



UNIVERSIDAD NACIONAL AUTÓNOMA
DE MÉXICO

MAESTRÍA EN CIENCIAS DE LA PRODUCCIÓN Y DE
LA SALUD ANIMAL

PARTICIPACIÓN DEL FACTOR DE
CRECIMIENTO ENDOTELIO VASCULAR (VEGF)
EN LA ATRESIA FOLICULAR DE LA OVEJA

T E S I S
PARA OBTENER EL GRADO DE
MAESTRO EN CIENCIAS

PRESENTA:
VERÓNICA SANGRADOR RODRÍGUEZ

TUTOR:
DRA. ANA MARIA ROSALES TORRES

COMITÉ TUTORAL:
DR. CARLOS G. GUTIÉRREZ AGUILAR
DRA. MARCELA VERGARA ONOFRE



Universidad Nacional
Autónoma de México



UNAM – Dirección General de Bibliotecas
Tesis Digitales
Restricciones de uso

DERECHOS RESERVADOS ©
PROHIBIDA SU REPRODUCCIÓN TOTAL O PARCIAL

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

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

AGRADECIMIENTOS

A los Doctores:

Ana María Rosales Torres, Marcela Vergara Onofre y Carlos Gutiérrez Aguilar por haber aceptado ser parte de mi Comité Tutoral y principalmente por su apoyo para la realización de esta Maestría.

Al M en C. Francisco Javier García Vázquez por su colaboración en la parte técnica de este proyecto.

A mis compañeros del laboratorio Bioquímica de la Reproducción, ya que cada uno puso un grano de arena para poder concluir este proyecto.

Al CONACYT por la beca otorgada para poder realizar los estudios de Maestría.

DEDICATORIAS

A mis padres: Leopoldo Sangrador y María del Carmen Rodríguez.

A mis hermanos: Gerardo y Luz Sangrador.

A mis Abuelos: Abraham Rodríguez y Graciela González

A la persona incondicional que siempre está a mi lado: Corín Diéguez.

A la Dra. Ana María Rosales Torres por todos los momentos de tolerancia y comprensión para conmigo y principalmente por el apoyo en toda la extensión de la palabra.

A la Dra. Marcela Vergara Onofre, no sólo por el tiempo y los conocimientos compartidos sino por su gran calidad humana.

CONTENIDO	PÁGINA
DEDICATORIAS	I
AGRADECIMIENTOS	II
RESUMEN	III
ABSTRACT	IV
1. INTRODUCCIÓN	1
2. REVISIÓN DE LITERATURA	4
2.1. Desarrollo Folicular	4
2.1.1. Reclutamiento	7
2.1.2. Selección	10
2.1.3. Dominancia	13
2.2. Atresia Folicular	16
2.2.1. Muerte celular en la atresia folicular	18
2.3. Angiogénesis, desarrollo folicular, atresia y VEGF	23
2.4. Factor de Crecimiento Endotelio Vascular	29
3. PLANTEAMIENTO DEL PROBLEMA	34
3.1. Hipótesis	35
3.2. Objetivo General	35
3.3. Objetivo Específico	35

4. MATERIAL Y MÉTODOS	36
4.1. Preparación del líquido folicular equino	36
4.2. Diseño experimental	36
4.3. procesamiento de la muestra	37
4.4. Clasificación folicular morfológica	38
4.5. Inmunohistoquímica	38
4.6. Conteo de células positivas a VEGF	39
4.7. Intensidad en la expresión de VEGF	39
4.8. Análisis estadístico	40
5. RESULTADOS	41
5.1. Respuesta al tratamiento de sincronización	41
5.2. Clasificación folicular por condición morfológica	41
5.3. Clasificación folicular por tamaño y condición morfológica	41
5.4. Expresión de VEGF en células de la granulosa	42
5.5. Intensidad de inmunotinción para VEGF por Tratamiento	42
5.6. Intensidad de inmunotinción para VEGF en folículos sanos y atrésicos	42
6. DISCUSIÓN	44
7. CONCLUSIÓN	49
8. LITERATURA CITADA	50
9. APÉNDICES Y ANEXOS	62

LISTA DE CUADROS Y FIGURAS

PÁGINA

Figura 1.	Características morfológicas de folículos sanos y atrésicos. Fotografías campo 40X de cortes histológicos de folículos teñidos en HyE: 1) folículo sano con capa multilaminar de células de granulosa intacta y bien organizada, 2) folículo con atresia temprana, muestran un escaso desprendimiento de la capa de células de la granulosa, y 3) folículo con atresia avanzada, con una capa de células de granulosa desorganizada, llegando a perder por completo las capas de células de granulosa.	64
Cuadro 1.	Porcentaje de folículos clasificados como sanos y atrésicos por tratamiento	65
Cuadro 2.	Número y porcentaje de folículos menores y mayores a 5 mm clasificados como sanos, ligeramente atrésicos o atrésicos avanzados.	66
Figura 2.	Porcentaje de células de la granulosa positivas a VEGF en folículos de diferentes tratamientos.	67
Cuadro 3.	Porcentaje de células de la granulosa positivas a VEGF en folículos de diferentes tratamientos.	68
Figura 3.	Fotografías campo 40X de células de la granulosa de ovino positivas a la prueba de inmunohistoquímica para VEGF con diferente marca de intensidad: A) control positivo (placenta de bovino), B) intensidad baja; C) intensidad media v D) intensidad alta.	69
Cuadro 4.	Número de folículos sanos, inicialmente atrésicos y atrésicos avanzados con diferente intensidad a VEGF.	70

RESUMEN

El VEGF además de estar involucrado en el desarrollo de vasos sanguíneos y la red vascular que favorecerá el acceso de nutrientes y factores tróficos a los folículos que la desarrollen, se le ha atribuido un papel como agente citoprotector sobre las células de la granulosa de bovino. Por lo anterior en este trabajo nos proponemos conocer si existen diferencias en la expresión de VEGF entre folículos sanos y atrésicos del día del estro y del día 4 del ciclo estral ovino, previo tratamiento de los animales con una fuente endógena de inhibina. Utilizando la técnica de inmunohistoquímica para evaluar la expresión de VEGF, encontramos que el VEGF se expresa en células de la granulosa de folículos sanos y atrésicos, en donde no hubo efecto del tratamiento con líquido folicular equino (LFE) sobre la expresión de VEGF ($P > 0.05$). Sin embargo, la aplicación del LFE tuvo efecto ($P < 0.001$) sobre la intensidad de inmunotinción de VEGF en células de la granulosa de folículos recuperados en los días 4 del ciclo S/T y 4 del ciclo C/LFE. Se encontró un efecto del grado de atresia del folículo sobre la intensidad de la marca para VEGF ($P = 0.02$) entre folículos sanos y con atresia temprana. Al comparar la intensidad inmunotinción de VEGF de los folículos sanos contra folículos con atresia avanzada también se encontró diferencia estadística ($P < 0.001$). Estos resultados demostraron que existe expresión de VEGF tanto en folículos sanos como en folículos con atresia inicial o avanzada y que el tratamiento con LFE no modificó el porcentaje de células positivas a VEGF aunque sí disminuyó la intensidad de la marca.

ABSTRACT

VEGF is evolved in the development of blood vessel and vascular network it will avail the access to nutriment and trophic factors, besides these, the follicles produce it, present a role like citoprotector agent on cell of granulose of bovine. Therefore, in this research we propose to know if exit difference between the VEGF in healthy and atresic follicles in the estral day and the 4 day estral cycle of ovine prior treatment to the animals with inhibin endogenous. Using immunohistochemistry technique we evaluated the VEGF expression in granulose cell in healthy and atresic follicles, while VEGF expression is not significant ($P > 0.05$) when used follicular liquid equine (FLE). Nevertheless, with granulose cells recovered from follicle on fourth day with or without FLE treatment had an effect about the intensity of VEGF immunostain ($P < 0.001$). We found an effect according with the atresic grade of follicle with the intensity of the marked for VEGF ($P = 0.02$) between healthy follicle and early atresia. When we compare the intensity VEGF immunostain of healthy versus advance atresia follicle we found significative difference ($P < 0.001$). In agreement with this observation, exist expression of VEGF in healthy as early or late atresia follicles, and the treatment with FLE didn't change the percentage of positive cells to VEGF although lower the intensity.

1. INTRODUCCIÓN

La actividad ovárica está caracterizada por las fases alternantes de crecimiento y regresión que implica tanto la estructura folicular como luteal (Barboni et al., 2000). El desarrollo folicular del ovino se presenta en ondas foliculares (Ginther et al., 1995), en las que un grupo de folículos primordiales en reposo abandona la reserva por un proceso de selección, cuyo mecanismo no está del todo dilucidado. En el bovino y la mayoría de los ovinos, sólo uno alcanza la dominancia y ovula si coincide con la luteolisis. Durante este proceso de selección y dominancia, participan factores de crecimiento que inician el reclutamiento y gonadotropinas que acentúan el crecimiento del folículo y permiten su ovulación. Los folículos subordinados y el dominante no ovulado sufren un proceso degenerativo conocido con el nombre de atresia por el cual son eliminados (Webb et al., 1999). La atresia folicular es un proceso degenerativo extenso que se propaga en todo el folículo y por la cual este pierde su integridad estructural (Sharma, 2000; Chedrese, 2003). En varias especies se conoce que el número de folículos atrésicos se incrementa en la medida que aumenta el tamaño de los folículos, de manera que cuando los folículos llegan a ser antrales, una alta proporción de ellos son atrésicos; en la oveja más del 80% de los folículos mayores de 3 mm son atrésicos (García et al., 1997). El desarrollo o la atresia folicular son producto de un balance entre factores de sobrevivencia y aquellos que provocan la muerte de las células foliculares (Jiang et al., 2003a). Algunos estudios han propuesto que el desarrollo de una red vascular apropiada es fundamental para que un folículo sea seleccionado como dominante (Mattioli et al., 2001). Mientras que en los folículos atrésicos existen varios reportes en los que se relaciona a este proceso con la disminución en la irrigación de los folículos (Barboni et al., 2000; Mattioli et al., 2001).

El Factor de Crecimiento Endotelio Vascular (VEGF), también conocido como factor de permeabilidad vascular (VPF) (Reynolds and Redmer, 1998), está involucrado en el desarrollo de vasos sanguíneos y la formación de la red vascular que favorecerá el acceso de nutrientes y factores tróficos a los folículos que la desarrollen (Phillips et al., 1990; Ferrara et al., 1992). En mamíferos se han identificado 6 isoformas de este factor; VEGF₁₂₁, VEGF₁₄₅, VEGF₁₆₅, VEGF₁₈₉, VEGF₂₀₆, y VEGF₁₈₃ (Otani et al., 1999). Las isoformas VEGF₁₂₁ y VEGF₁₆₅ tienen actividad angiogénica, son ácidas y no se unen fácilmente a la heparina. En cambio las isoformas VEGF₁₈₉ y el VEGF₂₀₆ son básicas y

se unen a la heparina con mayor facilidad que las dos primeras, por lo cual permanecen secuestradas en la matriz extracelular. Se ha observado sin embargo, que la plasmina hidroliza a estas isoformas y libera una proteína de 110 aminoácidos (VEGF₁₁₀) que se une al receptor del VEGF en la célula endotelial. El VEGF ha demostrado ser clave en la regulación de la vascularidad del ovario tanto en experimentos *in vivo* como *in vitro* (Barboni et al., 2000, Zimmermann et al., 2001).

Durante el desarrollo folicular en bovinos VEGF, además de su efecto angiogénico, se le ha atribuido un papel como agente citoprotector sobre las células de la granulosa (Greenaway, 2004). Alon et al., (1995) y Benjamin et al., (1999) han reportado que VEGF favorece la expresión de proteínas antiapoptóticas Bcl-2 y A1 en células del endotelio humano (Gerber et al., 1998).

La actividad angiogénica del VEGF está mediada principalmente por dos receptores tipo tirosina cinasa, el Flt-1 o receptor tipo 1 del factor (VEGFR-1) y el Flk-1 KDR o receptor tipo 2 (VEGFR-2) (Barboni et al., 2000; Zimmermann et al., 2001; Shimizu et al., 2003; Greenaway et al., 2004).

El destino hacia la atresia o la ovulación de un folículo, depende entonces de la presencia o ausencia de factores de sobrevivencia que promuevan el crecimiento folicular y protejan a sus células de la muerte celular. Entre los factores que destacan por su importante en el desarrollo de un folículo sano, se encuentran el complejo IGF (Monget et al., 2002), VEGF (Mattioli et al., 2000; Greenaway et al., 2004), estradiol y FSH (Quirk et al., 2003), así como la interacción entre estos factores.

Por lo anterior en este trabajo nos proponemos conocer si existen diferencias en la expresión de VEGF entre folículos sanos y atrésicos del día del estro y del día 4 del ciclo previo tratamiento de los animales con una fuente endógena de inhibina.

2. REVISIÓN DE LITERATURA

2.1. Desarrollo Folicular

El folículo, unidad funcional del ovario, es uno de los tejidos normales del organismo que experimenta una de las mayores tasas de crecimiento celular y diferenciación. En la mayoría de los mamíferos, las gametas femeninas, denominadas ovogonias durante el desarrollo prenatal, culminan su proliferación antes o inmediatamente después del nacimiento. En ese momento las ovogonias detienen su crecimiento para transformarse en ovocitos primarios. Los ovocitos primarios se rodean de una capa simple de células de la granulosa planas, no diferenciadas, llamadas pregranulosas y constituyen a los folículos primordiales, que representan la estructura funcional más importante del ovario ya que en esta etapa los folículos constituyen una reserva fija de gametas que se va disminuyendo gradualmente en cada ciclo sexual (Chedrese, 2003). El ovario de una oveja adulta contiene 12 000 – 86 000 folículos primordiales y 100 – 400 folículos en crecimiento de los cuales 10 – 40 son visibles en la superficie del ovario (Cahill et al., 1979; Mc Natty et al., 1982; et al., 1985 revisado en Maraceck et al., 2002).

El desarrollo folicular es controlado por una relación compleja entre esteroides foliculares, factores de crecimiento, factores extraováricos y el sistema de retroalimentación Hipotálamo-hipófisis-gónada. El crecimiento folicular es un proceso durante el cual el folículo adquiere progresivamente propiedades que son prerequisite para el desarrollo posterior, y finalmente llegar a la ovulación, mientras que aquellos que comenzaron el crecimiento y no alcanzan la ovulación se volverán atrésicos (Campbell et al., 1995; Adams, 1999).

En la oveja las etapas del desarrollo folicular han sido clasificadas de acuerdo al número de células de granulosa:

- Tipo 1: folículos primordiales (una capa de células aplanadas de granulosa),
- Tipo 1a: folículos transitorios (una capa de células mixtas de granulosa, cuboidales y aplanadas),
- Tipo 2: folículos primarios (una o dos capas de células cuboidales de granulosa),
- Tipo 3: preantral pequeño (dos a cuatro capas de células de granulosa),

- Tipo 4: preantral grande (cuatro a seis capas de células de la granulosa),
- Tipo 5: folículos antrales pequeños (más de 5 capas de células de granulosa con evidencia de un antro) (McNatty et al., 1999 revisado en Montgomery et al., 2001).

El patrón de desarrollo folicular en la oveja y la vaca es generalmente similar y las diferencias tienden a ser morfológicas más que fisiológicas (Campbell et al., 1995). La foliculogénesis en la oveja y la vaca es un proceso largo el cual toma alrededor de 180 días para que un folículo crezca desde su estado primordial (100 μm) a ovulatorio (oveja >5 mm; vaca > 10 mm). La formación del antro ocurre en un diámetro folicular de 0.2-0.4 mm en ovejas y 0.4-0.8 mm en vacas y esto toma aproximadamente 40 días para que los folículos alcancen tamaño ovulatorio (revisado en Campbell et al., 1995). La característica más notable del desarrollo folicular en la oveja y la vaca es la presencia de una jerarquía marcada en la población de folículos antrales con un gran número (20-30) de folículos con respuesta a gonadotropinas (ovejas 2-3 mm; vacas 3-4 mm), pocos folículos (1-4) dependientes de gonadotropinas (ovejas >3.5 mm; vacas $>4-5$ mm) y el número de folículos ovulatorios que es característico de la tasa de ovulación de cada raza (ovejas 1-4; vacas 1). Un folículo ovulatorio es un folículo grande (ovejas >4 mm; vacas >8 mm), altamente vascularizado, el cual es estrogénico y tiene un complemento entero de células de granulosa que contiene receptores a LH (Webb and England, 1982).

La dinámica folicular en el ovino es similar a la observada en el bovino, es decir en forma de ondas de desarrollo. El patrón de ondas de desarrollo folicular se refiere al crecimiento de un grupo de folículos antrales en forma sincrónica, para dar lugar a él o los folículos dominantes (Ginther et al., 1985a). En bovinos se han descrito de dos a tres ondas a lo largo del ciclo estral, que se inician aproximadamente los días 1, 9 y 16 del ciclo (Adams, 1999).

En ovinos la emergencia de los folículos que crecen desde 3 hasta 5 mm ocurre en ondas. Un rango de 2 a 5 ondas foliculares ocurren en cada ciclo interovulatorio pero el patrón predominante es de 3 ondas que emergen respectivamente alrededor de los días 0, 6 y 11 del ciclo estral ovino. Algunos autores encuentran una cuarta onda y en este caso la onda tres emerge más tempranamente y la onda 4 emerge el día 14. Algunas de las características más frecuentes observadas de las ondas son: 1) el folículo mayor de la

onda 1 es más grande que el folículo mayor de la onda 2; 2) la tasa de crecimiento desde el día de emergencia (primer día con un diámetro de 3mm) y el día de máximo diámetro es de alrededor de 1mm/día; 3) en promedio de 1.2 a 1.5 folículos alcanzan 5 o más milímetros de diámetro en cada onda pero esto depende de la raza estudiada; 4) el intervalo entre la onda 1 y la onda 2 es más largo que entre la onda 2 y la onda 3; y 5) los folículos que no alcanzan más de 3mm de diámetro emergen y regresan de modo más continuo (Rubianes, 2000).

Un tema de particular interés ha sido determinar la relación entre la FSH y la emergencia de las ondas foliculares. Existe buena evidencia de que las fluctuaciones en las concentraciones séricas de la FSH están íntimamente asociadas con la emergencia de las ondas. Un aumento de la FSH precede la emergencia de cada onda. Esto es seguido por un descenso que está negativamente correlacionado con las concentraciones séricas de estradiol que es producido fundamentalmente por el folículo más grande de la onda folicular (Baird et al., 1991).

Adams et al., (1992) demostraron que hay incremento en la concentración de FSH que comienza 2 días antes de la emergencia de una onda folicular y llegan al pico máximo 1 día antes o el día del comienzo de cada onda. Turzillo y Fortune (1990) también demostraron que alrededor del momento del celo hay 2 picos de FSH que son muy difíciles de diferenciar porque están muy cercanos entre sí. El primer pico de FSH ocurre al mismo tiempo que el pico preovulatorio de LH y es inducido por la liberación de GnRH desde el hipotálamo. El segundo pico ocurre cerca del momento de la ovulación y es aparentemente el responsable del reclutamiento de los folículos de la primera onda folicular (Bo, 2002).

De acuerdo a Goodman y Hodgen (1983) el desarrollo folicular puede ser dividido tres fases: (1) reclutamiento, la fase durante la cual un pool de folículos comienzan a crecer rápidamente; (2) selección, un proceso por medio del cual los folículos son seleccionados para un nuevo crecimiento; y (3) dominancia, el proceso en el cual el o los folículos dominantes sufren un desarrollo rápido mientras que el desarrollo de los folículos subordinados es suprimido (Armstrong and Webb, 1997). A continuación discutiremos las tres fases.

2.1.1 Reclutamiento

Existen dos tipos de reclutamiento durante el desarrollo folicular, el inicial y el cíclico. Durante el reclutamiento inicial factores intraováricos (c-kit y GDF-9) estimulan algunos folículos primordiales para iniciar el crecimiento, en tanto que, el resto de los folículos permanecen inactivos por meses o años. Se cree que el reclutamiento inicial puede ser un proceso continuo que comienza justo después de la formación del folículo, poco antes de iniciar la pubertad. Después del reclutamiento inicial, el crecimiento del ovocito, es una característica prominente de los folículos en crecimiento, pero estos ovocitos se mantiene arrestados en la profase de meiosis (McGee and Hsueh, 2000).

El receptor tirosina cinasa c-kit y su ligando, así como el factor de células troncales (SCF), han sido localizados en ovocitos y células de granulosa respectivamente (Motro and Bernstein, 1993). En el ratón la inhibición de la interacción SCF y c-kit previenen la transformación de folículos primordiales a folículos primarios (Huang et al., 1993; Yoshida et al., 1997). En el ovario de oveja, el mRNA de SCF ha sido detectado en células de granulosa y el mRNA de c-kit en el ovocito de todos los estadios del crecimiento folicular desde la fase primordial (Clark et al., 1996; Tisdall et al., 1997). Además, en la oveja, la proteína de c-kit puede ser localizada en ovocitos de folículos primordiales y en crecimiento y la proteína SCF en células de granulosa y ovocitos tanto de folículos primordiales como primarios. Estos resultados son consistentes con la necesidad de la activación del sistema tirosina cinasa c-kit por SCF que encontró Adams., (1999), como paso fundamental para el crecimiento de folículos primordiales.

El papel potencial del ovocito en el desarrollo folicular temprano está provisto fundamentalmente por el GDF-9, una proteína homodimérica de la familia del factor de crecimiento tumoral (TGF) que probablemente su vía de señalización sea tipo receptor serina-treonina cinasa (revisado en McGee and Hsueh, 2000). El GDF-9 es producido por ovocitos de ratón, vaca, oveja, rata y humano (McGrath et al., 1995; Aaltonen et al., 1999; Bodensteiner et al., 1999), tiene acción parácrina y regulatoria en el desarrollo de los folículos de varias especies de mamíferos. Se expresa en los ovocitos hasta casi cuando van a alcanzar la ovulación. En ratones la expresión de GDF-9 empieza en folículos primarios, mientras que en otras especies son expresados en ovocitos de folículos primordiales (vaca y oveja). La mutación del gen *Gdf9* por recombinación

homologa no previene el reclutamiento de folículos primordiales a la etapa de folículo primario (Eppig, 2001).

Los folículos primordiales que inician su crecimiento en respuesta a c-kit y al GDF-9 para llegar a la etapa de folículos preantrales permanecen en reposo hasta ser estimulados por la FSH (reclutamiento cíclico).

El reclutamiento cíclico empieza después del inicio de la pubertad y es el resultado del incremento en la secreción de FSH durante cada ciclo reproductivo que rescata una cohorte de folículos antrales de la atresia. Los ovocitos en estos folículos ya han completado su crecimiento, adquieren una zona pelúcida, y son competentes para reiniciar la meiosis. (McGee y Hsueh, 2000).

Los folículos que reinician su crecimiento durante el reclutamiento cíclico, son folículos preantrales o antrales tempranos, los cuales están constituidos por el ovocito, la zona pelúcida, células de granulosa (más de cinco capas), la membrana basal, la teca interna y la teca externa (McNatty et al., 1999; Senger, 2003). Los folículos antrales mayores a 3 mm en la oveja (McNelly et al., 1991) y 4 mm en la vaca son calificados como dependientes de gonadotropinas; el número de folículos en desarrollo son dependientes tanto de la cantidad de FSH como el tiempo de exposición a FSH (Picton et al., 1990).

La hormona folículo estimulante (FSH) es poco probable sea un factor crítico para la iniciación del crecimiento de folículos primordiales. Hay evidencias convincentes en ovejas, humanos, vacas y cerdos de que el gen para el receptor FSH (FSH-R) no es expresado hasta que el folículo ha alcanzado las etapas 2 – 3 del desarrollo (Tisdall et al., 1995; Xu et al., 1995; Yuan et al., 1996; Oktay et al., 1997). En ésta y en todas las subsecuentes etapas de desarrollo, el mRNA del FSH-R es localizado exclusivamente en células de granulosa. El análisis autoradiográfico de la unión de FSH marcada con ¹²⁵ en folículos preantrales es persistente con la presencia del FSH-R en células de granulosa de folículos tipo 2 – 4 pero no del tipo 1 ó 1a (Wandji et al., 1992a).

El mRNA de las enzimas esteroideogénicas, citocromo P450 side-chain-cleavage (P450scc), el citocromo P450 17 α -hidroxilasa (P450c17) y la 3 β hidroxisteroide

dehidrogenasa (3β -HSD) son expresadas después de la formación de la teca interna (Bao et al., 1997b).

Se ha encontrado una asociación entre el número de folículos que expresan mRNA para P450scc y P450arom (aromatasa) durante el inicio del reclutamiento y el número de folículos que continúan creciendo hasta la etapa de reclutamiento tardío, lo que hace suponer que la adquisición de la capacidad de sintetizar dichas enzimas es un factor decisivo para que los folículos reclutados continúen su crecimiento; folículos que alcanzan un crecimiento más allá de 4-6 mm (vaca) de diámetro, después de la etapa temprana de reclutamiento, expresan mRNA para P450scc y P450arom, lo que les da la capacidad para producir cantidades significativas de estradiol (Webb et al., 1999; Webb et al., 2003). Es probable que la expresión de P450scc y P450arom sea promovida por el incremento transitorio de FSH al inicio de cada onda folicular (Webb et al., 1999).

Como ya hemos mencionado, la FSH es un punto clave para la supervivencia de los folículos preantrales tempranos, pero existen otros factores producidos localmente que también son importantes en la supervivencia folicular.

Entre los factores de crecimiento que se conoce están involucrados en la regulación del desarrollo folicular se incluyen a la superfamilia del factor de crecimiento tumoral- β (TGF- β), al factor de crecimiento fibroblástico (FGF), al factor de crecimiento epidermal (EGF), al factor de crecimiento tumoral α (TGF- α) y al factor de crecimiento similar a la insulina (IGF) (Webb et al., 1997). Los sistemas de señalización de muchos de estos factores de crecimiento intraováricos actúan vía receptores tirocina-cinasa que regulan la diferenciación celular de granulosa y teca en una interacción directa y coordinada con el mecanismo estimulado de gonadotropinas (Revisado en Webb et al., 1999).

La adición de factores de crecimiento como IGF-I, TGF α , FGF-2 suprimen la apoptosis celular en folículos preovulatorios en cultivo, de la misma forma que lo hace FSH (revisado en McGee and Hsueh, 2000).

El TGF es producido por las células de la teca de bovino e influye en la proliferación de células de granulosa (Skinner et al., 1987; Wandji et al 1996b). En el ovario de oveja el

mRNA del TGF β 1 fue encontrado en el tejido estromal/intersticial y se observó primero en la teca interna de folículos tipo 4 ó 5, mientras el TGF β 3 se detectó principalmente en células del músculo liso alrededor de los vasos sanguíneos en la capa de la teca. El patrón de expresión de TGF β 2 fue similar al de TGF1 (McNatty et al., 1999).

Las células de granulosa en cultivo expresan el gen que codifica al factor de crecimiento fibroblástico 2 (FGF-2) (Neulfield et al., 1987). Estudios de inmunohistoquímica revelan que el péptido FGF-2 está difundido en todo el ovario del bovino estando presente en ovocitos de folículos primordiales y folículos primarios, células de la granulosa de folículos preantrales y antrales, teca interna, epitelio de la superficie del ovario y células del músculo liso alrededor de los vasos sanguíneos (Wandji et al., 1992b).

2.1.2 Selección

El mecanismo de selección del folículo dominante está basado en la respuesta diferencial de los folículos en una onda a FSH y LH (Ginther et al., 1996b). El mecanismo involucra en primer instancia el decline en el pico de FSH. El tiempo de selección (definido como la divergencia en los perfiles de crecimiento del dominante contra los folículos subordinados) coincide con el primer decremento significativo en las concentraciones de FSH (Adams et al., 1992) y la respuesta podría ser retrasada con FSH exógena (Adams et al., 1993a). El segundo aspecto importante en la selección del folículo dominante es un cambio en la sensibilidad de LH. El aumento transitorio de FSH permite un crecimiento folicular suficiente para que algunos folículos (no todos) adquieran sensibilidad a LH. Esta respuesta le da al folículo la habilidad para sobrevivir sin FSH. En el tiempo que los perfiles de crecimiento del dominante y los folículos subordinados empiezan a divergir, alrededor de 2 días después de la emergencia de la onda, el folículo destinado para volverse dominante aparentemente tiene más receptores a LH y la ventaja competitiva sobre los folículos subordinados. Sin embargo, los folículos subordinados pueden adquirir dominancia sí el folículo dominante original es removido (Adams et al., 1993b; Gibson et al., 1997) o sí se aplica FSH exógena (Adams et al., 1993a).

Aunque la LH sola no podría estimular el desarrollo folicular, pulsos de alta amplitud de LH, pueden inhibir parcialmente la acción estimuladora de FSH sobre el crecimiento folicular, dependiendo de los niveles de estimulación de FSH (McNelly et al., 1991). Además, la supresión completa de LH por inmunización pasiva inhibe el desarrollo folicular estimulado por FSH (McNelly et al., 1991). Usando un modelo similar en conjunción con un modelo de autotransplante de ovario Baird and McNelly., (1981); Campbell et al., (1995) demostraron y extendieron estos resultados para demostrar que los pulsos de LH de baja amplitud y frecuencia tiene un efecto pequeño sobre la habilidad de FSH para estimular el desarrollo de folículos antrales grandes y en ausencia de LH, estos folículos se mantienen críticamente dependientes de FSH por el soporte gonadotrófico. Sin embargo, folículos antrales grandes pueden transferir sus requerimientos gonadotróficos de FSH a LH si éste es liberado como pulsos de alta frecuencia y de baja amplitud. Habiendo transferido su requerimiento gonadotrófico de FSH a LH, estos folículos llegan a ser críticamente dependientes de LH de tal forma que el cese de los pulsos de alta frecuencia de LH podrían conducir a una rápida atresia, caracterizada por la incapacidad de los folículos para responder a un sólo pulso estimulador de LH. Esta transferencia de requerimientos gonadotróficos de FSH a LH es el mecanismo probable en donde el folículo preovulatorio puede resistir la caída de FSH, que ocurre en el inicio de la fase folicular seguido de la regresión luteal (Campbell et al., 1995).

El mRNA del receptor de la hormona luteinizante (LH-R) se ha demostrado en la teca interna de folículos preantrales tipo 4 – 5 de cerdos, vacas y ovejas y la expresión es detectada cuando la teca interna se forma alrededor de las células de granulosa (Xu et al., 1995; Yuan et al., 1996; Boa et al., 1997a revisado en Adams, 1999; Webb et al., 1999). En rumiantes domésticos hay evidencia de que los folículos tipo 4 – 5 tienen FSH-R y LH-R funcionales en células de granulosa y célula de la teca, respectivamente, y en las ovejas estos folículos son capaces de sintetizar progestágenos, andrógenos y estrógenos *in vitro* (McNatty et al., 1986; Yuan et al., 1996; Wandji et al., 1996b).

En bovinos, cerdos y ovejas los mRNAs para las enzimas P450ssc y P450c17 están presentes en la teca interna de folículos tipo 4 – 5, la cual también sintetiza andrógenos *in vitro* (McNatty et al., 1986; Yuan et al., 1996). La expresión del mRNA del complejo P450ssc es mayor en las células de folículos seleccionados que en folículos no

seleccionados, al igual que la expresión del complejo P450c17 y 3 β -HSD, en células de la teca de los folículos seleccionados. El citocromo P450arom se localiza solamente en células de granulosa, y su expresión no puede ser encontrada en folículos no reclutados mayores a 4 mm de diámetro (revisado en Webb et al, 1999).

El sistema IGF, ocupa una posición central dentro de la “red” de señales intraováricas en el desarrollo folicular, siendo de gran importancia en la selección folicular (Fortune et al., 2001). El sistema está compuesto por dos ligandos (IGF-I e IGF-II), dos receptores (IGFR-I e IGF -II), seis proteínas de unión a IGF (IGFBPs 1 - 6) y proteasas de IGFBP (Monget et al 2002).

En la oveja como en la rata, el cerdo y el humano, el IGF-I estimula tanto la proliferación como la diferenciación de células de granulosa. El IGF-I también estimula la esteroidogénesis en células de la teca. Montget et al., (2002) reportan que en la oveja, el IGF-I estimula principalmente la proliferación de células de granulosa de folículos pequeños (1-3 mm de diámetro). Por el contrario, el IGF-I estimula la secreción de progesterona por granulosa de folículos grandes (mayores a 5 mm de diámetro), pero no en folículos pequeños (Monniaux and Pissrlet, 1992).

2.1.3 Dominancia

Souza et al., (1996, 1997a, 1997b y 1998) indican que hay un periodo de dominancia folicular caracterizado por una alta secreción de estradiol e inhibina A, más corto que en el periodo de dominancia morfológica, a pesar de que los folículos dominantes no son la fuente principal de inhibina A por lo tanto, en la oveja, el tamaño folicular por si sólo no es un parámetro adecuado para asignar la dominancia (revisado en Webb et al., 1999).

La existencia dentro de una onda de la denominada dominancia folicular, en la vaca se caracteriza por dos fenómenos: la divergencia en el crecimiento entre el folículo mayor y el segundo mayor, y una disminución del número de folículos chicos correlacionada con el crecimiento del folículo mayor. Viñoles et al., (1999b) demostraron que durante la fase luteal de la oveja el fenómeno de dominancia folicular estaba presente.

La razón por la cual el folículo dominante puede crecer con bajos niveles de FSH mientras que los subordinados se atresian puede estar relacionada con la síntesis de receptores para LH en células de la granulosa del folículo dominante. Todos los folículos poseen receptores a LH en células de la teca y de FSH en células de la granulosa pero sólo el folículo dominante adquiere receptores para LH en células de granulosa. La LH se unirá a sus receptores en células de la granulosa estimulando una mayor producción de estradiol que le permitirá al folículo seguir creciendo aunque disminuyan los niveles de FSH circulantes (Bo, 2002).

La relación entre los niveles de LH y el crecimiento folicular también pueden explicar el fenómeno de regresión del folículo dominante de las ondas foliculares anovulatorias y el comienzo de la próxima onda folicular. Los altos niveles circulantes de progesterona producidos por el cuerpo lúteo, disminuyen la frecuencia de pulsos de LH y causan la detención de las funciones metabólicas del folículo dominante. Este cese de la secreción de 17β -estradiol e inhibina se produce antes de que se observe una disminución del diámetro del folículo dominante, pero tiene como consecuencia el aumento de las concentraciones de FSH que va a reclutar los folículos de la siguiente onda folicular. Por el contrario, al ocurrir la luteólisis hacia el final del ciclo hay un incremento de la frecuencia de los pulsos de LH que estimulan el crecimiento del folículo dominante y una mayor producción de 17β -estradiol, que induce los signos de estro y el pico preovulatorio de LH. También durante la gestación hay ondas foliculares pero las altas concentraciones de P4 hacen que el diámetro máximo del folículo dominante disminuya progresivamente (Bo, 2002).

Durante el crecimiento y las fases estáticas, la secreción continua de productos foliculares del folículo dominante causa que la FSH sea suprimida hasta un nadir, y junto con la supresión continua de LH como consecuencia de la secreción de progesterona en la fase luteal, el folículo dominante cesa sus funciones metabólicas y comienza a morir. El folículo dominante podría jugar un papel en su propio daño, también como la de sus subordinados. Bajo el cese en la secreción de productos del folículo, la FSH es otra vez llevada al pico. Este pico no tiene efecto sobre el folículo dominante “moribundo” o en regresión, pero estimula la emergencia de la próxima ola (Adams, 1999).

Las inhibinas y activinas son factores de crecimiento diméricos de la superfamilia del factor de crecimiento transformante β . Las subunidades inhibina α , inhibina/activina β_A e inhibina/activina β_B junto con los receptores de activina I, IIA y IIIB son expresadas en células del ovario durante el desarrollo folicular (Roberts et al., 1993; Cameron et al., 1994). En ovarios de oveja el mRNA y el péptido para la subunidad inhibina/activina β_B es detectada primero en células de granulosa de folículos tipo 1a - 3. Los folículos más pequeños contienen el péptido inhibina/activina β_B , donde estos contenían una capa de células de granulosa pero con un mínimo de células cuboidales. En las etapas posteriores de crecimiento, el péptido β_B se encontró elevado en la zona pelúcida a pesar de que la expresión del gen continuó en células de granulosa. En la etapa 5 y la siguiente el mRNA inhibina/activina β_A fue localizado exclusivamente en células de granulosa. En contraste a los resultados del mRNA inhibina/activina β_A , estudios inmunohistoquímicos localizaron el péptido inhibina/activina β_A en ovocitos también como en células de la granulosa de todas las etapas del desarrollo folicular.

La inhibina suprime la secreción de FSH a nivel hipofisiario, ello resulta en la supresión del desarrollo folicular y la producción de estradiol (revisado en Hernández et al., 2004). La inhibina está presente en concentraciones elevadas en el líquido folicular de las diferentes especies domésticas como en la yegua. La administración sistémica de este fluido, después de remover la fracción de hormonas esteroides, disminuye las concentraciones circulantes de FSH, efecto observado en ovejas tratadas con líquido folicular equino (Hernández et al., 1997). En yeguas se suprimió la secreción de FSH y el crecimiento folicular al aplicar LFE (Bergfelt and Ginthere, 1985), lo que confirma la alta homología que tiene la inhibina en las diferentes especies (García et al., 2001) y que es una fuente biológicamente activa de inhibina (Hernández et al., 2004). En novillas la administración de líquido folicular bovino (LFB) libre de esteroides, durante la emergencia de la primera ola de crecimiento folicular, bloquea el crecimiento del folículo dominante de la primera onda y también coincide con la disminución de los niveles plasmáticos de FSH. En el mismo estudio los niveles de FSH fueron suprimidos en la misma extensión en novillas tratadas con altas y bajas dosis de LFB, estas observaciones podrían reflejar la gran potencia de inhibina como supresor de la liberación de FSH hipofisiaria, porque aparentemente un pequeño incremento de inhibina se asocia con la caída drástica en la secreción de FSH (Bleach et al., 2001). Shi et al., (1990) reportan que la inyección de suero anti-inhibina en cerdos de guínea

confirman que es un factor importante en la regulación de la secreción de FSH en el ciclo estral. Estos resultados son similares a los reportados en otros animales tales como ratas (Arai et al., 1996), hamsters (Kishi et al., 1996), vacas (Kaneko et al., 1993) y ovejas (Mann et al., 1989), en los cuales se demostró que la inmunoneutralización pasiva de inhibina puede inducir un incremento en las concentraciones plasmáticas de FSH.

2.2. Atresia Folicular

El palabra atresia es de origen griego, literalmente significa la clausura u obliteración de un orificio o pasaje del cuerpo (a=no, tresos=perforación) (Hurwitz et al., 1992). En el contexto de la fisiología ovárica, la atresia folicular es un proceso degenerativo extenso que se propaga en todo el folículo y por la cual éste pierde su integridad estructural (Sharma, 2000; Chedrese, 2003).

La atresia se presenta en las hembras desde la vida prenatal (McGee and Hsueh, 2000). El funcionamiento de los ovarios, desde el punto de vista de desarrollo folicular, es caracterizado por el continuo crecimiento y degeneración de los folículos. Sólo unos pocos de los folículos que se desarrollan son seleccionados para ovular (Hirshfiel, 1991), por lo que parece posible concluir que el término normal de la maduración folicular es la atresia (Murdoch, 1992). El ovario humano contiene aproximadamente 2 millones de ovocitos al nacimiento, y alrededor de 400 folículos son ovulados normalmente durante la vida reproductiva femenina. En el tiempo de la menopausia, no se encuentran folículos ni ovocitos en el ovario (Hsueh et al., 1994). Por lo tanto, más del 99% de los folículos humanos sufren cambios degenerativos o atresia (Hsueh et al., 1994). El ovario de una oveja adulta contiene de 12 000 – 86 000 folículos primordiales y 100 – 400 folículos crecen, de los cuales 10 – 40 son visibles en la superficie del ovario (Mracek et al., 2002).

El proceso degenerativo de atresia puede ocurrir en cualquier etapa del desarrollo folicular, pero es más frecuente en los folículos antrales (Hirshfiel, 1991). En los

folículos preantrales es poco claro el mecanismo por el cual se vuelven atrésicos, sin embargo, en varias especies se conoce que el porcentaje de folículos atrésicos se incrementa en la medida que aumenta el tamaño de los mismos, de manera que cuando los folículos llegan a ser antrales, una alta proporción de ellos son atrésicos (Hirshfiel, 1991); en la rata, el 70% de los folículos antrales son atrésicos (Mandl and Zuckermen, 1950) en el ratón, 50% (Jones, 1956); en el conejo, 60% (Pincus and Enzmann, 1937); en el humano, el 50-99 % (Block, 1951) (citados por Hsueh et al., 1994) y en la oveja más del 80% de los folículos mayores de 3 mm son atrésicos (García et al, 1997). La incidencia de atresia en los folículos de ovejas es altamente dependiente del diámetro folicular, el 21% de los folículos pequeños son atrésicos, mientras que en los mayores de 6 mm el 93% lo son (revisado en Rosales, 1998).

Varios Procesos anatómo-fisiológicos están asociados con la atresia folicular, entre ellos se encuentra: desprendimiento y degeneración de las células de la granulosa, presencia de células con núcleos picnóticos en la granulosa (Hay et al., 1996), fragmentación de la lámina basal (Bagavandoss et al., 1983), reducción de la síntesis de DNA (Greewald, 1989), disminución de la síntesis de estrógenos (Carson et al., 1979), disminución de la capacidad de fijación de gonadotropinas (De Felicite et al., 1993); así como la disminución en la síntesis y expresión de los mRNA correspondientes a las aromatasas y a los receptores para gonadotropinas (Tilly et al., 1993); la supresión del acoplamiento metabólico por la pérdida de las uniones comunicantes (Wiensen et al., 1989); fragmentación internucleosomal del ADN, característico de las células que sufren apoptosis (Kaipia and Hsueh, 1997). La atresia también ha sido asociada con una falla en la producción o activación de enzimas que participan en la remodelación tisular del tejido ovárico, así como las colagenasas, gelatinasas, Pz-peptidasas (García et al., 1997) y del activador del plasminógeno (Meinecke et al., 1982).

Basándose principalmente en criterios morfológicos, la atresia de folículos antrales puede ser dividida en diferentes estados:

Estado I.- Folículo sano: es caracterizado por un número pequeño de CG con núcleos picnóticos (<10%) usualmente hacia el antro folicular, mientras que algunas células de granulosa todavía están en mitosis (Hsueh et al., 1994).

Estado II.- Atresia inicial: Se observan muchas CG con núcleos picnóticos (10-30%), se reduce la mitosis de CG y el detritus de las células se observan en el antro. La membrana basal pierde su integridad y hay infiltración de leucocitos hacia la granulosa. En el ovocito los cambios como si se hubiera reiniciado la meiosis son evidentes (Hsueh et al., 1994).

Estado III.- Atresia avanzada: Es caracteriza por una reducción en el número de CG, ninguna de éstas en mitosis, y el folículo se colapsa. En la ovejas se ha demostrado que los folículos atrésicos desaparecen aproximadamente a los 7 días de iniciado el proceso (revisado por Hsueh et al., 1994).

2.2.1. Muerte celular en la atresia folicular

La atresia folicular puede ser iniciada y propagada por la muerte de las células foliculares (Clark et al, 2004). Generalmente hay dos vías por las cuales las células pueden morir: apoptosis y necrosis. En la atresia folicular de la oveja se observa la participación de dos tipos de muerte, la contribución preponderante de cada tipo de muerte depende del tamaño del folículo. En los folículos pequeños participa principalmente la muerte por apoptosis, mientras que en los folículos grandes es la necrosis el principal tipo de muerte (Rosales et al, 2000).

Actualmente se encuentra en controversia cual de las células foliculares inicia con la atresia aunque se mantiene la idea generalizada que inicia con la muerte de las células de la granulosa y algunos otros apoyan que se inicia con la muerte de las células endoteliales de la teca (Makrigiannakis et al, 1999, Clark et al, 2004).

A pesar de que el mecanismo responsable de la atresia no está claramente definido, existen evidencias que muestran que la atresia comienza con la muerte de las CG y ésta es caracterizada por fragmentación internucleosomal del ADN, lo cual sugiere que estas células mueren por apoptosis. Este tipo de muerte celular ha sido reportada en gallinas, ratones (Rajakoski, 1996), bovinos, humanos (Jolly et al., 1994), ratas (Palumbo y Yeh, 1994; Jolly et al., 1994), ovejas (Murdoch, 1995; Rosales et al., 2000), cerdos (Miki et al., 1998; Liu et al., 2003) y equinos (Pederson et al., 2000).

El término de apoptosis originalmente definido como “la caída de las hojas de los árboles” o “la caída de los pétalos de las flores”, fue usado científicamente por primera vez para describir la muerte celular dependiente de energía por Kerr et al., (1972). La apoptosis o muerte celular programada describe la eliminación de células genéticamente determinadas. El proceso es iniciado por una señal de muerte que inclina el balance entre factores pro y anti-apoptóticos (Lu et al., 2005).

La apoptosis es un evento ordenadamente activo, que toma lugar en el tejido, sufriendo cambios en el desarrollo o respondiendo a alteraciones estímulo- fisiológicas. Este proceso de “suicidio” activo toma lugar en células con niveles de ATP normales y en general, requiere mRNA y síntesis de proteínas. La apoptosis afecta sólo células esparcidas e involucra encogimiento celular, condensación de la cromatina y la formación de pequeños pedazos esféricos de la membrana, referidos como cuerpos apoptóticos, los cuales contienen fragmentos nucleares. Las células apoptóticas son fagocitadas por sus vecinas. Porque la fagocitosis toma lugar usualmente antes de que la integridad de la membrana plasmática se pierda, no hay salida de componentes citoplásmicos, y por lo tanto, la reacción inflamatoria no es inducida (Hsueh et al., 1994). La membrana celular sufre una serie de cambios entre estos podemos mencionar: la expresión de sitios de unión a la trombospondina, la pérdida de residuos de ácido siálico y la exposición de fosfatidilserina (Rosales et al., 2000). La característica fundamental de la apoptosis es la activación de una endonucleasa dependiente de calcio/magnesio, que rompe el ADN de manera específica en espacios internucleosomales produciendo fragmentos de 180-200 pares de bases o sus múltiplos (Wyllie, 1980; Arends et al., 1990; Gaido and Cidloski, 1991, citado en Hsueh et al., 1994). El proceso de apoptosis ocurre rápidamente y las células que sufren este tipo de muerte podrían desaparecer completamente dentro de pocas horas (Murdoch, 1995; Yuan y Rajaduri, 2000).

Varios factores tales como la interacción de Fas con su ligando (FasL), el TNF- α , daño del ADN o hipoxia pueden disparar la apoptosis celular. Hay dos mecanismos fundamentales de señalización, el extrínseco y el intrínseco por los cuales la apoptosis es mediada. El mecanismo extrínseco es disparado por ligandos de muerte externos. El mecanismo intrínseco es disparado por señales apoptóticas internas e involucradas en la mitocondria.

La cascada de caspasas es central para la progresión de apoptosis. Han sido identificadas 14 caspasas en los mamíferos, las cuales, son clasificadas en caspasas iniciadoras y caspasas efectoras. Las caspasas iniciadoras, son la 8, 9 y 10, son activadas por autoproteólisis en respuesta a señales de muerte e inician la apoptosis (Chen y Wang, 2002; Thornberry and Lazebnik, 1998). Las caspasas efectoras son la 3, 6 y 7, son activadas por caspasas de iniciación y su función es la digestión proteolítica de la célula, culminando con la muerte (Thornberry and Lazebnik, 1998). Se han identificado alrededor de 100 substratos de caspasas; la DNasa activada por caspasa (ICAD); la PARP (por su siglas en inglés Poly ADP-Ribose Polymerasa), Bcl-2, laminina y varias proteínas de unión al citoesqueleto. La división de estas proteínas causan fragmentación del ADN (Thornberry y Lazebnik, 1998), inhibición y reparo de la síntesis de ADN (Tewari et al., 1995), disrupción de la membrana nuclear y condensación de la cromatina (Taimen y Kallajoki, 2003) y colapso del citoesqueleto (Kothakota et al., 1997; Rudel y Bocokh 1997; Harrington et al., 2001; Kook et al., 2000; Cheng et al., 2005 revisados en Lu et al., 2005).

El desarrollo de un folículo depende de factores de sobrevivencia que promuevan el crecimiento folicular y también protejan a las células de apoptosis. Esto incluye a factores de crecimiento producidos dentro del ovario entre los que destacan IGF (Monget et al., 2002) y VEGF (Mattioli et al., 2000; Greenaway et al., 2004), así como estradiol y las gonadotropinas LH y FSH. En ausencia de estos factores de sobrevivencia, el mecanismo de apoptosis endógena dentro del folículo llega a ser activado y conduce a atresia folicular.

Las gonadotropinas han mostrado tener un efecto modulador en la incidencia de la atresia folicular. La privación de gonadotropinas después de la hipofisectomía, conduce a la atresia y a la apoptosis de los folículos en desarrollo (Nahum et al., 1996), mientras que en folículos antrales tempranos cultivados, en presencia de FSH se previene el inicio espontáneo de la apoptosis folicular (Chun et al., 1996). Se sabe que el tratamiento de FSH es capaz de rescatar folículos en estadios tempranos de la atresia, pudiendo alcanzar estos folículos posteriormente todas las etapas de desarrollo hasta preovulatorias (Hirshfiel, 1991). Chun et al., (1994), han demostrado que en condiciones *in vivo*, el tratamiento con FSH, inhibe la fragmentación del ADN en CG.

También se ha demostrado que la hCG es tan efectiva como la FSH para evitar la fragmentación apoptótica del ADN del folículo bajo condiciones *in vitro*. En ovejas la administración de FSH exógena, incrementa el número de folículos antrales medianos y grandes, disminuyendo la incidencia de atresia. En folículos medianos (3 – 6 mm) y grandes (mayores a 6), la proliferación celular se reduce significativamente cuando se retira la aplicación de FSH (Jablonka-Shariff et al., 1996).

El estradiol es un importante factor intraovárico de crecimiento, diferenciación y de sobrevivencia, el cual estimula la proliferación de las CG y las protege contra apoptosis. (Revisado en Rosenfeld et al., 2001). Una diferencia temprana detectable entre el folículo dominante y los folículos subordinados al momento de la selección en el ganado es la capacidad incrementada de las células de CG para sintetizar estradiol. Guthrie y Cooper, (1996) reportaron que la concentración de estradiol es mayor en folículos sanos comparados con folículos atrésicos. Austin et al., (2001) mostraron que en folículos menores a 8 mm la concentración de estradiol es significativamente menor comparado con folículos mayores de 8.5 mm.

Jolly et al., (1992); Huet et al., (1997) y Rosales et al., (2000) han sugerido que el balance entre estradiol y progesterona quizá sea un buen predictor de si un folículo podría proceder a madurar o sufrir atresia. Yu et al., (2004) midieron las concentraciones de E2 y P4 en líquido folicular y encontraron que el nivel de estradiol es significativamente más bajo en folículos atrésicos que en folículos sanos, por otro lado, el nivel de progesterona fue más alto en folículos atrésicos, lo cual resultó en un cambio significativo en el ratio de E2/P4: mayor a 1 en folículos sanos y menor a 1 en folículos atrésicos, lo cual ya había sido sugerido por Rosales et al (2000), para ovejas. Estos resultados sugieren que cuando un folículo produce más progesterona que estradiol, sus células de la granulosa han iniciado el proceso de muerte característico de la atresia.

La disminución en la producción de E2 podría ser el resultado de una reducción en el número de células viables de la granulosa, la actividad de aromatasa o ambas (Tilly et al., 1992).

Estudios en especies domésticas sustentan un papel importante de IGF en el desarrollo folicular. El IGF incrementa la secreción de estradiol y la respuesta a gonadotropinas en CG cultivadas de bovinos y ovinos (revisado en Quirk, 2003). En el ganado, las concentraciones libres de IGF-I disminuyen en folículos subordinados grandes en el momento de la selección, pero no cambia en los folículos dominante (Beg et al., 2001; Ginther et al., 2003). Las IGFBP, relativamente con bajo peso molecular (BP2, BP4 y BP5), están presentes en el líquido folicular de folículos subordinados pero no en folículos dominantes de ganado (Echterkamp et al., 1994; de la Sota et al., 1996; Stewart et al., 1996; Mihm et al., 2000; Austin et al., 2001; Beg et al., 2001). La adición de IGF en un cultivo de CG previene la apoptosis inducida por FasL (Quirk et al., 2000). Hu et al, (2004) indicaron que la protección por IGF I es mediada a través de la vía de señalización de la fosfatidil inositol 3'OH cinasa (PI3K) y no por la vía de las Proteínas Activadoras de Mitosis (MAPK).

Como se mencionó anteriormente, una característica bioquímica común de la apoptosis, la degradación del ADN genómico por la acción de endonucleasas dependientes de calcio/magnesio (Arends et al 1990), se ha demostrada en folículos atrésicos (Hsu and Hsueh, 1997). Boone and Tsang (1998) han encontrado que la endonucleasa dependiente de calcio/magnesio relacionada en este proceso es la DNasa I (Boone et al., 1995; Boone and Tsang, 1997a, 1997b), la cual está presente en el núcleo de CG de folículos sanos (Boone and Tsang, 1997b). Esto sugiere que la DNasa I está presente, pero inactiva en CG y sólo necesita una señal que la active y degrade al ADN durante la atresia folicular.

En folículos de bovino, las CG pueden expresar Fas y FasL, y la expresión de ambas proteínas se incrementa durante la apoptosis inducida *in vitro* por el retiro de nutrientes. La apoptosis inducida al retirar la fuente de nutrientes (suero fetal) es mediada por la interacción de Fas/FasL. (Hu et al., 2001). En ratas, Kim et al., (1998) también sugieren que el sistema de señalización de Fas/FasL podría estar involucrado en la apoptosis de CG, en el penúltimo estadio de desarrollo folicular.

2.3. Angiogénesis, desarrollo folicular, atresia y VEGF

La formación de nuevos vasos sanguíneos ocurre mediante dos procesos: vasculogénesis y angiogénesis. La vasculogénesis es la diferenciación *in situ* de plexos capilares primarios a partir de células precursoras, conocidas como angioblastos y ocurre primordialmente durante el desarrollo embrionario (Klagsburn and Moses, 1999) y la angiogénesis se refiere a la formación de nuevos vasos sanguíneos a partir de los ya existentes y es esencial para el crecimiento y desarrollo del tejido normal (Folkman and Klagsbrun 1987; Klagsbrun and D'Amore 1991; Klagsburn and Moses, 1999).

El requisito para el crecimiento de nuevos vasos sanguíneos es esencial en todos los órganos en crecimiento y refleja el hecho de que el aporte adecuado de nutrientes y oxígeno sólo puede proporcionarse a los tejidos en una magnitud muy limitada a través de la difusión. Por consiguiente cada aumento en la masa de órganos o tejidos debe ser acompañado por un crecimiento adecuado de los vasos sanguíneos. Este hecho implica que en el animal adulto, debido a la escasez de procesos de crecimiento fisiológico y remodelación tisular que se requieren en condiciones normales, la angiogénesis es un proceso excepcional (Gordon et al., 1996; Augustin, 2000 revisado en Espinosa and Rosado, 2002).

El proceso angiogénico inicia con el crecimiento rápido de los capilares y culmina en la formación de una nueva capa microcirculatoria compuesta de arteriolas, capilares y venulas. La iniciación de la angiogénesis consiste de por lo menos de tres procesos: 1) ruptura de la membrana basamental de los vasos existentes, 2) migración de las células endoteliales de vasos existentes hacia un estímulo angiogénico, y 3) proliferación de células endoteliales (Redmer et al, 2001). El desarrollo de los nuevos vasos sanguíneos es completado por la formación de la lámina basal capilar y la diferenciación de nuevos capilares a arteriolas y venulas.

La angiogénesis es un proceso complejo donde existe un delicado balance entre promotores (factores angiogénicos) e inhibidores (factores antiangiogénicos). La perturbación de este equilibrio puede resultar en una falla del estado fisiológico y conducir a diferentes patologías (Abulafia and Sherer, 2000).

En los casos de angiogénesis normal, los factores de estímulo parecen ser la hipoxia y/o la acidosis tisular que inducen la liberación de factores estimuladores de la

angiogénesis. Los tejidos enfermos o dañados producen y liberan factores de crecimiento angiogénicos que se difunden hasta los tejidos cercanos (efecto parácrino) (revisado en Espinosa and Rosado, 2002).

Varios reguladores potenciales de la angiogénesis han sido identificados incluyendo al factor de crecimiento fibroblástico ácido (FGFa), factor de crecimiento fibroblástico básico (FGFb), angiogeninas, VEGF, el factor de crecimiento placentar (PIGF), interleucina 8 (IL-8), el factor de crecimiento de hepatocito (HGF), proliferinas, angiopietinas, el IGF I, TGF α , TGF β , el factor de crecimiento derivado de plaquetas (PDGF), EGF, etc. (Folkman and Shing, 1992; Klagsbrun and D'Amore 1991). Pero diferentes líneas de investigación demuestran que el VEGF juega un papel importante tanto en la angiogénesis fisiológica como en la angiogénesis patológica (Relf et al., 1997) y es el primer factor caracterizado con base a su habilidad para promover la proliferación vascular endotelial, así como incrementar la permeabilidad vascular (Ferrara, 2004).

Dentro de los factores inhibidores de la angiogénesis se encuentran, la angiostatina, endostatina, trombospondina 1 (TSP1) y TSP2, análogos de somatostatina (octeotrido), el fragmento 16-kDa de prolactina, etc. (revisado en Turner et al., 2000).

La angiogénesis que acompaña a la foliculogénesis se presenta en períodos cíclicos en las diferentes etapas del ciclo estral (Denekamp, 1984; Nottola et al., 1997; Zimmerman et al., 2003). En la foliculogénesis, la angiogénesis y regresión de vasos proporcionan los cambios en la red microvascular del folículo (Charney et al., 1975).

Durante la foliculogénesis, los folículos primordiales compuestos de un ovocito rodeados de una sola capa de células de granulosa, desarrollan para formar folículos secundarios, en la cual la capa de teca externa tiene su propia red vascular y la capa de la granulosa, a pesar de ser avascular (Stouffer et al., 2001), aparece por estar involucrada en la angiogénesis folicular: en realidad, las células de la granulosa han sido identificadas como el principal componente involucrado en la producción de VEGF tanto *in vivo* (Matioli et al., 2001) como *in vitro* (Grasselli et al., 2002). La angiogénesis folicular se inicia durante el desarrollo folicular temprano y continua hasta el final del crecimiento folicular (Suzuki et al., 1998). Sin embargo, durante el desarrollo del antro,

los folículos adquieren una red vascular en la capa de la teca, la cual cuando esta completamente establecida, consiste de dos redes capilares, localizadas en la teca interna y teca externa. Estos vasos sanguíneos recién formados aseguran un incremento en el suministro de gonadotropinas, factores de crecimiento, oxígeno, precursores de esteroides, así como de otras sustancias para el crecimiento folicular. En la capa de la teca, los vasos sanguíneos aumentan en número y tamaño conforme los folículos desarrollan pero no penetran la membrana basamental separando la teca interna de la capa de células de granulosa. La vascularización incrementada del folículo individual resulta en una distribución preferencial de gonadotropinas y, por lo tanto, podría jugar un papel instrumental en la maduración selectiva de los folículos preovulatorios (Zelevnik et al., 1981). A pesar de que la angiogénesis es en la capa de la teca y los receptores para los factores angiogénicos se localizan encontrados predominantemente en el endotelio vascular del ovario y células asociadas, muchos de los factores que regulan el proceso son sintetizadas predominantemente en la granulosa (Hamish, 2006).

En los folículos de bovino el flujo sanguíneo detectable crece gradualmente desde la base del folículo, paralelamente con las concentraciones plasmáticas de estradiol hasta la ovulación; sin embargo el estradiol no ejerce ningún efecto en la angiogénesis folicular (Acosta et al., 2003). Los folículos dominantes de bovinos durante fase folicular muestran un buen desarrollo de los capilares con una angiogénesis dependiente en la capa capilar interna. La proliferación capilar aparece para ser distribuida primero en la región apical, después en la región ecuatorial o basal de la capa capilar interna (Jian et al., 2003).

Por otro lado, la degeneración de la red capilar en folículos que fallan en el desarrollo es un factor relevante causando atresia folicular. Moor and Seamark (1986) sugieren que la disminución de la vascularidad podría limitar el acceso en folículos atrésicos a nutrientes, substratos, y hormonas *in vivo*. Greewald, (1989) encontró que la síntesis reducida de ADN de células endoteliales foliculares fue asociada con la reducida vascularidad folicular y es uno de los signos más tempranos de la atresia. Similarmente Redmer and Rynolds, (1996) observaron una cesación en la proliferación de células endoteliales de la teca, asociados con una disminución en la vascularidad tecal, tan pronto después del inicio de la atresia en folículos de bovino, ovino y porcino.

Uno de los factores de crecimiento más importantes que juega un papel fundamental en el proceso de angiogénesis a nivel folicular es el VEGF. Es factible que la expresión de VEGF en células de la granulosa sea estimulado por poco oxígeno presente en el ambiente folicular (revisado en Hunter et al., 2004). Estudios previos han demostrado que el crecimiento folicular es acompañado por una reducción en pO₂ en el líquido folicular y por un incremento en la producción de VEGF en células de granulosa (Basini et al., 2004). Aunque la producción de VEGF en células de la granulosa ha sido muy documentada, Bianco et al., (2005) demuestran que bajo condiciones normoxicas estas células son desprovistas de cualquier actividad angiogénica. Es probable que el inicio de una adecuada red vascular en el desarrollo del folículo dependa del inicio de un ambiente hipóxico, mientras bajo condiciones de disponibilidad normales de oxígeno, la producción de VEGF por células de la granulosa podría no ser suficientemente estimulado.

La regulación exacta de la expresión de VEGF no es conocida, a pesar de que numerosos estudios han demostrado que las gonadotropinas pueden estimular la producción de VEGF en células de la granulosa durante el desarrollo folicular, tanto *in vivo* como *in vitro* (Hazzard et al., 1999; Barboni et al., 2000; Schams et al., 2001). Esto sugiere que un inadecuado soporte de gonadotropinas podría conducir a un decremento en la vascularización folicular y una subsecuente daño funcional (revisado en Hunter et al., 2004), mientras que la producción de este factor de crecimiento por células de la teca no se modifica por el estímulo de estas hormonas. Estos autores han demostrado que, durante el desarrollo folicular, las células de la granulosa son las mayores promotoras de VEGF lo cual puede demostrarse tanto por la determinación del mRNA encargado de codificar su producción, como por la determinación directa de la síntesis *in vitro* de este factor. Es posible que la síntesis de VEGF en las células de la teca parezca inferior debido a que es fácilmente arrastrado por la circulación, mientras que el producido por células de la granulosa tiende a acumularse en el líquido folicular. También es posible aceptar que el VEGF producido en el interior del folículo bajo la acción de las gonadotropinas sea utilizado, sobre todo en las fases finales de crecimiento folicular, como un factor parácrino que difunde a través de la membrana basal del folículo para estimular, en las tecas, la formación de las capas internas, próximas a la membrana basal, que parecen ser determinantes en la fisiología folicular (Richards,

1980; Barboni et al., 2000; Van Blerkom et al., 1997 revisado en Espinosa y Rosado 2000).

La producción de VEGF es regulada diferentemente en folículos de acuerdo a su tamaño. El mRNA VEGF y la proteína en el ovario de primate son expresados en las células de la teca de folículos antrales y en células de granulosa más cercanas al ovocito en folículos preovulatorios pero no en células de granulosa de folículos primordiales y preantrales (Stouffer et al., 2001). En folículos de porcino y bovino el VEGF es expresado débilmente durante el desarrollo folicular temprano y llega a ser mas pronunciado en células de granulosa y teca a lo largo del desarrollo del folículo dominante (Barboni et al., 2000; Greenaway et al., 2005).

La expresión del mRNA y la proteína en células de la granulosa de varias especies es estimulada por el pico de LH (ciclos naturales) o con la administración de hCG (ciclos artificiales) (Koos, 1995; Christenson and Stouffer, 1997; Barboni et al., 2000). Recientemente se ha demostrado que exponer a niveles elevados de gonadotropinas incrementa no sólo la expresión de VEGF, sino también los receptores VEGFR- 1 (Flt-1) y (VRGFR-2) Flk-1 en folículos ováricos de rata y porcinos (Gómez et al., 2003; Shimizu et al., 2002).

Estudios válidos indican que la expresión incrementada de VEGF durante la fase folicular puede ser útil para incrementar el número de folículos dominantes destinados para ovular. Reynolds y Redmer, (1998) demostraron que folículos dominantes son más vasculares que los folículos no dominantes. Los folículos dominantes tiene una teca más vascular comparada con los otros folículos antrales y como resultado éstos muestran un incrementado nivel de gonadotropinas (McNatty et al., 1981) La inyección de fragmentos del gen VEGF en ovarios de cerdas tratadas con gonadotropina coriónica equina (eCG) incrementa el número de folículos grandes y el desarrollo de la red vascular en la capa de la teca (Shimizu et al., 2003). Por otra parte, la administración directa de VEGF al ovario incrementa el número de folículos preantrales en el ovario de rata, similar al bien conocido efecto de estrógeno (Danforth et al., 2003). Adicionalmente, Quintana et al. (2004) sugiere que la administración directa de VEGF al ovario disminuye la apoptosis ovárica en el ratón. La administración intraperitoneal de VEGF 120 y VEGF 164 estimulan marcadamente la angiogénesis folicular en la capa

de la teca interna, e incrementa el número de folículos preovulatorios saludables y ovocitos ovulados en ratas (Lijina et al., 2005). En contraste la administración de un anticuerpo anti-Flk/KDR inhibe la angiogénesis de folículos dependientes de gonadotropinas en ratones, lo cual, en turno bloquea el desarrollo de los folículos antrales maduros (Zimmermann et al., 2003). La inhibición de VEGF con un anticuerpo VEGF trap resulta en la disminución de la angiogénesis, reduciendo el reclutamiento y crecimiento de folículos antrales, también como, la disminución en la expresión de Flk/KDR en primates (Wulff et al., 2002). La elevada vascularidad o la permeabilidad vascular de los folículos en desarrollo pueden facilitar la liberación de agentes foliculotrópicos (ejemp. FSH, estrógeno, andrógeno) que resulta en el incremento de reclutamiento folicular de el pool de folículos primordiales y/o la inhibición de la atresia folicular (Zelevnik et al., 1981).

Los capilares de la capa de la teca llegan a ser hiperpermeables alrededor del tiempo de ovulación en varias especies de mamíferos (Moor and Seamark, 1986). En folículos de bovino y porcino, esto es acompañado por una expresión incrementada de VEGF y una muy alta acumulación de la proteína de VEGF en el líquido folicular (Barboni et al., 2000; Berisha et al., 2000). Los altos niveles de VEGF en el líquido folicular de folículos preovulatorios parecen difundirse hacia las capas externas y crear un gradiente angiogénico en la capa de la teca que atrae a los vasos sanguíneos hacia la capa de la granulosa (Barboni et al., 2000). Porque los vasos no pueden cruzar la barrera de la membrana basal, ellos desarrollan dentro de la capa de la teca, en cerrada proximidad a la membrana representando la principal fuente de nutrientes y gases para células de granulosa y germinales. Signos tempranos de atresia incluyen la desaparición de estos vasos internos sin modificación substancial de vascularización en otras regiones de la capa de la teca (Moor and Seamark, 1986). Por lo tanto, la persistencia de esta red vascular interna aparece para depender directamente de la acumulación de VEGF en el líquido folicular y cuando tal almacén no esta grandemente disponible, como ocurre en la atresia temprana, la red capilar sufre una degeneración intensiva (Mattioli et al., 2001).

Resultados recientes muestran que el VEGF es un tipo de factor de sobrevivencia para células endoteliales (Alon et al., 1995; Benjamin et al., 1999) e induce la expresión de proteínas antiapoptóticas Bcl-2 y A1 en células endoteliales de humano (Greber et al.,

1998). Recientemente Greenaway et al., (2004) han indicado que VEGF también tiene un papel citoprotector en el compartimiento de células de la granulosa de bovinos. La co-expresión de VEGF y Flk-1/KDR en células de la granulosa de ovarios de bovino protegen a estas células contra la muerte de células apoptóticas y la atresia folicular. Folículos sanos exhiben una muy baja incidencia de apoptosis y alta expresión de Flk-1/KDR en células de la granulosa. Folículos atrésicos tempranos, por otro parte, tienen significativamente más células de la granulosa apoptóticas y una reducida tinción de Flk-1/KDR. Además el bloqueo de Flk-1/KDR inhibe significativamente la habilidad de las células para responder a VEGF endógena y exógena, reduciendo la protección contra la activación de caspasa-3 y la apoptosis (Greenaway et al., 2004). El efecto protector de VEGF en las células de la granulosa ocurre vía interacción con Flk-1/KDR.

2.4. Factor de Crecimiento Endotelio Vascolar

En 1989, Ferrara and Henzel, reportaron el aislamiento de un mitógeno específico de células endoteliales el cual nombraron “Factor de crecimiento endotelio vascular” y Leung et al. y Keck et al., en 1989 demostraron que VPF Y VEGF eran la misma molécula, por lo cual también se le conoce como factor de permeabilidad vascular, ya que es capaz de incrementar 50 000 veces más la permeabilidad microvascular en comparación con la histamina (Watson y Al-zi-abi, 2002).

Actualmente la familia de VEGF comprende varios miembros, incluyendo la primer molécula identificada, VEGF A (también referida como VEGF), el factor de crecimiento placentar (PlGF), VEGF B, VEGF C, VEGF D (Ferrara and Davis, 1997). Adicionalmente dos homólogos de VEGF han sido identificados en el genoma del parapoxvirus, Orf virus, y han mostrado que tienen una actividad como la de VEGF. Principalmente, VEGF C y VEGF D regulan la angiogénesis linfática, enfatizando el único papel de esta familia del gen en controlar el crecimiento y diferenciación de múltiples componentes anatómicos del sistema vascular (Revisado en Ferrara, 2004).

VEGF tiene una homología significativa a PDGF (Factor de crecimiento derivado de plaquetas) y todas las ocho cisteínas encontradas en las cadenas A y B de PDGF son conservadas en VEGF (Leung et al., 1989; Keck et al., 1989). El gen VEGF A de humano esta organizado en ocho exónes, separados por siete intrónes (Houck et al.,

1991; Tischer et al., 1991) y esta localizado en el cromosoma 6p21.3 (Vicenti et al., 1996 Revisado en Ferrara, 2004). Existen cinco isoformas moleculares de VEGF que difieren en el número total de aminoácidos, son producidas como resultado del splicing alternativo de su gen. En humanos estas isoformas corresponden a VEGF 121, VEGF 145, VEGF 165, VEGF 189 y VEGF 206 (Kaczmarek et al., 2005). Las isoformas más cortas, VEGF 121, esta codificada por los exones 1-5 y 8, VEGF 165 incluye adicionalmente el exón 7. Los mRNA de VEGF 189 y 206 contienen los 8 exones, el splicing del exón 6 crea la diferencia entre VEGF 189 y 206 (Houck et al., 1991).

VEGF es una proteína dimérica. La principal forma tiene un peso molecular aproximadamente de 45 kDa y esta compuesta de la isoforma de 165 aminoácidos (Ferrara y Henzel, 1989). Las isoformas menores del VEGF humano contienen 121 y 189 aminoácidos. Comparado con VEGF 165, VEGF 121 carece de 44 aminoácidos, VEGF 189 tiene una inserción de 24 aminoácidos y VEGF 206 tiene una inserción adicional de 17 aminoácidos (Park et al., 1993). En roedores y bovinos los monómeros de VEGF son más cortos por un aminoácido. Los monómeros de VEGF tiene un solo sitio de glicosilación como Asp 75 de la proteína madura, pero la glicosilación no es necesaria para la actividad biológica (Yeo et al., 1991; Claffey et al., 1995), aunque es importante para la secreción eficiente de VEGF.

VEGF 121 es un polipéptido ácido que no se une a heparina debido a la falta del dominio de unión a heparina codificado por los exones 6 y 7. VEGF 189 y VEGF 206 son altamente básicas y se unen a heparina con gran afinidad (Houck et al., 1992). VEGF 189 y VEGF 206 son casi completamente secuestradas en la matriz extracelular (revisado en Ferrara, 2005). VEGF 121 y VEGF 165 son usualmente las especies moleculares predominantes producidos por una variedad de células normales y transformadas. Ambas de estas son difusibles, pero la secreción de la proteína VEGF 165 puede ser ligado a la superficie celular y a la matriz extracelular (Ferrara y Davis, 1997). VEGF 145 es otra isoforma secretada vinculada a las células endoteliales y su expresión se ha visto más restringida compara con otras formas de VEGF (Poltorak et al., 1997).

Las isoformas ligadas a la matriz extracelular podrían ser liberadas en una forma difusible por heparina, las cuales se desplazan de su unión a heparina como fragmentos,

o por la división de plasmina en el COOH terminal, la cual genera un fragmento bioactivo consistiendo de los primeros 110 aminoácidos del NH₂- terminal (Houck et al., 1992). Dando un papel importante a la activación del plasminógeno durante el proceso fisiológico y patológico de la angiogénesis (Pepper, 2001 revisado en Ferrara 2004).

Los efectos biológicos de VEGF son casi exclusivamente mediados vía dos sitios de unión de alta afinidad perteneciendo a la familia del receptor tirosincinasa, Flt1 o VEGFR-1 y Flk o VEGFR-2 (Ferrara and Davis, 1997), a pesar de que VEGFR-2 o KDR tiene menor afinidad para VEGF que Flt1, ya que El VEGF se une a Flt1 con una constante de disociación (K_d) de 10-20 pM por lo que se le considera que el factor tiene una alta afinidad para este receptor (Vries et al., 1992), mientras que el VEGFR-1 o KDR tiene menor afinidad con una K_d de 75-125 pM (Terman et al., 1992). Estos receptores contienen una región extracelular con siete inmunoglobulinas, también con una sola región transmembranal y un dominio tirosina cinasa (Revisado en Kaczmarek et al., 2005). Un miembro de la misma familia de receptores es VEGFR-3 (Flt-4) (Pajusola et al., 1992), el cual, sin embargo, no es un receptor para VEGF, pero en su lugar une VEGF C y VEGF D (Karkkainen et al., 2002; revisado en Ferrara 2004). Células endoteliales cultivadas expresan de 3000-60000 receptores KDR/célula y 500-3000 receptores Flt1/célula (Bikfalvi et al., 1991; Myoken et al., 1991; Olander et al., 1991). Recientemente, el ligando de reconocimiento de Flt1 fue localizado en el segundo dominio tipo inmunoglobulina. Algunos experimentos en los que se suprime el segundo dominio de Flt1 reportan inhibición en la unión de VEGF a este receptor, mientras que al introducir el segundo dominio del KDR en el Flt1 mutante se restaura la unión de VEGF (Ferrara, 2001).

La regulación de la expresión del gen VEGF ocurre vía diferentes mecanismos, incluyendo hipoxia, factores de crecimiento y citocinas (Ferrara 2000). La señal hipóxica es mediada vía factor inducible de hipoxia-1 (HIF-1), un heterodímero que consiste de una subunidad beta (HIF-1 β), un oxígeno y una subunidad alfa (HIF-1 α). La HIF-1 α es usualmente inestable en presencia de oxígeno y sujeto a ubiquinación dependiente de oxígeno y degradación proteasomal, mientras que durante los estados de hipoxia, HIF-1 α es estable (Semenza, 2001). El dímero HIF-1 se une al elemento de respuesta de hipoxia (HRE) dentro del promotor de VEGF y conduce a la transcripción

de VEGF (Shweiki et al., 1992). Otro factor de transcripción HIF-2alfa, también se acumula durante la hipoxia y se une a la subunidad beta para formar un complejo HIF-1, activando los HREs, conduciendo a una transcripción de VEGF (Stein et al., 1995; Semenza et al., 1997).

La actividad de permeabilidad vascular fue registrada por primera vez *in vivo* en la piel de cerdo guinea, donde la administración de VEGF/VPF causó hiperpermeabilidad en los vasos sanguíneos (Connolly et al., 1989). El mecanismo fundamental posible de la permeabilidad inducida por VEGF esta basado en la rápida fenestración, las cuales fueron observadas en el endotelio de pequeños vasos sanguíneos de roedores después del tratamiento con VEGF 165 (Roberts and Palade 1995). Otros efectos mediados por VEGF incluyen el efecto regulador de células sanguíneas, estimulación de la molécula de adhesión celular vascular-1 (VCMA-1) y la molécula de adhesión intercelular-1 (ICMA-1) en células endoteliales, regulación de diferenciación del hemangioblasto e inducción de vasodilatación *in vitro* (Ferrara, 1993; Ferrara and Davis, 1997; Ferrara, 2004).

3.1. Hipótesis

La expresión de VEGF en células de la granulosa de folículos sanos es mayor que en folículos atrésicos.

3.2. Objetivo General

Conocer la expresión de VEGF en folículos sanos, con atresia inicial y con atresia avanzada.

3.3. Objetivos Específicos

Inducir atresia por la aplicación de LFE a un grupo de ovejas en el día 3 del ciclo estral.

Evaluar la expresión de VEGF en las células de la granulosa de folículos sanos, con atresia inicial y con atresia avanzada mayores de 3 mm.

Conocer si el tratamiento con LFE, tiene efecto sobre la expresión de VEGF en las células de la granulosa de folículos de oveja.

3. PLANTEAMIENTO DEL PROBLEMA

El mecanismo de selección de los folículos que son rescatados de la atresia y sobreviven para quedar como dominantes aún no es del todo claro (Murdoch, 1992). Se sabe que el desarrollo de un folículo depende de la presencia o ausencia de factores de sobrevivencia que promuevan el crecimiento folicular y también protejan a las células de apoptosis. Entre estos factores de crecimiento producidos dentro del ovario destacan IGF (Monget et al., 2002) y VEGF (Mattioli et al., 2000; Greenaway et al., 2004), así como estradiol y las gonadotropinas LH y FSH. En ausencia de estos factores de sobrevivencia, el mecanismo de apoptosis endógena del folículo es activado y se produce atresia. En los últimos años, ha resultado de gran interés la participación que tiene el factor de crecimiento endotelio vascular en el desarrollo y atresia de los folículos, este factor junto con las gonadotropinas y otros factores de crecimiento favorece la creación y el mantenimiento de la vasculatura, lo cual garantiza la afluencia de hormonas, nutrientes y oxígeno a los folículos (Ferrara, 2004). Alon et al., (1995) y Benjamin et al., (1999) han reportado la participación de VEGF como un factor angiogénico, protector de células endoteliales en el humano que favorece la expresión de proteínas antiapoptóticas Bcl-2 y A1 (Gerber et al., 1998). Recientemente, Greenaway et al., (2004) han atribuido a VEGF un papel citoprotector en células no endoteliales, como las de la granulosa de los folículos ováricos de bovino. La co-expresión de VEGF y Flk-1/KDR en células de la granulosa de ovarios de bovino las protege contra la muerte por apoptosis y la atresia folicular.

El tratamiento de cerdas prepúberes con eCG condujo a un aumento en desarrollo folicular y las concentración de VEGF en líquido folicular así como del mRNA de este factor en células de la granulosa (Barboni y et al., 2000), lo cual sugiere que muy probablemente VEGF y FSH pueden tener una acción sinérgica en el desarrollo del folículo y en la selección de aquellos que ovularán o bien que FSH sea indispensable para la correcta expresión de VEGF. Lo anterior nos llevó a preguntarnos si existe variación en la expresión de VEGF en células de la granulosa de folículos sanos, con atresia moderada y con atresia avanzada y, si la disminución en la concentración sanguínea de FSH por el tratamiento con una fuente exógena de inhibina provoca atresia de los folículos y por ende la disminución en la expresión de VEGF?

4. MATERIAL Y MÉTODOS

Este trabajo se realizó en las siguientes instalaciones: Instituto Nacional de Investigaciones Forestales, Agrícolas y Pecuarias (INIFAP) “Las Margaritas” Teziutlán Puebla, Laboratorio Bioquímica de la Reproducción de la Universidad Autónoma Metropolitana-Xochimilco (UAM-X), Laboratorio de Reproducción de la Facultad de Medicina Veterinaria y Zootecnia (FMVZ), UNAM y Laboratorio de Patología del Instituto Nacional de Pediatría (INP).

4.1. Preparación del líquido folicular equino.

El líquido folicular (LFE) se colectó de ovarios de yeguas sacrificadas en el rastro municipal de Nezahualcoyotl, “La Aurora”. Después del sacrificio los ovarios se transportaron sobre hielo al laboratorio bioquímica de la reproducción de la UAM-X, en donde se succionó con jeringa estéril el líquido de los folículos visibles de cada ovario. Se trabajó el número de ovarios necesarios para obtener un volumen de 120 ml de líquido folicular. El líquido se procesó para eliminarle las hormonas esteroides, por el método descrito por Hernández et al., (1997), en donde el LFE se centrifugó a 12000 g durante 20 minutos a 4 °C, con el objetivo de separar detritus y se le agregaron 10mg/ml de carbón activado y 0.1 mg/ml de dextran, agitándolo por 1 hora, mínimo a 4 °C (este procedimiento se realizó 4 veces consecutivas), el LFE se filtró y se le adicionaron 100 UI de penicilina G/ml para finalmente aplicarlo.

4.2. Diseño experimental

Veintiún ovejas de la raza Pelibuey fueron sincronizadas mediante la inserción de una esponja intravaginal impregnada con 45 mg de acetato de fluorogestona (Chronogest, Intervet México). Se dividieron los animales aleatoriamente en tres grupos con 7 animales cada uno: los animales del grupo Estro, se ovariectomizaron el día del estro; los del grupo día 4 del estro sin tratamiento (grupo S/T) y los del grupo tratado con 3 dosis de LFE (grupo LFE) de 3 ml cada una vía intramuscular el día 3 del ciclo, se ovariectomizaron el día 4 del ciclo estral.

El día 5 de la aplicación de las esponjas, a las ovejas del grupo S/T y las del grupo LFE se les inyectó 2.5 mg de prostaglandinas $PGF_{2\alpha}$ por animal vía intramuscular y las esponjas intravaginales se retiraron el día 6 del tratamiento, se verificó la presencia del estro 5 veces al día utilizando un macho con pene desviado. Al grupo estro se le inyectó la misma dosis de prostaglandinas $PGF_{2\alpha}$ que a los grupos S/T y LFE en el día 9, para retirar las esponjas intravaginales el día 10, esperando el estro a las 48 horas.

Los ovarios se recuperaron vía quirúrgica bajo anestesia disociativa, 0.01 ml de hidrocloreuro de xilazina/kg de peso corporal vía intramuscular (Rompum, Bayer México) y 0.02 ml ketamina/kg de peso corporal vía intravenosa (Ketavet 1000, Revetmex México).

Los ovarios recuperados se identificaron con el número de animal y el grupo de pertenencia. Se realizó un esquema con la localización y el tamaño de los folículos observados en la superficie ovárica para usarlo como guía en el análisis histológico de cada ovario.

4.3. Procesamiento de la muestra

Inmediatamente que se recuperaron los ovarios, se fijaron en formaldehído al 10% a temperatura ambiente. Después de 72-96 horas de fijación, los ovarios se colocaron dentro de cassettes histológicos para realizar la deshidratación del tejido, utilizando agua destilada, alcohol 50%, alcohol al 80% (una sola vez), alcohol al 96%, alcohol absoluto, xilol (2 veces) y finalmente incluirlos en bloques de parafina.

El corte de los bloques de parafina se realizó en un microtomo con un grosor de 2 micras, dichos cortes se montaron en laminillas cubiertas con poli-l-lisina, identificándolas con el número de oveja y ovario correspondientes. En la parte superior de la laminilla se colocó el corte histológico de ovario procesado y en la parte inferior se colocó el corte histológico que funcionó como testigo (pulmón bovino). Las laminillas se colocaron en una canastilla de acero inoxidable ó de polipropileno de alta densidad y se introdujeron en la estufa a 60 °C por un tiempo mínimo de 30 minutos hasta 24 horas, para fundir la parafina. De cada ovario se tomó un corte para realizar una tinción con Hematoxilina-Eosina (HyE) para identificar al folículo de mayor

tamaño (5 mm o más) y los folículos que le seguían en tamaño (3-5 mm), así como para realizar la evaluación morfológica de atresia. Se realizaron 10 cortes secuenciales de cada bloque, en los cortes 1 y 5 se realizó la inmunohistoquímica para VEGF.

4.4. Clasificación folicular morfológica

Los folículos de cada ovario se clasificaron como grandes (mayores a 5 mm) y pequeños (3-5 mm) y por su condición morfológica, de acuerdo al número e integridad de las capas de granulosa, en : 1) folículos sanos, con capa multilaminar de células de granulosa intacta y bien organizada; 2) folículos atrésicos tempranos, la capa de las células de granulosa es completamente delgada y en algunos casos llega a estar parcial o completamente separada de la membrana basamental, 3) y folículos atrésicos avanzados, con una capa de células de granulosa desorganizada hasta perder por completo la capa de células de granulosa (Yang 2000).

4.5. Inmunohistoquímica

Se evaluó la expresión del Factor de Crecimiento Endotelio Vascular en células de granulosa de folículos pequeños y grandes, sanos, con atresia temprana y con atresia avanzada por Inmunohistoquímica (IHQ) utilizando un anticuerpo anti-VEGF policlonal de conejo (SyMed, No. cat. 18-0254), contra VEGF humano.

Las laminillas con el tejido se desparafinaron a 60 °C por 30 minutos, se hidrataron e inmediatamente se introdujeron en un vaso de copplin con 7 ml de buffer de citrato pH 6.5 (Bio SB 20X immuno/DNA retriever No. cat. BSB 0021) y agua destilada para realizar el desenmascaramiento del antígeno que se realizó a presión y temperatura constante (potencia 100 durante 5 minutos), empleando para ello una olla de presión para microondas, después de este procedimiento, las laminillas se dejaron enfriar, se eliminó el buffer de citrato pH 6.5; lavándolas con agua destilada por 3 veces, se bañaron en peróxido de hidrógeno al 0.9 % (para bloquear la peroxidasa endógena), durante 4 minutos, finalmente se lavaron con agua destilada 3 veces consecutivas para ser montadas en un sistema de capilaridad para Inmunohistoquímica (Shandon coverplates No. cat 72110017) con PBS (0.13 M) durante 4 minutos. Se agregaron 100 µl de albúmina sérica bovina (Sigma No. cat 1331a) por 5 minutos para bloquear sitios

de unión inespecíficos y posteriormente se agregaron 100 µl de anticuerpo primario (anti-VEGF), desarrollado para humano por 45 minutos, se lavó con PBS por 4 minutos y se agregó un anticuerpo secundario biotilado (Biogenex, No. cat. 94583, contra la región Fc de la inmunoglobulina de cuatro especies (ratón, conejo, cabra y hámster) desarrollado en cabra) por 30 minutos; se lavó nuevamente con PBS y se agregaron 100 µl del complejo HRP (estreptavidina-peroxidasa) durante 30 minutos (Biogenex No. cat 945883). Nuevamente se lavó con PBS y se procedió a revelar la laminilla con 100 µl de diamino-benzidina (Bio SB No. cat BSB 0017), observando la laminilla al microscopio de luz a 40X.

4.6. *Conteo de células positivas a VEGF*

Del total de folículos presentes en cada laminilla, se evaluó la reacción a VEGF por la técnica de inmunohistoquímica en él o los folículos grandes y tres folículos pequeños.

En cada folículo seleccionado, se evaluó la expresión de VEGF en 400 células de la granulosa dentro de cuatro campos ópticos a 40X cada uno (100 en cada campo), tomando como referencia los cuatro puntos cardinales (norte, sur, este y oeste) en dirección a las manecillas del reloj. Una vez contado los cuatro campos por cada replica (dos replicas por bloque) se calculó el promedio de células positivas y éste fue tomado como el número de células positivas a VEGF por folículo.

4.7. *Intensidad en la expresión de VEGF*

La intensidad de tinción que mostraron las células de la granulosa positivas a VEGF, fue calificada como baja, media y alta para cada folículo.

4.8. *Análisis estadístico*

Para determinar las diferencias estadísticas se realizaron, un análisis de varianza para los grados de atresia, tamaño folicular y expresión de VEGF y un análisis de regresión ordinal para los grados atresia, tamaño folicular e intensidad de tinción de VEGF.

5. RESULTADOS

5.1. Respuesta al tratamiento de sincronización

De las 21 ovejas sometidas a sincronización, 16 mostraron estro, quedando distribuidas de la siguiente manera: 6 ovejas en el grupo estro, 4 en el grupo S/T y 3 en el grupo LFE.

5.2. Clasificación folicular por condición morfológica

En la figura 1, se presentan imágenes características de folículos ováricos de ovino clasificados como sanos (a), con atresia temprana (b) y atresia avanzada (c).

El análisis de regresión ordinal encontró diferencia estadísticamente significativa ($P < 0.001$) entre la condición morfológica de los folículos del grupo S/T y el LFE; notándose un efecto muy claro del tratamiento con líquido folicular sobre la distribución de los folículos con respecto a su condición morfológica; en el grupo S/T, el 64% de los folículos son sanos y el 36% atrésicos y en el grupo LFE, el 2.85% de los folículos son sanos y el 97.15% atrésicos. Al comparar el grupo estro con el grupo S/T, también se encontraron diferencias ($P = 0.04$). En el grupo estro, el 42% de los folículos fueron sanos y el 58% atrésicos vs 64% sanos y 36% atrésicos del grupo S/T (Cuadro 1).

5.3. Clasificación folicular por tamaño y condición morfológica

Se encontró interacción del tratamiento con el tamaño y el grado de atresia en grupo tratado con LFE, ya que en este grupo, no se encontraron folículos mayores a 5 mm sanos (Cuadro 2). En el grupo estro, de la población total de folículos mayores a 5 mm, el 85.71% son sanos y el 14.29% presenta atresia avanzada, en folículos menores a 5 mm el 29.17% son sanos, el 41.66% presenta atresia temprana y el 29.17% atresia avanzada; en el grupo S/T, en folículos mayores a 5 mm, el 80% son sanos y el 20% presentan atresia temprana, en folículos menores a 5 mm el 58.82% son sanos, el 23.53% presentan atresia temprana y el 17.65% atresia avanzada y en el grupo LFE, en los folículos mayores a 5mm, no hubo folículos sanos, el 14.29% presenta atresia temprana

y el 85.71% atresia avanzada, en folículos menores a 5 mm el 3.57% son sanos, el 32.14% presenta atresia temprana y el 64.29% atresia avanzada.

5.4. Expresión de VEGF en células de la granulosa

No hubo efecto del tratamiento sobre la expresión de VEGF ($P > 0.05$) en las células de la granulosa, en el grupo estro (79.12 ± 26.87), grupo S/T (91.47 ± 16.88) y grupo LFE (94.69 ± 11.76), (Figura 2).

5.5. Intensidad de inmunotinción de VEGF por Tratamiento

Además del porcentaje de células positivas, se realizó una clasificación de acuerdo a la intensidad de la marca para VEGF en células de la granulosa de los tres grupos.

La aplicación de líquido folicular tuvo efecto sobre la intensidad de VEGF en células de la granulosa de folículos recuperados en los grupos S/T y LFE, el análisis de regresión ordinal encontró diferencia estadística significativa ($P < 0.001$) entre estos grupos. En el cuadro 3, se puede observar que en el grupo S/T, la mayor proporción de folículos presentaron una intensidad media (50%), mientras que en el grupo LFE, el 80% de los folículos presentaron intensidad baja. Al comparar los grupos Estro y S/T, no se encontró diferencia estadística significativa ($P = 0.07$) en la intensidad de VEGF; en el grupo Estro, el 52% de los folículos presentó intensidad media (Figura 3).

5.6. Intensidad de inmunotinción para VEGF en folículos sanos y atrésicos

Se encontró un efecto del grado de atresia del folículo sobre la intensidad de la marca para VEGF. El análisis de regresión ordinal reveló que existe diferencia estadística significativa ($P = 0.02$) entre folículos sanos y con atresia temprana con respecto a la intensidad de VEGF. En los folículos sanos, la mayoría presentó una intensidad media (64%) y en folículos con atresia temprana, el mayor porcentaje de éstos presentaron intensidad baja (60%). Al comparar la intensidad de VEGF de los folículos sanos contra folículos con atresia avanzada encontramos una diferencia estadística altamente significativa ($P < 0.001$) De los folículos con atresia avanzada, el 71% mostró una intensidad baja.

Cuando se comparo la intensidad de la tinción a VEGF entre los grupos tratados con LFE y sin tratamiento del día 4, se encontró una diferencia altamente significativa ($P < 0.001$) (Cuadro 4).

6. DISCUSIÓN

Este estudio demostró que existe expresión de VEGF tanto en folículos sanos como en folículos con atresia inicial o avanzada. Sin embargo, la inducción de la atresia con una fuente externa de inhibina redujo la intensidad de la expresión de VEGF en los folículos.

El tratamiento con LFE, una fuente de inhibina y por tanto inhibidor de FSH, no tuvo efecto sobre el número de células de la granulosa que tuvieron expresión a VEGF. Sin embargo, cuando se analizó la intensidad de la marca que tuvieron las células positivas a esta proteína, se encontró un efecto negativo significativo de la aplicación de LFE, de manera que en los folículos de las hembras del grupo LFE, el 80% presentaron una baja intensidad de la marca a VEGF, mientras que en el grupo S/T, el 50% de los folículos presentaron intensidad media, lo cual probablemente significa que el tratamiento con una fuente rica en inhibina puede afectar la cantidad de proteína VEGF que cada célula de la granulosa produce. En estudios similares Guzmán et al., (2006) reportaron que no existe diferencia en la expresión de VEGF en células de la granulosa entre el tipo folículos (dominantes vs subordinados) del día 4 del ciclo estral de bovino. Con los resultados obtenidos podemos sugerir que la cantidad de proteína que pueden producir las células de la granulosa de folículos sanos y atrésicos se ve afectada por la inhibina al suprimir los niveles de FSH.

La intensidad de VEGF en células de la granulosa se vio afectada por el grado de atresia de los folículos. En los folículos sanos, la mayoría presentó intensidad media (64%), en folículos con atresia temprana, el mayor porcentaje de éstos presentaron intensidad baja (60%) y el 71% de los folículos con atresia avanzada también mostraron intensidad baja. Un estudio reciente demostró que VEGF inhibe la apoptosis en células de la granulosa vía el receptor VEGFR2 (Greenaway et al., 2004). Una reducción en la tasa de producción de VEGF podría conducir a la atresia. Uno de los signos tempranos de la atresia folicular es una reducción en la síntesis de DNA en las células endoteliales acompañado de una disminución de la vascularidad del folículo (Greenwald, 1989). Los folículos con atresia inicial regeneran cuando son cultivados *in vitro* y reciben los nutrientes necesarios, lo que sugiere que el folículo se vuelve atrésico debido a la pérdida de vascularidad, que limita el acceso a los nutrientes, sustratos y hormonas

tróficas necesario para el metabolismo de las células foliculares (Moor and Seamark, 1986). Al respecto, Shimizu et al., (2003), reportaron que el incremento en la densidad vascular alrededor del folículo preantral contribuye a la inhibición de la atresia.

Shimizu et al., (2002) reportaron que la expresión de VEGF 120 y VEGF 164 se incrementaron en células de la granulosa de folículos de cerdas tratadas con eCG. Este mismo autor y su grupo, en un trabajo más reciente (Shimizu et al., 2007) encontraron que las células de la granulosa expresan VEGF120 ó VEGF164, dependiendo de la concentración de FSH que se adicione al medio de cultivo. Cuando agregaron concentraciones bajas de FSH (1ng/ml), se estimuló el mRNA de VEGF 164 mientras que la expresión de mRNA de VEGF 120 sólo fue inducida por altas concentraciones de FSH (10ng/ml). Así mismo, el estradiol también favoreció la expresión de VEGF120, pero no VEGF164. Los resultados de estos autores indican que FSH y estradiol alteran la expresión de VEGF. Es probable entonces que cada isoforma de VEGF participe de manera diferente en el desarrollo folicular y que justamente sea el nivel de FSH en las diferentes etapas del ciclo estral, la que determine que isoforma se debe sintetizar, o bien, que sea la capacidad de cada folículo para interactuar con esta gonadotropina la que favorezca la expresión de las distintas isoformas de VEGF. Aunque el anticuerpo que se usó en este estudio, no diferencia entre las isoformas de VEGF, probablemente en nuestros resultados, la disminución ocasionada en la concentración de FSH por la aplicación de LFE permitió la expresión de la isoforma 164, mientras que los folículos de los animales no tratados tal vez expresaron VEGF120, de allí que no hayamos encontrado diferencia en la expresión de VEGF. Lo anterior sería cierto sólo hasta antes de que las células del folículo que está presentando la atresia no lleguen al punto de “no retorno” durante el proceso de muerte celular. Ahora bien, la diferencia que encontramos en la intensidad de la marca para VEGF entre los animales del grupo S/T y el grupo LFE, reflejan que como en los folículos de los animales tratados con LFE, la gran mayoría tuvo una intensidad baja de la tinción para VEGF, seguramente muchas células en estos folículos ya estaban metabolitamente inactivos.

En un trabajo realizado por nuestro grupo de investigación, se encontró que durante el inicio de la atresia en folículos pequeños (3-6 mm) hubo más abundancia relativa de VEGF120, mientras que en folículos grandes (>6 mm) las isoformas más abundantes fueron VEGF164 y VEGF188 (Alonso-Pozos et al., 2006).

La apoptosis representa el principal tipo de muerte dentro de la atresia folicular, como se revisó antes, la apoptosis es un proceso activo, que echa a andar la expresión de moléculas importantes para tratar de rescatar a la célula de este destino o bien estados más avanzados, para su propia ejecución. La expresión de VEGF en las células del folículo puede ser un intento de lucha y tratar de regresar al folículo a su funcionamiento normal, sin embargo cuando no lo logra termina en un proceso degenerativo y progresivo hasta que se eliminan todos los restos del folículo.

La condición morfológica que se encontró en los folículos del grupo tratado con LFE seguramente responde a los efectos que el tratamiento tuvo sobre los niveles de FSH. Como se sabe, FSH es un factor de proliferación y sobrevivencia celular que favorecen el crecimiento del folículo en desarrollo (Mcgee and Hsueh, 2000). Estas evidencias surgen puesto que la hipofisectomía en ratas, resultó en apoptosis y atresia de los folículos en desarrollo (Nahum et al., 1996). De la misma forma, el tratamiento con FSH a folículos antrales tempranos en cultivo evitó la atresia y la apoptosis folicular. *In vivo* la administración de FSH cambia el balance entre folículos sanos y atrésicos, al evitar o retrasar la atresia (Jablonka-Shariff et al., 1996).

Uno de los factores de crecimiento más importantes que juega un papel fundamental en el proceso de angiogénesis a nivel folicular es el VEGF (revisado en Hunter et al., 2004).

Algunos estudios sugieren que la expresión de VEGF, es regulada por gonadotropinas y esteroides (Chistenson and Stouffer, 1997; Hazzard et al., 1999). En la mujer, el mensajero de VEGF es regulado a la alta en las células de la granulosa por la aplicación de hCG, FSH recombinante humana y prostaglandinas E2 de manera dosis dependiente (Laitinen et al., 1997). La LH y el factor de crecimiento insulinoide IGF-1, estimulan la expresión de VEGF en cultivos de células de la granulosa de bovinos (Schams et al., 2001) y en primates (Martínez-Chequer et al., 2003), también de manera dosis dependiente. En cerdas, la administración de eCG aumenta la expresión del mRNA para VEGF en células de la granulosa, de los receptores VEGF-1 y VEGF-2 en teca (Shimizu et al., 2002) y de los niveles de VEGF en líquido folicular, pero no del nivel del mRNA de VEGF en la teca (Barboni et al., 2000). En cerdas prepúberes tratadas con

eCG, condujo al aumento progresivo en el promedio del diámetro folicular, aumentando en forma paralela las concentraciones de VEGF en el líquido folicular y su mRNA en células de la granulosa (Barboni y col., 2000), lo cual sugiere que muy probablemente VEGF y FSH deben tener una acción sinérgica en el desarrollo y selección del folículo que va a ovular o bien que FSH sea indispensable para la correcta expresión de VEGF. En general se reconoce que el desarrollo folicular depende de la angiogénesis (Koos, 1989), mientras que la atresia folicular se asocia con frecuencia a la disminución en la vascularización. La angiogénesis es evidente durante el estado pre antral tardío, durante la adquisición de la teca (Suzuki et al., 1998). En el folículo antral tardío se establece la red vascular interna, en donde los capilares se dividen para formar una red rica de capilares semejante a una canasta. El establecimiento de la red capilar interna, coincide con el periodo de rápido crecimiento y diferenciación del folículo (Jiang et al., 2002; Neeman et al., 1997). Estos vasos sanguíneos recién formados aseguran un incremento en el suministro de gonadotropinas, factores de crecimiento, oxígeno, precursores de esteroides, así como de otras sustancias para el crecimiento folicular (Zelevnik et al., 1981). Esto sugiere que la entrada de gonadotropinas periféricas a través de un sistema vascular altamente desarrollado en el folículo, juega un papel importante en la selección y crecimiento del folículo dominante (Wulff et al., 2002). Por lo tanto, la ausencia o disminución de gonadotropinas limita la formación de la red capilar y como consecuencia causa atresia folicular.

Los resultados del presente estudio indican que la aplicación LFE es un importante inductor de atresia folicular en ovejas, ya que de acuerdo a la evaluación morfológica, en este estudio se encontró que el 97% de los folículos recuperados de los animales tratados fueron atrésicos, en tanto que para el grupo S/T sólo el 36%. En estudios previos, también en ovejas la aplicación de líquido folicular bovino en intervalos de 12 horas indujo la muerte de las células de la granulosa (apoptosis), antes de apreciar una disminución en la capacidad de las células de granulosa para responder a gonadotropinas o para sintetizar 17β -estradiol (Jolly et al., 1996).

El líquido folicular es una fuente rica en inhibina (Roser et al., 1994). Algunos autores han encontrado que la aplicación de líquido folicular equino libre de esteroides en ovejas (Hernández et al., 1997) y líquido folicular bovino (LFb) en animales de la

misma especie (Bleach et al., 2001) provocaron la disminución significativa de los niveles de FSH circulante.

En otros estudios, la aplicación de inhibina evitó la secreción de FSH a nivel hipofisiario (McNelly, 1984; Baird et al., 1986), ocasionando la supresión del crecimiento folicular y de la producción de estradiol (Wallace y McNelly, 1986; McLeod y McNelly, 1987; Hunter et al., 1988).

En este experimento pudimos constatar que la aplicación de LFE en ovejas tuvo un efecto negativo sobre el desarrollo folicular, lo que confirma la alta homología que tiene la inhibina en diferentes especies.

Como se sabe, la inmunohistoquímica (IHQ) es una técnica cualitativa y tiene como fundamento el uso de reactivos basados en anticuerpos para localizar epítopes(os) específicos en secciones de tejido. Los marcadores utilizados (epítopes presentes/ausentes) en IHQ como antígenos pueden ser visualizados por medio de anticuerpos específicos, estos anticuerpos una vez unidos a su receptor en el tejido son identificados por medios colorimétricos y/o enzimáticos; la reacción química generada puede ser citoplasmática, nuclear o en la superficie de las células (membrana), esta reacción química refleja la expresión de la proteína o epítope, por lo tanto a mayor intensidad de la marca del anticuerpo mayor expresión de la proteína (VEGF).

7. CONCLUSIONES

1. El factor de crecimiento endotelio vascular (VEGF) se expresa en células de granulosa de folículos antrales de ovejas sanos y atrésicos mayores de 3 mm
2. El tratamiento con 3 dosis de LFE en 24 horas, provocó la atresia de la mayoría de los folículos recuperados el día 4 del ciclo estral de las ovejas.
3. La expresión de VEGF en las células de la granulosa de folículos recuperados el día 4 del ciclo estral, no se modificó por la aplicación de LFE ni por el tamaño y el grado de atresia de los folículos.
4. El tratamiento con LFE no modificó el porcentaje de células positivas a VEGF aunque sí disminuyó la intensidad de la marca.
5. De acuerdo a los resultados, se rechaza la hipótesis ya que no se encontró diferencia en la expresión de VEGF entre folículos sanos, con atresia inicial y con atresia avanzada.

LITERATURA CITADA

1. Aaltonen J, Laitinen MP, Vuojolainen K, Jaatinen R, Horelli-Kuitunen N, Seppa L, Louhio H, Tuuri T, Sjoberg J, Butzow R, Hovata O, Dale L, Ritvos O. 1999. Human growth differentiation factor 9 GDF-9 and its novel homolog GDF-9B are expressed in oocytes during early folliculogénesis. *J Clin Endocrinol Metab* 84:2744-50.
2. Acosta TJ, Hayashi KG, Ohtani M, Miyamoto A. 2003. Local changes in blood flow within the preovulatory follicle wall and early corpus luteum in cows. *Reprod* 125:759-767.
3. Adams GP, Matteri RL, Kastelic JP, Ko JCH and Ginther OJ. 1992. Association between surges of follicle-stimulating hormone and the emergence of follicular waves in heifers. *J Reprod Fert* 94:177-188.
4. Adams GP, Kol K, Smith CA, Ginther OJ. 1993a. Selection of a dominant follicle and suppression of follicular growth in heifers. *Anim Reprod Sci* 30:259-271.
5. Adams GP, Kol K, Smith CA, Ginther OJ. 1993b. Effect of the dominant follicle on regression of its subordinates in heifers. *Canadian J Anim Sci* 72:267-275.
6. Adams GP. 1999. Comparative patterns of follicle development and selection in ruminants. *Reprod Dom Rum IV. J. Reprod. Fertil. Suppl.* 54:33-48.
7. Agustin HG. 2000. Vascular morphogenesis in the ovary. *Baillere's clin Obstet Gynecol* 14:867-82.
8. Alon T, Hemo I, Itin A, Pe'er J, Stone J, Keshet E. 1995. Vascular endothelial growth factor acts as a survival factor for newly formed retinal vessels and has implications for retinopathy of prematurity. *Nature Med* 1:1024-1028.
9. Alonso-Pozos, I, M. Romano-Pardo, C. Gutiérrez-Aguilar, A. Ávalos-Rodríguez, M. Vergara-Onofre, A. Rosado-García, y A. Rosales-Torres (2006) Expresión de isoformas del factor de crecimiento endotelio vascular (VEGF) durante el desarrollo y atresia folicular en las células de la granulosa y de la teca de los folículos de oveja. XXXI Reunión Anual de la Academia de Investigación en Biología de la Reproducción, Acapulco, Guerrero, México del 11, 12 y 13 de mayo.
10. Armstrong DG and Webb R. 1997. Ovarian follicular dominance: the role of intraovarian growth factors and novel proteins. *J Reprod Fert* 2:139-146.
11. Bagavandos P, Midgley ARJ, Wicha M. 1983. Developmental changes in the ovarian follicular basal lamina detected by immunofluorescence and electron microscopy. *J Histochem Cytochem* 31:633-640.
12. Baird A, Hsueh AJ. 1986. Fibroblast growth factor as an intraovarian hormone: differential regulation of steroidogenesis by an angiogenic factor. *Regul Pept.*;16(3-4):243-50.
13. Baird D, Campbell B, Mann G, McNelly A. 1991. Inhibin and oestradiol of the control of FSH secretion in the sheep. *J. Reprod Fertil.* 115:111-124.
14. Bao B, Garverick HA, Smith MF, Salfen BE, Youngquist RS. 1997a. Changes in messenger ribonucleic acid encoding luteinizing hormone receptor, cytochrome P450-side chain cleavage, and aromatase are associated with recruitment and selection of bovine ovarian follicles. *Biol Reprod* 56:1158-1168.
15. Bao B, Garverick HA, Smith GW, Smith MF, Salfen BE, Youngquist RS. 1997b. Expression of messenger RNA encoding β -hidroxiesteroide

- deshydrogenasa isomerase during recruitment and selection of bovine ovarian follicles: identification of dominant follicles by expression of 3 β -HSD in FNA within the granulosa cell layer. *Biol Reprod* 56:1466-1473.
16. Barboni B, Turriani M, Galeati T, Spinaci M, Bacci ML, Forni M and Mattioli M. 2000. Vascular endothelial growth factor production in growing pig antral follicles. *Biol Reprod* 63: 858-864.
 17. Bassini G, Bianco F, Bussolati S, Grasselli F. 2004. The effects of reduced oxygen tension on swine granulosa cells. *Regulatory Peptides* 120:69-75.
 18. Benjamin LE, Golijanin D, Itin A, Pode D, Keshet E 1999 Selective ablation of immature blood vessels in established human tumors follows vascular endothelial growth factor withdrawal. *J Clin Invest* 103:159-165.
 19. Bianco F, Basini G, Santini S, Grasselli F. 2005. Angiogenic activity of swine granulosa cells: effects of hypoxia and the role of VEGF. *Vet Res Com* 2:157-159.
 20. Bikfalvi A, Sauzeau C, Moukadiri H, Maclouf J, Busso N, Bryckaert M, Plouet J, Tobelem G. 1991. Interaction of vasculotropin/vascular endothelial cell growth factor with human umbilical vein endothelial cells: binding, internalization, degradation, and biological effects. *J Cell Physiol.* 149(1):50-59
 21. Block E. 1951. Quantitative morphological investigation of the follicular system in women. *Acta Endocrinol* 8:33-54.
 22. Bo GA. 2002. Dinámica follicular y tratamientos hormonales para sincronizar la ovulación en el ganado bovino. *Memorias del XI Congreso Venezolano de la producción y la industria animal.* Valera 22-26 octubre.
 23. Bodensteiner KJ, Clay CM, Moeller CL, Sawyer HR 1999 Molecular cloning of the ovine growth/differentiation factor-9 gene and expression of growth/differentiation factor- 9 in ovine and bovine ovaries. *Biol Reprod*; 60:381-386.
 24. Boone DL, Yan W, Tsang BK. 1995. Identification of a deoxyribonuclease I-like endonuclease in rat granulosa cell and luteal cell nuclei. *Biol Reprod* 53:1057-1065.
 25. Boom DL, Tsang BK. 1997a. Apoptosis: the role of DNAase I, in: Tilly JL, Straus III JF, Tenniswood M. (eds.), *Cell Death Reprod Physiol.* New York: Springer-Verlag; 249-271.
 26. Boom DL, Tsang BK. 1997b. Identification and localization of DNAase I in the rat ovary. *Biol Reprod* 57:813-821.
 27. Braw-Tal R. 1994. Expression of mRNA for follistatin and inhibin/activin subunits during follicular growth and atresia. *J Mol Endocrinol.* (3):253-64.
 28. Cahill LP, Mariana JC, Mauleón F. 1979. Total follicular population in ewes of high and low ovulation rates. *J Reprod Fert* 55:27-36.
 29. Cameron VA, Nishimura E, Mathews LS, Lewis KA, Sawchenko PE, Vale WW. 1994. Hybridization histochemical localization of activin receptor subtypes in rat brain, pituitary, ovary and testis. *Endocrinol* 134:199-808.
 30. Campbell BK, Scaramuzzi RJ, Webb R. 1995. Control of antral follicle development and selection in sheep and cattle. *J. Reprod. Fert* 49 (suppl):335-350.
 31. Carson RS, Findlay JK, Clarke IJ, Burger HG. 1981. Estradiol, testosterone and androstenedione in ovine follicular fluid during growth and atresia of ovarian follicles. *Biol Reprod* 24:105-113.

32. Charney DD, Didio LJ, Motta P. 1975. The development of rabbit ovarian follicles following copulation. *Fertil Steril*. 26:257-270.
33. Chedrese J. 2003. Regulacion autocrina y paracrina del desarrollo folicular I: efecto de los esteroides. *Rev Col Cienc Pec*, 16:171-182.
34. Chen M, Wang J. 2002. Initiator caspases in apoptosis signaling pathways. *Apoptosis* 7:313-3139.
35. Cheng AC, Huang TC, Lai CS, Pan MH. 2005. Induction of apoptosis by luteolin through cleavage of Bcl-2 family in human leukemia HL-60 cells. *Eur J Pharmacol* 509:1-10.
36. Christenson LK, Stouffer RL. 1997. Follicle-stimulating hormone and luteinizing hormone/chorionic gonadotropin stimulation of vascular endothelial factor production by macaque granulosa cells from pre and periovulatory follicles. *J Clin Endocrinol Metab* 82:2135-42.
37. Chun SY, Billing H, Tilly JL, Furuta I, Tsafiriri A, Hsueh AJW. 1994. Gonadotrophin suppression of apoptosis in culture preovulatory follicles: mediatory role of endogenous insulin-growth factor-I. *Endocrinol* 135:1845-1853.
38. Claffey KP, Senger DR, Spiegelman BM 1995. Structural requirements for dimerization, glycosylation, secretion, and biological function of VPF/VEGF. *Biochim Biophys Acta* 1246(1):1-9.
39. Clark DE, Tisdall DJ, Filder AE, McNatty KP. 1996. Localization of mRNA encoding c-kit during the initiation on folliculogenesis in ovine fetal ovaries. *J Reprod Fert* 106:329-335.
40. Clark LJ, Irving-Rodgers HF, Dharmaraja AM, Rodgers RJ. 2004. Theca intern: the other side of bovine follicular atresia. *Biol Reprod* 71:1071-1078.
41. Connolly DT, Olander JV, Heuvelman D, Nelson R, Monsell R, Siegel N, Haymore BL, Leimgruber R, Feder J. 1989. Human vascular permeability factor. Isolation from U937 cells. *J Biol Chem* 264:20017-20024.
42. De Felici M, Dolci S, Pesce. 1993. Proliferation of mouse primordial germ cells in vitro: a key role for c AMP. *Dev Biol* 157:277-280.
43. Denekamp J. 1984. Vasculature as a target for tumor therapy. In *Progress in Applied Microcirculation*, pp 28-38. Eds Hammersen F Hudlicka O. Karger, Basel.
44. Eppig JJ. 2001. Oocyte control of ovarian follicular development and function in mammals. *Reproduction*. 122(6):829-38. Review.
45. Ferrara N, Houck K, Jakeman L, Leung DW. 1992. Molecular and biological properties of the vascular endothelial growth factor family of proteins. *Endocrine Reviews*, 13:18-32.
46. Ferrara N. 1993. Vascular endothelial growth factor. *Trends in Cardiovascular Medicine* 3:244-250.
47. Ferrara N. 2000. Vascular endothelial growth factor and the regulation of angiogenesis. *Recent Prog Horm Res* 55:15-36.
48. Folkman J, Klagsbrun M. 1987. Angiogenic factors. *Science* 235: 442-447.
49. Folkman J, Shing Y. 1992. Angiogenesis. *J Biol Chem* 267:10931-10934.
50. Fortune EJ, Rivera MG, Evans ACO, and Turzillo A. 2001. Differentiation of Dominant Versus Subordinate Follicles in Cattle. *Biol Reprod* 65:648-654.
51. Gaido ML, Cidlowski JA. 1991. Identification, purification, and characterization of a calcium-dependent endonuclease (NUC18) from apoptotic rat thymocytes. NUC18 is not histone H2B. *J Biol Chem* 266:18580-18585

52. Garcia R, Ballesteros LM, Hernandez-Perez O, Rosales AM, Espinosa R, Soto H, Diaz de Leon L, Rosado A. 1997. Metalloproteinase activity during growth, maturation and atresia in the ovarian follicles of the goat. *Anim Reprod Sci.* 47:211-28.
53. Gerber HP, Dixit V and Ferrara N. 1998a. Vascular endothelial growth factor induces expression of the antiapoptotic proteins. Bcl-2 and A1 in vascular endothelial cells. *J Biol Chem* 273:13313-13316
54. Gerber HP, McMurtrey A, Kowalski J, Yan M, Keyt BA, Dixit V and Ferrara N. 1998b. Vascular endothelial growth factor regulates endothelial cell survival through the phosphatidylinositol 3-kinase/Akt signal transduction pathway. Requirement for Flk-1/KDR activation. *J Biol Chem* 273:30336-30343.
55. Ginther O, Kot K, Wiltbank M. 1995. Association between emergence follicular waves and fluctuation in FSH concentration during the estrous cycle in ewes. *Theriogenology.* 43:689-703.
56. Ginther OJ, Beg MA, Donadeu FX, Bergfelt DR. 2003. Mechanism of follicle deviation in monovular farm species. *Anim Repr Sci* 78:239-257.
57. Gomez R, Simon C, Remohi J, Pellicer A. 2003. Administration of moderate and high doses of gonadotropins to female rats increases ovarian vascular endothelial growth factor (VEGF) and VEGF receptor-2 expression that is associated to vascular hyperpermeability. *Biol Reprod* 68:2164-2171.
58. Gordon JD, Mesiano S, Zaloudek CJ. 1996. Vascular endothelial factor localization in human ovary and fallopian tubes: possible role in reproductive function and ovary cyst formation. *J Endocrin Metabol* 81:353-9.
59. Grasselli F, Basini G, Bussolati S, Tamanini C. 2002. Effects of VEGF and bFGF on proliferation and production of steroids and nitric oxide in porcine granulosa cells. *Reprod Dom Anim* 37: 362-368.
60. Greenaway J, Connor K, Pedersen G.H, Coomber L.B, Lamarre J, and Petrik J. 2004. Vascular Endothelial Growth Factor and Its Receptor, Flk-1/KDR, Are Cytoprotective in the Extravascular Compartment of the Ovarian Follicle. *Endocrinol* 145:2896-2905.
61. Greenaway J, Gentry PA, Feige JJ, LaMarre J, Petrik JJ. 2005. Thrombospondin and vascular endothelial growth factor are cyclically expressed in an inverse pattern during bovine ovarian follicle development. *Biol Reprod* 72.1071-1078.
62. Greenwald GS. 1989. Temporal and topographic changes in DNA synthesis after induced follicular atresia. *Biol Reprod*, 41:175-181.
63. Guthrie HD, Cooper BS. 1996. Follicular Atresia, follicular fluid hormones, and circulating hormones during the midluteal phase of the estrous cycle in pigs. *Biol Reprod* 55(3):543-7.
64. Guzmán A, Vergara M, Ávalos A, García FJ, Gutiérrez C, Rosado GA, Rosales AM. 2006. Expresión del factor de crecimiento endotelio vascular (VEGF) y su receptor tipo 2 (Flk-1) en células de la granulosa de folículos dominantes y subordinados de bovinos. En: Anónimo. Trabajos en extenso. XXXI Reunión anual, 11-13 de mayo de 2006; Guerrero (México). México: Academia de Investigación en Biología de la reproducción, AC; 2006.
65. Harrington EO, Smeglin A, Newton J, Ballard G, Round S S. 2001. Protein tyrosine phosphate-dependent proteolysis of focal adhesion complexes in endothelial cell apoptosis. *Am J Physiol Lung Cell Mol Physiol* 280:L342-353.

66. Hazzard TM, Molskness TA, Chaffin CL, Stouffer RL. 1999. Vascular endothelial growth factor and angiopoietin regulation by gonadotrophin and steroids in macaque granulosa cells during the peri-ovulatory interval. *Mol Hum Reprod* 5: 1115-1121.
67. Hernández CJ., Murcia MC., Valencia MJ, Rojas MS, Zarate MJ, Zarco L. 1997. Efecto del líquido folicular equino libre de esteroides sobre la secreción de FSH en ovejas en anestro estacional y la presentación del estro inducido con PGF2 α en ovejas ciclando. *Vet Méx.* 28:117-121.
68. Hernández CJ, García AA, Valencia MJ. 2001. Efecto del líquido folicular libre de esteroides durante la fase lútea sobre la tasa de ovulación en ovejas Rambouillet. *Vet Méx* 32(1):1-5.
69. Hernández CJ, Zarco QL, Kindahl H, Valencia MJ. 2004. Desarrollo folicular, concentraciones de FSH, estradiol, y MPGF α asociado con persistencia lútea inducida por la administración de líquido folicular equino libre de esteroides en la oveja. *Vet Méx* 35(1) 55-64.
70. Hirshfield AN. 1991. Development of follicles in the mammalian ovary. *Int Rev Cytol* 124:43-101.
71. Houck KA, Ferrara N, Winer J, Cachianes G, Li B, Leung DW. 1991. The vascular endothelial growth factor family: identification of a fourth molecular species and characterization of alternative splicing of RNA. *Mol Endocrinol* 5:1806-1814.
72. Houck KA, Leung DW, Rowl AM, Weiner J, Ferrara N. 1992. Dual regulation of vascular endothelial growth factor for bioavailability by generic and proteolytic mechanisms. *J. Biol Chem* 267:26031-26037.
73. Hsu SY, and Hsueh AJW. 1997. Hormonal regulation of apoptosis. An ovarian perspective. *Trends Endocrinol Metab* 8:208-213.
74. Hsueh AJ, Billig H, Tsafiri A. 1994. Ovarian follicle atresia: a hormonally controlled apoptotic process. *Endocr Rev.* 15:707-24.
75. Hu CL, Cowan RG, Harman RM, Quirk SM. 2004. Cell cycle progression and activation of Akt kinase are required for insulin-like growth factor I-mediated suppression of apoptosis in granulosa cells. *Mol Endocrinol* 18:326-38
76. Huang E, Manova K, Packer AI, Sanchez S, Bachvarova RF, Besmer BP. 1993. The murine steel panda mutation affects kit ligand expression and growth of early ovarian follicles. *Develop Biol* 157:100-109.
77. Huet C, Monget P, Pisselet C, Monniaux D. 1997. Changes in extracellular matrix components and steroidogenic enzymes during growth and atresia of antral ovarian follicles in the sheep. *Biol Reprod* 56(4):1025-34.
78. Hunter MG, Robinson RS, Mann GE, Webb R. 2004. Endocrine and paracrine control of follicular development and ovulation rate in farm species. *Anim Repr Sci* 82-83:461-477.
79. Jablonka-Shariff A, Reynolds LP, Redmer DA. 1996. Effects of gonadotropin treatment and withdrawal on follicular growth, cell proliferation, and atresia in ewes. *Biol Reprod.* 55:693-702.
80. Jiang JY, Macchiarelli G, Miyabayashi K, Sato E. 2002. Follicular microvasculature in the porcine ovary. *Cell Tissue Res.* 310:93-101.
81. Jiang JY, Macchiarelli G, Tsang BK, Sato E. 2003a. Capillary angiogenesis and degeneration in bovine ovarian antral follicles. *Reprod* 125:211-223. 18,

82. Jiang JY, Cheung CK, Wang Y, Tsang BK. 2003b. Regulation of cell death and cell survival gene expression during ovarian follicular development and atresia. *Front Biosci.* 1;8:d222-37.
83. Jolly PD, Smith PR, Heath DA, Hudson NL, Lun S, Still LA, Watts CH, McNatty KP. 1997. Morphological evidence of apoptosis and prevalence of apoptotic versus mitotic cells in the membrana granulosa of ovarian follicles during spontaneous and induced atresia in ewes. *Biol Reprod* 56:837-846.
84. Jones EC. 1956. The antral ovary. PhD Thesis, University of Birmingham, Birmingham, United Kingdom.
85. Kaczmarek MM, Schams D, Ziecik AJ. 2005. Role of vascular endothelial growth factor in ovarian physiology- an overview. *Reprod Biol* 5:111-136.
86. Kaipia A and Hsueh AJW. 1997. Regulation of ovarian follicle atresia. *Annu Rev Physiol* 59:349-363.
87. Kaneko H, Nakanishi Y, Taya K, Kishi H, Watanabe G, Sasamoto S, Hasegawa H. 1993. Evidence that inhibin is an important factor in the regulation of FSH secretion during the mid luteal phase in cow. *J Endocrinol* 123:383-391.
88. Karkkainen MJ, Makinen T, Alitalo K. 2002. Lymphatic endothelium: a new frontier of metastasis research. *Nat Cell Biol* 4:E2-E5.
89. Keck PJ, Hauser SD, Krivi G, Sanzo K, Warren T, Feder J, Connolly DT. 1989. Vascular permeability factor, an endothelial cell mitogen related to PDGF. *Science* 246:1309-1312.
90. Kerr JFR, Wyllie AH, Currie AR. 1972. Apoptosis a basic biological phenomenon with wide-ranging implication in tissue kinetics. *Br j Cancer*, 26:239-257.
91. Kishi H, Okada T, Otsuka M, Watanabe G, Taya K, Sasamoto S. 1996. Induction of superovulation by immunoneutralization of endogenous inhibin through the secretion of FSH in cyclic golden hamster. *J Endocrinol* 152:65-75.
92. Klagsbrun M, D'Amore PA. 1991. Regulators of angiogenesis. *Annual Rev Physiol* 53: 217-239.
93. Kook S, Shim SR, Choi SJ, Ahn J, Kim JI, Eom SH, Jung YK, Paik SG, Song WK. 2000. Caspase-mediated cleavage of p130cas in etoposide-induced apoptotic Rat-1 cells. *Mol Biol Cell* 11:929-939.
94. Koos RD. 1989. Potential relevance of angiogenic factors to ovarian physiology. *Semin Reprod Endocrinol* 7:29-40.
95. Koos RD. 1995. Increased expression of vascular endothelial growth/permeability factor in the rat ovary following an ovulatory gonadotropin stimulus: potential roles in follicle rupture. *Biol Reprod* 52:1426-1435.
96. Kothakota S, Azuma T, Reinhard C, Klippel A, Tang J, Chu K, McGarry TJ, Kirschner MW, Kothe K, Kwiatkowski DJ, et al. 1997. Caspase-3-generated fragment of gelsolin: effector of morphological change in apoptosis. *Science* 278:294-298.
97. Laitinen M, Ristimäki A, Honkasalo M, Narko K, Paavonen K, Ritvos O. 1997. Different hormonal Regulation of vascular endothelial growth factors VEGF, VEGF-B, and VEGF-C messenger ribonucleic acid levels in cultured human granulosa-luteal cells. *Endocrinol* 138:4748-4756.
98. Leung DW, Cachianes G, Kuang WJ, Goeddel DV, Ferrara N. 1989. Vascular endothelial growth factor is secreted angiogenic mitogen. *Science* 246:1306-1309.

99. Liu ZH, Yue KZ, Ma SF, Sun XS, Tan JH. 2003. Effects of pregnant mare serum gonadotropin (eCG) on follicle development and granulosa-cells apoptosis in the pig. *Theriogenology* 59:775-785.
100. Lu Q, Harrington EO, Rounds S. 2005. Apoptosis in lung injury. *Keio J Med* 4:184-189.
101. Mandl AM, Zucherman S. 1951. The relation of age to numbers of oocytes. *J Endocrinol* 7:190-193.
102. Mann GE, Campbell BK, McNeilly AS, Baird DT. 1989. Passively immunizing ewes against inhibin during the luteal phase of the oestrous cycle raises the plasma concentration of FSH. *J Endocrinol* 123:386-391.
103. Maracek I, Krajnicáková M, Kostecký M, Gréserová G, Valocký I. 2002. Tertiary Follicular Growth wave dynamics after oestrus synchronization and superovulation in ewes and goats. *Acta Vet Brno* 71:481-486.
104. Martinez-Chequer JC, Stouffer RL, Hazzard TM, Patton PE, Molskness TA. 2003. Insulin-like growth factors-1 and -2, but not hypoxia, synergize with gonadotropin hormone to promote vascular endothelial growth factor-A secretion by monkey granulosa cells from preovulatory follicles. *Biol Reprod*, 68:1112-1118.
105. Mattioli M, Barboni B. 2000. Signal transduction mechanism for LH in the cumulus-oocyte complex. *Mol Cell Endocrinol*. 161(1-2):19-23.
106. Mattioli M, Barboni B, Turriani M, Galeati G, Zannoni A, Castellani G, Berardinelli P. and Scapolo PA. 2001. Follicle activation involves vascular endothelial growth factor production and increased blood vessel extension. *Biol. Reprod.* 65:1014-
107. McGrath SA, Esquela AF and Lee SJ. 1995. Oocyte-specific expression of growth/differentiation factor-9. *Mol Endocrinol* 9:131-136.
108. McLeod BJ, McNeilly AS. 1987. Suppression of plasma FSH concentrations with bovine follicular fluid blocks ovulation in GnRH treated seasonally anoestrous ewe. *J Reprod Fertil* 81:187-194.
109. McNatty KP, Gibb M, Dobson C, Ball K, Coster J, Heath D, Thurley DC. 1982. Preovulatory follicular development in sheep treated with PMSG and/or prostaglandin. *J Reprod Fert* 65:11-123.
110. McNatty KP, Kieboom LE, McDiarmid J, Heath DA, Lun S. 1986. Adenosine cyclic 3,5 monophosphate and steroid production by small ovarian follicles from Booroola ewes with and without a fecundity gene. *J Reprod Fert* 76:471-480.
111. McNeilly AS. 1981. Inadequate corpus luteum function after the induction of ovulation in anoestrous ewes by LH-RH or an LH-RH agonist. *J Reprod Fertil*. 63(1):137-44.
112. McNeilly AS. 1984. Changes in FSH and the pulsatile secretion of LH during the delay in oestrus induced by treatment of ewes with bovine follicular fluid. *J Reprod Fertil* 72(1):165-72.
113. Meinecke B, Meinecke-Tillmann S, Gips H. 1982. In vitro studies on steroid secretion of intact and atretic follicles *Berl Munch Tierarztl Wochenschr* 95(6):107-11.
114. Miki S, Noboru M, Yoshihiro K, et al. 1998. Ultrastructural changes in granulosa cells in porcine antral follicles undergoing atresia indicated apoptotic cell death. *J Reprod Dev* 44:7-14.
115. Myoken Y, Kayada Y, Okamoto T, Kan M, Sato GH, Sato JD. 1991. Vascular endothelial cell growth factor (VEGF) produced by A-431 human epidermoid

- carcinoma cells and identification of VEGF membrane binding sites. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 88(13):5819-23.
116. Monget P, Fabre S, Mulsant P, Lecerf F, Elsen JM, Mazerbourg S, Pisselet C, Monniaux D. 2002. Regulation of ovarian folliculogenesis by IGF and BMP system in domestic animals. *Domest Anim Endocrinol* 23:139-154.
 117. Monniaux D and Pisselet C. 1992. Control of proliferation and differentiation of ovine granulosa cells by insulina-like growth factor-1 and follicle stimulating hormona in vitro. *Biol Reprod* 46: 109-119.
 118. Montgomery GW, Galloway S, Davis G, and McNatty K. 2001. Genes controlling ovulation rate in sheep. *Reprod* 121:843-852.
 119. Murdoch W. 1992. Comparative morphometry and steroidogenic function of antral ovine follicles destined for ovulation or atresia. *Dom. Anim. Endocrinol.* 9(3): 219-224.
 120. Murdoch W. 1995. Programmed cell death in preovulatory ovine follicles. *Biol Reprod* 53:8-12.
 121. Motro B and Bemstein A. 1993. Dynamics changes in ovarian c-kit and steel expression during the estrus reproductive cycle. *Develop Dynam* 197:69-79.
 122. Neeman M, Abramovich R, Schiffenbauer YS, Tempel C. 1997. Regulation of angiogenesis by hypoxic stress: from solid tumours to the ovarian follicle. *Int J Exp Pathol* 78:57-70.
 123. Neufield G, Ferrara N, Schweigerer L, Mtchell R, Gospodarowicz D. 1997. Bovine granulosa cells produce basic fibroblastic growth factor. *Endocrinol* 121:597-603.
 124. Nottola SA, Macchiarelli G, Motta PM. 1997. The angioarchitecture of estrus, pseudopregnant and pregnant rabbit ovary as seen by scanning electron microscopy of vascular corrosion casts. *Cell Tissue Res* 288:353-363.
 125. Oktay K, Briggs D, Gosden RG. 1997. Ontogeny of follicle-stimulating hormone receptor gene expression in isolated human follicles. *J Clin Endocrinol Metabol* 82:3748-3751.
 126. Olander JV, Connolly DT, DeLarco JE. 1991. Specific binding of vascular permeability factor to endothelial cells. *Biochem Biophys Res Commun* 175(1):68-76.
 127. Pajusola K, Aprelikova O, Korhonen J, Kaipainen A, Pertovaara L, Alitalo K. 1992. FLT4 receptor tyrosine Kinase contains seven immunoglobulin-like loops and expressed in multiple human tissues and cell lines. *Cancer Res* 52:5738-5743.
 128. Pepper MS. 2001. Extracellular proteolysis and angiogenesis. *Thromb Haemost* 86:346-355.
 129. Pederson HG, Watson ED, Telfer EE. 2000. Apoptosis in equine granulosa cells and its relation to cumulus expansion and oocyte chromatin configuration in ovarian follicles. *J Reprod Fertil Suppl* 56:455-462.
 130. Phillips H, Hains j, Leung D, Ferrara N. 1990. Vascular endothelial growth factor is expressed in rat corpus luteum. *Endocrinol* 127:965-967.
 131. Picton HM, Tsonis CG, Mc Nelly AS. 1990. FSH causes a time-dependent stimulation of preovulatory follicle growth in the absence of pulsatile LH secretion in ewes chronically-treated with gonadotrophin-releasing hormone agonist. *J Endocrinol* 126:297-307.
 132. Pincus G, Enzmann EV. 1937. The growth, maturation and atresia of ovarian eggs in the rabbit. *J Morphol* 61:351-383.

133. Poltorak Z, Cohen T, Sivan R, Kandelis Y, Spira G, Vlodavsky I, Keshet E, Neufeld G. 1997. VEGF 145, a secreted vascular endothelial growth factor isoform that binds to extracellular matrix. *J Biol Chem* 272:7151-7158.
134. Quintana R, Kopcow L, Sueldo C, Marconi G, Rueda NG, Baranao RI. 2004. Direct injection of vascular endothelial growth factor into the ovary of mice promotes follicular development. *Fertil Steril* 82:1101-1105.
135. Quirk SM, Harman RM, Cowan RG. 2000. Regulation of Fas antigen (Fas, CD95)-mediated apoptosis of bovine granulosa cells by serum and growth factors. *Biol Reprod* 63:1278-1284.
136. Rajakoski E. 1996. The ovarian follicular system in sexually mature heifers with special reference to season, cyclical and left-right variation. *Acta Endocrinol Suppl* 52:1-68.
137. Redmer DA, Doraiswamy V, Bortnem BJ, Fisher K, Jablonka-Shariff A, Grazul-Bilska AT, Reynolds LP. 2001. Evidence for a role of capillary pericytes in vascular growth of the developing ovine corpus luteum. *Biol Reprod*, 65:879-889.
138. Redmer DA and Reynolds LP. 1996. Angiogenesis in the ovary *Reviews of Reprod* 1: 182-192.
139. Reynolds, LP. and Redmer, DA. 1998. Expression of the angiogenic factors, basic fibroblast growth factor and vascular endothelial growth factor, in the ovary. *J Anim Sci*; 76:1671-1681.
140. Richards JS. 1980. Maturation of ovarian follicles: actions and interactions of pituitary and ovarian hormones on follicular cell differentiation. *Physiol Rev* 60:51-89.
141. Roberts VJ, Barth S, el-Roeiy and Yen SS. 1993. Expression of inhibin/activin subunits and follistatin messenger ribonucleic acids and proteins in ovarian follicles and the corpus luteum during the human menstrual cycle. *J Clin Endocrinol Metabol* 77:1402-1410.
142. Roberts WG, Palade GE. 1995. Increased microvascular permeability and endothelial fenestration induced by vascular endothelial growth factor. *J Cell Sci* 108:2369-2379.
143. Rosales T. AM. *Atresia Follicular. Biología de la Reproducción*. Ed. Javier Velázquez Moctezuma. UAM-I, 1998.
144. Rosenfeld CS, Wagner JS, Roberts RM, Lubahn DB. 2001. Intraovarian actions of oestrogen. *Reprod* 122: 215-226.
145. Roser JF, McCue PM, Hoye E. 1994. Inhibin activity in the mare and stallion. *Dom Anim Endocrinol* 11:87-100.
146. Rubianes E. 2000. Avances en el conocimiento de la fisiología ovárica de los pequeños rumiantes y su aplicación para el manejo reproductivo. *Actas de Fisiología* 6;93-103.
147. Rudel T, Bokoch GM. 1997. Membrane and morphological changes in apoptotic cells regulated by caspase-mediated activation of PAK2. *Science* 276: 1571-1574.
148. Schams D, Kosmann M, Berisha B, Amselgruber WM, Miyamoto A. 2001. Stimulatory and synergistic effects of luteinising hormone and insulin like growth factor 1 on the secretion of vascular endothelial growth factor and progesterone of cultured bovine granulosa cells. *Exp Clin Endocrinol Diabetes* 109:155-162.

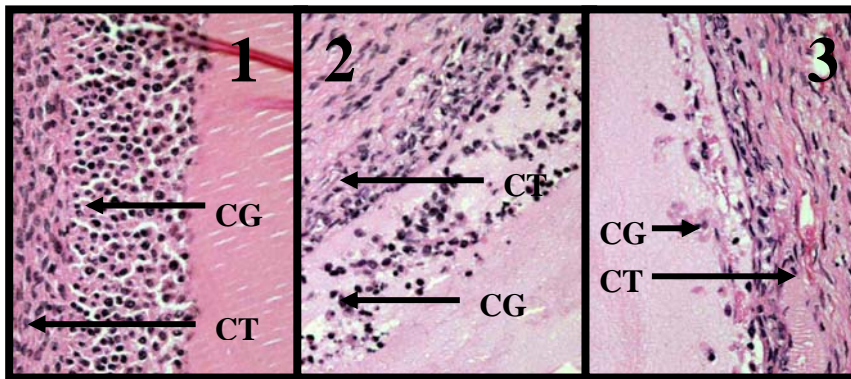
149. Semenza GL, Agani F, Boot G, Forsythe J, Iyer N, Jiang BH, Leung S, Roe R, Wiener C, Yu A. 1997. Structural and functional analysis of hypoxia inducible factor 1. *Kidney Int* 51:553-555.
150. Semenza GL. 2001. HIF-1 and mechanism of hypoxia sensing. *Curr Opin Cell Biol* 13:167-171.
151. Senger P. L. 2003. Pathways to pregnancy and parturition. Second edition. Pp. 368.
152. Shimizu T, Jiang JY, Sasada H, Sato E. 2002. Changes of messenger RNA expression of angiogenic factor and related receptors during follicular development in gilts. *Biol Reprod*, 67:1846-1852.
153. Shimizu T, Kawahara M, Abe Y, Yokoo M, Sasada H, Sato E. 2003. Follicular microvasculature and angiogenic factor in the ovaries of domestic animals. *J Reprod Dev*, 49:181-192.
154. Shimizu T, Jayawardana BC, Tetsuka M, Miyamoto A. 2007. Differential effect of follicle-stimulating hormone (FSH) and estradiol on expression of vascular endothelial growth factor (VEGF) 120, VEGF 164 and their receptors in bovine granulosa cells. *J Reprod Develop*. Advance publication.
155. Skinner MK, Keshi-Oja J, Osteen K, Moses HL. 1987. Ovarian theca cells produce transforming growth factor-beta which can regulate granulosa cell growth and differentiation. *Endocrinol* 121:786-792.
156. Souza CJ, Campbell BK, Baird DR. 1996. Follicular dynamics and ovarian steroid secretion in sheep during anoestrus. *J Reprod Fert* 108:101-106.
157. Souza CJ, Campbell BK, Baird DR. 1997a. Follicular dynamics and ovarian steroid secretion in sheep during the follicular and early luteal phases of the estrous cycle. *Biol Reprod* 56:483-488.
158. Souza CJ, Campbell BK, Baird DR, Webb R. 1997b. Secretion of inhibin A and follicular dynamics throughout the estrous cycle in sheep with and without the Booroola gene (*Fec β*). *Endocrinol* 138:5333-5340.
159. Souza CJ, Campbell BK, Baird DR. 1998. Follicular development and concentrations of ovarian steroids and inhibin A in jugular venous plasma during the luteal phase of the oestrus cycle. *J Endocrinol* 156:5563-572.
160. Stein I, Neeman M, Shweiki D, Itin A, Keshet E. 1995. Stabilization of vascular endothelial growth factor mRNA by hypoxia and hypoglycemia and coregulation with other ischemia-induced genes. *Mol Cell Biol* 15:5363-5368.
161. Stouffer RL, Martinez-Chequer JC, Molskness TA, Xu F, Hazzard TM. 2001. Regulation and angiogenic factors in the primate ovary. *Arch Med Res*, 32:567-575.
162. Suzuki T, Sasano H, Takaya R, Fukaya T, Yajima A, Nagura H. 1998. Cyclic changes of vasculature and vascular phenotypes in normal human ovaries. *Hum Reprod* 13:953-959.
163. Taimen P, Kallajoki M. 2003. NuMA and nuclear lamins behave differently in Fas-mediated apoptosis. *J Cell Sci* 116:571-583.
164. Terman BI, Dougher-Vermazen M, Carrion ME, Dimitrov D, Armellino DC, Gospodarowicz D, Bohlen P. 1992. Identification of the KDR tyrosine kinase as a receptor for vascular endothelial cell growth factor. *Biochem Biophys Res Commun*. 87(3):1579-86.
165. Tewari M, Quan LT, O'Rourke K, Desnoyers S, Zeng Z, Beidler DR, Poirier GG, Salvesen GS, Dixti VM. 1995. Yama/PPP32 beta, a mammalian

- homolog of CED-3, is a CrmA-inhibitable protease that cleaves the death substrate poly (ADP-ribose) polymerase. *Cell* 81:801-809.
166. Thornberry NA, Lazbnik Y. 1998. Caspases: enemies within. *Science* 281:1312-1316.
 167. Tilly JL, Hsueh AJW. 1993. Microscale autoradiographic method for qualitative and quantitative analysis of apoptotic DNA fragmentation. *J Cell Physiol* 154:519-526.
 168. Tischer E, Mitchell R, Hartman T, Silva M, Gospodarowicz D, Fiddes JC, Abraham JA. 1991. The human gene for vascular endothelial growth factor. Multiple protein forms are encoded through alternative exon splicing. *J Biol Chem* 266:11947-11954.
 169. Tisdall DJ, Watanabe K, Hudson NL, Smith P, McNatty KP. 1995. FSH receptor gene expression during ovarian follicle development in sheep. *J Mol Endocrinol* 15:273-281.
 170. Tisdall DJ, Quirke LD, Smith P and McNatty KP. 1997. Expression of the ovine stem cell factor during folliculogenesis in late fetal and adult ovaries. *Journal of Molecular Endocrinol* 18:127-135.
 171. Tisdall DJ, Hudson N, Smith P, McNatty KP. Localization of ovine follistatin and alpha and beta (A) inhibin mRNA in the sheep ovary during the oestrous cycle. *J Mol Endocrinol* 12:181.
 172. Torney AH, Hodgson YM, Forage R, de Kretser DM. Cellular localization of inhibin mRNA in the bovine ovary by in-situ hybridization. *J Reprod Fertil*. 86(1):391-9.
 173. Turzillo AM, Fortune JE. 1990. Suppression of the secondary FSH surge with bovine follicular fluid is associated with delayed ovarian follicular development in heifers. *J Reprod Fertil* 89:643-653.
 174. Van Blerkom J, Antczak M, Schrader R. 1997. The developmental potential of the human oocyte is related to the dissolved oxygen content of follicular fluid: association with vascular endothelial growth factor levels and perifollicular blood flow characteristics. *Hum Reprod* 12:1047-5105.
 175. Vicenti V, Cassano C, Rocchi M, Persico G. 1996. Assignment of the vascular endothelial growth factor gene to human chromosome 6p21.3. *Circulation* 93:1493-1495.
 176. Viñoles C, Meikle A, Forsberg M, Rubianes E. 1999. The Effect of subluteal levels of exogenous progesterone on follicular dynamics and endocrine patterns during the early luteal phase of the ewe. *Theriogenology* 51:1351-1361.
 177. Wallace JM, Mc Neilly JS, Baird DT. 1986. Ovulation rat and embryo survival in Damline ewes after treatment with follicular bovine fluid in the luteal phase in the oestrous cycle. *J Reprod Fertil* 75:102-109.
 178. Wandji SA, Pelletier G, Sirard MA. 1992a. Ontogeny and cellular localization of ¹²⁵I labelled insulin-like growth factor, ¹²⁵I labelled follicle stimulating hormone and ¹²⁵I labelled human chorionic gonadotrophin binding sites in ovaries from bovine fetuses and neonatal calves *Biol Reprod* 47:814-822.
 179. Wandji SA, Pelletier G, Sirard MA. 1992b. Ontogeny and cellular localization of ¹²⁵I labelled basic fibroblast growth factor and ¹²⁵I labelled epidermal growth factor binding sites in ovaries from bovine fetuses and neonatal calves. *Biol Reprod* 47:807-813.

180. Wandji SA, Eppig JJ, Fortune JE. 1996. FSH and growth factor affect the growth and endocrine functions in vitro in granulosa cells of ovine preantral follicles. *Theriogenology* 45:817-832.
181. Webb R, Campbell BK, Garverick HA, Gong JG, Gutierrez CG, and Armstrong DG. 1999. Molecular mechanisms regulating follicular recruitment and selection. *Reproduction in Domestic Ruminants IV. J. Reprod. Fertil. Suppl.* 54:33-48.
182. Webb R, Nicholas B, Gong JG, Campbell BK, Gutierrez CG, Garverick HA, Armstrong DG. 2003. Mechanisms regulating follicular development and selection of the dominant follicle. *Reprod Suppl.* 61:71-90.
183. Wyllie AH. 1980. Glucocorticoid-induced thymocyte apoptosis is associated with endogenous endonuclease activation. *Nature* 284:555-556.
184. Wulff, C., Wiegand, J.S., Saunders, K.P.T., Scobie, A.G. and Fraser, M.H. 2001. Angiogenesis during follicular development in the primate and its inhibition by treatment with truncated Flt-1-Fc (vascular endothelial growth factor Trap A40). *Endocrinol.* 142: 3244-3254.
185. Yang MY and Rajamahendran R. 2000. Morphological and biochemical identification of apoptosis in small, medium and large bovine follicle and the effects of follicle stimulating hormone and insulin-like growth factor I on spontaneous apoptosis in cultured bovine granulosa cell. *Biol Reprod* 62:1209-1217
186. Yeo TK, Senger DR, Dvorak HF, Freter L, Yeo KT. 1991. Glycosylation is essential for efficient secretion but not for permeability-enhancing activity of vascular permeability factor (vascular endothelial growth factor). *Biochem Biophys Res Commun* 179(3):1568-75.
187. Yohsida W, Takakura N, Kataoka H, Kunisada T, Okamura H and Nishikawa S. 1997. Stepwise requirement of c-kit tyrosine kinase in mouse ovarian follicle development *Develop Biol* 184:122-137.
188. Yu YS, Sui HS, Han ZB, Li W, Luo MJ, Tan JH. 2004. Apoptosis in granulosa cells during follicular atresia: relationship with steroids and insulin-like growth factors. *Cell Research* 14(4):341-346.
189. Yuan W, Lucy MC, Smith MF. 1996. Messenger Ribonucleic acid for insulin-like growth factor-I and II, insulin-like growth factor binding protein-2 gonadotrophin receptor, and steroidogenic enzymes in porcine follicles. *Biol Reprod* 55:1045-1054.
190. Zeleznik AJ, Schuler HM, Reichert LE. 1981. Gonadotropin-binding sites in the rhesus monkey ovary: role of the vasculature in the selective distribution of human chorionic gonadotropin to the preovulatory follicle. *Endocrinol* 109:356-362.
191. Zimmerman RC, Hartman T, Kavie S, Pauli SA, Bohlen P, Sauer MV and Kitajewski, J. 2003. Vascular endothelial growth factor receptor 2-mediated angiogenesis is essential for gonadotropin-dependent follicle development. *J Clin Invest*, 112:659-669.

APÉNDICES Y ANEXOS

Figura 1. Características morfológicas de folículos sanos y atrésicos. Fotografías campo 40X de cortes histológicos de folículos teñidos en HyE: 1) folículo sano con capa multilaminar de células de granulosa intacta y bien organizada, 2) folículo con atresia temprana, muestran un escaso desprendimiento de la capa de células de la granulosa, y 3) folículo con atresia avanzada, con una capa de células de granulosa desorganizada, llegando a perder por completo las capas de células de granulosa.



CG: Células de la Granulosa, CT: Células de la Teca.

Cuadro 1. Porcentaje de folículos clasificados como sanos y atrésicos por tratamiento.

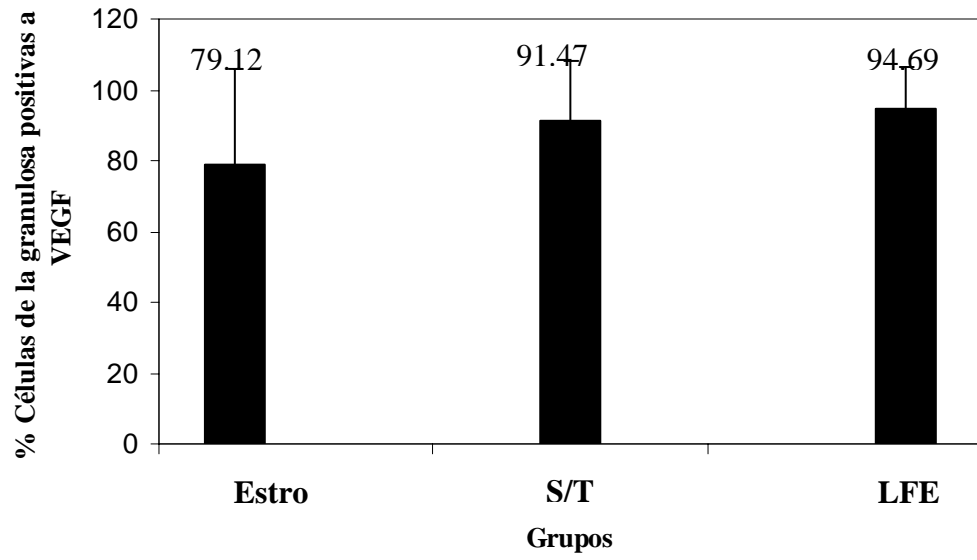
Tratamiento	Folículos Sanos (%)	Folículos Atrésicos (%)
GRUPO ESTRO	13 (42)	18 (58)
GRUPO S/T	14 (64%)	8 (36)
GRUPO LFE	1 (2.85%)	34 (97.15)

Entre los grupos 1 y 2: $P=0.04$; y entre los grupos 2 y 3: $P<0.001$

Cuadro 2. Número y porcentaje de folículos menores y mayores a 5 mm clasificados como sanos, ligeramente atrésicos o atrésicos avanzados.

Tratamiento	Folículos Mayores a 5 mm			Folículos Menores a 5 mm		
	Sano (%)	Atresia Temprana (%)	Atresia Avanzada (%)	Sano (%)	Atresia Temprana (%)	Atresia Avanzada (%)
GRUPO ESTRO (n=10)	6 (85.71)	0 (0)	1 (14.29)	7 (29.17)	10 (41.66)	7 (29.17)
GRUPO S/T (n=6)	4 (80)	1 (20)	0 (0)	10 (58.82)	4 (23.53)	3 (17.65)
GRUPO LFE (n=11)	0 (0)	1 (14.29)	6 (85.71)	1 (3.57)	9 (34.14)	18 (64.29)

Figura 2. Porcentaje de células de la granulosa positivas a VEGF en folículos de diferentes tratamientos.

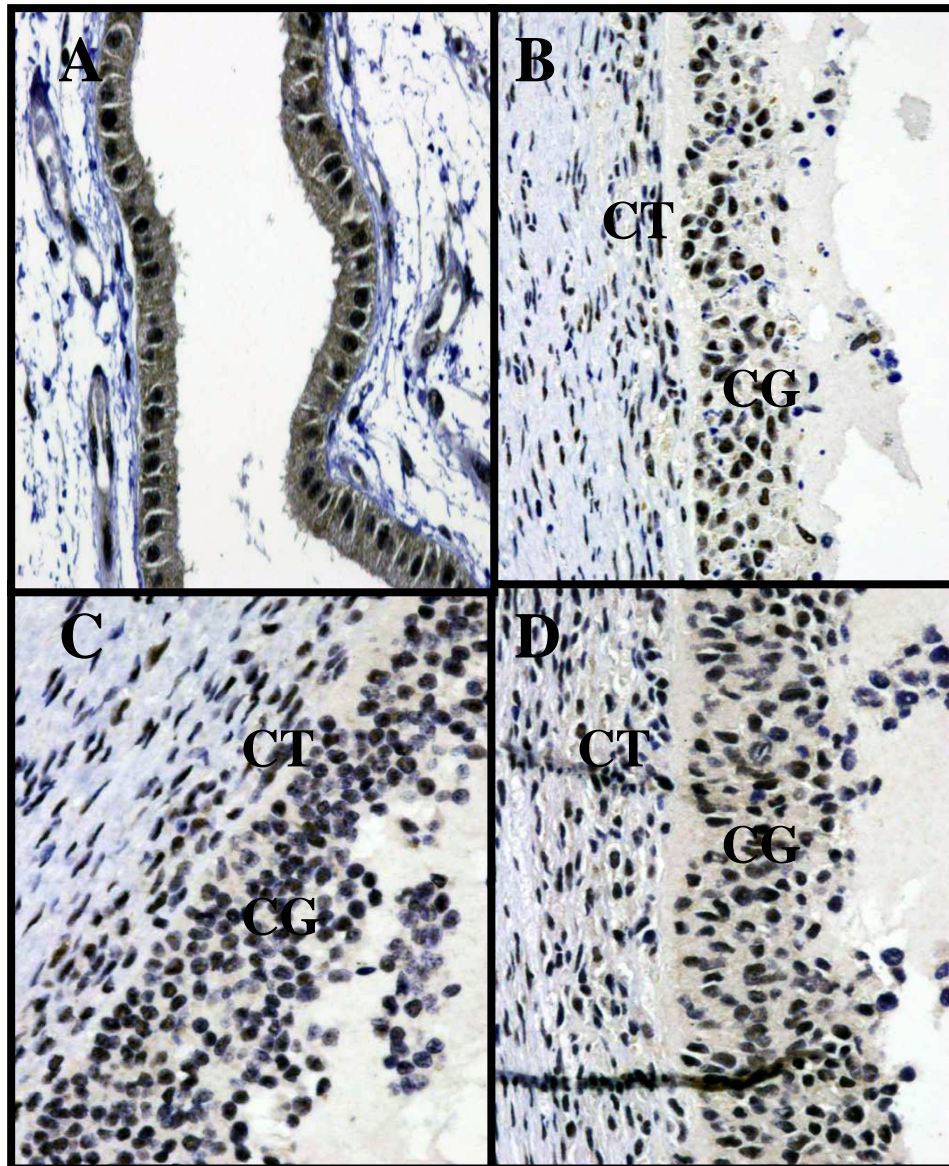


Cuadro 3. Porcentaje de folículos con diferente marca de inmunotinción a VEGF en diferentes grupos.

	Tratamiento		
Intensidad	ESTRO (%)	S/T (%)	LFE (%)
1	39	23	80
2	52	50	17
3	9	27	3

Entre los grupos 1 y 2: $P=0.07$; y entre los grupos 2 y 3: $P<0.001$. Intensidad 1= baja; Intensidad 2= media e Intensidad 3=alta

Figura 3. Fotografías campo 40X de células de la granulosa de ovino positivas a la prueba de inmunohistoquímica para VEGF con diferente marca de intensidad: A) control positivo (placenta de bovino), B) intensidad baja; C) intensidad media y D) intensidad alta.



CG: Células de la Granulosa; CT: Células de la Teca

Cuadro 4. Número de folículos sanos, inicialmente atrésicos y atrésicos avanzados con diferente marca de inmunotinción a VEGF.

Tratamiento	Condición Morfológica								
	Sano			Atresia Temprana			Atresia Avanzada		
	Intensidad			Intensidad			Intensidad		
	1	2	3	1	2	3	1	2	3
Grupo ESTRO	1	0	0	8	2	0	19	4	1
Grupo S/T	2	9	3	2	2	1	1	0	2
Grupo LFE	3	9	1	5	3	2	5	3	0

Entre los grupos 1 y 2: $P=0.07$; y entre los grupos 2 y 3: $P<0.001$. Entre folículos sanos y con atresia temprana: $P=0.02$; y entre folículos sanos y con atresia avanzada: $P<0.001$.

Intensidad 1= baja; Intensidad 2= media e Intensidad 3=alta

FUENTE DE INHIBINA

(Hernández et al., 1997)

Recuperación de líquido folicular equino para obtener una fuente rica en inhibina:

1. Recuperar líquido folicular equino y conservarlo en refrigeración hasta que se tenga la cantidad suficiente.
2. Centrifugarlo a 12000 g durante 20 minutos a 4 °C, con el objetivo de separa detritus
3. Agregar 10mg/ml de carbón activado y 0.1 mg/ml de dextran, agitándolo por 1 hora, mínimo a 4 °C.
4. Centrifugarlo a 12000 g durante 20 minutos a 4 °C.
5. Agregar 10mg/ml de carbón activado y 0.1 mg/ml de dextran, agitándolo por 1 hora, mínimo a 4 °C.
6. Centrifugarlo a 12000 g durante 20 minutos a 4 °C.
7. Agregar 10mg/ml de carbón activado y 0.1 mg/ml de dextran, agitándolo por 1 hora, mínimo a 4 °C.
8. Centrifugarlo a 12000 g durante 20 minutos a 4 °C.
9. Agregar 10mg/ml de carbón activado y 0.1 mg/ml de dextran, agitándolo por 1 hora, mínimo a 4 °C.
10. Centrifugarlo a 12000 g durante 20 minutos a 4 °C.
11. Filtrar el líquido folicular equino preparado con papel filtro No. 1
12. Adicionar 100 UI de penicilina G/ml de liquido folicular equino
13. usar inmediatamente o congelar a -20°C hasta su uso.