG, Armstrong DT (1982) Infertility in superovulated immature rats. Role of ovarian steroid  
hypersecretion Biol reprod 26:861 - 868
- Miura M, Zhu H, Rotello R, Hartweg EA, Yuan J (1993). Induction of apoptosis in fibroblasts by IL- $\beta$   
converting enzyme a mammalian homologue of the C elegans cell death gene ced-3 Cell 75 653 -  
660
- Monniatux D, Mariana JC, Gibson WR (1984) Action of PMSG on follicular populations in the  
heifer J reprod fertil 70: 243 - 253
- Morales TI, Woessner JF, Marsh JM and LeMaire WJ (1983). Collagen, collagenase and  
collagenolytic activity in rat Graafian follicles during follicular growth and ovulation Biochem  
biophys acta 756 119 -122
- Moor RM , Dott HM and Cran DG (1978) Macroscopic identification and steroidogenic function of  
atretic follicles in sheep J. endocrinol. 77 309 - 318
- Moor RM, Osborn JC, Cran DG and Walters DE ( 1981). Selective effect of gonadotrophins on cell  
coupling, nuclear maturation and protein synthesis in mammalian oocytes J embryol exp morph  
61 347 - 365

- Moor RM Osborn JC, Crosby IM (1985) Gonadotropin-induced abnormalities in sheep oocytes after superovulation J reprod fertil 74 167 - 172
- Niswender DG and Terry MN (1994) Corpus luteum and its control in infraprimates species en Physiology of reproduction 2da ed editado por Knobil E and Neill JD Raven Press, Ltd , NY pg 781 -816
- Nuti K M Sridharan BN, Meyer RK (1975) Reproductive biology of PMSG primed immature female rats Biol reprod. 13 38 - 44
- Paynton BV, Rempel R and Bachvarova R. (1988) Changes in state of adenylation and time course of degradation of maternal mRNA during oocyte maturation and early embryonic development in the mouse Dev 129 304 - 314
- Paynton BV, Rempel R and Bachvarova R (1990) Changes in maternal RNAs during oocyte maturation en Fertilization in mammalian editado por Bavister BD, Cummins J and Roldan ERS, Sero Symposium, USA Norwell, Massachusetts, pg 25 - 34.
- Ramirez VD and Lin DW (1994) The neuroendocrine control of the rabbit ovarian cycle Physiology of reproduction 2da ed editado por Knobil E and Neill JD. Raven Press, Ltd , NY pg.. 585 - 611
- Roco JR, Liederman RC, Lepoff RB and Gerchenson LE (1992) Characterization of uterine epithelium apoptotic cell death kinetics and regulation by progesterone new and RU 482 Am j. pathol 140 449 - 456
- Roller RJ, Kinloch RA, Hiraoka BY, Li SS and Wassarman PM (1989). Gene expression during mammalian oogenesis and early embryogenesis Quantification of three messenger RNAs abundant in fully grown mouse oocytes Development (Cambridge, UK) 106: 251 - 261
- Rosado, A y Rosales TAM (1991). Maduración folicular en el mamífero. Atresia, determinantes bioquímicos Ciencia 42: 81 - 97
- Rosales TAM and Rosado A (1989) Bioquímica de la maduración folicular en el mamífero Ciencia 40 275 - 288
- Rosales TAM, Hernández-Pérez O, Domínguez R, Mercado E and Rosado A (1990) Proteolytic activities in goat antral follicles Anim reprod sci 23 213 - 222.
- Ruiz DMF (1988) Fundamentos de embriología y fisiología de la reproducción Recopilación de textos básicos editado por la UNAM , México DF
- Sasamoto S, Sato K, Naito H (1972) Biological active life of PMSG on mice with special reference to follicular ability to ovulate J reprod fertil 30 371 - 379
- Saumade J (1980) Concentrations of luteinizing hormone, oestradiol-17-  $\beta$  and progesterone in the plasma of heifers treated to induce superovulation. J endocrinol. 84: 425 - 437
- Saumade J Procureur R and Chupin D. (1984) Effect of injection time of anti-PMSG antiserum on ovulation rate and quality of embryos in superovulated cows Theriogenology 21 727 - 731
- Schultz RM and Wassarman PM (1977) Specific changes in the pattern of protein synthesis during meiotic maturation of mammalian oocytes *in vitro* Proc natl acad sci USA 75 4160-

Schwartz NB (1982) Novel peptides in ovarian follicular fluid implications for contraceptive development *Research frontiers in fertility regulation*. 2 1-11

Schwartzman AR And Cidowski AJ (1993). Apoptosis The biochemistry and molecular biology of programmed cell death *Endocrine rev* 14 133- 151

Sorrentino S Jr, Reiter RJ, Lee LA, Schalch DS (1972) Timing and neural pathways involve in release of luteinizing hormone after pregnant mare serum administration, *Neuroendocrinology* 9:341 - 348

Steller H ( 1995) Mechanisms and genes of cellular suicide *Sci* 267 1445 - 1462

Szego CM (1976) Steroid-protein binding From circulating blood to target cell nucleus. *Gynecol Invest* 7 251 - 279.

Tilly JL, Kowalski KI, Johnson AL and Hsueh AJW (1991) Involvement of apoptosis in ovarian follicular atresia and postovulatory regression *Endocrinol* 129 2799-2801.

Tilly JL, Billing H, Kowalski KI and Hsueh AJW (1992). Epidermal growth factor and basic fibroblasts growth suppress the spontaneous onset of apoptosis in cultured rat ovarian granulosa cells and follicles by a tyrosine kinasa-dependent mechanism *Mol endocrinol* 6 1942 - 1950

Tilly JL, Billing H, Kowalski KI, Schomberg WD and Hsueh AJW (1992) Apoptosis in atretic ovarian follicles is associated with selective decreases in messenger ribonucleic acid transcripts for gonadotropin receptors and cytochrome P450 aromatase *Endocrinol* 131 1670 - 1676

Tsafriri A and Brawn RH (1984) Experimental approaches to atresia in mammals *Oxford rev reprod biol* 6. 266 - 275

Uitenbroek JT, Meijs-Roelofs HMA, Woutersen PK, Cappellen WA, Gribling-Hegge LA, and Greef WJ (1985) Changes in ovarian steroidogenesis in prepuberal rats induced to ovulate by low doses of human chorionic gonadotrophin *J. endocrinol* 107 113 - 119

Wang L, Miura M, Bergeron L, Zhu H, Yuan J (1994) Ich-1, an Ice/Ced-3 related gene, encodes both positive and negative regulators of programmed cell death *Cell* 78: 739 - 750.

Walton EA , Armstrong DT (1981) Ovarian function and early embryo development in immature rats given a superovulatory dose of PMSG, late neutralize by antiserum *Biol. reprod* 27.841 - 846.

Walton EA, Evans G, Armstrong DT (1983) Ovulation response and fertilization failure in immature rat induced to superovulate *J reprod fertil*. 67 91 - 96

Watson VJ and Erba E ( 1994) Flow cytometry en *Animal cell culture A practical approach* 2da ed editado por Freshney RI IRL PRESS, Oxford University Press, Oxford pg 165 - 212

Wassarman PM and Albertin FD (1994). The mammalian ovum en *Physiology of reproduction* 2da ed editado por Knobil E and Neill JD Raven Press, Ltd., NY pg 79 - 122.

Wassarman PM and Josefomiez WJ (1978) Oocyte development in the mouse: a ultrastructure comparison of oocyte isolate at various stages of growth and meiotic competence. *J morphol* 156 209 - 236

White E (1993) Death-defying acts: a meeting review on apoptosis *Genes dev* 7 2277 - 2284

Wise T. (1987) Biochemical analysis of bovine follicular fluid albumin, total protein, lysosomal enzymes, ions, steroids and ascorbic acid content in relation to follicular size, rank, atresia classification and day of estrous cycle. *J anim sci* 64 1153 - 1169.

Wiensen JF and Midgley RA Jr. (1993) Changes in expression of connexin 43 Gap junction messenger ribonucleic acid protein during ovarian follicular growth *Endocrinol* 133 741 - 746

Wylie CC (1980). Primordial germ cells in anuran embryos their movement and its guidance. *Bio science* 30 27 - 31

Yuan J (1996). Evolutionary conservation of a genetic pathway of programmed cell death. *J. cell biochem* 60 4-11

Younglai E U (1984) Effects of pregnant mare s serum gonadotrophin administered *in vivo* on steroid accumulation by isolated rabbit ovarian follicles *Acta endocrinology* 107: 531-537

Yun YW, Ho Yuen B , Moon YS (1987) Effects of superovulatory doses of pregnant mare serum gonadotropin on oocyte quality and ovulatory and steroid hormone responses in rats. *Gamete res* 16 109 - 120

Yun YW, Ho Yuen M, Moon YS (1988) Effects antiandrogen flutamide, on oocyte quality and embryo development in rats superovulate with pregnant mare serum gonadotropin *Biol reprod.* 39 279 - 286

Yun YW, Yu FH, Yuen BH, Moon YS (1989) Effects of a superovulatory dose of pregnant mare serum gonadotropin on follicular steroid contents and oocyte maturation in rats *Gamete res* 23:289 - 298

Zeleznik AJ, Ihring LL and Steven GB (1989) Developmental expression of  $Ca^{2+}/Mg^{2+}$  dependent endonuclease activity in rat granulosa and luteal cells. *Endocrinol.* 129 2218 -2220