



**UNIVERSIDAD NACIONAL AUTÓNOMA DE  
MEXICO**

---

**MAESTRÍA EN CIENCIAS DE LA PRODUCCIÓN Y  
DE LA SALUD ANIMAL**

**“IMPORTANCIA DE LA GLUCOSA-6 FOSFATO  
DESHIDROGENASA (G6PDH) EN EL SISTEMA  
ANTIOXIDANTE MEDIADO POR GLUTATIÓN  
(GSH) EN LA APOPTOSIS DURANTE LA  
ATRESIA FOLICULAR DE LA OVEJA”.**

**TESIS  
PARA OBTENER EL GRADO DE:  
MAESTRA EN CIENCIAS**

**PRESENTA:  
ALICIA GONZÁLEZ GONZÁLEZ**

**TUTOR:  
DRA. CLARA ORTEGA CAMARILLO**

**COMITÉ TUTORAL:  
DR. EVERARDO GONZÁLEZ PADILLA  
DRA. MARCELA VERGARA ONOFRE**

MÉXICO, D. F.

2007.



Universidad Nacional  
Autónoma de México

Dirección General de Bibliotecas de la UNAM

**Biblioteca Central**



**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.

## DEDICATORIAS

A mis padres: Josefina y Francisco, por apoyarme siempre a pesar de mis desaciertos, por sus consejos y sabias palabras en el momento adecuado y sobre todo por su amor incondicional.

A mis hermanos: Miguel, Carlos, Francisco, Sergio, Álvaro y en especial a mi hermana Ofelia, porque siempre están conmigo cuando los necesito, porque me quieren, me escuchan, me alientan.....por ser mi mejor amiga.

A mis sobrinos: Dariana, Alejandro y Oliver, mi alegría y mi principal motivación.

Porque sin ustedes no hubiera podido realizar este sueño.

## **AGRADECIMIENTOS**

A Dios, por poner en mi camino a todas y cada una de las personas que han estado conmigo y de las que siempre tendré algo que aprender, sobre todo de aquellas que me alientan para continuar a pesar de las adversidades.

Al Dr. Miguel Cruz López, por las facilidades otorgadas en la Unidad de Investigación Medica en Bioquímica.

A la Dra. Clara Ortega Camarillo, por su apoyo en la dirección y realización de esta tesis y sobre todo por plasmar en ella su sabiduría.

A mi comité tutorial: Dr. Everardo González Padilla y Dra. Marcela Vergara Onofre, por las sugerencias y el apoyo otorgado en la realización de este trabajo y por compartir conmigo parte de su gran conocimiento.

A la Dra. Clara Murcia Mejía, por su amabilidad y valiosa ayuda en la parte técnica de Radioinmunoanálisis.

A la Dra. Maria de Lourdes Juárez Mosqueda y al Dr. Luis Alberto Zarco Quintero, por ser una parte fundamental en mi formación y por brindarme un poco de su tiempo.

Al CONACYT por la beca que me otorgo durante mis estudios de maestría.

A mis amigos y compañeros de laboratorio: Rosita, Nayeli, Irma, Roxana, Marisol, Emilio, Julio, Gerardo, Citlali, Paty, Juan, Olga, Rebeca, Margarita, Genoveva, Catarina, Daniel, David, Adán y Alfonso, por la alegría, los buenos momentos, sus consejos y porque mi vida no seria igual sin ustedes.

# ÍNDICE

Abreviaturas.....	I
Índice de tablas.....	III
Índice de figuras.....	IV
<b>RESUMEN</b> .....	V
<b>ABSTRACT</b> .....	VII
<b>I. INTRODUCCIÓN</b> .....	1
<b>II. ANTECEDENTES BIBLIOGRAFICOS</b> .....	3
1.- Producción ovina en México.....	3
2.- Características reproductivas de las ovejas.....	4
2.1.- Pubertad y madurez sexual.....	4
2.2.- Ciclo estral.....	6
3.- Crecimiento y desarrollo folicular.....	7
3.1.- Ovogénesis.....	8
3.1.1.- Crecimiento del ovocito.....	10
3.1.2.- Maduración meiótica.....	10
4.- Foliculogénesis.....	11
4.1.- Reclutamiento inicial.....	11
4.2.- Reclutamiento cíclico.....	14
4.3.- Hormonas que intervienen en la maduración folicular.....	17
4.3.1.- FSH.....	17
4.3.2.- Estrógenos.....	17
4.3.3.- Andrógenos.....	19
4.3.4.- LH.....	19
4.3.5.- Prostaglandinas.....	20
5.- Ovulación.....	20
6.- Cuerpo lúteo.....	22
6.1.- Angiogénesis.....	23
6.2.- Funcionalidad.....	25

6.3.- Luteólisis.....	25
7.- Factores que intervienen en la maduración folicular.....	26
7.1- Kit Ligand.....	28
7.2.- Factor de Crecimiento Fibroblástico Básico.....	28
7.3.- Factor de Crecimiento Insulinoide.....	29
7.4.- Factor de Crecimiento Epidérmico.....	30
7.5.- Factor de Crecimiento Derivado de Plaquetas.....	31
7.6.- Factor de Crecimiento Endotelio-Vascular.....	31
7.7.- Factor de Crecimiento Transformante- $\beta$ .....	32
8.- Atresia folicular.....	33
8.1.- Muerte celular en la atresia folicular.....	36
8.2.- Apoptosis.....	36
8.2.1.- Cambios morfológicos.....	37
8.2.2.- Vías de señalización.....	38
8.2.3.- Vía intrínseca.....	39
8.2.4.- Vía extrínseca.....	39
9.- Radicales libres.....	40
9.1.- Definición.....	40
9.2.- Origen.....	41
9.3.- Clasificación.....	41
9.4.- Acciones.....	42
10.- Especies reactivas de oxígeno.....	43
10.1.- Participación de las ERO en la maduración folicular.....	45
10.2.- Efectos deletéreos de las ERO.....	46
11.- Sistemas antioxidantes.....	46
11.1.- Glutación.....	47
12.- Estrés oxidativo.....	48
12.1.- Estrés oxidativo en atresia folicular.....	49
12.2.- Estrés oxidativo y muerte celular.....	50
13.- Glucosa-6-fosfato deshidrogenasa (G6PDH).....	51

13.1.- Vía de las pentosas fosfato.....	52
13.2.- Regulación de la G6PDH.....	53
13.3.- G6PDH en el estrés oxidativo.....	54
13.4.- G6PDH en la muerte celular.....	55
<b>III. PLANTEAMIENTO DEL PROBLEMA.....</b>	<b>56</b>
<b>IV. HIPÓTESIS.....</b>	<b>57</b>
<b>V. OBJETIVOS.....</b>	<b>57</b>
<b>VI. MATERIAL Y METODOS.....</b>	<b>58</b>
1. Obtención y clasificación de folículos.....	58
2. Procesamiento de la muestra. ....	59
3. Procesamiento de CG.....	59
4. Determinación del índice apoptótico.....	59
5. Concentración de proteínas.....	61
6. Actividad de G6PDH.....	61
7. Concentración de GSH.....	61
8. Determinación de ERO.....	62
9. Determinación de grupos carbonilos.....	63
10. Determinación de hormonas esteroides.....	63
11. Análisis estadístico.....	64
<b>VII. RESULTADOS.....</b>	<b>65</b>
1. Folículos colectados.....	65
2. Índice de apoptosis.....	66
3. Actividad de G6PDH.....	68
4. Concentración de GSH.....	70
5. Producción de ERO.....	72
6. Determinación de grupos carbonilos.....	74
7. Determinación de hormonas esteroides.....	76
<b>VIII. DISCUSIÓN.....</b>	<b>78</b>
<b>IX. CONCLUSIÓN.....</b>	<b>85</b>
<b>X. LITERATURA CITADA.....</b>	<b>86</b>

## RESUMEN

En la atresia folicular las células de la granulosa (CG) se pierden por apoptosis. Mediante este proceso se eliminan la mayoría de folículos ováricos (99%). El estrés oxidativo induce apoptosis en muchos sistemas celulares, de tal forma que el equilibrio entre prooxidantes y antioxidantes tiene gran relevancia para la supervivencia celular. La enzima Glucosa-6-fosfato deshidrogenasa (G6PDH), provee el NADPH que mantiene al glutati6n, el principal antioxidante en el ovario en forma reducida (GSH). El objetivo de este trabajo fue determinar la actividad de G6PDH y su contribuci6n al mantenimiento de las concentraciones de GSH durante la atresia folicular de la oveja. Se utilizaron folículos clasificados por tama1o (4-6 mm y > 6 mm) y grado de atresia (1, 2 y 3). Se separaron las CG y el líquido folicular (LF). La apoptosis se evalu6 mediante Anexina V-FITC. Se midi6 la actividad de G6PDH, la concentraci6n de GSH y de grupos carbonilos, mediante espectrofotometría. Las especies reactivas de oxígeno (ERO), se detectaron con 2',7'-diacetato de diclorodihidrofluoresceína (DCDHF-DA). La concentraci6n de estradiol ( $E_2$ ), progesterona ( $P_4$ ) y dehidroepiandrosterona (DHEA), se determin6 mediante radioinmunoanálisis. Los resultados se analizaron con ANOVA y Tukey. Encontramos que la actividad de G6PDH y la concentraci6n de GSH en CG y LF disminuyeron conforme avanzo el grado de atresia y el índice de apoptosis. Tal comportamiento denot6 un estrés oxidativo en folículos atrésicos, como consecuencia del aumento de ERO y de grupos carbonilos. Estos resultados demuestran que en la apoptosis de CG de los folículos atrésicos la actividad de G6PDH es de gran importancia para el funcionamiento del sistema antioxidante del GSH y la prevenci6n de la muerte. Adem6s, observamos que la actividad de G6PDH en CG es 10 veces mayor que en LF, mientras que la concentraci6n de GSH fue menor en CG con respecto a LF. Esto permite inferir que las CG proveen de GSH al líquido folicular para permitir la preservaci6n del ovocito. La relaci6n  $E_2:P_4$  fue mayor a 1 en folículos sanos y menor en atrésicos. La DHEA, al igual



que P<sub>4</sub>, incremento conforme avanza el grado de atresia, lo cual permite suponer, que la acumulación de DHEA en folículos atrésicos, altera aún más la actividad de G6PDH, incrementando el estrés oxidativo.

Palabras Clave: G6PDH; GSH; estrés oxidativo; apoptosis; atresia folicular.

## ABSTRACT

In the follicular atresia the granulosa cells are lost by apoptosis and by this process the majority of ovarian follicles (99%) are eliminated. Oxidative stress induces apoptosis in various experimental models, and because an alteration between oxidants and antioxidants are involved in regulation of cell survival. The glucose-6-phosphate dehydrogenase (G6PDH) determines the production of NADPH necessary to maintain the reduced form of glutathione (GSH), which is principal the antioxidant of the ovary. This study was designed to find the contribution G6PDH activity and GSH levels to the follicular atresia in the ewe. Preovulatory follicles were isolated from ewe ovaries and classified by size (4-6 mm and > 6 mm) and by atresia stages (1, 2 and 3). The granulosa cells (GC) and follicular fluid (FF) were isolated and annexin V binding and propidium iodide (PI) uptake was used to detect apoptotic cells in GC. The G6PDH activity, GSH levels and carbonyl groups were measured by spectrophotometry in GC and FF. The ROS was detected with 2',7-dichlorofluorescein diacetate (DCFH-DA). Oestradiol ( $E_2$ ), progesterone ( $P_4$ ) and dehydroepiandrosterone (DHEA) concentrations were determined by RIA in GC and FF. The results were analyzed with ANOVA and Tukey probes. Follicles were considered healthy when the concentration ratio of  $E_2:P_4$  was > 1.0 and as atretic when the ratio was < 1.0. We found that G6PDH activity and GSH concentrations in GC and FF decreased during the progress of atresia and with the increase of apoptotic cells. Besides, GC showed more G6PDH activity than FF, while GSH levels were less in the GC than in FF. These events denoted oxidative stress in atretic follicles because they showed increase of ROS and carbonyl groups. The results show that in granulosa cells apoptotic in atretic follicles the G6PDH activity is of great importance for the antioxidant system of GSH and for the prevention of cell death, besides then it is assumed that granulosa cells provide GSH to follicular fluid for optimal

behavior for oocyte. DHEA as well as P<sub>4</sub>, increased with stage of atresia and suggest that DHEA accumulation in atretic follicles modifies G6PDH activity and increased oxidative stress.

Key Words: G6PDH; GSH; oxidative stress; apoptosis; follicular atresia.

# **IMPORTANCIA DE LA GLUCOSA 6 FOSFATO DESHIDROGENASA (G6PDH) EN EL SISTEMA ANTIOXIDANTE MEDIADO POR GLUTATIÓN (GSH) EN LA APOPTOSIS DURANTE LA ATRESIA FOLICULAR DE LA OVEJA.**

## **I. INTRODUCCIÓN**

El desarrollo folicular en el ovario del mamífero inicia con la proliferación de CG que rodean al ovocito, y es seguido por la diferenciación de las células intersticiales del estroma ovárico que formará la capa de CT. Ambos tipos de células proliferan para generar un grupo de folículos antrales de los cuales surgirán los folículos dominantes, que seguramente alcanzaran la ovulación y los folículos restantes se eliminarán por un proceso degenerativo conocido como atresia. Hasta el momento no se conocen con precisión las causas que desencadenan la atresia folicular, sin embargo, uno de los avances más importantes en los últimos años ha sido la demostración de que la apoptosis, es un evento fundamental de la atresia, que inicia en CG. Aunque trabajos recientes, proponen que en la oveja la atresia involucra dos mecanismos de muerte celular (apoptosis y necrosis), y que la participación preponderante de uno de los dos tipos depende del tamaño del folículo (Rosales et al., 2000; Alonso et al., 2003). Renvoize y colaboradores (1998), mencionan que ambos tipos de muerte comparten propiedades bioquímicas que podrían ser producidas por el mismo estímulo y sólo representar los extremos de una vía única de muerte que comienza con la permeabilidad transitoria de la membrana mitocondrial (Lemasters et al., 1998), y donde el estado redox y la disponibilidad intracelular de ATP pueden definir la vía de muerte (Tsujiimoto et al., 1997; Khandoker, 2001).

Durante el proceso de atresia el estrés oxidativo es de gran relevancia, y es consecuencia del aumento en la producción de ERO. Como se sabe estos últimos pueden causar alteraciones en las biomoléculas (proteínas, lípidos, carbohidratos y DNA) y modificar sus funciones (Duru et al., 2000; Agarwal et al., 2003), por lo que su producción es mantenida en un rango fisiológico, por la activación de sistemas antioxidantes intracelulares, sin embargo, diversas condiciones pueden irrumpir este balance. Dada su participación en la producción de NADPH, un reductor encargado de mantener al glutatión en forma reducida, la G6PDH es una enzima importante en la regulación redox. El mecanismo por el cual el estrés oxidativo induce muerte celular aun no se ha definido claramente (Lavrentiadou et al., 2001; Agarwal et al., 2003; Lapointe et al., 2005), por lo cual resulta de gran interés estudiar la importancia de la G6PDH en el sistema antioxidante mediado por GSH durante la atresia folicular de la oveja (Owen et al., 2001).

## **II. ANTECEDENTES BIBLIOGRAFICOS**

### **1.-Producción ovina en México**

El ganado ovino, por su importancia social y medioambiental, ha sido una especie en franco crecimiento a escala mundial durante los últimos años. En México las explotaciones de ovinos representan un gran potencial, ya que esta especie por sus hábitos alimenticios y tamaño, aprovechan de manera eficiente los pastizales y permiten el mantenimiento de las actividades agrarias en zonas desfavorecidas. Así, mediante el aprovechamiento de los matorrales contribuyen en la limpieza de zonas de explotación, evitando la propagación de incendios y por lo tanto, en la conservación del medio ambiente. Además de ser una fuente de proteínas de origen animal, representan una alternativa viable para la diversificación agropecuaria y un ingreso económico para los productores (Cuellar, 2006).

De acuerdo con los datos de la FAO, en el año de 1998, México ocupó el lugar número 40 en la producción mundial de carne de ovinos con 30, 413 Ton, mientras que China, Australia y Nueva Zelanda ocuparon los primeros lugares con 7 519, 828; 1 250, 000 y 615, 331 Ton respectivamente (SAGAR, 1998).

En países como Estados Unidos, tercer lugar a nivel mundial en importaciones de carne ovina con 77, 508 toneladas, en 2004 según el USDA (Departamento de Agricultura de Estados Unidos), el inventario de ovinos contaba con 7.8 millones de cabezas, de los cuales 4.66 millones (59.74 %) eran reproductores y los 3.14 millones de corderos restantes para abasto. En ese año, el hato reproductor contaba con 3.79 millones (81.33%) de hembras, 185, 000 (3.97%) machos y 680, 000 (14.60%) corderos de reemplazo, con lo cual se logró obtener 3.14 millones de cabezas para abasto, lo que representó 0.83 corderos por hembra al año. En

el primer semestre del 2005, se registro el nacimiento de 3.6 millones de corderos, lo cual indica que el parámetro reproductivo parto por hembra por año se incremento a 0.95 (Acero, 2005). En México la producción ovina nacional reportada por SAGARPA en 2004 fue de 42 140 Ton de carne, 30% más que la de 1999. Sin embargo, este incremento no fue suficiente para cubrir las demandas de la población, ya que solo apporto el 48.9% del consumo total, por lo que se tuvieron que importar 44 035 Ton de carne de ovino en canal para cubrir el mercado, con lo cual México continua siendo el principal país importador en América Latina y el lugar numero 6 a nivel mundial. El déficit en el abasto se debe a que existe una baja productividad de los rebaños, ya que del inventario nacional de alrededor de 7 millones de cabezas, el 43% son hembras (2.58 millones), sacrificandose alrededor de 1.63 millones al año, lo que representa una producción promedio de 0.6 corderos por hembra por año (Acero, 2005; Cuellar, 2006). Lo anterior resalta la importancia de realizar estudios que coadyuven a aumentar la eficiencia reproductiva de los hatos; en particular sobre el desarrollo folicular en la oveja, un proceso de la biología reproductiva que incluye mecanismos fisiológicos, cuya regulación determina aquellos folículos que alcanzaran la ovulación, aquellos que permanecerán en la poza de reserva y los que serán eliminados por atresia.

## **2.- CARACTERÍSTICAS REPRODUCTIVAS DE LAS OVEJAS**

### **2.1.- Pubertad y madurez sexual**

La oveja es una especie poliéstrica estacional que tiene un ritmo anual de actividad reproductiva, regulado por cambios en el fotoperiodo (cantidad de horas luz diaria a lo largo del año), el factor medioambiental mas decisivo en la

reproducción (Legan, 1980). Con el fotoperiodo sincronizan el momento del año en que deben iniciar su estación reproductiva, de manera que la actividad sexual inicia cuando la cantidad diaria de horas luz disminuye, lo cual ocurre a partir del solsticio de verano. Esto permite que los nacimientos ocurran en primavera cuando las condiciones ambientales y nutricionales son favorables, facilitando con ello la supervivencia de las crías.

El inicio de la pubertad está determinado principalmente por el genotipo y por factores medioambientales como fotoperiodo y nutrición (L'anson et al., 1997), y se ha considerado que existe una relación directa entre pubertad y prolificidad, es decir que razas más precoces son también más prolíficas. Con el inicio de la pubertad empieza la actividad reproductiva, en la hembra esta acompañada con la primera ovulación y el primer incremento de progesterona plasmática. El fotoperiodo, la nutrición y el desarrollo corporal mínimo (aproximadamente 2/3 partes del peso adulto) son determinantes para el inicio de la pubertad. El grado óptimo del desarrollo debe alcanzarse en la estación reproductiva (López Sebastián et al., 1985), de no ser así el periodo prepúber continua con el anestro estacional (Fitzgerald y Butler, 1982). Este hecho condiciona diferencias en el comienzo de la pubertad, que puede variar desde 7 meses hasta cerca de 2 años. El desarrollo corporal y época en que se alcanza la pubertad esta determinado por la época de nacimiento, así las cubriciones de otoño producen partos al final del invierno, las buenas condiciones de alimentación durante primavera y verano, permiten un desarrollo sexual rápido, alcanzándose la madurez con el comienzo de la primera estación reproductiva en el siguiente otoño (González et al., 2003).

En el periodo prepúber las ligeras variaciones en esteroides gonadales inhiben la secreción pulsátil de GnRH hipotalámico y con ello las gonadotropinas hipofisarias (Foster y Ryan, 1981). En la transición del periodo prepúber a púber, el hipotálamo pierde sensibilidad frente a los esteroides, lo que permite el incremento de la secreción de GnRH y LH, e inicia el proceso que culmina con la



madurez sexual hasta producirse la primera descarga preovulatoria de LH, con lo cual en el ovario se forma el primer tejido luteal. En realidad no ocurrió una ovulación, pero provocó un primer incremento de progesterona (inferior a 0.5 ng/ml), con duración menor a 6 días. La desaparición de este primer tejido trae consigo una nueva descarga de LH, con ovulación y formación de un cuerpo lúteo de duración y actividad normal (López Sebastián et al., 1985). Sin embargo el primer celo es posterior, aparece hasta que uno o varios de estos ciclos de duración y secreción normal de progesterona provocan el efecto necesario para las manifestaciones normales del celo y con ello el primer ciclo fértil (González et al., 2003).

## 2.2.- Ciclo estral

A partir de la pubertad las hembras desarrollan su capacidad para producir gametos funcionales de forma cíclica (en la oveja cada 17 días en promedio) durante toda la vida reproductiva, siendo interrumpidos solo durante los periodos de anestro. En cada ciclo se realizan de manera continua los procesos de crecimiento y desarrollo folicular cuyo objetivo es la maduración y liberación de gametos para su fertilización. Estos procesos están determinados por dos periodos: la **fase folicular** que dura 2 ó 3 días y corresponde con las fechas anteriores al tiempo de ovulación (12 a 24 h antes de terminar el estro), de las cuales aproximadamente 30 - 36 horas corresponden al periodo de receptividad sexual; y la **fase luteínica**, con la formación del CL y un incremento en la producción de progesterona, que dura aproximadamente 14 – 15 días en la oveja (Goodman y Hoodge, 1983; Greenwald, 1994).

El crecimiento, desarrollo y maduración de los folículos ováricos ocurren durante el ciclo estral en la mayoría de los animales. De acuerdo a los eventos

endocrinológicos y de comportamiento folicular, el ciclo estral se ha dividido en 4 etapas: *Estro*, *Metaestro*, *Díastro* y *Proestro*. La duración de cada una de ellas y en conjunto del ciclo estral, varía de una especie a otra.

En el **Proestro** ocurre el crecimiento de folículos en sus etapas finales (antral y preovulatorio) debido al aumento en los niveles de gonadotropinas (FSH y LH) en esta fase del ciclo. Algunos factores de crecimiento como el IGF, EGF y VEGF, entre otros, también actúan en conjunto con las cascadas hormonales proporcionando el soporte necesario para el óptimo desarrollo folicular (Elsenhauer et al., 1995).

El **Estro** es una etapa caracterizada por un aumento en el nivel de estrógenos circulantes, lo cual provoca cambios conductuales en el animal para la receptividad sexual, además de inducir la ovulación (Elsenhauer et al., 1995).

En el **Metaestro** los óvulos liberados se encuentran en el oviducto y hay un incremento en la producción de progesterona (Chun et al., 1995).

En el **Díastro**, si no hay fecundación, al final de esta etapa se inicia la síntesis de postranglandinas, encargadas de lisar el cuerpo lúteo, lo que trae como consecuencia una disminución en los niveles de progesterona y un aumento en la producción de FSH y LH (proestro), iniciando nuevamente el ciclo estral (Elsenhauer et al., 1995, Chun et al., 1995).

### 3.- CRECIMIENTO Y DESARROLLO FOLICULAR

La ovogénesis es el proceso de generación de los gametos femeninos, y abarca desde la formación de las células germinales hasta la culminación del proceso

meiótico que da como resultado un ovocito maduro. Este proceso se interrumpe en varias ocasiones, por lo que se ha dividido en 3 fases: 1) Ovogénesis propiamente dicha; 2) Crecimiento del ovocito; y 3) Maduración Meiótica (Rosales y Rosado, 1989).

### **3.1.- Ovogénesis**

Esta etapa comprende la formación de PMGs presentes en el saco vitelino durante la vida embrionaria y el inicio de la meiosis de las mismas, en la tercera semana de gestación en el embrión humano (Pedersen, 1970) y cercano al octavo día de la vida embrionaria en el ratón, dentro del endodermo del saco vitelino, cerca del alantoides (Wagenen y Simpson, 1965). Por lo que se consideran de origen extragonadal (Buccione et al., 1990). Para la generación de las PMGs son necesarias las BMP-4 y BMP-8b, producidas por el ectodermo extraembrionario (Ying et al., 2000). Las PMGs migran mediante movimientos ameboideos o por movimientos de tipo laminar sobre las células del intestino (Donovan et al., 1986) hasta llegar a la cresta genital en formación. Esto es dirigido por factores quimiotácticos esteroidales así como por el TGF- $\beta$ , ambos producidos por la gónada primordial (Godin y Wylie, 1991). La migración de estas células esta acompañada de una gran actividad mitótica regulada por varios factores de crecimiento que elevan las concentraciones de AMPc y estimulan su proliferación (De Felici, 1993), por ejemplo, c-kit, un receptor con actividad de tirosina cinasa que se expresa en PMGs y su ligando KL están presentes en toda la vía migratoria hasta la cresta genital. KL es el encargado de la sobrevivencia y proliferación de las PMGs (Matsui et al., 1991). Estas células una vez que han migrado y colonizado la cresta genital (gónadas en formación), se conocen como ovogonias (Richards, 2001).

Existe un proceso mitótico que se restringe a periodos prenatales o bien a inmediatos post-natales dependiendo de la especie (Mauleon, 1976), es decir, en el doceavo día de gestación en el ratón (Pederson, 1970) y cerca de la séptima semana de gestación en el humano (Van Wagenen y Simpson, 1965), mientras que en el lemur a edad adulta las ovogonias aun conservan una alta actividad mitótica. En el humano las ovogonias conservan una tasa elevada de mitosis que continua hasta alcanzar un total de 6 – 7 millones en la semana 20 de gestación, acompañada de una degeneración masiva que afecta células en cualquier fase del ciclo celular (Forabosco et al., 1991).

Después de que las PMGs colonizan el ovario, inicia un proceso de proliferación y reorganización de células somáticas mesenquimatosas y del epitelio celómico que origina el tejido estromal que contiene PMGs rodeadas por células derivadas de la *rete ovarii*, precursoras de las CG; de origen mesonéfrico y el tejido estromal que dará origen a las CT (Roy y Greenwald, 1990).

Con la interrupción de la mitosis, las ovogonias se transforman en ovocitos primarios e inician la meiosis. El ovocito primario es rodeado por una capa de células aplanadas llamadas "pregranulosa", estableciendo así el llamado folículo primordial (Forabosco et al., 1991). La meiosis del ovocito primario progresa hasta llegar a diploteno o dictioteno de la profase I, en la que poco antes del nacimiento en el caso del humano y después del nacimiento en el caso del ratón, los ovocitos quedan detenidos antes de completar dicho proceso, posteriormente se reanuda en aquellos folículos estimulados selectivamente para ovular y con ello culminar la primera parte de la meiosis, también conocida como meiosis I (Greenwald y Roy, 1994).

### **3.1.1.- Crecimiento del ovocito**

Al entrar en diploteno, el ovocito primario es rodeado de células pregranulosas. No obstante que el proceso de reducción cromosómico del ovocito se detiene, experimenta un crecimiento por vitelogénesis a nivel citoplasmático y nuclear, adquiere un núcleo grande y vesiculoso al que se ha nombrado “vesícula germinal”, existe un incremento en la actividad transcripcional, en el número de ribosomas, mitocondrias, gránulos corticales y sáculos del aparato de Golgi, así como acumulación de tubulina y actina, además de que se sintetizan proteínas que van a formar la capa extracelular o zona pelúcida. Durante esta etapa el ovocito continúa detenido en la primera profase de la meiosis y una vez completado su desarrollo, se diferencia morfológica y bioquímicamente adquiriendo la capacidad para continuar la meiosis (capacitación meiótica), momentos antes de la ovulación (Payton et al., 1990).

### **3.1.2.- Maduración meiótica**

Las etapas finales del crecimiento del ovocito coinciden con el crecimiento folicular en el que aumenta el número de capas de CG y se inicia la formación del antro. La secreción de gonadotropinas estimulan el crecimiento final del folículo (desde antral hasta preovulatorio) y reanudan indirectamente la meiosis del ovocito (Lei et al., 2001; Park y et al., 2004) al liberarlo del folículo durante la ovulación. La meiosis reinicia con el rompimiento de la vesícula germinal, induciendo al ovocito a entrar en la etapa de maduración meiótica (Richards, 2001; Themeen y Huhtaniemi, 2000). Al finalizar la telofase I el citoplasma se divide asimétricamente produciendo 2 células muy diferentes en tamaño, una de ellas es pequeña y contiene poco citoplasma (primer cuerpo polar), la otra, el ovocito secundario, es de mayor tamaño y continuará con el proceso meiótico hasta la metafase II, donde el proceso de división se detiene nuevamente hasta que es estimulado para

continuar por la penetración espermática. En esta etapa cada cromosoma todavía esta compuesto por 2 cromátidas hermanas que se separarán en la segunda división de la meiosis, cuando se distribuyen en 2 células mediante un proceso idéntico a la mitosis, la telofase. Después de la separación final de los cromosomas en la anafase II, el citoplasma del ovocito secundario se divide nuevamente de forma asimétrica produciendo un ovulo pronucleado y un segundo cuerpo polar, ambos poseen una dotación haploide de cromosomas, sin embargo debido a esas divisiones asimétricas del citoplasma, los óvulos conservan su gran tamaño y los cuerpos polares se degeneran (Rosales y Rosado, 1989).

## 4.- FOLICULOGÉNESIS

Las etapas de crecimiento del ovocito y de maduración meiótica se han considerado como una sola, la denominada foliculogénesis, sin embargo, tomando en cuenta la participación del estímulo gonadotrópico, algunos investigadores han optado por llamarla maduración folicular (Hirshfield, 1991), la cual se divide en 2 etapas: 1) reclutamiento inicial y 2) reclutamiento cíclico (Fauser y Van Heusden, 1997; Kawamura et al., 2004).

### 4.1.- Reclutamiento inicial

Las hembras al momento del nacimiento cuentan con una dotación fija de **folículos primordiales** (compuestos por el ovocito y algunas células de la granulosa aplanadas o pregranulosa) que constituyen la poza de reserva en el ovario. El reclutamiento inicial es el mecanismo que regula la salida gradual o activación de los folículos primordiales para empezar su desarrollo, el cual inicia

con el crecimiento del ovocito, seguido de la transformación de las células de la granulosa aplanadas a cuboidales, convirtiéndose de folículo primordial a **folículo primario** (Greenwald y Roy, 1994), mientras que el resto permanecerán quiescentes por días, meses o años dependiendo de la especie (McGee y Hsueh, 2000).

El folículo primario se caracteriza por presentar una capa completa de CG rodeadas por la lámina basal, aunque algunos investigadores como Richards (2001) y Smitz (2002) mencionan que en este folículo ya se encuentran algunas CT que se reclutaron del estroma intersticial y han comenzado a colocarse alrededor de la lámina basal para formar lo que será la teca interna (Richards et al., 2001; Smitz y Cortvrindt, 2002). Durante la transición de folículo primordial a primario se forma la zona pelúcida (Smitz y Cortvrindt, 2002). Al parecer el reclutamiento inicial es un proceso independiente de gonadotropinas y dependiente de factores de crecimiento autócrinos y parácrinos, sin embargo, recientemente se ha establecido la importancia de estas hormonas durante todo el desarrollo folicular, así como su interacción con factores producidos intrafolicularmente como algunos factores del sistema IGF y los miembros de la familia del TGF- $\beta$  (Hirshfield, 1989); como el GDF-9 que es secretado por el ovocito y que está involucrado en la comunicación ovocito-granulosa, además de regular la proliferación de CG (Elvin et al., 1999; McGee y Hsueh, 2000).

Sin embargo, los factores que estimulan el reclutamiento inicial no se conocen por completo y se ha propuesto, que probablemente, los folículos primordiales antes de ser activados se encuentran bajo una influencia inhibitoria constante, de origen sistémico y/o local que los obliga a permanecer inactivos y que la disminución de estas influencias inhibitorias y/o el aumento de factores estimuladores son los que permiten el crecimiento inicial del folículo (Wandji et al., 1997).

Por otro lado se sabe que los receptores funcionales para FSH aparecen en el folículo hasta el estado secundario, sin embargo las células pregranulosa de folículos primordiales responden a activadores de la vía del AMPc incrementando la expresión de aromatasas y receptores a FSH, lo cual es indicativo de que factores endógenos que estimulan esta vía podrían estar participando en el reclutamiento inicial (Fauser y Van Heusden, 1997).

Entre el ovocito primario y las células pregranulosas y granulosa existen uniones intercelulares comunicantes (Gap) presentes durante toda la maduración folicular, desde antes y después de la formación de la zona pelúcida, y disminuyen paulatinamente hasta desaparecer al aproximarse la ovulación. A través de las uniones Gap, el ovocito puede recibir nutrientes y sustancias reguladoras del crecimiento provenientes de las células foliculares que lo rodean, lo cual puede ser crucial desde las primeras etapas de desarrollo folicular (Richards et al., 2001). La transmisión de señales y el paso de segundos mensajeros (AMPc y  $Ca^{2+}$ ) de una célula a otra permiten que la respuesta a un estímulo sea coordinada y sincronizada (Elvin y matzuk, 1998).

Adicionalmente, en los folículos primarios las CG ya han comenzado a adquirir la capacidad de sintetizar algunos esteroides sexuales, ya que presentan receptores específicos para andrógenos, los cuales además de servir como sustrato para la aromatización, en concentraciones bajas también pueden estimular la acción de la aromatasas y la proliferación celular (Cheng et al., 2002).

En el **folículo secundario o preantral** las CG proliferan hasta formar varias capas y empiezan a expresar los receptores funcionales a FSH y LH. Las capas interna y externa de CT se han formado (Richards, 2001; Smitz y Cortvrindt, 2002), de las cuales la segunda está altamente vascularizada (Greenwald y Roy, 1994; Smitz y Cortvrindt, 2002). Aunque los folículos preantrales pequeños no tienen un suministro vascular propio, la angiogénesis inicia en la teca en cuanto se



desarrolla el antro en un folículo y continua a lo largo del desarrollo folicular (Wulff y col., 2001). Son dos las redes concéntricas de vasos sanguíneos que se llegan a formar y que se dirigen hacia la teca interna y la teca externa, sin llegar, en un folículo integro, a penetrar la granulosa (Neeman, 2002).

Diversos estudios realizados en ratas indican que el desarrollo de folículos primordiales y primarios, hasta la fase preovulatoria y según el estado en que se encuentren, requiere de diferentes factores estimuladores y de sobrevivencia (Richards, 2001). Aunque el mecanismo exacto para iniciar el crecimiento de un grupo de folículos primordiales se desconoce, se ha comprobado que FSH, activina y GDF-9 estimulan el crecimiento y diferenciación de folículos primarios y secundarios (McGee y Hsueh, 2000).

#### **4.2.- Reclutamiento cíclico**

El reclutamiento cíclico inicia con el establecimiento del ciclo estral después de la pubertad. Una vez que se activa el eje hipotálamo-hipófisis-gónada, los niveles de gonadotropinas se manifiestan de forma cíclica y el desarrollo folicular ocurre por el aumento de FSH circulante que rescata de la atresia a un número limitado de folículos antrales. El folículo adquiere entonces el nombre de **folículo antral o terciario** y bajo la acción de los estrógenos incrementa y acumula líquido folicular en los espacios intercelulares de la granulosa y forma una cavidad llamada antro (Smits y Cortvrindt, 2002). La acumulación de líquido tiene como fin proveer de un medio endocrino especial al ovocito y a las CG, ya que contiene proteínas plasmáticas, mucopolisacáridos, electrolitos, gonadotropinas, esteroides sexuales, factores de crecimiento, citocinas, EROs y antioxidantes (Aten et al., 1992; Attaran et al., 2000; Din y Ornar, 2002).

Aparentemente la FSH es el principal estímulo para los folículos capaces de continuar su crecimiento hasta **folículo antral grande**, de donde surgirán los **folículos dominantes**, cuya principal característica es su gran tamaño y capacidad esteroidogénica que le permiten escapar de la atresia. Después de que el folículo es seleccionado como dominante continúa su crecimiento hacia estado **preovulatorio** (conocido también como **folículo de Graaf**) y finalmente alcanzara la ovulación (Zelevnik y Benyo, 1994; McGee y Hsueh, 2000). Este tipo de folículos contienen ovocitos que terminaron su etapa de crecimiento y son competentes para reanudar la meiosis (McGee y Hsueh, 2000).

El paso de un folículo preantral a antral, así como todos los procesos que participan (división y diferenciación celular, esteroidogénesis, etc.), pueden estar influenciados por la acción sinérgica de gonadotropinas. Sin embargo, varios estudios han demostrado que la interacción granulosa-teca tiene también un papel muy importante en esta etapa del desarrollo folicular (Elvin, 1999), esto a través de la liberación de algunos factores de crecimiento como: 1) el KGF (Parrot y Skinner, 1998); 2) el HGF (Eppig et al., 1998) y 3) el KL (Elvin et al., 1999) y el GDF-9 entre otros (tabla 1). El KGF y el HGF son producidos por CT y regulan el crecimiento de CG y la esteroidogénesis. El KL es sintetizado por CG y regula la liberación de los dos anteriores en CT, al mismo tiempo que regula la liberación de algunos factores de crecimiento por parte del ovocito (Parrot y Skinner, 1998). GDF-9 induce la división de las CG en dos poblaciones: las del cúmulus (que rodean al ovocito) y las del muro (que se encuentran en la periferia del antro). En ambas modula la expresión de genes, en células del cúmulus por ejemplo, regula la expresión de dos genes que controlan su expansión: la hialuronidasa sintetasa-2 (HAS-2) y la cicloxigenasa-2 (COX-2). También modula la esteroidogénesis al estimular la expresión de la proteína StAR (reguladora de la esteroidogénesis) (Elvin et al., 1999), disminuye el número de receptores a LH en las células del cúmulus y los aumenta en células del muro (McGee y Hsueh, 2000).

Podría ser que la dominancia en un folículo resida en la presencia de un mayor número de receptores para FSH, LH y a receptores  $\alpha$  y  $\beta$  de estrógenos, además de la presencia de proteasas específicas para las proteínas de unión al IGF como la IGFBP-4. Debido a que la IGFBP-4 tiene alta afinidad por IGF, la disminución en los niveles foliculares de esta proteína conlleva al incremento en la interacción de IGF con su receptor, a su vez IGF sinergiza con FSH para promover tanto el crecimiento folicular como la aromatización, lo que resulta en el incremento de la capacidad esteroideogénica del folículo dominante. Por lo tanto la FSH es el principal factor de sobrevivencia que rescata a los folículos antrales tempranos de la atresia durante el reclutamiento cíclico. Una vez que el folículo antral alcanza gran tamaño, produce factores locales de crecimiento, incluyendo algunos factores antiatrésicos que intervienen en el crecimiento final (ver tabla I). Sin embargo hasta el momento no se conoce un mecanismo que determine exactamente como se propicia la maduración folicular (McGee y Hsueh, 2000; Smitz y Cortvrindt, 2002).

Los estrógenos ejercen un efecto positivo sobre los folículos dominantes, al mismo tiempo el folículo dominante libera algunos factores inhibidores del crecimiento como la inhibina y la foliculoestatina. Los estrógenos y la inhibina causan una retroalimentación negativa sobre el eje hipotálamo-hipófisis para la liberación de FSH, por lo que el resto (los folículos subordinados) se quedará sin el aporte gonadotrópico para continuar su crecimiento y por consiguiente iniciaran el proceso de atresia (Fauser y Van Heusden, 1997).

Durante el reclutamiento cíclico, sólo un número limitado de folículos sobreviven mientras que la gran mayoría siguen el camino hacia la atresia. Aunque en el establecimiento del folículo dominante y de los subordinados, están involucrados mecanismos que aún desconocemos, en los últimos años se han tenido importantes avances que nos permiten saber que el rápido crecimiento que tienen los folículos dominantes es producto de altos niveles de factores de crecimiento

autócrinos y parácrinos que estimulan su vasculatura y por ende la mayor afluencia de gonadotropinas hacia los folículos elegidos que alcanzarán la ovulación (McGee y Hsueh, 2000).

### **4.3.- Hormonas que intervienen en la maduración folicular.**

#### **4.3.1.- Hormona estimulante de los folículos**

Los folículos primordiales pueden iniciar su crecimiento en ausencia de gonadotropinas, sin embargo el crecimiento final de los folículos preovulatorios es estrictamente dependiente de ellas, principalmente de FSH, cuyos requerimientos incrementan con la proliferación de CG y del mismo crecimiento folicular que llevan a la separación espacial de las células del cúmulus de las del muro; proceso que necesita la regulación de factores y hormonas que provienen de CG del muro o del complejo cúmulus/ovocito dependientes de PKA. Dado que el crecimiento de los folículos es avascular, son los gradientes de factores los que al parecer establecen las zonas y los microambientes foliculares. Se ha mostrado que FSH y estradiol, estimulan la proliferación celular aumentando los niveles de ciclina D2 (regulación a la alta) vía AMPc, conduciendo a la célula a la fase S del ciclo (Robker, 1998, Orly, 2000).

#### **4.3.2.- Estrógenos**

Los estrógenos potencian la acción de las gonadotropinas, por si solos son incapaces de mantener la actividad mitogénica y necesitan de otros factores provenientes de CG, CT y ovocito, entre ellos el IGF I y II, así como sus receptores (tipo I y tipo II) (Webb et al., 1999; Monget y Bondi, 2000). Ambos ligandos son

indispensables durante la maduración folicular debido a sus efectos mitogénicos, a su acción potenciadora de los efectos de FSH (Abel et al., 2000) sobre la esteroidogénesis a través del citocromo P450 aromatasa, además de estimular la formación de receptores para FSH (Richards, 1994, 2001) y LH por lo que su expresión está directamente relacionada con la supervivencia y proliferación de las CG (Zhang et al., 2001). Después de que el folículo es seleccionado como dominante continúa su crecimiento hasta entrar en el estado preovulatorio o folículo de Graaf y a medida que llega a su madurez, aumenta la secreción de estrógenos llegando a producir un pico antes de la ovulación (Robker y Richards, 1998).

Una vez que se incrementa la síntesis de P450arom y por consiguiente la síntesis de estrógenos, estos últimos son transportados rápidamente a las células vecinas a través de la membrana celular por difusión simple (Nilson et al., 2001), se unen a su receptor estrogénico citoplásmico de tipo  $\alpha$ , mediante el dominio de unión al ligando (LDB), unión de tipo no covalente, tras la homodimerización o heterodimerización interactúa con las fracciones nucleares del SRE (interacción del dominio de unión al DNA del receptor con el Elemento de Respuesta a Esteroides del DNA) para la activación de la transcripción génica. Son múltiples las regiones del receptor que intervienen en la activación de la transcripción, aunque existen dos áreas específicas conocidas como factores amplificadores de la transcripción -1 y -2 (TAF-1 y TAF-2) que permiten la transcripción inducida por regiones promotoras (secuencias cortas de DNA), indispensables para iniciar la transcripción y síntesis de RNAm. Una vez que los estrógenos se unen a su receptor del tipo  $\alpha$ , induce la síntesis de factores de transcripción esenciales para la fase de síntesis (Fase S) y proteínas nucleares como la histona H1 fundamental para el inicio de la fase mitogénica (Fase M) del ciclo celular. Al mismo tiempo induce la síntesis del ER $\beta$ , que al unirse con su ligando disminuye el nivel de receptores a estrógenos, por lo cual el ER $\beta$  parece tener un papel modulador de la expresión génica (Nilsson et al., 2001).

### **4.3.3.- Andr6genos**

En trabajos realizados por Robker y Richard en 1998, observaron que en los fol6culos antrales tempranos, los andr6genos llevan a cabo una funci3n muy similar a la de FSH estimulando la s6ntesis de algunos reguladores positivos del ciclo celular como la ciclina D2 y la s6ntesis de otras prote6nas como P450arom y PCNA v6a AMPc, adem6s de disminuir los niveles de dos inhibidores del ciclo celular, p27 y p21, por lo que su actividad mitog6nica es mayor que la de FSH.

### **4.3.4.- Hormona luteinizante**

Durante la maduraci3n folicular el ovocito crece y adquiere la maduraci3n mei3tica (Eppig et al, 1998) que lo hace competente para la fertilizaci3n. La LH tiene como funci3n principal en el ovario, liberar al ovocito para reanudar la meiosis. En las CG durante el crecimiento folicular se induce la expresi3n de la enzima aromatasa, as6 como del receptor a LH. La aromatasa se encarga de convertir andr6genos a estr6genos. Al aumentar los niveles s6ricos de estr6genos se incrementan los de LH, la cual r6pidamente act6a sobre las CG de fol6culos preovulatorios para terminar con la expresi3n de genes involucrados en el crecimiento folicular y estimula la expresi3n de los genes requeridos para la ovulaci3n y luteinizaci3n (Richards, 1997; 2001), incluyendo el receptor de progesterona (Park et al., 2004) y la enzima COX2, y junto con la inhibici3n de la expresi3n de genes como la ciclina D2 se incrementa la expresi3n de inhibidores del ciclo celular como p21 y p27 (Robker y Richards, 1998), con lo que se induce la salida de CG del ciclo celular, adem6s de favorecer la luteinizaci3n (Richards, 1994; 2001). Por ello, la regulaci3n de la proliferaci3n y diferenciaci3n celular por parte de las gonadotropinas, establece un balance alternado de reguladores positivos y negativos del ciclo celular (Sicinski et al., 1996; Robker y Richards, 1998; Kawamura et al., 2004).

#### **4.3.5.- Prostaglandinas**

Al inducirse la luteinización y el aumento en la producción de progesterona, también se induce la síntesis de prostaglandinas E y F, así como otros eicosanoides indispensables para la ruptura del folículo. Una vez que las prostaglandinas E y F aumentan en el líquido folicular y alcanzan un pico en el momento ovulatorio, actúan sobre el músculo liso permitiendo su contracción, ayudando de esta manera a la expulsión del ovocito (McGee y Hsueh, 2000).

### **5.- OVULACIÓN**

La ovulación es el proceso de ruptura del folículo y liberación de un ovocito maduro. Se considera que LH es el estímulo fisiológico que inicia este proceso, al actuar directamente sobre las CG rompiendo las uniones Gap para la reanudación de la meiosis del ovocito. En el folículo estimula la producción de AMPc, la activación de PKA y la síntesis de estradiol. LH también inactiva la  $17\alpha$ -hidroxilasa y por lo tanto induce un incremento de progesterona y de otros esteroides con funciones oxigénicas, que labilizan la membrana lisosomal y modifican las propiedades de permeabilidad de otros organelos, incluyendo la membrana plasmática, también son estimuladores del AP tisular presente en los folículos maduros. Las gonadotropinas inhiben la producción de inhibidores (tipo 1, tipo 2 y nexina) del AP e inducen su secreción, los cuales actúan sobre el plasminógeno presente en el líquido folicular y los tejidos ováricos, para convertirlo en plasmina, una enzima que actúa sobre la colágena debilitando y degradando el tejido conectivo. No obstante del efecto de los esteroides arriba mencionados, las prostaglandinas tienen un efecto labilizador de la membrana lisosomal más importantes aun que los esteroides.  $PGF_2\alpha$  por su acción vasoconstrictora reduce el flujo sanguíneo y actúa sobre las fibras musculares para aumentar su

contracción. Otro de los factores que contribuye en la ovulación es la distensibilidad de la pared folicular, lo cual contribuye al crecimiento final del folículo y a su protrusión sobre la superficie del ovario (Rosales y rosado, 1993).

Espey (1980) propuso que uno de los efectos del pico de gonadotropinas era la inducción de una reacción inflamatoria en la pared de los folículos maduros, lo cual podría estar apoyado por la presencia de serina proteasas, particularmente del activador del plasminógeno, y por actividad colagenolítica, ambos eventos presentes en los procesos inflamatorios agudos. A este ultimo respecto, poco antes de la ovulación los ovarios se hacen hiperémicos (Tanaka et al., 1989) con un aumento en la dilatación y la permeabilidad vascular; con estos cambios dramáticos tambien se da un aumento local en la concentración de factores vasoactivos, que normalmente ocurren durante la inflamación, como prostaglandinas (Espey et al., 1986), histamina y de algunas sustancias de las llamadas cininas, como la bradicidina (Yoshimura et al., 1988). Otras sustancias que se incrementan durante la ovulación son las llamadas kalicreínas, péptidos con actividad proteolítica, generados por la liberación del factor de Hageman en los sitios donde acontece la reacción inflamatoria. Las kalicreínas rompen otros péptidos como los cininogénos y origina la liberación de cininas (bradicidina y kalidina). El sistema kalicreína-kalidina activa la fosfolipasa A2 y por tanto promueve la síntesis de prostanoides, con lo cual posiblemente estos componentes de la reacción inflamatoria participan en el mecanismo de ovulación induciendo la síntesis de prostaglandinas, molécula característica del proceso ovulatorio (Rosales y Rosado, 1993).

La presencia de estas actividades tripsinoides, además del activador del plasminógeno y la plasmina, indican que son necesarias varias enzimas hidrolíticas además de la colagenasa, para la degradación del tejido conectivo que rodea al folículo.



Además se ha podido demostrar la presencia de tejido muscular liso en el estroma cortical y en la teca externa de los folículos, que aunado a la presencia de sustancias estimuladoras de la contracción del músculo liso, como las prostaglandinas, han llevado a pensar que la contractibilidad del músculo liso participa parcialmente como uno de los factores que desencadenan la ovulación; ya que ésta aumenta conforme se aproxima el tiempo de ovulación (Rosales y Rosado, 1993).

Todos estos eventos encadenados conducen a la ruptura de la pared folicular y a la liberación del ovocito (Chun et al., 1994). Posteriormente, las CG adyacentes a la membrana basal aumentan de tamaño y cierran el folículo, adquiriendo apariencia vacuolada y un pigmento amarillo (luteína) convirtiéndose en células luteínicas que formaran el CL (McGee y Hsueh, 2000).

## **6.- CUERPO LÚTEO**

El CL es una glándula transitoria formada por tejido heterogéneo constituido por diferentes tipos celulares incluyendo células endoteliales, células lúteas grandes y pequeñas, así como células inmunes (leucocitos y macrófagos) y células musculares lisas, todos ellos interactúan entre sí a través de sus productos secretados, para asegurar el crecimiento y desarrollo del CL normal, inclusive algunos de los productos actúan como reguladores intraováricos. La formación del CL, inicia por una serie de cambios bioquímicos y morfológicos en las CT interna y CG de los folículos preovulatorios para dar origen a las células lúteas pequeñas y grandes respectivamente (Villavicencio et al., 2002), capaces de producir una gran cantidad de progesterona (Neiswender et al., 2000; Demeestere et al., 2005). Es decir, cada folículo ovulado da lugar a un CL. La diferenciación de células foliculares (cuya función principal era producir estradiol) a células lúteas (que

ahora producirán progesterona), esta dada principalmente por el incremento en la expresión de enzimas que convierten el colesterol a progesterona (P450 ssc y 3 $\beta$ -HSD) y el decremento en la expresión de aquellas que participan en la síntesis de estrógenos (P450arom) (Spaczynski et al., 2005).

Después de la ovulación, la cavidad antral del folículo se llena de sangre, razón por la cual a esta estructura se le denomina primariamente cuerpo hemorrágico. Una vez que inicia la diferenciación de las células foliculares poco antes de la ovulación, las células lúteas empiezan a proliferar rápidamente hasta formar una masa compacta de células a la que propiamente se llama CL (Neiswender et al., 2000; Rathbone et al., 2001).

Al igual que un folículo, el CL necesita un soporte hormonal para poder desarrollarse. Este soporte está dado principalmente por LH, la cual promueve la actividad de las enzimas P450ssc y 3 $\beta$ -HSD (Hadley, 1996) para la síntesis de progesterona (Rueda et al., 2000). Estas 2 hormonas son fundamentales para las sobrevivencia de las células lúteas (Peluso et al., 2000). El desarrollo del CL esta favorecido además por otros factores de crecimiento y hormonas entre los que se encuentran: el IGF, VEGF y la GH (Fraser et al., 2000; Boonyaparakob et al., 2003).

### **6.1.- Angiogénesis**

Angiogénesis, se refiere al proceso que lleva a la generación de nuevos vasos sanguíneos a partir de los preexistentes. Este proceso incluye la degradación de la membrana basal de los capilares a través de los cuales migran algunas células endoteliales (formando un brote) que proliferan para crear un nuevo lumen y la maduración de los vasos sanguíneos. Es un proceso complejo en el cual se mantiene un balance entre promotores e inhibidores. En la maduración y

formación del CL, participa el VEGF, FGF, IGF y la angiopoiteina (Gioacchini et al., 2005).

Una característica importante durante el desarrollo del CL es su gran demanda metabólica debido a la elevada tasa de crecimiento, lo cual implica un mayor desarrollo de vasos sanguíneos para satisfacer las necesidades de oxígeno y nutrientes de esta glándula, por lo que VEGF, un potente mitógeno de células endoteliales juega un papel importante en la formación de vasos sanguíneos durante la formación del CL que le permite cubrir estas demandas (Ferrara y Smyth, 1997); por ejemplo el flujo sanguíneo disminuye ligeramente poco después de la ovulación, pero se incrementa gradualmente en forma paralela conforme incrementa el volumen y las concentraciones de progesterona. En las ovejas un folículo ovulado pesa alrededor de 40 mg y tiene que desarrollarse a un CL maduro de entre 600 y 700 mg en 3 ó 4 días (Niswender et al., 2000). El aumento en la angiogénesis del día 2 al 5 del ciclo estral, refleja el desarrollo de un CL normal, que exhibe periodos regulares de crecimiento dividido en 3 etapas: angiogénesis, funcionamiento y luteólisis o regresión del CL (Sayre et al., 2000).

Algunos estudios han demostrado que IGF estimula la síntesis de progesterona en el CL de rata cuando las células son estimuladas simultáneamente con IGF y hCG. Resultados similares han sido encontrados en células lúteas humanas en donde un incremento de IGF-I estimula la síntesis de progesterona. Además IGF induce un incremento de estradiol por las CG luteinizadas en el humano y en las células lúteas en cultivo. Por lo tanto esos resultados indican que IGF-I participa en la regulación de la función esteroideogénica en el humano (Ferrara, 2004).

## **6.2.- Funcionalidad**

La máxima actividad esteroidogénica en el cuerpo lúteo ocurre durante la mitad de la fase luteal con la producción de progesterona y estradiol (Okuda et al., 2004). Algunos reportes en cultivo de células lúteas de bovino muestran que IGF-I incrementa la síntesis de DNA, la secreción de progesterona y potencializa la capacidad de unión de LH con su receptor lo que lleva a un incremento en el efecto luteotrófico de esta hormona (Woad et al., 2000). También se ha observado que en las novillas con un balance energético negativo presentan decremento en el desarrollo del CL, asociándose a una disminución en las concentraciones circulantes de IGF-I y del contenido de progesterona en el CL (Yung et al., 1996). Por otra parte, en el bovino se ha visto un incremento en el mRNA del IGF-I entre el día 5 y 15 del ciclo estral, mientras que la expresión del IGF-II tiende a disminuir (Word et al., 2000). Para el caso de VEGF, los resultados encontrados por Boonyaprakob y colaboradores (2003), demostraron que la expresión de VEGF y sus receptores en el CL se mantienen sin cambios importantes a lo largo de diestro.

## **6.3.- Luteólisis**

En la oveja cuando un ovocito ovulado no es fecundado el CL sufre un proceso de regresión denominado luteólisis alrededor del día 14 ó 15 del ciclo estral (Goodman y Hudge, 1983) y el día 16 en el bovino (Zheng et al., 1994); ello como resultado de la liberación pulsátil de  $\text{PGF}_2\alpha$  por parte del endometrio (Okuda et al., 2004). El efecto luteolítico de  $\text{PGF}_2\alpha$  esta dado principalmente por su acción vasoconstrictora sobre el endotelio vascular que irriga al CL, ocasionando un menor aporte de nutrientes, oxígeno y colesterol necesario para la esteroidogénesis. También se ha sugerido que esta hormona puede tener un efecto directo sobre los receptores a hormonas luteotrópicas, captación de

colesterol por la célula, expresión de enzimas esteroideogénicas y transporte de colesterol hacia la mitocondria (Niswender et al., 2000). La involución también puede ser debida en parte a la disminución del mRNA que codifica para las enzimas esteroideogénicas, de actividad de las enzimas y/o a la disminución en el número de células que componen el CL. Previos estudios indican que los mecanismos de muerte celular programada pueden estar involucrados en la involución del CL en ratones, ovinos, bovinos y humanos (Rueda et al., 1997; Sayre et al., 2000; Iñiguez et al., 2001).

La disminución en la producción de progesterona observada durante la luteólisis coincide con el incremento de una de las proteínas de unión a IGF, la IGFBP-1. Las proteínas de unión y los receptores a IGF, regulan la acción metabólica de IGFs en el CL. IGFBP-1 inhibe la acción luteotrópica del IGF-1 y conduce a la lisis de CL. Con la edad del CL también se incrementa la cantidad de IGFBP-1, lo que sugiere que IGF-I y IGFBP-1 regulan la vida del mismo (Sayre et al., 2000; Hasti y Haresign, 2005).

En roedores la involución del CL se ha relacionado con el incremento de ERO, principalmente  $O_2^-$  y  $H_2O_2$ , estas moléculas pueden generar daño en las membranas plasmáticas de las células lúteas provocando: pérdida de receptores a gonadotropinas; disminución en la formación de AMPc y en la capacidad esteroideogénica (Márquez y López, 1997).

## **7.- FACTORES QUE INTERVIENEN EN LA MADURACIÓN FOLICULAR**

El desarrollo folicular y ovocitario dependen de la interrelación entre diversos factores de crecimiento (que se resumen en la tabla 1 y se describen más

adelante), de las concentraciones séricas de gonadotropinas (FSH y LH) a lo largo del ciclo reproductivo, de los esteroides periféricos e intrafolículos (Kably et al., 2003), así como del equilibrio en la producción de ERO y de la eficiencia de los sistemas antioxidantes (Knapen et al., 1998; Dinara et al., 2001).

**Tabla I.** Algunos factores que intervienen en la maduración folicular.

<b>Factor</b>	<b>Sitio de expresión</b>	<b>Función</b>
<b>KL</b>	Células de la granulosa	Estimula la mitosis y el inicio del crecimiento folicular. Tiene actividad mitogénica sobre la granulosa. Inhibe la expresión de BMP-15. Se requiere para la expresión del FGFb.
<b>c-kit</b>	Células germinales primordiales, teca y ovocito.	Al parecer estimula la activación de folículos primordiales.
<b>FGFb</b>	Células germinales primordiales y en granulosa de folículos en desarrollo.	La interacción de KL y el FGFb favorecen la transición de folículo primordial a folículo primario.
<b>BMP-7</b>	Células de la teca	Promueve la transición de folículo primordial a folículo primario e incrementa la proliferación de células de la granulosa.
<b>LIF</b>	Células de la granulosa	Promueve la diferenciación, crecimiento y proliferación celular en la transición de folículo primordial a primario. Incrementa la expresión de KL. Actúa en sinergismo con FGF-7, BMPs, KGF y KL. Tiene efecto antiapoptótico.
<b>TGF-<math>\beta</math></b>	En ovocito al principio del desarrollo folicular y en teca en etapas más avanzadas.	Influye sobre la proliferación celular desde la fase primordial hasta la fase antral.
<b>IGF-I</b>	Células pregranulosas y granulosa durante el desarrollo de folículos preantrales.	Estimula la síntesis de DNA y la actividad de la aromataasa. En estados de desarrollo avanzado amplifica la acción de las gonadotropinas (FSH) y regula los niveles de ER $\beta$ .
<b>IGF-II</b>	Células de la teca.	Estimula la mitosis en células de la granulosa.
<b>EGF</b>	Teca y se deposita en líquido folicular. Sus receptores se encuentran en células de la granulosa.	Es un mitógeno al cual responden las células de la granulosa. Su acción es potenciada por IGF-I.
<b>PGF</b>	Células de la granulosa.	Participa en la diferenciación de la granulosa y actúa sobre la producción de prostaglandinas.
<b>OMI</b>	Células de la granulosa.	Previene la reanudación de la meiosis hasta el inicio del pico preovulatorio de LH.
<b>GDF-9</b>	Ovocitos en crecimiento de folículos primarios y secundarios.	Evita la proliferación acelerada de células de la granulosa y estimula la presencia de células de la teca.
<b>GDF-9<math>\beta</math> y BMP-15</b>	En ovocito en estados tempranos de desarrollo folicular.	Estimula la expresión de KL en células de la granulosa. Probablemente tiene actividad mitogénica sobre las células de la granulosa en folículos preantrales. Regula la citodiferenciación y expansión de células del cumulus.
<b>KGF</b>	Células de la teca	Regula el crecimiento de células de la granulosa y la esteroidogénesis.
<b>HGF</b>	Células de la teca	Participa en la proliferación de células de la granulosa y maduración del ovocito.

## **7.1.- Kit Ligand**

KL, también conocido como stem cell factor o steel factor, es responsable de la activación de folículos primordiales (Hirshfield, 1989) y se produce en CG (Flanagan y Leder, 1990; Huang et al., 1990). Su receptor c-kit, con actividad tirosina cinasa, se expresa en PMGs, ovocito (Packer et al., 1994; 1996; Yoshida et al., 1997) y en estados más avanzados del desarrollo en CT (Parrot y Skinner, 1998; Otsuka y Shamasaki, 2002). Cuando las CT comienzan a rodear al folículo, son capaces de estimular positivamente la producción de KL que a su vez estimula la síntesis de KGF y HGF, estableciendo un tipo de retroalimentación positiva con factores de origen parácrino que estimulan la proliferación de CG y la maduración ovocitaria, de esta forma la cooperación que existe entre las CT y CG favorece la viabilidad del ovocito en los folículos preantrales tardíos (Hirutsugu et al., 1999).

## **7.2.- Factor de Crecimiento Fibroblástico Básico**

El FGFb estimula la proliferación de células epiteliales y fibroblastos, además de la angiogénesis. El receptor del FGFb se localiza en ovocito y en CG, en todos los estadios del desarrollo. Su función principal es evitar la apoptosis de las CG (Trollice et al., 1997) y aunque el mecanismo por el cual esto ocurre aun se desconoce, es un factor esencial para el crecimiento folicular (Ojeda y Dissen, 1994; Peluso et al., 2001). Actualmente, se considera de gran importancia su interacción con KL en la transición de folículo primordial a primario. Además el FGFb potencializa las acciones de KL (Peluso et al., 2001).

### **7.3.- Factor de Crecimiento Insulinoide**

Los IGFs o somatomedinas (Schneider et al, 2003) son hormonas polipeptídicas que se presentan en 2 formas: IGF-I y IGF-II, de los cuales IGF-I actúa como estimulador del crecimiento (Sanders y Debuse; 2004), se secreta principalmente en hígado, en respuesta a GH (Torrado y Carrascosa, 2003). Los receptores a IGF-I están distribuidos en cerebro, hipofisis, gónadas, músculo esquelético y tracto reproductivo (Codner y Cassorla, 2002, Schneider et al., 2003). IGF-I estimula el inicio del crecimiento folicular, en la pregranulosa a través de un receptor de membrana de la familia "tirosina cinasa", que estimula la actividad de la aromatasa e indirectamente la replicación del DNA, asimismo se sabe que en estados de desarrollo avanzado se encuentra en CG y amplifica la acción de las gonadotropinas, mientras que el IGF-II se encuentra en CT interna y estimula la mitosis en CG, por lo que ambos intervienen en la proliferación y diferenciación de estas células (Adashi, 1998; Monget et al., 2002; Mazerbourg et al., 2003). Las concentraciones foliculares de IGF-I incrementan conforme aumenta el tamaño del folículo, mientras que IGF-II no presenta cambios (Hasti y Haresign, 2005).

La bioactividad de IGF, esta regulada por 6 proteínas de unión conocidas como IGFBP-1, -2, -3, -4, -5 y -6, que presentan alta afinidad por ellos, cuando se unen a los IGFs prolongan su vida media y bloquean sus funciones. Las concentraciones de IGFBP -2, -4 y -5 disminuyen durante el crecimiento folicular y aumentan durante la atresia en todas las especies (Fraser et al., 2000; Iñiguez et al., 2001).

Además IGF I tiene un importante efecto anti-apoptótico en varios tejidos, ya que regula la concentración de diversos miembros de la familia de Bcl2 (Abel et al., 2000), estimula a su propio receptor para incrementar la replicación del DNA, la proliferación y supervivencia celular de la teca interna (Babu et al., 2000 y 2001).



IGF-I tiene un papel dual en la regulación del folículo, actúa conjuntamente con FSH como un mediador autócrino del crecimiento de CG y, en ausencia de FSH, como un regulador parácrino de la proliferación celular del *cúmulus oophorus* en folículos antrales pequeños (Sirotkin y Makarevich, 2002). Por otro lado, en el humano IGF-I es un potente regulador de la síntesis de estradiol en células de la granulosa y de progesterona en células lúteas, además aumenta la proliferación de CG en folículos pequeños, y estimula la secreción de progesterona en folículos grandes (Holly et al., 1999). Así, en el humano IGF-I estimula el desarrollo de folículos primordiales y puede ser un factor importante en el inicio del crecimiento folicular (Torrado y Carrascosa, 2003).

#### **7.4.- Factor de Crecimiento Epidérmico**

En condiciones *in vitro*, el EGF tiene propiedades mitogénicas en CG del bovino, porcino, conejo, cobayo y humano, donde su acción es potenciada por la presencia de otros factores de crecimiento como IGF-I (Rajarajan et al., 2005). En la cabra, el EGF estimula la formación de uniones comunicantes, las cuales están formadas principalmente por Cx43. Melton y col., (2001) reportan cantidades substanciales de Cx43 detectadas inicialmente en CG, seguidas por la activación del desarrollo folicular, sugiriendo una asociación entre el aumento de las uniones intercelulares tipo Gap y el inicio del crecimiento folicular. Estos datos son apoyados por Bolama y colaboradores (2002) donde encuentran que EGF promueve en el folículo preantral la expresión de proteínas Cx43 para la formación de uniones tipo Gap.

Por otro lado, la exposición *in vitro* de CG al EGF estimula su proliferación e incrementa la afinidad a FSH (May et al., 1987; Mao et al., 2004; Andrade et al., 2005), causando un acelerado crecimiento de folículos preantrales hasta llegar a ser antrales. En el humano el EGF estimula la actividad de la aromatasa y por

tanto la producción de estrógenos (Misajon et al., 1999), no así en otras especies como la oveja y la cabra, donde su efecto esteroideogénico está dirigido hacia la producción de progesterona (Murray et al., 1993; Bel y Pandey, 2001). Aunque no se ha entendido por completo el mecanismo de acción de EGF, se ha propuesto que su presencia contribuye a evitar la atresia folicular.

### **7.5.- Factor de Crecimiento Derivado de Plaquetas**

El PDGF es de los factores de crecimiento que se encuentran en mayor cantidad en suero más no así en plasma, es una glicoproteína, formada por 2 péptidos: PDGF A y PDGF B (Pimentel, 1987). En la rata estimula la secreción de FSH, induce la expresión de los receptores para LH y la producción de progesterona (Battista et al., 1989; May et al., 1992). Recientemente se ha demostrado que IGF-I, EGF y PDGF, pueden actuar sinérgicamente para promover la proliferación de células tanto de la granulosa como de teca interna, teniendo PDGF mayor efecto sobre CT (Taylor, 2000).

### **7.6.- Factor de Crecimiento Endotelio-Vascular**

El VEGF, es un factor angiogénico que estimula receptores tirosina-cinasa, actúa como un potente mitógeno y protector de apoptosis en las células del endotelio vascular (Tran et al., 2002). En el ovario la formación de nuevos vasos sanguíneos facilita la transferencia de hormonas, oxígeno y nutrientes a las células foliculares. Los folículos y el CL producen varios factores angiogénicos, de los cuales VEGF es considerado el más importante. De tal forma que su inhibición disminuye la angiogénesis y abate el desarrollo y maduración de folículos antrales; además, se cree que por su actividad permeabilizante, puede ser responsable de la formación del antro y participar en la ovulación. En el cuerpo

lúteo el VEGF tiene patrones diferentes de expresión dependiendo del estadio de desarrollo, y en la mayoría de las especies, su expresión aumenta en la fase lútea temprana para desarrollar la red capilar de alta densidad que el CL demanda (Kaczmarek et al., 2005).

En CG de bovino y rata en cultivo existe la coexpresión tanto del RNAm como de la proteína para VEGF y su receptor. En los folículos, la expresión de ambas moléculas es mayor en granulosa de los folículos sanos, mientras que la inhibición del receptor tiene un importante efecto en la inducción de atresia. Esto destaca la importancia de VEGF en la dinámica folicular, incluyendo el desarrollo del CL y la atresia (Greenaway, 2004).

### **7.7.- Factor de Crecimiento Transformante- $\beta$**

Dentro de la superfamilia del TGF- $\beta$  se encuentran los receptores y ligandos de las BMPs entre ellas las BMP-4, -6, -7 y -15. Aunque hasta el momento se desconoce el mecanismo exacto que estimula la activación de los folículos primordiales, se ha confirmado la participación BMP-7 como promotor de la transición de folículo primordial a primario al favorecer la proliferación de CG (Shimasaki, et al., 1999; Otsuka et al., 2000; 2001).

El GDF-9 y su homólogo la BMP-15, son proteínas glucosiladas y utilizan enlaces no covalentes para la formación de dímeros (McGrath et al., 1995; Laitinen et al., 1998; Otsuka et al., 2000). Actúan en sinergismo para estimular la proliferación y organización de CG, estableciendo y manteniendo las funciones y diferencias entre las CG del muro, las periantrales y las del cúmulus, que expresan diferentes productos. Recientemente se demostró que BMP-15 es necesaria para la fertilidad normal en la oveja, ya que mutaciones en el gene *bmp15* causan arresto de los folículos en el estadio primario (Galloway et al., 2000).

El TGF- $\beta$  se expresa al principio del desarrollo folicular principalmente en ovocito y en fases más avanzadas se encuentra en CT. Ejerce influencia sobre el crecimiento y desarrollo folicular desde la fase primordial hasta la fase antral y tiene efectos sobre la proliferación, organización y diferenciación celular. En los folículos antrales, donde la participación de gonadotropinas es indispensable para su desarrollo, la FSH, estrógenos y dihidrotestosterona estimulan la síntesis del receptor del TGF $\beta$  (Shimasaki, et al., 1999; Otsuka et al., 2000).

## **8.- ATRESIA FOLICULAR**

El término atresia es de origen griego y significa clausura u obliteración de un orificio o pasaje del cuerpo (Hurwitz et al., 1992). Dicho término es utilizado para definir el mecanismo por el cual el ovario pierde, sin llegar a la ovulación la gran mayoría de los ovocitos (70 - 99.9%), que constituyen el potencial reproductivo de las hembras (Rosales, 1999).

La atresia folicular es un proceso degenerativo que experimentan la mayoría de los folículos que pueblan el ovario de todos los animales vertebrados mamíferos y no mamíferos (Ryan et al., 1976). Se presenta en las hembras desde la vida prenatal, en los humanos comienza al sexto mes de vida embrionaria (Peters et al., 1975) y continúa ininterrumpidamente durante toda la vida reproductiva, dando lugar a una pérdida progresiva de células germinales. El desarrollo folicular se caracteriza por el continuo crecimiento y degeneración de folículos, por lo tanto sólo algunos de los que inician su desarrollo son seleccionados para ovular (Hirshfiel, 1991), lo cual indica que el término normal de la maduración folicular es la atresia (Murdoch, 1992).

El grado de atresia de los folículos puede clasificarse de acuerdo a su apariencia morfológica y macroscópica apoyada en tres aspectos: vascularización de la teca interna, integridad de la capa granulosa y translucidez del folículo (Rosales et al., 2000).

Aun no son claros los mecanismos fundamentales que llevan a la muerte masiva de las células somáticas y germinales que se encuentran en el ovario, posiblemente este proceso representa una ventaja evolutiva por la cual se selecciona solo a los ovocitos que aseguren que su fecundación terminará con la generación de un nuevo ser capaz de mantener la especie (Hsueh et al., 1996).

La atresia ocurre en cualquier etapa del desarrollo folicular, aunque es mas frecuente en los folículos antrales (Hirshfiel, 1991); ésta pérdida al parecer es esencial para mantener la masa celular y la homeostasis en el ovario. El porcentaje de atresia varia entre especies: en la rata 70%, en el ratón 50% (Jones, 1956), en el conejo 60% (Petrucci, 1978), en el humano entre 50 y 75% (Magnusson et al., 1983), en el cerdo entre 73% y 84% (Centola, 1982) y en la oveja mas del 80% (García et al., 1997).

Observaciones al microscopio electrónico han revelado que las células de los folículos antrales con atresia avanzada presentan alteraciones citoplásmicas que varían de acuerdo al grado de atresia y que van desde la vacuolización y edematización de mitocondrias y otros organelos, hasta daños más severos. Las células de la granulosa en proceso degenerativo muestran con frecuencia núcleos con una marcada condensación nuclear (picnósis) (Gondos, 1982). Cuando las CG se desprenden y flotan en el espacio antral, adquieren formas irregulares y pierden sus proyecciones citoplásmicas, mientras que las células normales son esféricas y tienen numerosas proyecciones irregulares (Wiensen et al., 1993). Las proyecciones citoplásmicas, se correlacionan normalmente con la presencia de receptores a LH (Ruiz, 1988), de modo que la pérdida de las mismas conducen al

folículo al desacoplamiento metabólico para la biosíntesis de esteroides, ya sea como consecuencia de un menor número de receptores o de su incapacidad para unir gonadotropinas en este tipo de folículos, ello aunado a una disminución en la expresión de RNA mensajeros (RNAm) para la aromatasa (Tilly et al., 1992). Posiblemente esto último se debe a la muerte de CG que se observa en la atresia, lo cual explica la menor concentración de  $E_2$  y mayor concentración de  $P_4$  en el líquido de folículos atrésicos (Rosales et al., 2000). La relación  $E_2:P_4$  es directamente proporcional con el grado de atresia, donde es superior a 1 en folículos sanos y menor en folículos atrésicos (Rosales et al., 2000; Roth et al., 2001; Jiang et al., 2003).

Además de la aromatasa, se han involucrado otras enzimas que participan de manera importante en el proceso de atresia, por ejemplo algunas enzimas lisosomales (Quirk et al., 1995), como la aspartil endopeptidasa y la catepsina-D; otras de importancia en la remodelación tisular, como tripsina, antitripsina, colagenasas, gelatinasas, Pz-peptidasas, el AP y; aquellas que participan en la síntesis de DNA. También se ha encontrado un incremento de las proteínas de unión a IGF (IGFBPs), así como modificaciones en el receptor para la angiotensina II y para la glicoproteína-2-sulfatada, también conocida como TRPM-2 (Rosales et al., 2000).

Se han identificado diversos procesos anátomo-fisiológicos y bioquímicos que se correlacionan con el proceso de atresia, entre ellos se incluye, desprendimiento y degeneración de CG, presencia de células con núcleos picnóticos en la granulosa, fragmentación de la lámina basamental, y fragmentación internucleosomal del DNA, característico de células que mueren por apoptosis. En ovinos, las células de la teca de folículos atrésicos experimentan un proceso degenerativo similar al que presentan las CG, aunque este proceso parece estar restringido a los estadios más avanzados de la atresia (Hsueh et al., 1994).

### **8.1.- Muerte celular en la atresia folicular**

Estudios morfológicos comparativos realizados hace varias décadas, donde se identificó la presencia de núcleos picnóticos en CG y de la teca de folículos atrésicos (Hay et al., 1976; Hirsfield y Midgley, 1978), así como estudios bioquímicos posteriores donde se demostró la fragmentación internucleosomal del DNA en éstas células, han permitido demostrar que la apoptosis es un evento fundamental en la atresia (Hughes y Gorospe, 1991; Tilly et al., 1991).

El proceso de atresia es estrictamente regulado, comienza con la pérdida rápida de CG por apoptosis (principalmente por las que se encuentran delimitando el antro) (Hughes, 1991; Tilly et al., 1991) y continua con la pérdida menos rápida de CT, también por apoptosis, pero en estados avanzados de la atresia y en menor índice que en CG (Palumbo y Yeh, 1994). Cabe mencionar que en el ovocito desde la vida fetal se ha podido detectar apoptosis (Mahmound, 2005).

Aunque al principio existió la duda de apoptosis en CT interna, con el paso del tiempo se confirmó su participación en diferentes especies: Aves (Tilly et al., 1991); cerdos (Tilly et al., 1992); ratas (Palumbo y Yeh, 1994); bovinos (Isobe y Yoshimura, 2000; Yang y Rajamahendran, 2000) y ovinos (Dhar, 2001). Sin duda uno de los avances más importantes en la atresia folicular, ha sido la demostración de la participación de apoptosis como principal tipo de muerte en CG (Mahmound, 2005).

### **8.2.- Apoptosis**

La apoptosis es un mecanismo de muerte celular programada altamente conservado, en el cual la célula participa de forma activa, ocurre bajo condiciones fisiológicas y juega un papel esencial en el desarrollo y la homeostasis de

organismos mayores. La apoptosis esta gobernada por un programa genético, que puede ser iniciado por una gran variedad de señales de muerte, tales como ligandos y la interacción con sus receptores, alteraciones en el metabolismo energético y potencial redox, producción de ceramidas, movilización de calcio ( $\text{Ca}^{2+}$ ) y activación o inactivación de proteínas de la familia Bcl-2 (Chen et al., 2003). La señal de muerte altera el balance entre moléculas pro y anti-apoptóticas, disparando este proceso (Lu et al., 2005).

### **8.2.1.- Cambios morfológicos**

Los cambios morfológicos que ocurren en la apoptosis han sido bien caracterizados e incluyen: encogimiento celular, desaparición de microvellosidades, formación de ampollas en la superficie celular que contienen organelos, condensación de la cromatina y fragmentación nuclear, cambios en los organelos intracitoplásmaticos y alteraciones a nivel de la membrana celular. Otra característica fundamental de apoptosis es la activación de endonucleasas dependiente de  $\text{Ca}^{2+}$  y  $\text{Mg}^{2+}$  (DNAasa activada por caspasas conocida como CAD) que rompen el DNA de manera específica en el espacio internucleosomal, produciendo fragmentos de 180-200 pares de bases o sus múltiplos (Hsueh, 1994 y 1996). Finalmente, las células se separan en pequeños pedazos esféricos de doble membrana que contienen fragmentos nucleares, referidos como cuerpos apoptóticos (Willingham; Lu et al., 2005). Estos cuerpos apoptóticos son fagocitados por macrófagos o células vecinas para evitar una respuesta inflamatoria (Quin et al., 2005).

Las características bioquímicas de apoptosis incluyen: alteraciones en la homeostasis de iones intracelulares; activación de proteasas y endonucleasas que degradan proteínas y DNA respectivamente; generación de ceramidas y pérdida de la asimetría de la membrana, es decir cambios en la orientación de fosfolípidos,



por ejemplo, cuando las células han iniciado el proceso apoptótico, la fosfatidilserina es expuesta hacia la cara externa de la membrana plasmática (Blake y Gores, 1997).

### **8.2.2.- Vías de señalización**

En células de mamíferos la cascada de señalización que culmina con apoptosis puede ser por dos mecanismos: uno extrínseco, mediado por receptores de muerte (desencadenado por la unión de moléculas de muerte a sus receptores en la superficie celular) (Zacks et al., 2004) y otro intrínseco, mediado por la mitocondria (generado por señales en el interior de la célula) (Hussein et al., 2003). Sin embargo, ambos terminan desestabilizando la función mitocondrial y activando pro-caspasas (caspasas inactivas). Las caspasas (por sus siglas en inglés **cytosolic aspartate specific proteasas**) son sintetizadas como procaspasas y una vez activadas reconocen residuos de ácido aspártico y rompen diversos sustratos (proteínas inhibidoras de caspasas de DNA activas, DNA polimerasa, Bcl-2, laminina y otras proteínas de unión al citoesqueleto). Hasta el momento se han identificado al menos 14 caspasas, de las cuales 11 se encuentran en el humano (Riedl y Shi, 2004). Estas proteasas se han clasificado en iniciadoras (2, 8, 9 y 10) y efectoras (3, 6 y 7) (Crow et al., 2004). Las caspasas iniciadoras son activadas por autoproteólisis en respuesta a señales de muerte, mientras que las efectoras, que inician la digestión proteolítica de la célula, son activadas por las iniciadoras, culminando con fragmentación del DNA, inhibición de síntesis y reparación del DNA, daño a la membrana nuclear, condensación de la cromatina y colapso del citoesqueleto (Lu et al., 2005; Yan y Shi, 2005).

### **8.2.3.- Vía intrínseca (eventos mediados por la mitocondria)**

La vía de señalización intrínseca, implica una serie de estímulos estresantes que se traducen en una señal de muerte. Estos estímulos pueden ser extracelulares (deficiencia de nutrientes, de factores tróficos y/o de supervivencia, radiación, drogas y estrés físico) o intracelulares (estrés oxidativo, daño del DNA y proteínas malformadas) (Crow et al, 2004). Las señales de muerte ocasionan que las proteínas de la familia Bcl-2 con dominios pro-apoptóticos BH3 [Bid, Bad, Noxa y PUMA (por sus siglas en ingles **p**53 **u**pregulated **m**odulator of **a**poptosis)], especialmente Bax y Bak se ensamblen en un poro en la membrana mitocondrial externa (Hussein et al., 2003 a,b) y permitan la liberación de factores pro-apoptóticos como citocromo c, la proteína Smac/Diablo y el factor inductor de apoptosis (AIF), desde el espacio intermembranal de la mitocondria hasta el citoplasma (Wang, 2002). Este evento puede ser antagonizado por proteínas anti-apoptóticas Bcl-2 y Bcl-x<sub>L</sub> (Crow et al, 2004). La liberación del citocromo c, activa directamente al factor activador de proteasas apoptóticas (Apaf-1) que unido a la caspasa 9 (iniciadora), en presencia de ATP, forman el complejo denominado "apoptosoma", que subsecuentemente activa a las caspasas efectoras 3 y 7, conduciendo así a la apoptosis (Yan y Shi, 2005). Por otro lado, dentro del citosol existen proteínas inhibidoras de apoptosis (IAPs), que al unirse a caspasas efectoras las mantienen inactivas, pero cuando Smac/Diablo es liberada, remueve a las IAPs de las caspasas, dejándolas nuevamente activas para culminar con la apoptosis (Hussein et al., 2003; Yan y Shi, 2005).

### **8.2.4.- Vía extrínseca (eventos mediados por receptores de muerte)**

En esta vía los eventos apoptóticos inician por la unión de receptores de muerte a sus ligandos. Entre ellos se encuentran FasL/Fas, factor de necrosis tumoral  $\alpha$  y su receptor-1 (TNF-  $\alpha$ /TNFR-1), AporL/receptor de muerte 3 (DR3) y

Apo2L/receptor de muerte 4 y 5 (DR4 Y DR5) (Lu et al, 2005). La unión inicial de los ligandos a sus receptores y la transmisión de señales son a través de dominios de muerte (DD), dominios efectores de muerte y dominios de reclutamiento de caspasas (CARD). Los dominios de muerte se encuentran en proteínas citoplásmicas incluyendo FAS-asociada a proteínas con dominios de muerte (FADD), receptor de TNF asociado a proteínas con dominios de muerte (TRADD) y proteínas que interactúan con receptores (RIP), así como proteínas transmembrana, incluyendo TNF-R1, TRAIL-R1/DR4 y TRAIL-R2/DR5. el dominio CARD regula la activación de las proteínas adaptadoras y de las procaspasas que llevan a la activación de las caspasas (Hussein y col., 2003a).

La interacción de FasL con su receptor, ocasiona el ensamble de un complejo de señalización inductor de muerte (DISC) en la membrana plasmática, también se requiere una proteína adaptadora denominada dominio de muerte asociado a Fas (FADD), que lleva a las caspasas iniciadoras 8 y 10 hacia DISC para activarlas. Una vez activada la caspasa 8, activa a las pro caspasas 3 y 7 (punto en el que ambas vías convergen). Por otro lado caspasa 8, rompe el fragmento C-terminal de Bid, formando tBid (Bid trucado), el cual se transloca a la membrana mitocondrial externa, para inducir la apertura del poro de permeabilidad, y con ello la liberación de factores pro-apoptóticos (Yan y Shi, 2005).

## **9.- RADICALES LIBRES**

### **9.1.- Definición**

Un radical libre se define como aquella especie química que posee un electrón desapareado (Boonstra y Post, 2004). Los electrones de átomos o moléculas

ocupan regiones en el espacio denominados orbitales, cada orbital únicamente puede contener dos electrones como máximo, cuando en un orbital externo hay un solo electrón, se dice que este último no está apareado, lo que le confiere una alta capacidad de reacción y corta existencia.

## **9.2.- Origen**

Desde el punto de vista químico, un radical libre puede originarse por distintos mecanismos en las reacciones de transferencia de electrones: 1) absorción de energía ionizante como ultravioleta, visible y térmica; 2) reacciones de óxido reducción (redox), de transferencia no enzimática de electrones, en el caso de reacciones catalizadas por metales de transición como Fe y Cu; y 3) reacciones catalizadas por enzimas como SOD que cataliza la formación de  $H_2O_2$  (Membrillo et al., 2003), óxido nítrico sintetasa que produce óxido nítrico y NADPH oxidasa en el fagocito que produce anión superóxido (Kenneth et al., 1998). Pero la más frecuente en los organismos vivos es mediante la adición de un electrón a una molécula estable.

## **9.3.- Clasificación**

Los radicales libres se han clasificado de acuerdo con el grupo funcional presente en la molécula (Hallinwell y Gutteridge, 1992). Los más frecuentes son los radicales libres de oxígeno, en cuya estructura está presente el oxígeno ( $O_2$ ) como centro funcional. De menor importancia son los que contienen azufre, fósforo o nitrógeno como centro reactivo; dada la relevancia del oxígeno en los procesos aeróbicos, los radicales libres de oxígeno son los más comunes. La mayoría de ellos provienen de reacciones metabólicas en las que éste participa de ahí que el  $O_2$  sea una molécula potencialmente tóxica.

La reducción univalente del  $O_2$  genera intermediarios reactivos en una serie de reacciones que involucran cuatro electrones, produciendo tres compuestos denominados: anión superóxido ( $O_2^{\cdot-}$ ), peróxido de hidrógeno ( $H_2O_2$ ) y radical hidroxilo ( $\cdot OH$ ) (Hallinwell y Gutteridge, 1992). El  $H_2O_2$  no es un radical libre, pero cae en la categoría de ERO por ser un compuesto intermediario e importante en la bioquímica de los radicales libres, ya que se descompone fácilmente en presencia de metales de transición (principalmente  $Fe^{2+}$ ) para producir el radical  $\cdot OH$  (Hallinwell y Gutteridge, 1992). Además del  $O_2$ , el nitrógeno también es capaz de formar radicales libres como: óxido nítrico ( $NO\cdot$ ) y dióxido nítrico ( $NO_2\cdot$ ), conformando las llamadas especies reactivas del nitrógeno (ERN) (Dröge, 2002). A su vez, los radicales  $\cdot OH$  son capaces de reaccionar con las biomoléculas produciendo radicales libres orgánicos menos reactivos, como los peróxilos ( $ROO\cdot$ ) y radicales tiol ( $RS\cdot$ ). Por su parte el  $O_2^{\cdot-}$  y  $NO\cdot$  reaccionan entre sí para formar el peroxinitrito (ONOO) (Kodaman y Behrman, 2001; Tsai-Turton y Luderer, 2006).

#### **9.4.- Acciones**

Una vez formados los RL interactúan con otras moléculas a través de reacciones de óxido reducción (redox) con el propósito de lograr una configuración electrónica estable (Chihuailaf et al., 2002). Su daño es causado al reaccionar con diversas biomoléculas sustrayendo electrones para lograr su estabilidad, los substratos moleculares mas comunes suelen ser los ácidos grasos poliinsaturados de las membranas celulares, nucleótidos en el DNA y los aminoácidos en las proteínas (Boonstra y Post, 2004).

Cuando un RL reacciona con una molécula no radical puede ceder o captar electrones, o simplemente puede unirse a ella. En cualquiera de estos casos la molécula no radical se convierte en un RL y se desata una reacción en cadena, es

decir, un RL genera a otro RL. Solo cuando se encuentran dos RL la reacción en cadena se detiene (Chihuailaf et al., 2002; Membrillo et al., 2003).

Siempre que se producen RL, las enzimas y proteínas pueden ser atacadas, como consecuencia, las modificaciones oxidativas pueden ocurrir en una variedad de procesos fisiológicos y patológicos. Esas modificaciones pueden ser primarias o secundarias. Las modificaciones primarias ocurren por la oxidación catalizada por metales, y son mediadas por la radiación y por el ozono o los óxidos de nitrógeno. Las modificaciones secundarias ocurren cuando las proteínas son modificadas por moléculas generadas por la oxidación u otras moléculas. Por ejemplo; las modificaciones covalentes de proteínas por hidroxinonenal, producido por la oxidación de lípidos o por la introducción de grupos carbonilos (aldehidos y cetonas) dentro de las proteínas (Requena, 2001; Hicks, 2005).

La presencia de grupos carbonilos se toma como una presunta evidencia de modificaciones oxidativas, aunque no es específica de una modificación oxidativa, ya que la glicosilación de proteínas también puede adicionar grupos carbonilos en los residuos de aminoácidos. A pesar de ello la técnica para grupos carbonilos basada en la reacción de 2,4-dinitrofenilhidracina (DNPH) para formar 2,4-dinitrofenilhidrazonas, es una buena opción para detectar y cuantificar modificaciones oxidativas de proteínas (Levine et al., 1990; Requena, 2001).

## **10.- ESPECIES REACTIVAS DE ÓXIGENO**

Debido a la importancia del oxígeno en los procesos aerobios, los RL derivados del oxígeno son los más comunes (Kehrer, 1993), por esta característica se les denomina especies reactivas de oxígeno (ERO) (Chihuailaf et al., 2002; Membrillo et al., 2003).

En los organismos vivos, las ERO tienen origen endógeno y exógeno; la producción del primer grupo ocurre mediante diversas fuentes claramente definidas como son:

- En el metabolismo aeróbico, las mitocondrias consumen oxígeno molecular y lo reducen formando agua. Una pequeña fracción del oxígeno se metaboliza vía reducción univalente produciendo el anión  $O_2^-$ , del que derivan el  $H_2O_2$  y el radical  $\cdot OH$ .
- En los peroxisomas, vía oxidasas, se forma  $H_2O_2$  como producto intermediario.
- El citocromo P-450 constituye una defensa primaria contra xenobióticos y sustancias endógenas que incrementan la producción de radicales libres.
- La fagocitosis.
- La reacción de NADP(H) oxidasa.
- La vía de la lipoxigenasa.

La mitocondria, el organelo encargado de la producción de ATP, es también la principal fuente intracelular del  $O_2^-$ , que se origina por la reducción no enzimática del oxígeno molecular. Se estima que más del 1% del flujo de electrones mitocondriales en condiciones normales, se dirige a la formación de este radical, por lo que cualquier alteración en el transporte de electrones aumenta de manera importante su producción (Agarwal, 2003).

Las ERO en el ovario se originan a través de la respiración celular en la mitocondria y en la ruta esteroideogénica (Hornsby y Crivello, 1983; Hsu y Hammond, 1987; Peltota et al., 1996). Es importante mencionar que la infiltración de leucocitos durante el periodo periovulatorio también constituyen una fuente importante de ERO, principalmente del  $O_2^-$  (Kodaman y Behrman, 2001).

Las fuentes exógenas comprende la ingesta de algunos metales de transición como el  $\text{Fe}^{2+}$  y  $\text{Cu}^{2+}$ , que promueven la producción de radicales libres a partir de peróxidos. Igualmente los solventes orgánicos, pesticidas, el humo del cigarro, las radiaciones, la hiperoxia, entre otros contribuyentes (Díaz, 2006).

### **10.1.- Participación de ERO en la maduración folicular**

Las ERO no solo ocasionan daño, pues a ciertas concentraciones tienen un papel importante en la regulación de muchas funciones celulares y actúan como segundos mensajeros para activar factores de transcripción específicos tales como KAPPA B (NF-kB) y AP-1 (Huein y Chen, 2002; Martindale y Holbrook, 2002; Boonstra y Post, 2004); además de que podrían estar implicados en el proceso de ovulación.

Los niveles de  $\text{O}_2^-$  y de la enzima antioxidante SOD varían en relación inversa durante el ciclo reproductivo. Así por ejemplo, en el estro, cuando ocurre la ovulación, se observa un aumento de LH y del anión superóxido mientras que la actividad de SOD disminuye (Reley y Behrman, 1991). En un estudio con ovarios de conejo en cultivo, Miyazaki y col., (1991) demostraron que la ovulación se reduce significativamente cuando se agrega SOD al medio de incubación. Por lo que se propuso que las ERO podrían estar involucradas en la activación de la fosfolipasa A, para liberar ácido araquidónico de la bicapa fosfolipídica y producir prostaglandinas ( $\text{PGE}$  y  $\text{PGF}_2\alpha$ ) mediante una reacción catalizada por cicloxigenasa, que se incrementa durante el periodo preovulatorio, ambos eventos necesarios para que ocurra la ovulación (Wong et al., 1986). Por otro lado, también existen evidencias de que la maduración del ovocito involucra un incremento en la peroxidación lipídica de las células intrafoliculares (Reley y Behrman, 1991).



## **10.2.- Efectos deletéreos de las ERO**

Las ERO inhiben la esteroidogénesis debido a la interrupción del transporte del colesterol dentro de la célula y/o a la mitocondria, y por lo tanto disminuyen la síntesis de progesterona. El aumento en la producción del  $O_2^{\cdot-}$  durante el transporte de electrones en la mitocondria, esta relacionado con la peroxidación lipídica de las membranas, causando daño a células foliculares y por consiguiente disminución de la esteroidogénesis (Behrman y Aten, 1991; Sugino et al., 1993).

Por otro lado se sabe que el  $H_2O_2$  (50 $\mu$ M), inhibe la función de CG, ya que bloquea la producción de AMPc, por un incremento en la actividad de fosfodiesterasa (Margolin et al., 1990). Se ha propuesto también que el  $H_2O_2$  disminuye la síntesis de progesterona al inhibir la actividad del citocromo P450<sub>ssc</sub> y de la enzima 3 $\beta$  hidroxiesteroide deshidrogenasa (3 $\beta$ HSD), además de inhibir la producción de estrógenos a nivel de aromatasa y/o 17 $\beta$ HSD (Endo et al., 1993). La acción del  $H_2O_2$  en las CG es muy rápida, evita el acoplamiento del receptor de FSH con la adenilil ciclasa vía proteínas G, y probablemente induce daños a nivel del DNA y membrana celular. Estos efectos se caracterizan por una abrupta depleción del ATP y abrogación de la acción de FSH y LH, que conduce a la acumulación de progesterona (Margolin et al., 1990).

## **11.- SISTEMAS ANTIOXIDANTES**

El término antioxidante se asigna a aquella entidad química que a bajas concentraciones, retarda o previene la oxidación de un sustrato (lípidos, proteínas, carbohidratos y DNA) (Hallinwel y Gutteridge, 1992; Hallinwel, 1995). Para equilibrar la respuesta oxidante, los organismos aerobicos han desarrollado mecanismos que contrarrestan la formación de RL, por medios enzimáticos

(SOD, Glutación reductasa y catalasa) y no enzimáticos (GSH, bilirrubina, ácido úrico, albúmina, además de los minerales selenio y zinc; las vitaminas A, C y E, y las hormonas melatonina y estrógenos (Mecocci et al., 2000; Din y Ornar, 2002; Ali et al., 2002). En condiciones fisiológicas, estos mecanismos de defensa mantienen una baja concentración de ERO en la célula y su actividad requiere forzosamente ser regulada; de aquí que el equilibrio entre la producción de especies reactivas y las defensas antioxidantes determina el grado de estrés oxidativo (Finkel y Holbrook, 2000). De los sistemas antes mencionados, el que tiene mayor capacidad intracelular de secuestrar radicales libres es el GSH, ya que puede atrapar al  $O_2^{\cdot-}$ , al  $H_2O_2$  y peróxidos orgánicos (Diplock, 1994).

### **11.1.- Glutación**

El glutación es un tripéptido (gama-glutamilcisteinilglicina), que se sintetiza continuamente dentro de la célula y se degrada fuera de ella. La cisteína central de la molécula, proporciona el grupo SH (tiol) característico del glutación reducido (GSH), siendo este último la molécula no proteica de mayor importancia en la contribución de grupos tiol presentes en los tejidos y líquidos biológicos. Debido a sus concentraciones del orden milimolar, se considera el agente reductor intracelular más importante. Dentro de las funciones del péptido destacan: mantener los grupos SH de las cisteínas presentes en las proteínas y otros componentes celulares; participar en el transporte de aminoácidos y péptidos a través de las membranas celulares; y proteger a las células contra la toxicidad del estrés oxidativo al interactuar en forma directa con el radical hidroxilo, alcóxilo y peróxilo. A través de la vía redox del GSH, la glutación peroxidasa, enzima citosólica que transforma al  $H_2O_2$  en  $H_2O$ , ocupa en la reacción dos moléculas de GSH que ceden dos hidrógenos formándose entre ellas un enlace disulfuro. El GSH se regenera mediante la glutación reductasa en presencia de NADPH. El GSH se mantiene a una concentración milimolar (mM) en tejidos como el cristalino

y eritrocitos en el mamífero y cloroplastos de las plantas. El glutatión también se encuentra en otros tejidos como hígado, riñón y ovario. En el ovario pueden encontrarse niveles ligeramente altos de GSH, por lo que es posible que tenga una participación importante en la protección de células foliculares contra el daño por agentes tóxicos exógenos y ERO intracelulares. En terminos generales, el glutatión existe en dos formas, la reducida (GSH) y la oxidada (GSSG); en condiciones fisiológicas la forma reducida prevalece por encima de la forma oxidada debido a la acción de glutatión reductasa en presencia de NADPH y a la síntesis *de novo* (Griffith, 1999), pero en situaciones de estrés oxidante las concentraciones de GSH disminuyen y aumentan las de GSSG, lo que en un momento dado favorece el daño por EROs y la muerte por apoptosis (Tsai-Turton y Luderer, 2006).

Investigaciones recientes, han demostrado la participación del GSH en varios procesos involucrados en el crecimiento y desarrollo folicular, así como en la maduración del ovocito. Por ejemplo, la concentración intracelular de GSH en ovocitos de cerdas refleja el estado de maduración citoplásmica, por lo que comúnmente se utiliza como un marcador bioquímico de madurez y viabilidad ovocitaria, protege el huso meiótico del daño oxidativo y asegura la formación del cigoto, favorece la condensación de la cromatina antes de la formación del pronúcleo; en el ratón mejora la capacidad del embrión para disminuir los efectos citotóxicos del  $H_2O_2$ , el cual podría detener su desarrollo en estado de dos células (Nasr- esfahani y Jonson, 1992).

## **12.- ESTRÉS OXIDATIVO**

El estrés oxidativo que deriva del incremento en la producción de radicales libres acoplado con una deficiencia de los sistemas antioxidantes, es ampliamente

aceptado como un mediador clave en el desarrollo y progreso de la muerte celular. Actualmente el estrés oxidativo está asociado con la etiología de numerosas enfermedades (Dröge, 2002).

### **12.1.- Estrés oxidativo en atresia folicular**

La atresia folicular se caracteriza, en parte, por la pérdida de sensibilidad a FSH y de la función esteroidogénica. Existen evidencias indirectas que sugieren que las ERO están involucradas en el proceso de atresia. Como resultado del estímulo gonadotrópico, el ovario es una fuente potencial de ERO debido a la esteroidogénesis, (Margolin et al., 1990); Además durante la ovulación hay infiltración de leucocitos y macrófagos, los cuales generan peróxido en cantidades suficientes para producir daño e incluso muerte celular (Murdoch y McCormick, 1989).

Las CG son extremadamente sensibles al  $H_2O_2$ , el cual inhibe la sensibilidad a FSH, disminuye la producción de AMP cíclico e incrementa la de progesterona. Estos efectos interfieren con la activación de proteínas G y de adenilil ciclasa en la membrana plasmática de las CG (Reley y Behrman, 1991). De tal forma que es posible que la atresia folicular inicie por un desbalance entre antioxidantes y prooxidantes EROs (Tilly y Tilly, 1995). Algunos estudios revelan que la supervivencia folicular mediante gonadotropinas coincide con el aumento en la expresión de enzimas antioxidantes (Tilly, 1996). Posiblemente, FSH favorece un aumento en la expresión de enzimas antioxidantes, que protege a las células foliculares del estrés oxidativo durante el proceso de maduración. Si la respuesta al estrés oxidativo no es adecuada, ocurren alteraciones en las células, que conducen a los folículos al proceso degenerativo de atresia (Tilly y Tilly, 1995).

## 12.2.- Estrés oxidativo y muerte celular

Denham Harman, desde 1956 sugirió que las ERO producidas durante la respiración aerobia causan daño oxidativo, resultando en deterioro y muerte celular.

Las ERO se sabe que regulan la muerte en diferentes tipos celulares dependiendo de su concentración intracelular. La producción excesiva de ERO, conduce a un estado de estrés oxidativo, con efectos deletéreos para las células aerobias, en estas condiciones se observa peroxidación lipídica, daño a membranas celulares, inactivación de enzimas caspasas y muerte celular necrótica (Kankan y Jain, 2000). De esta manera las ERO inducen muerte celular por daño directo. Mientras que bajos niveles de ERO probablemente regulen la apoptosis en forma indirecta, a través de la activación de proteínas cinasas y/o fosfatasa, movilización de calcio ( $\text{Ca}^{2+}$ ), activación o inactivación de factores de transcripción, lo cual repercute en la expresión de genes y conduce a la muerte celular apoptótica (Hildeman et al., 2003). Sin embargo el mecanismo por el cual el estrés oxidativo induce apoptosis, es aun sujeto de intensas investigaciones.

El anión superóxido no es liposoluble y por si mismo no causa peroxidación lipídica. Sin embargo, puede incrementar la liberación de Fe (II) de las proteínas que contienen este metal, como consecuencia del ataque oxidativo; una vez libre el Fe (II) reduce al peróxido de hidrogeno en el inicio de la reacción de Fenton (Liochev, 1996). El  $\text{O}_2^-$  es convertido por SOD en  $\text{H}_2\text{O}_2$ , el cual, en las células epiteliales y traqueó bronquiales actúa sobre la membrana plasmática para activar a la esfingomielinasa neutra dependiente de magnesio ( $\text{Mg}^{2+}$  N-SMasa), y generar ceramidas e inducir la apoptosis (Huein y Chen, 2002).

Las ERO pueden inducir indirectamente apoptosis por cambios en el potencial redox, disminución de GSH, de ATP y de los equivalentes reductores NADH y

NADPH. Esos cambios pueden facilitar la peroxidación lipídica y la apertura de un poro de permeabilidad transitoria, que permita la liberación del citocromo c y del factor inductor de apoptosis (AIF) (Huei y Chen, 2002). El citocromo c junto con Apaf activara a la procaspasa-9, iniciandose así la cascada proteolítica que culmina en apoptosis (Green y Reed, 1998).

### **13.- GLUCOSA-6-FOSFATO DESHIDROGENASA**

La G6PDH es la enzima reguladora clave del flujo de carbonos a través de la vía de las pentosas fosfato y la principal fuente intracelular de NADPH, por lo tanto es un regulador del estado redox determinante de la sobrevivencia celular, que se requiere para la activación de varios sistemas enzimáticos, de ahí que se haya propuesto a la G6PDH como un regulador critico en la muerte celular. Su función frente al estrés oxidativo ha sido bien reconocida en los eritrocitos (donde es la única fuente de NADPH) y en otras estirpes celulares. Con lo cual, se reconoce que la G6PDH es una enzima antioxidante crítica en mantener los niveles de GSH durante la exposición a ERO (Díaz, 2006).

La vía de las pentosas fosfato constituye una vía alterna para el metabolismo de la glucosa, no produce A TP, pero cuenta con dos funciones importantes:

- Producción de NADPH, coenzima empleada para la síntesis reductora (de ácidos grasos y esteroides), reducción de peróxido de hidrógeno (vía redox del glutatión y catalasa), fagocitosis (NADPH oxidasa), y eliminación de esteroides, alcoholes y drogas (sistema del citocromo P-450).
- Producción de residuos de ribosa para la biosíntesis de nucleótidos y ácidos nucleicos.

### 13.1.- Vía de las pentosas fosfato

La ruta de las pentosas fosfato actúa en dos fases: oxidativa y no oxidativa; en la fase oxidativa la primer reacción es catalizada por la G6PDH que oxida a la glucosa 6-fosfato a la correspondiente lactona, la cual se hidroliza por una lactonasa específica a 6-fosfogluconato, que experimenta una descarboxilación oxidativa, para dar  $\text{CO}_2$ , NADPH y una pentosa fosfato, la ribulosa 5-fosfato. En la fase no oxidativa, parte de la ribulosa 5-fosfato se convierte en otros azúcares de cinco carbonos, incluyendo la ribosa 5 fosfato; la cual puede utilizarse en la síntesis de nucleótidos o en el siguiente paso de la ruta de las pentosas. Posteriormente una serie de reacciones convierten tres moléculas de azúcares de cinco carbonos en dos moléculas de un azúcar de seis carbonos y una molécula de un azúcar de tres carbonos. Algunos de estos azúcares se convierten en glucosa 6-fosfato y el ciclo se repite. El destino real de los azúcares fosfatados depende de las necesidades metabólicas de la célula en la que se esta desarrollando la ruta. Si la necesidad principal radica en la síntesis de nucleótidos y ácidos nucleicos, el principal producto es la ribosa 5-fosfato, y no se producen la mayor parte de los reordenamientos de la fase no oxidativa. En contraste, si la necesidad principal es la generación de NADPH, la fase no oxidativa genera compuestos que pueden convertirse con facilidad en glucosa-6-fosfato. De esta manera, una célula con necesidades moderadas de NADPH y de pentosas fosfato, la fructosa 6-fosfato y gliceraldehído 3-fosfato producidos en la fase no oxidativa pueden catabolizarse en mayor medida mediante la glucólisis y el ciclo del ácido cítrico. Dadas las múltiples necesidades metabólicas de una célula, es improbable que ninguno de estos tres modos de actuación se emplee de manera exclusiva en una determinada célula. Los tejidos con mayor actividad de la vía son: hígado, glándula mamaria, tejido adiposo y corteza adrenal; quienes cuentan con un sistema enzimático completo, cerca del 30% de la oxidación de la glucosa que tiene lugar en el hígado transcurre por esta ruta. En el ovocito se sintetiza la G6PDH durante la ovogénesis. Permanece activa durante la fase de crecimiento

del mismo para proveer ribosa fosfato en la síntesis de nucleótidos y gran cantidad del NADPH que es utilizado como donador de hidrógenos o electrones en las reacciones reductivas, así como en la formación de ácidos grasos, pero su actividad disminuye cuando finaliza esta fase. En el ratón y la rata, la actividad de G6PDH es alta en ovocitos foliculares y disminuye en un 40% cuando ocurre la ovulación. Ferrandi y col. (2002), reportaron una actividad elevada de G6PDH en ovocitos inmaduros y una disminución significativa después de la maduración en bovinos. Por el contrario en cabras prepúberes los ovocitos más competentes pueden seleccionarse mediante tinción con azul brillante de crecilo, un indicador de la actividad de G6PDH (Rodríguez et al., 2002; 2003). En la cerda esta enzima también se ha asociado inversamente con la maduración y tasa de fertilización de ovocitos (Urdaneta et al., 2003).

### **13.2.- Regulación de la G6PDH**

El gene de la G6PDH en los mamíferos se localiza en el cromosoma X, tiene una extensión de 18 kb y contiene 13 exones, se expresa constitutivamente en varios tejidos y en especial en el adiposo, hepático, pulmonar y en las células en proliferación (Kletzien et al., 1994). El gene es modulado por diferentes estímulos externos incluyendo las siguientes hormonas: insulina,  $17 \beta$  estradiol, dehidroepiandrosterona, adrenalina, cortisona y tirosina; así como el factor de crecimiento epidérmico, que induce la expresión del gene de la enzima (Kletzien et al., 1994; Salati y Amir-Ahmady, 2001). Los carbohidratos en la dieta incrementan la síntesis de G6PDH, en especial con glucosa seguida de sacarosa y fructosa, la magnitud del incremento es determinada por la cantidad de carbohidratos consumidos, contrario a este efecto la ingesta de ácidos grasos puede inhibirla. Así como las hormonas y la dieta regulan la actividad de la enzima, el vanadato y selenato también inducen su expresión y actividad; ya que mimetizan la acción de la insulina (Berg et al, 1995). Dentro del grupo de vitaminas hidrosolubles, la



nicotinamida y el ácido nicotínico estimulan la expresión del gene de la G6PDH en células de Jurkat (Yang et al., 1999) también lo hace la forma oxidada de la vitamina C, lo que se refleja en el aumento de las concentraciones del GSH e inhibición de la producción de  $H_2O_2$ , evitando de esta manera la muerte celular (Farquharson et al., 1993; Wang et al., 1999).

### **13.3.- G6PDH en el estrés oxidativo**

El potencial redox esta determinado por la concentración de antioxidantes y reductores. Estudios realizados en diversos tipos celulares han permitido ver la importancia de G6PDH, como principal proveedora de NADPH, indispensable para restablecer al GSH en condiciones de estrés oxidativo y favorecer la sobrevivencia celular (Filosa et al., 2003). Por el contrario, la deficiencia de G6PDH trae como consecuencia un decremento de NADPH, inhibición del crecimiento celular, y mayor susceptibilidad al daño oxidativo (Farquharson et al., 1993). Además algunas investigaciones reportan que esta enzima participa en los proceso de transcripción, traducción y postraducción (Kletzien et al., 1994).

En el humano su deficiencia condiciona a desarrollar hipertensión, diabetes (Wan et al., 2002) y algunas enfermedades asociadas con la edad. Los tejidos con una actividad alta de G6PDH responden a las necesidades de NADPH para mantener el estado redox celular, el funcionamiento de los sistemas antioxidantes y en definitiva la sobrevivencia celular. En células de HeLa se ha observado que el efecto protector de la G6PDH ante el daño oxidativo se asocia a cambios en su actividad, mientras GSH disminuye, la G6PDH alcanza su máxima pico, y el GSH inicia su incremento acompañado de un decremento en la concentración de EROs. Este tipo de respuesta se considera como adaptación celular a la exposición a  $H_2O_2$  o a drogas que disminuyen los niveles de GSH (Salvemini et al., 1999).

#### **13.4.- G6PDH en la muerte celular**

Estudios realizados por Wang y col., (1999) indican que la inhibición de G6PDH potencializa la muerte celular inducida por  $H_2O_2$ , y que la sobre expresión de esta enzima incrementa la resistencia a la muerte. En cultivos celulares una disminución de suero causa muerte celular que se asocia con un decremento en la actividad de G6PDH y una elevada producción de ERO, que se corrige casi por completo con la adición de substratos para la enzima. La inhibición de G6PDH incrementa significativamente el índice de apoptosis, la pérdida de los grupos tioles en las proteínas, la degradación de otras enzimas, así como cambios en la fosforilación de proteínas cinasas activadoras de la mitosis (MAPK). Estos cambios son similares a los que se observan por la adición de  $H_2O_2$ , lo cual indica que esta enzima tiene un papel crítico en la muerte celular inducida por estrés oxidativo.

### III. PLANTEAMIENTO DEL PROBLEMA

Existen dos grandes periodos en los cuales predomina la degeneración celular durante la maduración folicular en el ovario: uno comprende la decadencia de células germinales, caracterizado por una gran pérdida de ovocitos (Richards et al., 2002) principalmente en la etapa prenatal, mientras que el otro incluye la degradación folicular (atresia), que ocurre durante la vida reproductiva. La atresia puede ocurrir en cualquier estadio del desarrollo folicular. La mayor parte de los ovocitos nunca alcanza la maduración total necesaria para ser ovulados, por tal motivo cualquier ovario normal en edad reproductiva contiene habitualmente numerosos ovocitos en degeneración dentro de folículos que no podrán alcanzar su desarrollo total (Kaipia y Hsueh, 1997).

Estudios morfológicos y bioquímicos han demostrado que la muerte de las células germinales y somáticas en el ovario ocurre frecuentemente por apoptosis (Hsueh et al., 1996). Este proceso esta regulado por varios factores como: hormonas polipeptídicas, factores locales de crecimiento, citosinas, esteroides (Hsueh, 2000), ERO y enzimas antioxidantes (Tsai-Turton y Luderer., 2006). A pesar de la importancia de la atresia folicular, los mecanismos celulares y moleculares de este fenómeno, aún se desconocen (Kaipia y Hsueh, 1997). La G6PDH, es una enzima que participa en el mantenimiento del estado redox intracelular, mediante la producción de NADPH (Kletzien et al., 1994). Este último es necesario para regenerar al GSH, principal antioxidante intracelular, y se ha observado que un incremento en la actividad de esta enzima estimula el crecimiento e inhibe apoptosis en diversos tipos celulares (Wang et al., 1999). Debido a su importancia se ha considerado como un marcador de viabilidad celular, sin embargo, pocos de estos estudios se han orientado a estudiar el papel de G6PDH y las ERO en el inicio y progreso de la atresia, por lo que se requieren más estudios para poder entender este proceso. Sí el efecto que tiene la G6PDH sobre diversas estirpes celulares es el mismo sobre las CG, planteamos la siguiente hipótesis:

## **IV. HIPÓTESIS**

El grado de atresia folicular es dependiente de la actividad de G6PDH y del contenido de GSH.

## **V. OBJETIVOS**

### **GENERAL**

Determinar la actividad de la enzima G6PDH y su contribución al mantenimiento de la concentración de GSH así como su relación con el grado de atresia folicular en la oveja.

### **ESPECÍFICOS**

En líquido folicular (LF) y células de la granulosa (CG) de folículos con diferentes tamaños (4-6mm y >6mm) y grados de atresia (1, 2 y 3).

- Medir la actividad de G6PDH
- Cuantificar la concentración de GSH
- Determinar el daño por estrés oxidativo, por la presencia de proteínas carboniladas.
- Estudiar la producción de ERO en CG
- Medir la concentración de estradiol, progesterona y DHEA en LF.

## VI. MATERIAL Y METODOS

### 1. Obtención y clasificación de folículos.

Se obtuvieron ovarios de ovejas no gestantes sacrificadas en el rastro "Milpa Alta". De los cuales se utilizaron únicamente aquellos que a la exploración macroscópica no presentaron cuerpos lúteos (CL) ni anomalías reproductivas aparentes. Los ovarios fueron transportados en un amortiguador salino de fosfatos (PBS) ( $\text{Na}_2\text{HPO}_4$ , 8.1 mM;  $\text{KH}_2\text{PO}_4$ , 2.51 mM; NaCl, 140 mM; KCl, 156 mM) a pH 7.4 a 4 °C, y en un lapso no mayor a 60 min del rastro a la Unidad de Investigación Médica en Bioquímica, del Hospital de Especialidades en el Centro Médico Nacional SXXI. Antes de iniciar la disección de los folículos, los ovarios se lavaron dos veces con PBS (4 °C) para eliminar la mayor cantidad de sangre. Los folículos fueron disecados utilizando pinzas de microcirugía y posteriormente lavados dos veces con PBS, empleando para ello un microscopio estereoscópico (American optical instrument company) equipado con una fuente de iluminación eléctrica, con aumento de 120x. Los folículos obtenidos se clasificaron en base a la técnica descrita por Ballesteros (1992) y modificada por Rosales y col., (2000); por tamaño en dos grupos: de 4-6 mm y > de 6 mm y por grado de atresia en tres (1, 2 y 3): Atresia 1, folículos sanos que presentaron abundante irrigación, apariencia brillante y sin desprendimientos aparentes de su capa granulosa; Atresia 2, folículos que presentaron ligera disminución de su irrigación y pequeños desprendimientos de su capa granulosa; y atresia 3, folículos con una importante disminución de su irrigación, desprendimientos abundantes de su capa granulosa y apariencia grisácea.

## **2. Procesamiento de la muestra.**

Para separar los componentes foliculares (CG, CT y LF) después de su clasificación, los folículos fueron abiertos en dos partes con la ayuda de una tijera de microcirugía, el LF se recuperó en un tubo eppendorf, y se hizo un suave raspado con pinzas de punta roma para recuperar las células de la granulosa adheridas a la pared folicular. El raspado se hizo con 200  $\mu$ l de PBS (Ballesteros et al., 1992). Se tomó una alícuota de CG para medir viabilidad con azul tripan, índice apoptótico y ERO. Todas las muestras fueron procesadas inmediatamente.

## **3. Procesamiento de CG**

Las CG fueron homogenizadas en 250  $\mu$ l de PBS en un homogenizador vidrio-teflón tipo Potter-Elvehjem unido a un motor eléctrico a 1500 rpm. Posteriormente el homogenizado obtenido fue centrifugado a 15 000 rpm x 10 min a 4 °C para separar los restos celulares del sobrenadante, se separaron alícuotas del homogenizado total para la cuantificación de proteínas (5  $\mu$ l) (Lowry, 1951), concentración de GSH (20  $\mu$ l), así como la actividad de G6PDH (10  $\mu$ l). Una vez calculada la concentración de proteínas se tomaron 250  $\mu$ g para determinar la concentración de grupos carbonilos. Estos parámetros también se midieron en LF. Finalmente se hicieron alícuotas de LF y se congelaron a -70 °C para la cuantificación de hormonas esteroides E<sub>2</sub>, P<sub>4</sub> y DHEA.

## **4. Determinación del índice apoptótico**

Las CG se lavaron 2 veces con PBS por centrifugación a 250 x g durante 5 minutos y se resuspendieron en amortiguador de Unión (Hepes 10mM, pH 7.4, NaCl 140 mM, CaCl<sub>2</sub> 5mM), a una concentración de 1 x 10<sup>6</sup> células por mililitro.

Se tomaron 100  $\mu\text{l}$  de esta suspensión y se les adicionaron 20  $\mu\text{l}$  de anexina V-FITC (10  $\mu\text{g/ml}$ ) y 20  $\mu\text{l}$  de ioduro de propidio (50  $\mu\text{g/ml}$ ). Las muestras se agitaron en un vórtex y se incubaron durante 15 min en ausencia de luz, a temperatura ambiente. En un citómetro de flujo BD FACSAria (Becton Dickinson System and company; NYSE: BDX, San José, CA), se analizaron 30, 000 células por cada folículo. La emisión de la fluorescencia se midió a 515 nm en el caso de anexina V-FITC y a 610 nm para ioduro de propidio (FL2), con una excitación a 488 nm.

Los datos obtenidos se analizaron con el programa FACSDiva para citometría de flujo. Los resultados de fluorescencia se obtuvieron en una gráfica en la que se registró la FL2 en el eje de las “y” y FL1 en el eje de las “x” en forma logarítmica. En esta gráfica se formaron 4 cuadrantes: en el inferior izquierdo (células que no incorporaron el fluorocromo), se localizaron las células vivas; en el inferior derecho (positivo para FL1 y negativo para FL2) se localizaron las células positivas a anexina V-FITC, e indican apoptosis temprana; en el superior izquierdo (negativo para FL1 y positivo para FL2), se localizaron las células en las que ingresó IP, indicativo de necrosis; y en el cuadrante superior derecho (positivo para FL1 y FL2), se encontraron las células que presentaron estado tardío de apoptosis.

Una de las primeras características de las células que mueren por apoptosis, es la exposición de fosfatidilserina en la cara externa de la membrana plasmática. Este evento es de gran utilidad para identificar a las células en apoptosis temprana, para lo cual se utiliza anexina V-FITC, la anexina V es una proteína que en presencia de  $\text{Ca}^{2+}$  se une a fosfolípidos, en particular a la fosfatidilserina (Shiratsuchi et al., 1998), por lo que las células que muestran fluorescencia positiva a anexina V y negativa a IP, corresponden a células que han iniciado el proceso de apoptosis; y las células positivas tanto a anexina V-FITC como a IP corresponden a células en apoptosis tardía. La suma de estos grupos conformo el índice total de células apoptóticas.

## **5. Concentración de proteínas**

Se determinó la concentración de proteínas utilizando un estuche de Bio-Rad Laboratories (Bio-Rad D<sub>c</sub> Protein Assay, n° cat. 500-0116), por la técnica de Lowry (1951). Se utilizaron alícuotas de 10 µl (1:2) de CG y LF (1:20). En una placa de 96 pozos, por duplicado se colocaron 20 µl de H<sub>2</sub>O destilada para cada muestra, 5 µl de muestra, 25 µl de solución A (500 µl del bote A / 10 µl del bote S) y 200 µl de la solución B. Se mezcló perfectamente y se realizó la lectura en Multiskan EX de Labsystems a 690 nm. Cada ensayo se realizó con una curva estándar de albúmina de suero bovino (1 mg/ml de H<sub>2</sub>O destilada).

## **6. Actividad de G6PDH**

Para determinar la actividad de la G6PDH se preparó una mezcla de reacción en la cual se proporcionaron las condiciones favorables y el sustrato para la actividad de G6PDH. La mezcla constó de 520 µl de amortiguador de trietanolamina 0.1 M (pH 7.6 con NaOH 1N), 40 µl de cloruro de magnesio (MgCl<sub>2</sub>) 0.1M, 20 µl de Glucosa-6-P 35 mM y 20 µl de NADP 11 mM, a la cual se le adicionaron 10 µl de la muestra (CG o LF) y se midió la absorción a 340 nm durante 10 minutos a intervalos de 1 minuto (Butcher, 1985).

## **7. Concentración de GSH**

Se utilizaron alícuotas con 20 µl de LF y 60 µl de homogenizado total de CG, que fueron resuspendidos con un volumen igual de ácido metafosfórico (AMP) al 5% y posteriormente centrifugados a 3,000 x g por 10 min a 4 °C. El sobrenadante obtenido se utilizó para la determinación de GSH. En un tubo de ensayo se colocaron 900 µl de AMP al 5%, posteriormente se adicionaron los sobrenadantes



de cada muestra, 2 ml de amortiguador Tris Base 0.4 M pH 8.9 y 50  $\mu$ l de 5,5'-dithiobis (2 -ácido nitrobenzoico) (DTNB) (DTNB 4 mg /ml de metanol). Se agito durante 10 segundos e inmediatamente se realizo la lectura del espectro de absorción a 412 nm en un espectrómetro (Lambda 25 UV/VIS Spectrometer, Perkin Elmer). Cada ensayo se realizo con una curva estándar de GSH (6 mg/10 ml de AMP al 5%) y cada una de las muestras se realizo por duplicado (Griffith, 1990).

## 8. Determinación de ERO

La detección de ERO se realizo con la técnica descrita por Jun y col., 1998, que consta de la utilización de la sonda 2',7'-diclorodihidrofluoresceína diacetato (DCHF-DA, de Molecular probes inc. Eugene DR. USA). Las células de la granulosa se lavaron con PBS y se incubaron con 3 ml de solución Hanks' y 2',7'-diacetato de diclorodihidrofluoresceína 5  $\mu$ M, en la oscuridad durante 30 min. La DCHF-DA se internaliza en las células, donde los grupos acetato son hidrolizados por acción de esterasas intracelulares formando 2',7'-diclorodihidrofluoresceína (DCHF), un compuesto polar que permanece atrapado dentro de la célula. La DCHF es oxidada por RL o por lipoperóxidos generando 2',7'-diclorofluoresceína (DCF), un producto fluorescente. La DCF en CG se cuantifico por citometría de flujo (exc 488 nm y 525 nm emisión). Los niveles de DCF producidos en el interior de la célula, están relacionados linealmente con la presencia de oxidantes, de tal manera que la emisión de luz fluorescente provee una aproximación de la concentración de ERO (Moustafa et al., 2004). Para determinar la producción de ERO se estimo el promedio de células que presentaron fluorescencia positiva a DCF.

## **9. Determinación de grupos carbonilos.**

Se utilizaron 250 µg de proteína de líquido folicular y homogenizado de CG. Las proteínas se precipitaron con 1 ml de ácido tricloracético (TCA) al 20%, se centrifugaron a 500 x g 10 min 4 °C, se lavaron 3 veces por centrifugación con 1 ml TCA 5% 500 x g 10 min 4 °C c/u y posteriormente 3 veces mas con 1 ml de cloroformo. El precipitado se dejo secar y posteriormente se resuspendió con 1 ml de una solución 2,4-dinitrofenilhidrazina (DNPH) 2% en HCl 2 N, se dejo incubar a 37 °C por 60 min durante los cuales se agito en un vórtex a intervalos de 5 min. Posteriormente las proteínas se precipitaron con TCA 20% frió durante 5 min y se centrifugo a 500 x g x 10 min 4 °C. Se realizaron 2 lavados, c/u con 1 ml de etanol/acetato de etilo (1/1 v/v). El precipitado obtenido se dejo secar y posteriormente se disolvió en 1 ml de clorhidrato de Guanidina 6 M en amortiguador de fosfatos 20 mM pH 6.5, para eliminar el material insoluble y recuperar el sobrenadante se centrifugo a 500 x g x 10 min a 4 °C. Del sobrenadante se tomo el espectro de absorción de 300 – 600 nm, encontrando a 375 nm el pico de absorción de la dinitrofenilhidrazona (Levine et al., 1990).

## **10. Determinación de hormonas esteroides**

Las concentraciones de hormonas esteroides E<sub>2</sub>, P<sub>4</sub> y DHEA fueron medidas en LF mediante radioinmunoanálisis, utilizando los kits Coat-A-count Estradiol y Coat-A-count Progesterona (de Diagnostic Products Corporation, Los Angeles, CA, USA.) y DHEA RIA DSL 9000 active (de Diagnostic Systems Laboratories, Texas, USA), siguiendo las instrucciones del proveedor. El procedimiento se basa en la utilización de tubos recubiertos de anticuerpos. La hormona marcada con <sup>125</sup>I compite con la hormona de la muestra por los sitios de unión con el anticuerpo. Después de la incubación la hormona unida se separa de la hormona libre por decantación y se analiza en un contador gama. La cantidad de cuentas esta

inversamente relacionada con la cantidad de la hormona presente en la muestra. La concentración de la hormona en la muestra se determinó comparando las cuentas con una curva estándar. Las diluciones utilizadas fueron 1:400 para E<sub>2</sub> y 1:40 para P<sub>4</sub> y DHEA. Los límites de sensibilidad fueron de 8 pg/ml para E<sub>2</sub> y 0.02 ng/ml para P<sub>4</sub> y DHEA. El coeficiente de variación intraensayo fue de 5.07%, 2.89% y 3.05%, mientras que el interensayo de 4.9%, 5.9% y 10.8%, para E<sub>2</sub>, P<sub>4</sub> y DHEA respectivamente.

## **11. Análisis estadístico**

Los datos se analizaron mediante un Análisis de Varianza (ANOVA) y prueba de Tuckey, utilizando un programa de computadora SPSS. Para el análisis de la actividad de G6PDH y la concentración de difenilhidrazonas, se realizó una transformación logarítmica a los datos.

## VII. RESULTADOS

### 1. Folículos colectados

Las características de los folículos analizados se muestran en la **tabla II (A y B)**. Aquí podemos observar que se colectaron mas folículos pequeños (4-6mm) que grandes (>6mm), 148 y 108 respectivamente, que corresponden al 57.81% y 42.19% del total (256). El porcentaje de folículos sanos, sin considerar el tamaño fue de 23.05 % y el de folículos en degeneración del 76.95%.

**Tabla II A.** Clasificación y porcentaje de los folículos obtenidos.

Grado de atresia	Tamaño y número de folículos					
	4-6mm	%	>6mm	%	Total	%
1*(sanos)	29	11.33	30	11.72	59	23.05
2	55	21.48	46	17.97	101	39.45
3	64	25.00	32	12.50	96	37.50
<b>Total</b>	<b>148</b>	<b>57.81</b>	<b>108</b>	<b>42.19</b>	<b>256</b>	<b>100</b>

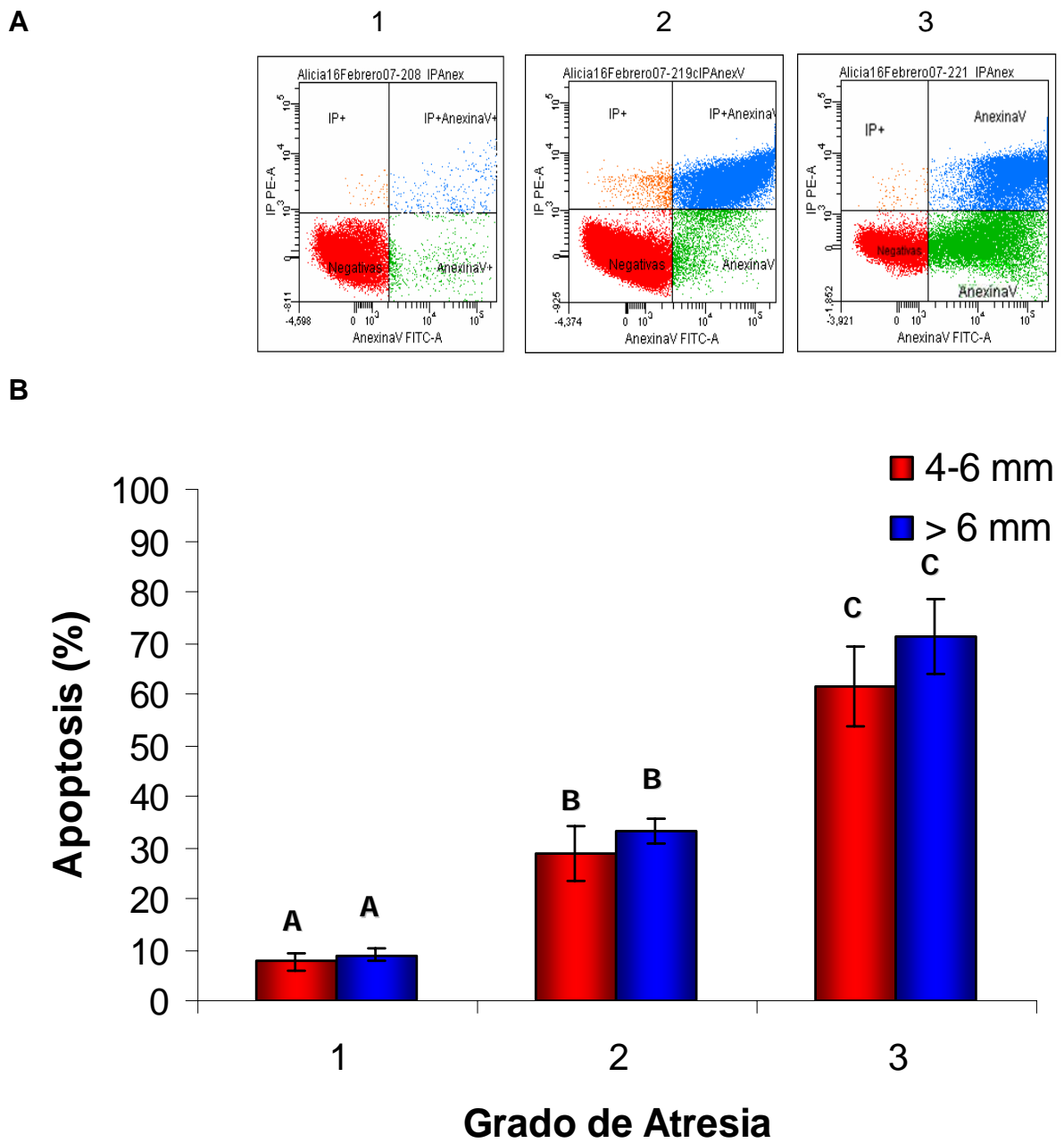
\* Los folículos clasificados como grado de Atresia 1, por sus características: abundante irrigación, sin desprendimientos de su capa granulosa y apariencia brillante, corresponden a folículos sanos.

**Tabla II B.** Porcentaje de folículos sanos y atrésicos.

Clasificación	Folículos de 4-6 mm		Folículos > 6 mm	
	Número	%	Número	%
<b>Sanos</b>	29	19.59	30	27.78
<b>Atrésicos</b>	119	80.41	78	72.22
<b>Total</b>	<b>148</b>	<b>100%</b>	<b>108</b>	<b>100%</b>

## 2. Índice de apoptosis

En la **figura 1 (A)** se muestra un citograma representativo de cada grado de atresia. En la **(B)** se presentan los porcentajes de células apoptóticas en cada uno de los grupos. Los resultados demuestran que conforme avanza el grado de atresia, aumenta el porcentaje de células apoptóticas y disminuye el de células viables. Estos resultados mostraron diferencias significativas entre atresia 2 ( $33.3 \pm 2.5$ ) y atresia 3 ( $71.15 \pm 7.3$ ), respecto a folículos con atresia 1 ( $9 \pm 1.2$ ), recordemos que este grupo corresponde a folículos sanos. No observamos diferencias significativas entre folículos pequeños (4-6 mm) y grandes (>6 mm). En esta figura, también se muestra un citograma representativo de cada uno de los grados de atresia, en el que se puede apreciar como las células que han iniciado el proceso de apoptosis, con la translocación de fosfatidilserina, se mueven hacia el cuadrante superior donde se localizan las células en apoptosis tardía que muestran fluorescencia positiva tanto a anexina V-FITC como a ioduro de propidio.

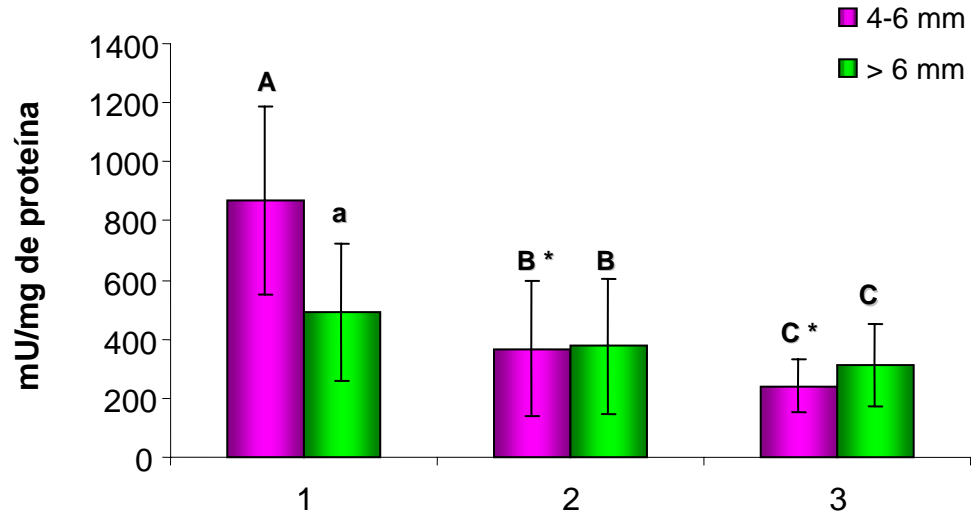


**Figura 1.** Índice de apoptosis. **(A)** Citograma representativo de cada grado de atresia. **(B)** Porcentaje de apoptosis en las células de la granulosa (Anexina V<sup>+</sup> y Anexina V<sup>+</sup>/IP<sup>+</sup>), en relación al tamaño y grado de atresia de los folículos. Se muestra el promedio  $\pm$  DE de 5 experimentos/grupo. Literales desiguales denotan diferencia significativa ( $p < 0.05$ ) entre grado de atresia.

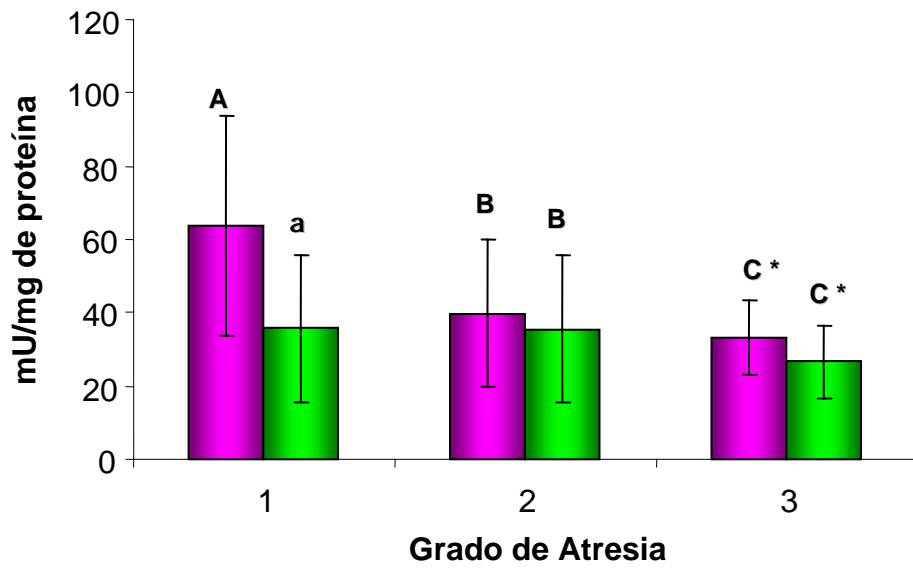
### 3. Actividad de G6PDH

En la **figura 2**, se muestra la actividad de G6PDH en CG (**A**) y LF (**B**). El análisis de varianza en la actividad de G6PDH, con una  $P < 0.05$ , indica que existe diferencia significativa en CG de folículos con atresia 2 y 3 contra atresia 1 ( $370 \pm 230$ ;  $240 \pm 90$  y  $870 \pm 320$  mU/mg de proteína, respectivamente). En tamaño los únicos que mostraron diferencia significativa fueron los folículos de atresia 1, tanto en CG como en LF. En líquido folicular existió diferencia significativa entre los folículos con atresia 3 respecto a los de atresia 1 ( $30 \pm 10$ ;  $60 \pm 30$  mU/mg de proteína, respectivamente). Claramente se puede observar la tendencia a disminuir la actividad de la enzima conforme avanza el grado de atresia, siendo mayor la diferencia cuando se comparan folículos sanos (atresia 1) contra atrésicos (atresia 2 y 3).

**A**



**B**

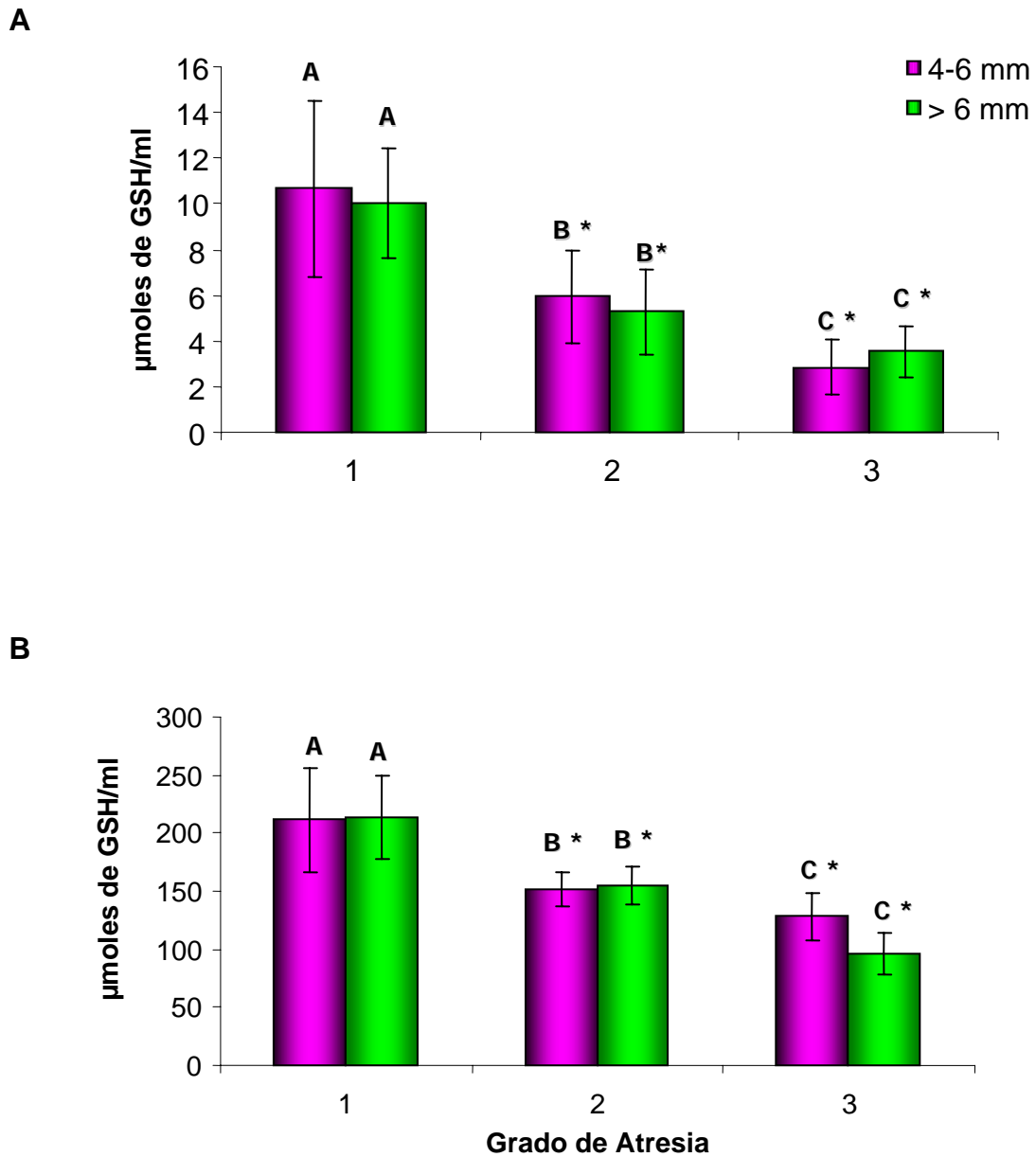


**Figura 2.** Actividad de G6PDH en células de la granulosa **(A)** y líquido folicular **(B)** en folículos con diferente tamaño y grado de atresia. Los datos representan el promedio  $\pm$  DE de 10 experimentos/grupo. Literales desiguales denotan diferencia significativa ( $p < 0.05$ ) entre tamaños y los asteriscos entre grados de atresia.



#### 4. Concentración de GSH

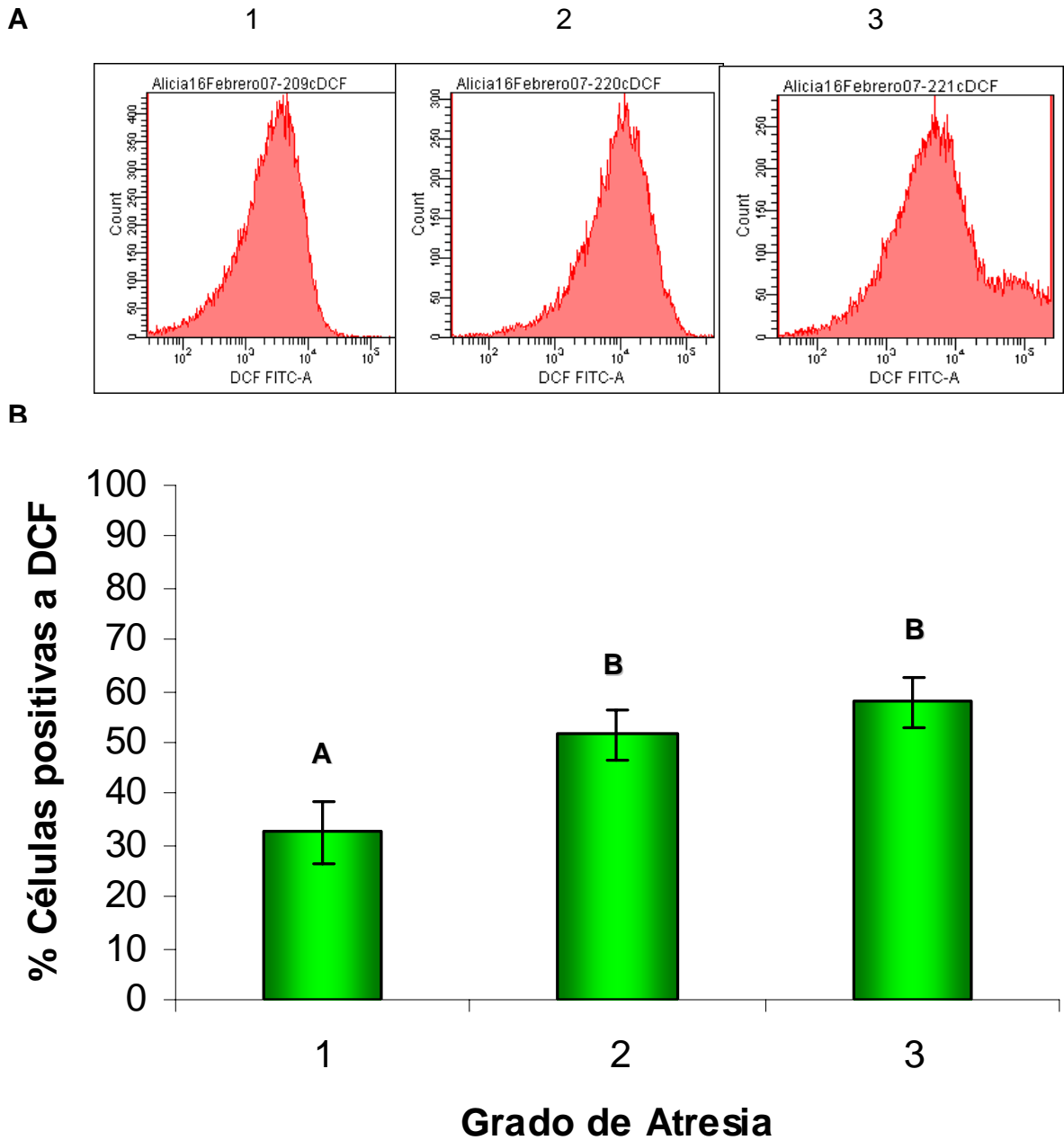
En la **figura 3**, se observan las concentraciones de GSH en CG **(A)** y LF **(B)**. Las concentraciones de GSH en CG fueron de  $10.67 \pm 3.84$ ,  $5.94 \pm 2.02$  y  $2.85 \pm 1.22$  en folículos de 4-6mm, y  $10.06 \pm 2.40$ ;  $5.28 \pm 1.88$  y  $3.55 \pm 1.22$   $\mu\text{moles/ml}$  en folículos > 6mm con atresia 1, 2 y 3 respectivamente. En LF fueron de  $211 \pm 44.8$ ;  $152 \pm 14.4$ ; y  $129 \pm 20.5$  en folículos de 4-6 mm y  $213 \pm 36.3$ ;  $155 \pm 16.9$  y  $96 \pm 17.7$   $\mu\text{moles/ml}$  para folículos > 6mm con atresia 1, 2 y 3 respectivamente. Los resultados muestran que las diferencias en las concentraciones de GSH de CG y LF entre los tres grados de atresia son estadísticamente significativas ( $P < 0.05$ ), no así cuando se comparan por tamaño, aunque esta si es significativa en el LF de los folículos con atresia 3. Se observa que las concentraciones de GSH son superiores en folículos sanos y disminuyen en los folículos en degeneración (atresia 2 y atresia 3). Es importante destacar que en LF, la concentración de GSH es 20 veces superior que en CG.



**Figura 3.** Concentraciones de Glutatión reducido en células de la granulosa **(A)** y líquido folicular **(B)**, en diferente tamaño (4-6mm y >6mm) y grado de atresia (1, 2 y 3) de los folículos. Los datos representan el promedio  $\pm$  DE de 10 experimentos/grupo. Literales desiguales denotan diferencia significativa ( $p < 0.05$ ) entre tamaños y los asteriscos entre grados de atresia.

## 5.- Producción de ERO

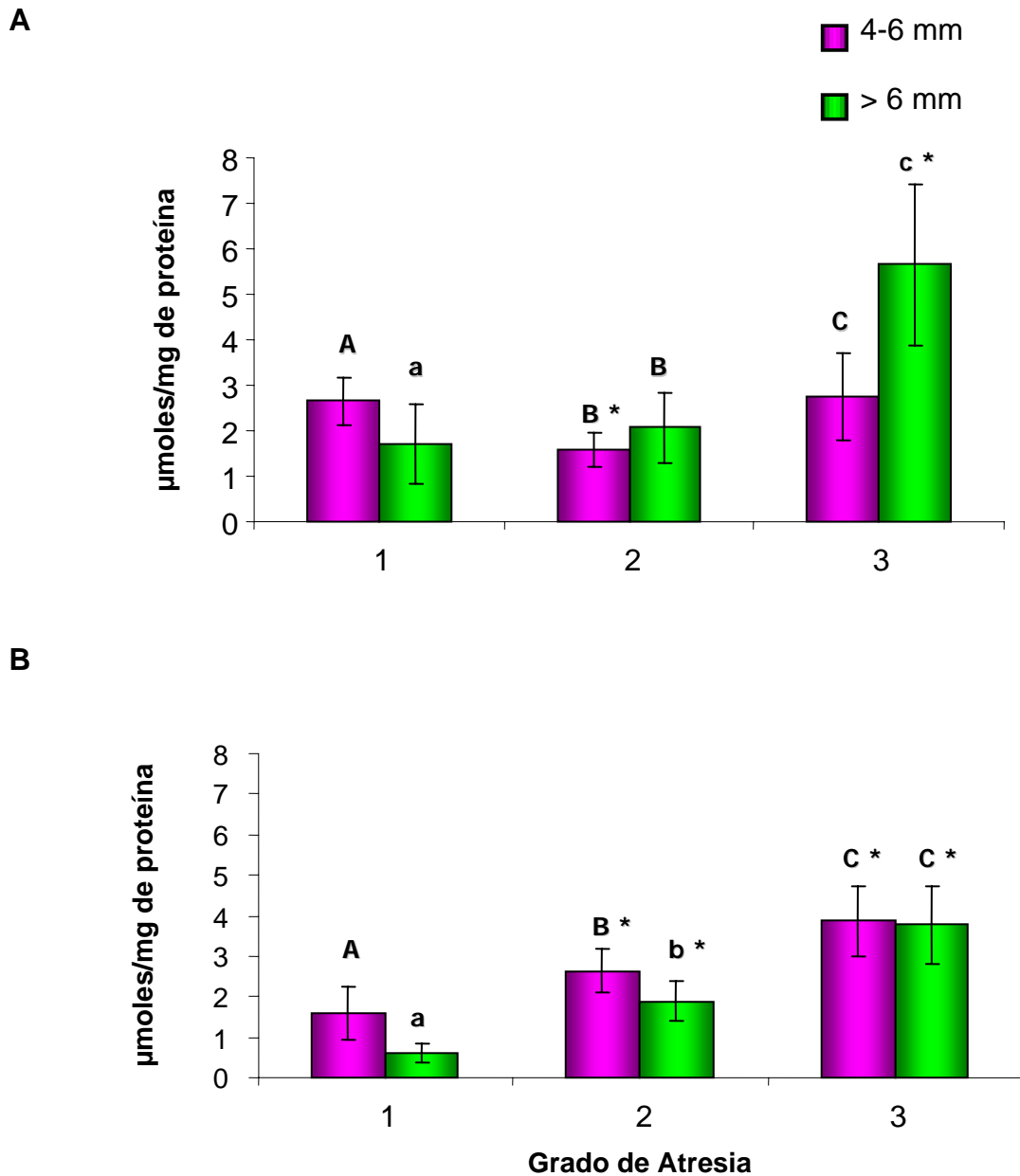
En la **figura 4, (A)** se presenta un histograma representativo de cada grado de atresia. **(B)** se muestra el promedio  $\pm$  DE del porcentaje de CG positivas a DCF, donde puede observarse un incremento significativo ( $p < 0.05$ ), en la producción de ERO de acuerdo al grado de atresia folicular, siendo menor en los folículos sanos o atresia 1 con respecto a los de atresia 2 y atresia 3 ( $32.5 \pm 6$ ;  $51.56 \pm 4.8$  y  $56.4 \pm 5.06$ , respectivamente). En esta figura también se muestra un histograma representativo de las células incubadas en presencia de DCDHF y analizadas por citometría de flujo, donde puede apreciarse el incremento de células positivas a DCF en los folículos atrésicos.



**Figura 4.** Producción de Especies Reactivas de Oxígeno. **(A)** Histograma representativo de CG incubadas con DCDHF, en diferentes estados de atresia folicular. **(B)** Porcentaje de células de la granulosa positivas a DCF, de acuerdo al grado de atresia (1, 2 y 3). Se muestra el promedio  $\pm$  DE de 5 experimentos/grupo. Literales desiguales denotan diferencia significativa ( $p < 0.05$ ) entre grado atresia.

## 6.- Determinación de grupos carbonilos

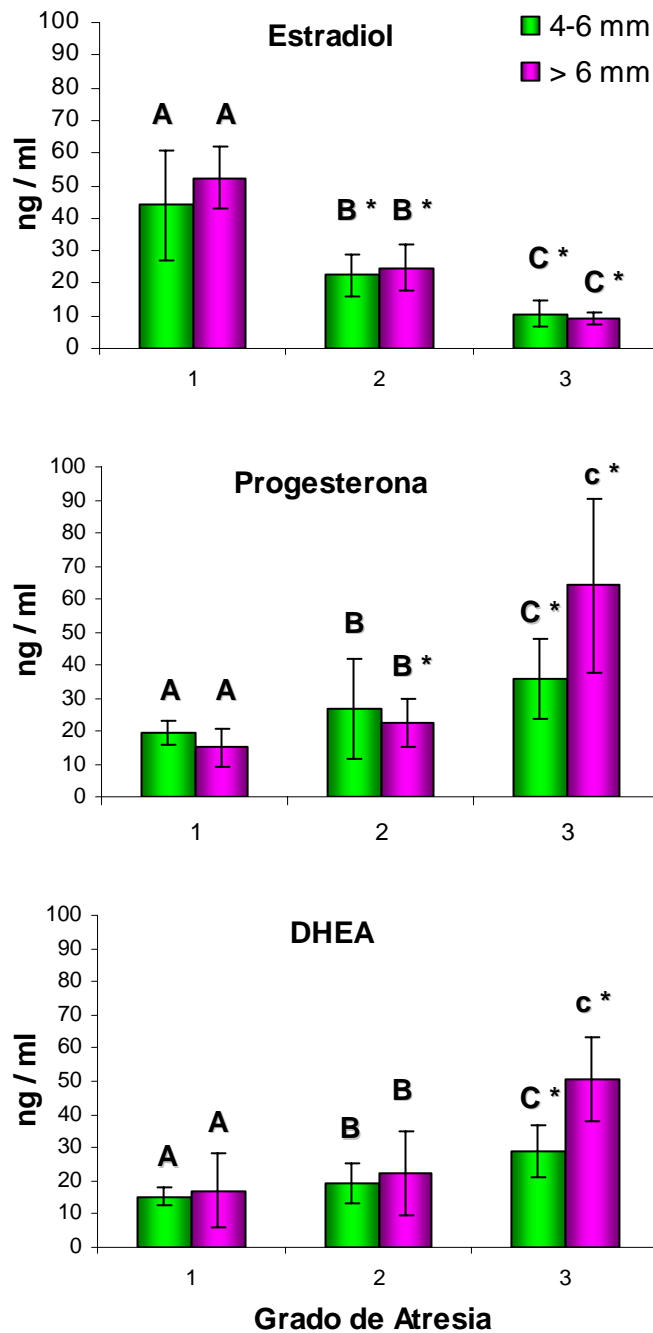
La **figura 5**, muestra las determinaciones de grupos carbonilos en CG **(A)** y LF **(B)**. Los resultados obtenidos demuestran que en LF la presencia de proteínas oxidadas se incremento conforme avanzo el grado de atresia tanto en los folículos grandes como en los folículos pequeños. Las proteínas oxidadas en CG tendieron a incrementarse solo en los folículos > 6mm ( $1.71 \pm 0.88$ ,  $2.08 \pm 0.77$  y  $5.66 \pm 1.78$   $\mu$ moles/mg de proteína, en atresia 1, 2 y 3 respectivamente), mientras que en los folículos pequeños en atresia 2 se presentaron los valores menores ( $1.58 \pm 0.38$ ) que atresia 1 ( $2.65 \pm 0.53$ ), incrementando nuevamente en atresia 3 ( $2.74 \pm 0.96$ ). El análisis de varianza de los datos del LF mostró diferencia significativa ( $P < 0.05$ ) entre los folículos con atresia 2 y 3, y los de atresia 1. Por tamaño las diferencias también fueron significativas en folículos de atresia 1 y 2. En el líquido folicular conforme avanzo el grado de atresia se incremento la presencia de grupos carbonilos en las proteínas, lo mismo el células de la granulosa pero solo en folículos > 6mm.



**Figura 5.** Concentración de grupos carbonilos en proteínas de células de la granulosa (**A**) y líquido folicular (**B**), en folículos con diferente tamaño (4-6mm y >6mm) y grado de atresia (1, 2 y 3). Los datos representan el promedio  $\pm$  DE de 10 experimentos/grupo. Literales desiguales denotan diferencia significativa ( $p < 0.05$ ) entre tamaños y los asteriscos entre grados de atresia.

## 7. Determinación de hormonas esteroideas

En la **figura 6**, se muestran los promedios  $\pm$  DE de las concentraciones hormonales de **E<sub>2</sub>**, **P<sub>4</sub>** y **DHEA**. La relación E<sub>2</sub>:P<sub>4</sub>, fue superior a 1 en los folículos sanos y menor en los atrésicos. E<sub>2</sub> mostró una tendencia a disminuir mientras que P<sub>4</sub> y DHEA a incrementarse conforme avanzo el grado de atresia. A pesar de que en cada una de las hormonas, las diferencias de concentración entre tamaño no fueron estadísticamente significativas, en los folículos > 6 mm el promedio de E<sub>2</sub> fue mayor en los folículos con atresia 1 y 2, mientras que el de P<sub>4</sub> fue menor en estos últimos. En el caso de DHEA, en promedio su concentración fue mayor en los folículos grandes en todos los grados de atresia. Los resultados mostraron un incremento en el nivel de DHEA en relación con el grado de atresia, siendo mayor y estadísticamente significativo solo en los folículos con atresia 3 en relación a los folículos con atresia 1 (50.5 $\pm$ 12.5 y 17.16 $\pm$ 11.22 ng/ml respectivamente). Este mismo comportamiento fue observado en folículos de 4-6 mm (15.3 $\pm$ 2.5; 19.9 $\pm$ 6.1 y 28.92 $\pm$ 8 ng/ml respectivamente).



**Figura 6.-** Determinaciones de estradiol, progesterona y DHEA, en folículos pequeños (4-6 mm) y grandes (>6 mm), con diferente grado de atresia (1, 2 y 3). Se presenta el promedio  $\pm$  DE de 10 experimentos/grupo. Literales desiguales denotan diferencia significativa ( $p < 0.05$ ) entre tamaños y los asteriscos entre grados de atresia.



## VIII. DISCUSIÓN

En la mayoría de las especies durante el desarrollo folicular de cada ciclo reproductivo, solo algunos folículos son seleccionados para ovular, mientras que el resto degeneran (McGee y Husueh. 2000). Los resultados que obtuvimos en cuanto al porcentaje de folículos atrésicos (>70%, tabla 2 A y B) concuerdan con trabajos previos realizados en oveja (García et al., 1997; Rosales et al., 2000).

La atresia folicular es un proceso regulado que inicia con la pérdida de CG mediante apoptosis (Huges, 1991; Tilly et al, 1991) y continúa en las CT aunque en menor índice y en estados más avanzados de la atresia (Palumbo y Yeh, 1994). Investigaciones recientes indican que la muerte en diversos tipos celulares puede ser iniciada por varios estímulos extra e intracelulares, de los cuales a nivel intracelular el estrés oxidativo posee gran relevancia (Wang et al, 1999; Chandra et al, 2000; Hildeman et al, 2003). Sin embargo, son pocos los estudios que se han orientado a estudiar la relación entre estrés oxidativo y apoptosis en los folículos ováricos. Este trabajo describe por primera vez la actividad de G6PDH en los componentes foliculares (CG y LF) de oveja y su relación con el estrés oxidativo que ocurre durante la atresia folicular.

La anexina V (Figura 1), permite identificar aquellas células que han expuesto fosfatidilserina hacia el exterior de la membrana plasmática e iniciado el mecanismo de apoptosis. Se corroboró que en la atresia folicular está involucrada la apoptosis como principal tipo de muerte en CG, ya que conforme avanza el grado de atresia, el porcentaje de células positivas a Anexina V se incrementa. Los datos concuerdan con otros estudios en los que se ha demostrado que la apoptosis es el principal tipo de muerte en CG durante la atresia folicular (Palumbo y Yeh, 1994; Matsui et al., 2003; E-Valdez et al., 2005). Por otro lado, los resultados de DCF (figura 4) muestran la misma tendencia que con Anexina V,

es decir que a mayor grado de atresia mayor es el número de células positivas a DCF, lo cual denota que la muerte de CG en los folículos atrésicos tiene una estrecha relación con la presencia de estrés oxidativo.

El estrés oxidativo ha sido ligado a la muerte por apoptosis en diversos tipos celulares, y las células foliculares no podrían ser la excepción. El estado redox, en todos los tipos celulares está determinado por el principal reductor intracelular, NADPH (Wang et al., 1999), generado a través de la vía de las pentosas, por la G6PDH (Kletzien et al., 1994), y su importancia radica en la regeneración del GSH, un antioxidante fundamental en el ovario (Tilly, 1996; Luberda, 2005), con lo cual se reconoce a la G6PDH como una enzima antioxidante crítica para mantener los niveles de GSH durante la exposición a ERO (Díaz-Flores, 2006). Recientemente se demostró que la disminución de GSH aumenta el índice de atresia en folículos antrales de la rata y que el tratamiento con suplementos o precursores como N-acetilcisteína, protege contra el estímulo apoptótico, al igual que en otros tipos celulares (Tilly y Tilly, 1995; Tsai-Turton y Luderer, 2006). En este trabajo medimos la actividad de G6PDH (figura 2A y B) y las concentraciones de GSH (figura 3A y B) en CG y LF, los resultados demuestran que ambas biomoléculas están involucradas en la atresia folicular, ya que folículos clasificados como atresia 1 (sanos), presentaron mayores concentraciones de GSH, las cuales disminuyeron según el grado de atresia. Este comportamiento posiblemente está relacionado con la actividad de G6PDH, mediante el suministro de NADPH, ya que esta enzima mostró la misma tendencia que el GSH, lo cual es indicativo de que las concentraciones de GSH dependen de la actividad de G6PDH; así los folículos sanos poseen mayor protección y capacidad antioxidante, siendo la actividad de G6PDH determinante para el inicio y progreso de la atresia. Un hecho notable es que la actividad de G6PDH fue 10 veces superior en las CG, pero las concentraciones de GSH fueron 20 veces superiores en LF. Esto podría deberse a que la G6PDH es una enzima intracelular y por otro lado, a que finalmente las células foliculares, especialmente CG, tienen como

función principal proveer un microambiente óptimo para el desarrollo y viabilidad del ovocito (Parrot y Skinner, 1998), lo cual hace suponer que debido a la mayor actividad de G6PDH en las CG, se están generando cantidades considerables de GSH que son depositadas en el LF, esto con la finalidad de brindar mayor protección al ovocito, ya que conforme se acerca el momento de la ovulación la pared y las células foliculares sufren ciertas modificaciones, que aunado a la infiltración de leucocitos y macrófagos, probablemente representan un sitio activo en la generación de RL (Brannstrong et al., 1994; Lachampelle et al., 1996). Esto último, al parecer es uno de los requisitos para la ovulación, por lo cual el ovocito debe de ir inmerso en una gran cantidad de factores que lo protejan de la oxidación (Jozwik et al., 1999), ya que se ha observado que en aquellos gametos que presentan modificaciones oxidativas se afecta la fertilización.

Los antioxidantes son utilizados para neutralizar RL, que se generan como parte del metabolismo celular normal, en el transporte de electrones asociado a la esteroidogénesis en la glándula adrenal (Hornsby y Crivello, 1983), testículo (Peltota et al., 1996) y probablemente en el ovario (Tsai-Turton y Luderer, 2006). Las CG son un elemento fundamental en la esteroidogénesis, ya que contienen las enzimas necesarias (3- $\beta$  hidroxisteroide deshidrogenasa, 17- $\beta$  hidroxisteroide deshidrogenasa y P450<sub>arom</sub> entre otras) para la conversión de andrógenos a estrógenos, por lo cual requieren mayor consumo de antioxidantes. Esto también podría causar que las CG contengan menores concentraciones de GSH, y así una protección inadecuada contra ERO desencadene la atresia folicular (Tilly y Tilly, 1995; Tsai-Turton y Luderer, 2006). Las ERO promueven la apoptosis en diversos modelos como los hepatocitos (Haidara et al., 2002), las células epiteliales (Jungas et al., 2002), los fibroblastos (Ran et al., 2004) y recientemente se demostró en los folículos ováricos de rata (Tsai-turton y Luderer, 2006). Para medir la producción de ERO utilizamos DCDHF, un indicador de H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>, ·OH, peroxidasas y peróxinitrito (Vaquero et al., 2004). Nuestros resultados demostraron que aquellos folículos con menor índice apoptótico presentan menor

cantidad de ERO, lo que se relaciona también con un menor estrés oxidativo. Los RL causan alteraciones a las biomoléculas (lípidos, proteínas y DNA), con lo cual modifican su estructura y por lo tanto su función biológica. En este estudio utilizamos la medición de grupos carbonilos como indicador de daño oxidativo. El daño causado a las proteínas es irreversible y puede propiciar el incremento en el enrollamiento de las estructuras secundarias con la pérdida de la estructura terciaria y/o cuaternaria, esto debido al ataque oxidativo del radical  $\text{OH}\cdot$  sobre los residuos de aminoácidos, produciendo las llamadas proteínas carboniladas y favoreciendo el entrecruzamiento de proteínas con otras biomoléculas como glucosa (glucosilación). Estos cambios conformacionales hacen a las proteínas más susceptibles de proteólisis, desnaturalización y pérdida de su actividad biológica (Levine et al., 1990; Hicks, 2005). Nuestros resultados de difenilhidrazonas (figura 5), generadas por la reacción de difenilhidrazina con proteínas carboniladas, muestran un incremento según avanza el grado de atresia, que se asocia con una protección ineficiente contra ERO, probablemente ocasionado por la disminución en la actividad de G6PDH. No sería de sorprender que la prevalencia de ERO cause modificaciones en la G6PDH, que afecten su actividad biológica y como consecuencia el abastecimiento del NADPH necesario para restaurar los niveles de GSH. Aunque NADPH también se produce por la segunda enzima de la vía de las pentosas, la 6-fosfogluconato deshidrogenasa, su actividad depende de la disposición de sustrato, el cual es provisto por la G6PDH. La malato deshidrogenasa y la isocitrato deshidrogenasa, ambas dependientes de  $\text{NADP}^+$ , también pueden producir NADPH (Flint y Denton, 1970), pero en la mayoría de las células no reemplazan a la G6PDH como su fuente principal (Zhang et al., 2000b; Filosa et al., 2003).

Estudios *in vitro* han demostrado que el tratamiento de la G6PDH con algún sistema oxidante y con los productos secundarios a la lipoperoxidación, como el hidroxinonanal, la enzima experimenta cambios oxidativos que incrementan su labilidad al calor y la pérdida de su actividad biológica (Oliver et al., 1987; Ninfali,

2001). Así, la caída en la actividad de la G6PDH se refleja en el incremento en la producción de ERO y del índice apoptótico. A pesar de que la actividad de G6PDH fue mayor en CG y las concentraciones de GSH superiores en LF, la acumulación de difenilhidrazonas fue muy similar tanto en CG como en LF. Posiblemente, esto apoya la propuesta de que en CG, el GSH es menor debido a que, por un lado éste es consumido para neutralizar las ERO y por otro se está convirtiendo en el LF para coadyuvar a las propiedades antioxidantes del mismo.

Por otra parte los factores endocrinos primarios que regulan la apoptosis en folículos ováricos son las gonadotropinas FSH y LH, (Chun et al., 1994; Chun et al., 1996, Tilly et al., 1992; Tilly et al., 1995). El efecto antiapoptótico al parecer está mediado por la inhibición del daño mitocondrial, por el estímulo en la expresión de moléculas de supervivencia (Wang et al., 2002) e inhibición de aquellas pro-apoptóticas (Tilly et al., 1995; Robles et al., 1999; Matikainen et al., 2001), además del incremento de los niveles del antioxidante GSH que provee un efecto antiapoptótico por su capacidad para neutralizar ERO. También se ha observado que la deficiencia de GSH es necesaria para la liberación del citocromo c y por tanto la inducción de apoptosis (Ghibelli et al., 1998; Coppola y Ghibelli, 2000). En este trabajo observamos que las concentraciones de GSH tanto en CG como en LF fueron disminuyendo a medida que aumentaba el grado de atresia. En la rata, la FSH incrementa las concentraciones foliculares de GSH, lo cual sugiere que su efecto antiapoptótico sobre las CG es a través del GSH (Tsai-Turton y Luderer, 2006). Nuestros resultados también demostraron que GSH participa de manera importante en la viabilidad celular, ya que aquellos folículos clasificados como sanos presentaron las concentraciones más altas de GSH. Además de aumentar los niveles de GSH, las gonadotropinas también pueden incrementar en el ovario, la expresión de enzimas antioxidantes como SOD (Sasaki et al., 1994; Tilly y Tilly, 1995) y la presencia de vitaminas que protegen del estrés oxidativo como la vitamina A y el ácido ascórbico (Aten et al., 1992) en CG (Behrman et al., 1996). Nuestros datos concuerdan con resultados encontrados en otros tipos

celulares donde la viabilidad depende de un incremento en la actividad de G6PDH. Como se mencionó la FSH ejerce su efecto antiapoptótico mediante GSH, la G6PDH es determinante para la provisión de NADPH, y por lo tanto del GSH, con lo cual esta enzima determina la viabilidad o el camino hacia atresia, que inicia efectivamente en las CG.

En los folículos ováricos, durante el desarrollo se producen hormonas esteroides, en CT ocurre la conversión desde colesterol a pregnenolona, después a progesterona y posteriormente a androgenos (dihidrotestosterona, testosterona, dehidroepiandrosterona y androstenediona), mientras que en CG se realiza la conversión de estos a estrógenos (estrona, estriol y estradiol). Las hormonas esteroides en el LF, principalmente la relación  $E_2:P_4$ , se ha utilizado para diferenciar folículos sanos de atrésicos; cuando la relación es superior a 1 los folículos son considerados como sanos y cuando es menor, como atrésicos (Roth et al., 2001; Jiang et al., 2003). Esto es apoyado por experimentos realizados por Manikkam y Rajamahendran (1997) en folículos de bovino, donde el incremento en las concentraciones de progesterona se correlaciona con una disminución en la actividad de la  $P450_{arom}$ , por lo tanto en las concentraciones de  $E_2$  y el mayor índice apoptótico, donde aquellos folículos que tuvieron mayores cantidades de  $E_2$  ocurrió lo contrario. Esto se debe a que las CG de folículos atrésicos pierden su capacidad esteroidogénica, lo que favorece la acumulación de progesterona. Nuestros resultados (figura 6) concuerdan con lo antes mencionado, donde la relación  $E_2:P_4$  es superior a 1 en folículos sanos (atresia 1) y se hace inversa según avanza el grado de atresia.

La DHEA es un esteroide de 19 carbonos, producido principalmente en la corteza suprarrenal y en menor índice en las gónadas, actúa como precursor de testosterona y estrógenos, presenta actividad andrógena relativamente débil (Dorfman et al., 1956), y a pesar de que su papel no se ha definido de manera concluyente (Nafziger et al., 1991; Berdanier et al., 1993), se ha reportado que

presenta efectos antiproliferativos sobre varias líneas celulares y sobre el metabolismo celular de algunas enzimas entre ellas G6PDH (Farquharson et al., 1993; Wang et al., 1999). Su concentración puede variar de manera significativa durante el día, de acuerdo a la secreción de la hormona ACTH y su producción afecta la síntesis de insulina (Zumoff et al., 1980; Berdanier et al., 1993). Esta última es uno de los reguladores positivo de G6PDH, además de los estrógenos (Tian et al., 1999). Hasta el momento no existen datos reportados sobre las concentraciones de DHEA en LF y mucho menos en relación al grado de atresia, en este estudio encontramos que esta hormona presenta un comportamiento similar al de  $P_4$ , es decir que en folículos sanos su acumulación es limitada y se hace mas evidente, conforme avanza el grado de atresia. Lo anterior indica que la actividad de G6PDH, no se ve afectada por DHEA en folículos sanos, pero si en los atrésicos y que a su vez, probablemente,  $E_2$  este ejerciendo un efecto positivo sobre la actividad de esta enzima en los folículos sanos.

## IX. CONCLUSIÓN

La enzima G6PDH esta relacionada con la sobrevivencia de las CG; el incremento en su actividad posiblemente provee cantidades importantes de NADPH para regenerar al GSH y con ello proporcionar mayor protección y capacidad antioxidante en el folículo. Por esta razón, consideramos que su actividad es determinante para el inicio y progreso de la atresia folicular, sin importar el estadio del desarrollo en que se encuentre el folículo. A pesar de ser una enzima intracelular también esta presente en el LF, sin embargo, su actividad es mayor en CG, por lo que se propone que las CG contribuyen de manera importante en la producción del GSH que se concentra en el LF, proporcionando así, mayor protección al ovocito.

Los folículos sanos mantienen su capacidad esteroidogénica, lo cual impide la acumulación de progesterona y DHEA, precursores de andrógenos en las CT, pero con efecto antiproliferativo en las CG durante el desarrollo folicular. En los folículos atrésicos se pierde esta capacidad, debido a la muerte de las células de la granulosa. El incremento en la concentración de ERO y DHEA, contribuye a la inhibición de la G6PDH, y por lo tanto a la inducción de apoptosis en las células de la granulosa de folículos atrésicos.



## X. LITERATURA CITADA

- Abel, M.H., Wootton, A.N., Wilkins, V., Hutaniemi, I., Knight, P.G., Charlton, H.M. 2000. The effect of a null mutation in the FSH receptor gene on mouse reproduction. *Endocrinol* 141:1795–1803.
- Acero, C.M. 2005. Papel de México y América Latina en el comercio mundial de la carne ovina. Memorias de la XXXIII Reunión de la Asociación Mexicana de Producción Animal A.C. / XIX Reunión de la Asociación Latinoamericana de Producción Animal A.C. Tampico, Tamaulipas.
- Adashi, E.Y. 1998. The IGF family and folliculogenesis. *J Reprod Immunol* 39:13-19.
- Agarwal, B.B. 2003. Role of reactive oxygen species in the pathophysiology of human reproduction. *Fertil Steril* 79: 829-843.
- Al-Gubory, K.H., Bolifraud, P., Germain, G., A., Nicole, A., Ceballos, B. 2004. Antioxidant enzymatic defence systems in sheep corpus luteum throughout pregnancy. *Reprod* 128: 767-774
- Ali, A.A., Bilodeau, J.F., and Sirard, M.A. 2002. Antioxidant requirements for bovine oocytes ovaries during in vitro maturation, fertilization and development. *Theriogenology* 59:939-949.
- Alonso, P.I., Rosales, T. A. M., Avalos, R. A., Vergara, O. M., Rosado, G. A. 2003. Mechanism of cell death during follicular atresia depends on follicular size. *Theriogenology* 60:1071-1081.
- Andrade, E.R., Marcondes, S.M., Alcindo, A.A., Ademir, O.J., Toniolli R. 2005. Interaction of in dole acetic acid with EGF and FSH in the culture of ovine preantral follicles. *Theriogenology* 64:1104- 113.
- Aten, R.F., Duarte, K.M., Behrman, H.R. 1992. Regulation of ovarian antioxidant vitamins reduced glutathione and lipid peroxidation by luteinizing hormone and prostaglandin F<sub>2</sub>α. *Biol Reprod* 46:401-407.
- Attaran, M., Pasqualotto, E., Falcone, T., Goldberg, J., Miller, K., Agarwal, A., Sharama, R.K. 2000. The effect of follicular fluid reactive oxygen species on outcome of in vitro fertilization. *Int J Fertil* 45(5): 314-320.

- Babu, P.S., Danilovich, N., Sairam, M.R., 2001. Hormone-induced receptor gene splicing: enhanced expression of the growth factor type I FSH receptor motif in the developing mouse ovary as a new paradigm in growth regulation. *Endocrinol* 142:381–389.
- Babu, P.S., Krishnamurthy, H., Chedrese, P.J., Sairam, M.R. 2000. Activation of extracellular-regulated kinase pathways in ovarian granulosa cells by the novel growth factor type I follicle stimulating hormone receptor role in hormone signaling and cell proliferation. *J Biol Chem* 275:27615–27626.
- Ballesteros, L.M., Rosales, T.A.M., Rosado, A., Hernández, P.O. 1992. Activity, compartmentation and subcellular distribution of lysosomal enzymes during follicular maturation in the goat. *Anim Reprod Sci* 27:129-139.
- Battista, P.J., Alilla, H.W., Rexroad, C.E., Hanselz, W. 1989. The effects of platelet-activating factor and platelet-derived compounds on bovine luteal cell progesterone production. *Biol Reprod* 40:769-775.
- Behl, R., Pandey, R.S. 1999. Effect of insulin-like growth factor-I on caprine granulosa cell steroidogenesis in vitro. *Small Rumin Res.* 33:165-169.
- Behrman, H.R., Preston, S.L., Aten, R.F., Rinaudo, P., Zreik, T.G. 1996. Hormone induction of ascorbic acid transport in immature granulosa cells. *Endocrinol* 137:4316-4321.
- Behrman, H.R., Aten, R.F. 1991. Evidence that hydrogen peroxide blocks hormone-sensitive cholesterol transport into mitochondria of rat luteal cells. *Endocrinol* 128: 2958–2966.
- Berdanier, C.D., Parente, J.A. Jr., McIntosh, M.K., 1993. Is dehydroepiandrosterone an antiobesity agent?. *FASEB J* 7:414-419.
- Berg, E.A., Wu, J.Y., Campbell, L., Kagey, M., Stapleton, S.R. 1995. Insulin-like effects of vanadate and selenate on the expression of glucose-6-phosphate dehydrogenase and fatty acid synthase in diabetic rats. *Biochimie* 77, 919-24.
- Blake, A.J., Gregory, J.G. 1997. Physiology and pathophysiology of apoptosis in epithelial cells of the liver, pancreas and intestine. Center for Basic Research in Digestive Diseases, Division of Gastroenterology, Mayo Clinic, Medical School, and Foundation, Rochester, Minnesota 55905.1174-1188.

- Bolamba, D., Floyd, A.A., McGlone, J.J., Lee, V.H. 2002. Epidermal growth factor enhances expression of Connexin 43 protein in cultured porcine preantral follicles. *Biol Reprod*: 67:154-160.
- Boonstra, J., Post, J.A. 2004. Molecular events associated with reactive oxygen species and cell cycle progression in mammalian cells. *Gene* 337: 1-13.
- Boonyaparakob, U., Gadsby, J.E., Hedgpeth, V., Routh, P., Almond, G.W. 2003. Expression and localization of vascular endothelial growth factor and its receptors in pig corpora lutea during the estrous cycle. *Reprod* 126(3):393-405.
- Buccione, R., Schroeder, A.C., Eppig, J.J. 1990. Interactions between somatic cells and germ cells throughout mammalian oogenesis. *Biol Reprod* 43:543-547.
- Butcher, E. 1985. Red cell metabolism. A manual of biochemical methods. 2edn. New York Grune & Stratton, 66-139.
- Centola, G.M. 1982. Light microscopic observations of alterations in staining of the zone pellucida of porcine follicular oocytes: possible early indications of atresia. *Gamete Res* 6:293-304.
- Chandra, J., Samali, A., Orrenius, S. 2000. Triggering and modulation of apoptosis by oxidative stress. *Free Radic Biol Med* 29:323-333.
- Chen, Q., Crosby, M., Almasan, A. 2003. Redox regulation of apoptosis before and after cytochrome c release. *Korean J Biol Sc* 7(1):1-9.
- Chihuailaf, R.H., Contreras, P.A., Wittwer, F.G. 2002. Patogenesis del estrés oxidativo: Consecuencias y evaluación en salud animal. *Vet. Mex.* 33(3): 265-283.
- Chun, S.Y., Billig, H., Tilly, J.L., Furuta, I., Tsafri, A., Hsueh, A.J.W. 1994. Gonadotropin suppression of apoptosis in cultured preovulatory follicles: Mediator role of endogenous insulin-like growth factor I. *Endocrinol* 135:1845-1853.
- Chun, S.Y., Eisenhauer, K.M., Minami, S., Billig, H., Perlas, E., Hsueh, A.J. 1996. Hormonal regulation of apoptosis in early antral follicles: follicle-stimulating hormone as a major survival factor. *Endocrinol* 137:1447-1456.

- Codner, E., Cassorla, F. 2002. Growth hormone and reproductive function. *Mol Cell Endocrinol* 186:133-136.
- Coppola, S., Ghibelli. 2000. GSH. Extrusion and the mitochondrial pathway of apoptotic signaling. *Biochem Soc Trans.* 28:56-61.
- Crow, M.T., Mani, K., Nam, Y.J., Kitsis, R.N. 2004. The mitochondrial death pathway and cardiac myocyte apoptosis. *Circ Res* 95: (10) 957-70.
- Cuellar, O.J. 2006. La producción ovina en México.- Descripción general y la ovinocultura empresarial del occidente.- Memorias de la primera semana Nacional de ovinocultura. Foro Ovino. Tulancingo Hidalgo, México.
- De Felici, M., Dolci, S., Pesce, M. 1993. Proliferation of mouse primordial germ cell in Vitro: a key role for cAMP. *Dev Biol* 157:277-280.
- Demeestere, I., Centner, J., Gervy, C., Englert, Y., Delbaere, A. 2005. Impact of various endocrine and paracrine factors on in vitro culture of preantral follicles in rodents. *Reprod* 130(2):147-156.
- Denham, H. 1956. Aging: A theory based on free radicals and radiation chemistry. *J Gerontol* 11: 298-300.
- Dhar, B.W., Doughton, E., Pruyers, R.W., Brown, Findlay, J.K. 2001. Effect of immunization against the alpha N (aN) and alpha C (aC) peptides of the alpha43 subunit of inhibin on antral follicular growth and atresia and the patterns of gonadotrophin secretion in ewes. *Reprod* 121 (30) 707-718.
- Díaz, F.M. 2006. Efecto de la nicotinamida sobre la actividad de Glucosa-6 fosfato deshidrogenasa y la vía redox del glutatión en diabetes experimental. Tesis para obtener el grado de Doctora en Ciencias Quimicobiológicas. Instituto Politecnico Nacional.
- Din, E.Z., Ornar, H.M. 2002. Some antioxidants activities, lipid peroxide and nitric oxide levels in follicular fluid and its relation to oocyte quality in bufalo-cows. *Assiut Vet Med J* 49(96):293-310.
- Diplock, A.T. 1994. Antioxidants and disease prevention. *Mol Aspects Med* 15, 293-376.
- Donovan, P.J., Stott, D. Cairns, L.A., Heasmam, J., Wylie, C.C. 1986. Migratory and postmigratory mouse primordial germ cells behave differently in culture. *Cell* 44:831-838.

- Dorfman, R.I., Shipley, R.A. 1956. Androgens: John Wiley and sons. New York. 116- 128.
- Dröge, W. 2002. Free radicals in the physiological control of cell function. *Physiol Rev* 82,48-95.
- Duru, N.K., Morshedi, M.S., Oehninger. 2000. Effects of hydrogen peroxide on DNA and plasma membrane integrity of human spermatozoa. *Fertil Steril* 74, 1200-1207.
- Eisenhauer, K.M., Chun, S.Y., Billig, H., Hsueh, A.J.W. 1995. Growth hormone suppression of apoptosis in preovulatory rat follicles and partial neutralization by insulin-like growth factor binding protein. *Biol Reprod* 53:13–20.
- Elvin, J.A., Clark, A.T., Wang, P., Wolfman, N.M., Matzuk, M.M. 1999. Paracrine actions of growth differentiation factor-9 in the mammalian ovary. *Mol Endocrinol* 13:1035–1048.
- Elvin, J.A., Matzuk, M.M. 1998. Mouse models of ovarian failure. *Rev Reprod* 3:183–195.
- Elvin, J.A., Yan, C., Wang, P., Nishimori, K., Matzuk, M.M. 1999. Molecular characterization of the follicle defects in the growth differentiation factor 9 deficient ovary. *Mol Endocrinol* 13:1018-1034.
- Endo, T., Aten, R.F., Leykin, L., Behrman, H. R. 1993. Hydrogen peroxide evokes antiestrogenic and antigonadotropic actions in human granulosa luteal. *J Clin Endocrinol Metab* 76:337-342.
- Espey, L. L. 1986. Ovarian increase in kinin-generating capacity in PMSG/hCG-primed immature rat. *Am J Physiol Endocrinol Metab* 251: E362-E365.
- Espey, L. L. 1990. Ovulation as an inflammatory reaction – a hypothesis. *Biol Reprod* 22: 73–106.
- E-Valdez, K., Peder, C.S., Adele, M.T. 2005. Regulation of apoptosis during atresia of dominant bovine follicles of the first follicular wave following ovulation. *Reprod* 130;71-81.
- Farquharson, C. J., Milne, Loveridge, N. 1993. Mitogenic action of insulin-like growth factor-I on human osteosarcoma MG-63 cells and rat osteoblasts

maintained in situ: the role of glucose-6-phosphate dehydrogenase. *Bone Miner* 22: 105-115.

- Fauser, B.C., Van Heusden, A.M. 1997. Manipulation of human ovarian function: physiological concepts and clinical consequences. *Endocr Rev* 18:71–106.
- Ferrara, N. 2004. Vascular endothelial growth factor: Basic Science and Clinical Progress. *Endocr Rev* 25(4):581-611.
- Ferrara, N., Davis-Smyth, T. 1997. The biology of vascular endothelial growth factor. *Endocr Rev* 18: 4-25.
- Filosa, S., Fico, A., Paglialunga, F., Balestrieri, M., Crooke, A., Verde, P., Abrescia, P., Bautista, J.M., Martini, G., 2003. Failure to increase glucose consumption through the pentose-phosphate pathway results in the death of glucose-6-phosphate dehydrogenase gene-deleted mouse embryonic stem cells subjected to oxidative stress. *Biochem J* 370, 935-943.
- Finkel, T., Holbrook, N.J. 2000. Oxidants, oxidative stress and the biology of ageing. *Nature* 9,239-247.
- Fitzgerald, J., Butler, W.R. 1982. Seasonal effects and hormonal patterns related to puberty in ewe lambs. *Biol Reprod* 27: 853-856.
- Flanagan, J.G. Leder, P. 1990. The kit ligand: a cell surface molecule altered in steel mutant fibroblasts. *Cell* 63 (1):185-94.
- Flint, A.P.F., Denton, D.R.M. 1970. The Role of Nicotinamide-Adenine Dinucleotide Phosphate-dependent malate dehydrogenase and isocitrate dehydrogenase in the supply of reduced Nicotinamide-Adenine Dinucleotide Phosphate for steroidogenesis in the superovulated rat ovary. *Biochem J* 117, 73-83.
- Forabosco, A., Sforza, C., De Pol, A., Vizzotto, L., Marzona, L., Ferrario, V.F. 1991. Morphometric study of the human neonatal ovary. *Anat Rec* 231:201-208.
- Forstreuter, F., Lucius, R., Mentlein, R. 2002. Vascular endothelial growth factor induces chemotaxis and proliferation of microglial cells. *J Neuroimmunol* 132:93-98.
- Foster, D.L., Ryan, K.D., 1981. Endocrine mechanism governing transition into adulthood in female sheep. *Reprod Fertil Supp.* 30: 75-90.

- Fraser, H.M., Lunn, S.F., Kim, H., Duncan, W.C., Rodger, F.E., Illingworth, P.J., Erickson, G.F. 2000. Changes in insulin-like growth factor binding protein-3 messenger ribonucleic acid in endothelial cells of the human corpus luteum: a possible role in luteal development and rescue. *J Clin Endocrinol Metab* 85(4):1672-7.
- Garcia, R., Ballesteros, I.M., Hernández, P.O., Rosales, A.M., Espinosa R, Soto, H., Diaz de león, I., Rosado, A. 1997. Metalloproteinase activity during growth maturation and atresia in ovarian follicles of the goat. *Anim Reprod Sci.* 47: 211-228.
- Gardner, A.M., Xu, F.H., Fady, C., Jacob, F.J., Duffey, D.C., Lichtenstein, A. 1997. Apoptotic vs. nonapoptotic cytotoxicity induced by hydrogen peroxide. *Free Radic Biol Med* 22: 73-83.
- Ghibelli, L., Fanelli, C., Rotilio, G., Lafavia, E., Coppola, S., Colussi, C., Civitareale, P., Ciriolo, M.R. 1998. Rescue of cells from apoptosis by inhibition of active GSH extrusion. *FASEB J* 12:479-486.
- Gioacchini, G., Cardinali, M., Maradonna, F., Funkenstein, B., Mosconi, G., Carnevali, O. 2005. Hormonal control of the IGF system in the sea bream ovary. *Ann N Y Acad Sci* 1040: 320–322.
- González, B.A., Carrizosa, J.A., Díaz, D.C., García, R.M., Urrutia, B., Santiago, M.A., Cocero, M.J., Lopez, S.A. 2003. Effects of ovarian follicular status on superovulatory response of goats to FSH treatment. *Small Rumin Res* 48: 9-14.
- Gonzalez-Robayna, I.J., Falender, A.E., Ochsner, S., Firestone, G.L., Richards, J.S. 2000. FSH stimulates phosphorylation and activation of protein kinase B (PKB/Akt) and serum and glucocorticoid-induced kinase (Sgk): evidence for A-kinase independent signaling in granulosa cells. *Mol Endocrinol* 14:1283–1300.
- Goodman, A.C., Hodge, G.D. 1983. The ovarian trial of the primate menstrual cycle. *Recent Prog Horm Res* 39: 1-73.
- Green, R., Reed, J. C. 1998. Mitochondria and apoptosis. *Sci* 281:1309-1112.
- Greenaway, J., Connor, K., Pedersen, H., Coomber, B., Iamarre, J., 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.

- Greenwald, G., Roy, S.Y. 1994. Follicle development and its control In: Knobil, E., Neill, J. *The Physiology of Reproduction*. Raven Press New York, pp 629–724.
- Griffith, O.W. 1999. The enzymes of glutathione synthesis: gamma-glutamylcysteine synthetase. *Adv Enzimol Rel Areas Mol Biol* 73: 2009-267.
- Hadley, M.E. 1996. *Endocrinology*. Ed. CARRIE BRANDON. 518 pp Estados Unidos.
- Haidara, K., Morel, I., Abaléa, V., Barré, G., Denizeau, F. 2002. Mechanism of tert-Butylhydroperoxide induced apoptosis in rat hepatocytes: involvement of mitochondria and endoplasmic reticulum. *Biochim Biophys Acta* 1542:173-185.
- Halliwell, B. 1995. The definition and measurement of antioxidants in biological systems. *Free Radic Biol Med* 18, 125-126.
- Halliwell, B., Gutteridge, J.M. 1992. Biologically relevant metal ion-dependent hydroxyl radical generation. *FEBS Lett* 307, 108-112.
- Hasti, P., Haresign, W. 2005. Expression of mRNAs encoding insulin-like growth factor (IGF) ligands, IGF receptors and IGF binding proteins during follicular growth and atresia in the ovine ovary throughout the oestrous cycle. *Anim reprod sci* 28: 290-299.
- Hicks, D. 2005. Trunk muscle composition as a predictor of reduced functional capacity in the health, aging and body composition study: The moderating role of back pain. *J Gerontol Biol Sc Med Sc* 60:1420-1424.
- Hildeman, D.A., Mitchell, T., Aronow, B., Wojciechowsky, S., Kappler. 2003. Control of Bcl-2 expression by reactive oxygen species. *PNAS* 100(25): 15035-15040.
- Hirsfiel, A.N., 1991. Development of follicles in the mammalian ovary. *Int Rev Cytol* 124:43-101.
- Hirshfield, A.N. 1989. Granulosa cell proliferation in very small follicles of cycling rats studied by long-term continuous tritiated-thymidine infusion. *Biol Reprod* 41:309 –316.
- Hockenbery, D.M., Olvtviai, Z.N., Yin, X.M., Miliman, C.L., Korsmeyer, S.J. 1993. Bcl-2 functions in an antioxidant pathway to prevent apoptosis. *Cell* 75: 241- 251.



- Holly, A., Garmey, C., Veldhuis, O. 1999. Mechanisms of insulin-like growth factor I augmentation of follicle-stimulating hormone-induced porcine steroidogenic acute regulatory protein gene promoter activity in granulosa cells. *Endocrinol* 140:146-153.
- Hornsby, P.J., Crivello, J.F. 1983. The Role of lipid peroxidation and biological antioxidants in the function of the adrenal cortex. Part 2. *Mol Cell Endocrinol* 30: 123-147.
- Hsue, A.J., Billig, A., Tsafari, A. 1994. Ovarian follicle atresia: a hormonally controlled apoptotic process. *Endocr Res* 15:707-724.
- Hsueh, A.L., Eisenhauer, K., Chun, S.Y., Hsu, S.Y., Billig, H. 1996. Gonadal cell apoptosis. *Recent Prog Horm Res* 51: 433-455.
- Huein, W.Y., Chen, L.W. 2002. Oxidative stress, mitochondrial DNA mutation, and impairment of antioxidant enzymes in aging. *Proc Soc Exp Biol Med* 217:53-63.
- Hughes, F.M., Gorospe, W.C. 1991. Biochemical identification of apoptosis (programmed cell death) in granulosa cell: evidence for a potential mechanism underlying follicular atresia. *Endocrinol* 129: 2415-2422.
- Hurwitz, A., Adashi, E. 1992. Ovarian follicular atresia as an apoptotic process: a paradigm programmed cell death in endocrine tissue. *Mol Nad Cell Endocrinol* 84:C19-C23.
- Hussein, M.R., Haemel, A.K., Wood, G.S. 2003b. p53-related pathways and the molecular pathogenesis of melanoma. *Eur J Cancer Prev* 12: 93-100.
- I'anson, H., Terry, S.K., Lehman, M.N., Foster, D.L. 1997. Regional differences in the distribution of gonadotrophin -releasing hormone cells between rapidly growth and growth-restricted prepubertal female sheep. *Endocrinol* 138: 230-236.
- Iñiguez, G., Villavicencio, A., Gabler, F., Palomino, A., Vega, M. 2001. Effect of nitric oxide on the expression of insulin-like growth factors and insulin-like growth factor binding proteins throughout the lifespan of the human corpus luteum. *Reprod* 122, 865–873.
- Jiang, J.Y., Cheung, C.K., Wang, V., Tsang, B.K. 2003. Regulation of cell death and cell survival gene expression during ovarian follicular development and atresia. *Front Biosci* 1(8): 222-237.

- Jiang, J.Y., Macchiarelli, G., Tsang, B.K., Sato, E. 2003. Capillary angiogenesis and degeneration in bovine ovarian antral follicles. *Reprod* 125: 211–223.
- Jones, E.C. 1956. The aging ovary. PhD Thesis, University of Birmingham, Birmingham, United Kingdom.
- Jozwik, M., Slawomir, W., Jozwik, M., Szamatowicz. 1999. Oxidative stress markers in preovulatory follicular fluid in humans. *Mol Hum Reprod* 5 (5): 409-413.
- Jungas, T., Motta, I., Duffieux, F., Fanen, P., Stoven, V., Ojcius, D.M. 2002. Glutathione levels and Bax activation during apoptosis due to oxidative stress in cells expressing wild-type and mutant cystic fibrosis transmembrane conductance regulator. *J Biol Chem* 277:27912-27913.
- Kaczmarek, M.M., Schams, D., Ziecik, A.J. 2005. Role of vascular endothelial growth factor in ovarian physiology - an overview. *Reprod Biol* 5 (2): 111-136.
- Kaipia, A., Hsueh, A.J.W. 1997. Regulation of ovarian follicular atresia. *Annu Rev Physiol* 59:349-363.
- Kehrer, J.K. 1993. Free radicals as mediators of tissue injury and disease. *Crit Rev Toxicol* 23: 21-48.
- Khandoker, M.A. 2001. Role of gelatinasa on atresia follicular in the bovine ovary. *Biol Reprod.* 65: 726-732.
- Kletzien, R.F., Harris, K.W., Foellmi, L.A. 1994. Glucose-6-phosphate dehydrogenase: a “housekeeping” enzyme subject to tissue-specific regulation by hormones, nutrients, and oxidant stress. *FASEB J* 8: 174-181.
- Knapen, M.F., Zusterzee, C.M., Peters, W.H., Steegers, E.A. 1998. Glutathione and Glutathione-related enzymes in reproduction. A review. *Eur Obstet Gynecol Reprod Biol* 82: 171-184.
- Lavrentiadou, N.S., Chan, C., Kawcak, N.T., Ravid, T., Tsaba, A., Van der Vliet, A., Rassoly, R., Goldkorn. 2001. Ceramide-mediated apoptosis in lung epithelial cells in regulated by glutathione. *Am J Respir Cell Mol Biol* 25:676-684.

- Legan, S.J., 1980. Photoperiodic control of seasonal breeding in ewes: modulation of the negative feedback action of estradiol. *Biol Reprod* 23: 1061- 1068.
- Lei, Z.M., Mishra, S., Zou, W., Xu, B., Foltz, M., Li, X., Rao, C.V. 2001. Targeted disruption of luteinizing hormone/human chorionic gonadotropin receptor gene. *Mol Endocrinol* 15:184-200.
- Lemasters, J.J., Njeminen, A.L., Quian, T., Trost, L., Elmore, S.P., Nishimura, Y., Crowe, R.A., Casio, W.E., Bradham, C.A., Brenner, D.A. herman, B. 1998. The mitochondrial permeability transition in cell death: a common mechanism in necrosis, apoptosis and autophagy. *Biochem Biophys Acta* 1366: 177-223.
- Levine, R.L., Garland, D., Oliver, C.N., Amici, A., Climent, I., Stadtman, E.R. 1990. *Methods enzymol* 186, 464-478.
- Liochev, S.I. 1996. The role of iron-sulfur clusters in vivo hydroxyl radical production. *Free Radic Res* 25:369-384.
- Lopez-Sebastian., Alonso de Miguel, M., Brunet, G.A. 1985. Características del comienzo de la pubertad en corderas Manchegas mediante la estimulación por machos en estación desfavorable. *Inv Agr Ser Ganadera* 22: 167-181.
- Lowry, O.H., Rosebrough, N.J., Farr, L.A., Randall, R.J. 1951. Protein measurement with the folin phenol reagent. *J Biol Chem* 193:265-275.
- Isobe, N., Yoshimura, V. 2000. Localization of apoptotic cell in the cystic ovarian follicles of cow: a DNA-end labeling histochemical study. *Theriogenol* 53: 897-904.
- Lu, O., Harrington, E.O., Rounds, S. 2005. Apoptosis and lung injury. *Keio J Med* 54 (4):184-9.
- Luberda, Z. 2005. The role of glutathione in mammalian gametes. *Reprod Biol* 5(1): 5-17.
- Luderer U, Diaz O, Faustman EM, Kavanagh TJ. 2003. Localization of glutamate cysteine ligase subunit mRNA with the rat ovary and relationship to follicular atresia. *Mol Reprod Dev* 65:254-261.
- Luderer, U., Kavanagh, T.J., White, C.C., Faustman, E.M. 2001. Gonadotrophin regulation of glutathione synthesis in the rat ovary. *Reprod Toxicol* 15:495-504.

- Magnusson, C., Bar, A.S., Braw, R., Tsafirri, A. 1983. Oxygen consumption by rat oocytes and cumulus cells during induced atresia. *J Reprod Fertil* 68:97-103.
- Manikkam, M., Rajamahendran, R. 1997. Progesterone-induced atresia of the proestrus dominant follicle in the bovine ovary: Changes in diameter, insulin-like growth factor system, aromatase activity, steroid hormones, and apoptotic index. *Biol Reprod* 57, 580-587.
- Mao, J., Smith, M.F., Rucker, E.B., Wu, G.M., McCauley, T.C., Cantley, T.C., Didion, B.A., Day, B.N. 2004. Effect of epidermal growth factor and insulin-like growth factor on porcine preantral follicular growth, antrum formation, and stimulation of granulosa cell proliferation and suppression of apoptosis in vitro. *J Anim Sc* 82:967-1975.
- Margolin, Y., Aten, R.F., Berhman, R. 1990. Antigonadotropic and antisteroidogenic actions of peroxide in rat granulosa cells. *Endocrinol* 127:245-250.
- Marquez, C.I., Lopez, O.A. 1997. Generación de radicales libres en el cuerpo lúteo de bovinos lecheros. *Gaceta de Ciencias Veterinarias* 3(2): 23-29.
- Matikainen, T., Perez, G.I., Zheng, T.S., Kluzak, T.R., Rueda, B.R., Flavell, R.A., Tilly, J.L. 2001. Caspase-3 gene knockout defines cell lineage specificity for programmed cell death signaling in the ovary. *Endocrinol* 142:2468-2479.
- Matsui, Y., Torsoz, D., Nishikawa, S., Nishikawa, S.I., Williams, D., Zsedo, K., Hogan, B.L.M. 1991. Effect of Steel factor and leukemia inhibitory factor and murine primordial germ cells in culture. *Nature* 353:760-752.
- May, J.V., Bridge, A.J., Gotcher, E.D., Gangrade, B.K. 1992. The regulation of porcine theca cell proliferation *in Vitro*: synergistic actions of Epidermal Growth Factor and Platelet-Derived Growth Factor. *Endocrinol* 131:689-697.
- May, J.V., Buck, P.A., Schomberg, D.W. 1987. Epidermal growth factor enhance (<sup>125</sup>I) iodo-follicle stimulating hormone binding by cultured porcine granulosa cell. *Endocrinol* 120:2413-2420.
- Mazerbourg, S., Bondy, C.A., Zhou, J., Monget, P. 2003. The insulin-like growth factor system: a key determinant role in the growth and selection of ovarian follicles? A comparative species study. *Reprod Domest Anim* 38:247-258.

- McGee, E.A., Hsueh, J.W. 2000. Initial and cyclic recruitment of ovarian follicles. *Endocrine Rev* 21 (2): 200-214.
- Mecocci, P., Polidori, M.C., Troiano, L., Cherubini, A., Cecchetti, R., Pini, G. 2000. Plasma antioxidants and longevity: a study on healthy centenarians. *Free Radic Biol Med* 28, 1243-1248.
- Melton, C.M., Zaunbrecher, G.M., Yoshizaki, G., Patiño, R., Whisnant, S., Rendon, A., Lee, V.H. 2001. Expression of connexin 43 mRNA and protein developing follicles of prepubertal porcine ovaries. *Comp Biochem Physiol B*; 130:43-55.
- Membrillo, O.A., Córdova, I.A., Hicks, G.J., Olivares, C.I., Martínez, T.V., Valencia, M.J. 2003. Peroxidación lipídica y antioxidantes en la preservación de semen. Una revisión. *INTERCIENCIA* 28(12):699-704.
- Misajon, A., Hutchinson, P., Lolatgis, N., Trounson, A.O., Almahbobi, G. The mechanism of action of epidermal growth factor and transforming growth factor- $\alpha$  on aromatase activity in granulosa cells from polycystic ovaries. *Mol Hum Reprod* 1999;5:96-103.
- Monget, P., Fabre, S., Mulsant, P., Lecerf, F., Elsen, J.M., 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.
- Moustafa, M.H., Sharma, R.K., Thorton, J. Masha, E., Hafez, A.A., Thomas, J.A. Agarwal, A. 2004. Relationship between ROS production, apoptosis and DNA denaturation in spermatozoa from patients examined for infertility. *Hum Reprod* 19(1) 129-138.
- Murdoch, W.J. 1992. Comparative morphometry and steroidogenic function of antral ovine follicles destined for ovulation or atresia. *Dom Anim Endocrinol* 9(3): 219-224.
- Murdoch, W.J., McCormick, R.J. 1989. Production of low molecular weight chemoattractants for leukocytes by periovulatory ovine follicles. *Biol Reprod* 40:86-90.
- Murray, J.F., Downing, J.A., Eváns, G., Findlay, J.K., Scaranmuzzi, R.J. 1993. EGF acts directly on the sheep ovary in vivo to inhibit estradiol and inhibin secretion and enhance progesterone secretion. *J Endocrinol* 137:253-264.

- Nafziger, A.N., Herrington, D.M., Bush, T.L. 1991. Dehydroepiandrosterone and dehydroepiandrosterone sulfate: their relation to cardiovascular disease. *Epidemiol Rev* 13: 267-293.
- Nemezc, G., Asem, E.K. 1997. Influence of follicular maturation on the susceptibility of chicken ovarian granulosa cells to free oxygen radicals comp. *Biochem Physiol* 117(1):25-30.
- Nilsson, S., Sari, M., Eckardt, T., Michel, T., Thomsen, J., Andersson, G., Enmark, E., Pettersson, K., Warne, M.J. Gustafsson, J.A. 2001. Mechanisms of estrogen action. *Physiol Rev* 81(4): 1535-1555.
- Niswender, G.D., Juengel, J.L., Silva, P.J., Rollyson, M.K., McIntush, E.W. 2000. Mechanisms controlling the function and life span of the corpus luteum. *Physiol Rev* 80(1):1-29.
- Okuda, K., Korzekwa, A., Shibaya, M., Murakami, S., Nishimura, R., Tsubouchi, M., Woclawek-Potocka, I., Skarzynski, D.J. 2004. Progesterone is a suppressor of apoptosis in bovine luteal cells. *Biol Reprod* 71 (6):2065-71.
- Orly, J. 2000. Molecular events defining follicular developments and steroidogenesis in the ovary. Gene Engineering in Endocrinology. Humana Press Inc., Totowa, NJ, pp 239–275.
- Otsuka, F., Shimasaki, S. 2002. A negative feedback system between oocyte bone morphogenetic protein 15 and granulosa cell kit ligand: Its role in regulating granulosa cell mitosis. *PNAS*. 99(2): 8060-8065.
- Palumbo, A., Yeh, J. 1994. *In situ* localization of apoptosis in rat ovary during follicular atresia. *Biol Reprod* 51: 88-95.
- Park, J.Y., Su, Y.Q., Ariga, M.L., Jin, S.L. Conti, M. 2004. EGF-like growth factors as mediators of LH action in the ovulatory follicle. *Sci* 303: 682–684.
- Parrott, J.A., Skinner, M.K.1998. Thecal cell-granulosa cell interactions involve a positive feedback loop among keratinocyte growth factor, hepatocyte growth factor, and Kit ligand during ovarian follicular development. *Endocrinol* 139:2240 –2245.
- Pederson, T. 1970. Follicle kinetics in the ovary of the cyclic mouse. *Acta Endocrinol* 64:304-323.

- Peltola, V., Huhtaniemi, I., Metsa-Ketela, T., Ahotupa, M. 1996. Induction of lipid peroxidation during steroidogenesis in the rat testis. *Endocrinol* 137: 105-112.
- Peters. H. 1979. Some aspects of early follicular development. In: Midgley, A.R., Sadler, W.A. Editors. Ovarian follicular development and function. N Y Raven Press. pp 1-13.
- Pimentel, E. 1987. Hormones, growth factors, and oncogenes. CRC Press, USA. pp 254.
- Quin, J., Ye, N., Liu, X., Lin, B. 2005. Microfluidic devices for the analysis of apoptosis. *Electrophoresis* 26(19):378- 388.
- Quirk, S.M., Cowan, R.G., Joshi, S.G., Henrikson, K.P. 1995. Fas antigen-mediated apoptosis in human granulosa/lutea cells. *Biol Reprod* 52:279-287.
- Rajarajan, K., Rao, B.S., Vagdevi, R., Tamilnani, G., Arwlakumari, G., Sreenu, M., Amarnath, D., Naik, B.R., Rao, V.H. 2005. Effect of various growth factors on the in vitro development of goat preantral follicles. *Small Rum Res* 175:3575-3581.
- Ran, Q., Liang, H., Gu, M., Qi, W., Walter, C.A., Roberts, L.J., Herman, B., Richardson, A., Van Remmen, H. 2004. Transgenic mice overexpressing Glutathione peroxidase-4 are protected against oxidative stress-induced apoptosis. *J Biol Chem* 279:55137-55146.
- Rathbone, M.J., Kinder, J.E., Fike, K., Kojima, F., Clopton, D., Ogle, C.R., Bunt, C.R. 2001. Recent advances in bovine reproductive endocrinology and physiology and their impact on drug delivery system design for the control of the estrous cycle in cattle. *Adv Drug Deliv Rev.* 50(3):277-320.
- Renvoizé, C., Biola, A., Pallardy, M., Breard, J. 1998. Apoptosis: Identification of dying cells. *Cell Biol Toxicol* 14:111-120.
- Requena, J.R., Chien-Chung, Ch., Levine, R.L., Stadtman, E.R. 2001. Glutamic and aminoadipic semialdehydes are the main carbonyl products of metal-catalyzed oxidation of proteins. *PNAS* 2 (98): 69-74.
- Richards, J. S. 2001. Perspective: The ovarian follicle- a perspective in 2001. *Endocrinol* 142 (6) 2184-2191.

- Richards, J.S. 1994. Hormonal control of gene expression in the ovary. *Endocrinol Rev* 15:725–751.
- Richards, J.S. 2001. New signaling pathways for hormones and cyclic adenosine 3', 5'-monophosphate action in endocrine cells. *Mol Endocrinol* 15:209–218.
- Robker, R.L., Richards, J.S. 1998. Hormonal control of the cell cycle in ovarian cells: proliferation versus differentiation. *Biol Reprod* 59:476–482.
- Robker, R.L., Richards, J.S. 1998. Hormone-induced proliferation and differentiation of granulosa cells: a coordinated balance of the cell cycle regulators cyclin D2 and p27KIP1. *Mol Endocrinol* 12:924–940.
- Robles, R., Tao, X.J., Trbovich, A.M., Maravei, D.V., Nahum, R., Perez, G.I., Tilly, K.I., Tilly, J.L. 1999. Localization, regulation, and possible consequences of apoptotic protease-activating factor 1 (Apaf-1) expression in granulosa cells of the mouse ovary. *Endocrinol* 140:2641-2644.
- Rosales, T.A.M., Rosado, A. 1993. Bioquímica de la maduración folicular en el mamífero: III Ovulación. *Ciencia* 44: 487-489.
- Rosales, T.A.M. 1999. Caracterización bioquímica de la maduración y la atresia folicular en la oveja. Tesis para obtener el grado de doctora en ciencias biológicas. Universidad Autónoma Metropolitana Iztapalapa.
- Rosales, T.A.M., Avalos, R.A., Vergara, O.M., Hernandez, P.O., Ballesteros, L.M., Garcia-M, R., Ortiz, V.N. Rosado, A. 2000. Multiparametric study of atresia in ewe antral follicles: histology, flow cytometry, internucleosomal DNA fragmentation, and lysosomal enzyme activities in granulosa cells and follicular fluid. *Mol Reprod Dev* 55:270-81.
- Roth, R., Meidan, A., Shaham-Albalancy, Braw-Tal, R., Wolfenson, D., 2001. Delayed effect of heat stress on steroid production in medium-sized and preovulatory bovine follicles. *Reprod* 121: 745–751.
- Roy, K.S., Grewald, G.S. 1990. Immunohistochemical localization of epidermal growth factor-like activity in the hamster ovary with a polyclonal antibody. *Endocrinol* 126:1309-1317.
- Rueda, B.R., Tilly, K.I., Hansen, T.R., Jolly, P.D., Hoyer, P.B., Tilly, J.L. 1997. Increased Bax and interleukin-1 converting enzyme messenger RNA



levels coincide with apoptosis in the corpus luteum during structural regression. *Biol Reprod* 56: 186-193.

- Rueda, S.R., Hendry, I.R., Hendry, I.W., Stormshak, F., Slayden, O.D., Davis, J.S. 2000. Decreased progesterone levels and progesterone receptor antagonists promote apoptotic cell death in bovine luteal cells. *Biol Reprod* 62(2):269-76.
- Ryan, R.J., Lee, C.Y. 1976. The role of membrane bound receptors. *Biol Reprod* 14: 16-29.
- SAGAR. 1998. Información estadística ganadera.
- SAGARPA. 2004. Producción anual pecuaria en México. Centro de Estadística Agropecuaria.
- Salati, L.M., Amir-Ahmady, S. 2001. Dietary regulation of expression of glucose-6 phosphate dehydrogenase. *Annu Rev Nutr* 21,121-40.
- Salvemini, F., Franze, A., Iervolino, A., Filosa, S., Salzano, S., Ursini, M.V. 1999. Enhanced glutathione levels and oxidoresistance mediated by increased glucose 6-phosphate dehydrogenase expression. *J Biol Chem* 274, 2750-2757.
- Sasaki, J., Sato, E.F., Nomura, T., Mori, H., Watanabe, S., Kanda, S., Watanabe, H., Utsumi, K., Inoue, M. 1994. Detection of manganese superoxide dismutase mRNA in the theca interna cells of rat ovary during the ovulatory process by *in situ* hybridization. *Histochemistry* 102: 173-176.
- Sayre, B.L., Taft, R., Inskoop, E.K., Killefer, J. 2000. Increased expression of insulin-like growth factor binding protein-1 during induced regression of bovine corpora lutea. *Biol Reprod* 63: 21–29.
- Schneider, H.J., Pagotto, U., Stalla, G.K. 2003. Central effects of the somatotropic system. *Eur J Endocrinol* 149:377-392.
- Sicinski, P., Donaher, J.L., Geng, Y., Parker, S.B., Gardner, H., Park M.Y., Robker, R.L., Richards, J.S., McGinnis, L.K., Biggers, J.D., Eppig J.J., Bronson, R.T., Elledge, S.J., Weinberg, R.A. 1996. Cyclin D2 is an FSH-responsive gene involved in gonadal cell proliferation and oncogenesis. *Nature* 384:470 –474.

- Sirotkin, A.V., Makarevich, A.V. 2002. Growth hormone can regulate functions of porcine ovarian granulosa cells through the cAMP/protein kinase A system. *Anim Reprod Sci.* 70:111-126.
- Smitz, J.E., Cortvrindt, G.R. 2002. The earliest stages of folliculogenesis in vitro. *Reprod* 123: 185-202.
- Spaczynski, Z., Tilly, L., Mansour, A., Duleba, J. 2005. Insulin and insulin-like growth factors inhibit and luteinizing hormone augments ovarian theca-interstitial cell apoptosis. *Mol Hum Reprod* 11(5): 319–324.
- Sugino, N., Nakamura, Y., Takeda, O., Ishimatsu, M. Kato, H. 1993. Changes in activity of superoxide dismutase and lipid peroxide in corpus luteum during pregnancy in rats. *J Reprod Fertil* 97: 349-351.
- Taylor, C. 2000. Platelet-Derived Growth Factor activates porcine thecal cell phosphatidylinositol-3-kinase-Akt/PKB and Ras-extracellular signal regulated kinase-1/2 kinase signaling pathways via the Platelet-Derived Growth Factor- $\beta$  receptor. *Endocrinol* 141:1545-1553.
- Themmen, A.P. Huhtaniemi, I.T. 2000. Mutations of gonadotrophins and gonadotrophins receptors: Elucidations the physiology of pituitary-gonadal function. *Endocr Rev* 21: 551–583.
- Tilly, J.L. Kowalski, K.I., Johnson, A.I., Hsueh, A.J.W. 1991. Involvement of apoptosis in ovarian follicular atresia and postovulatory regression. *Endocrinol* 129:2799-2801.
- Tilly, J.L., Billig, H., Kowalski, K.I., Hsueh, A.J.W. 1992. Epidermal growth factor and basic fibroblast growth factor suppress the spontaneous onset of apoptosis in cultured rat ovarian granulosa cells and follicles by a tyrosine kinase-dependent mechanism. *Mol Endocrinol* 6:1942-1950.
- Tilly, J.L., Kowalski, K.I., Schomberg, D.W., Hsue, A.J.W. 1992. Apoptosis in atretic ovarian follicles is associated with selective decreases in messenger ribonucleic acid transcripts for gonadotropin receptor and cytochrome P450 aromatase. *Endocrinol* 131 1670-1676.
- Tilly, J.L., Tilly, K.I., Kenton, M.L., Jonson, A.L. 1995. Expression of members of the Bcl-2 gene family in the immature rat ovary: equine chorionic gonadotropin-mediated inhibition of granulosa cell apoptosis is associated with decreased Bax and constitutive Bcl-2 and Bclx<sub>long</sub> messenger ribonucleic acid levels. *Endocrinol* 136:232-241.

- Tilly, J. L. and Tilly, K. I. 1995. Inhibitors of oxidative stress mimic the ability of follicle-stimulating hormone to suppress apoptosis in cultured rat ovarian follicles. *Endocrinol.* 136:242-252.
- Tilly, J.L. 1996. Apoptosis and ovarian function. *Rev Reprod* 1:162-172.
- Todaro, G.J., Fryling, C., De Larco, J.E. 1980. Transforming growth factors produced by certain human tumor cells: polypeptides that interact with epidermal growth factor receptors. *Proc Natl Acad Sci* 77:5258-5262.
- Torrado, J., Carrascosa, C. 2003. Pharmacological characteristics of parenteral IGF-I administration. *Curr Pharm Biotechnol* 2: 123-40.
- Tran, J., Master, Z., Yu, J.L., Rak, J., Dumont, D.J., Kerbel, R.S. 2002. A role for surviving in chemoresistance of endothelial cells mediated by VEGF. *Proc Natl Acad Sci USA* 99:4349-4354.
- Tsai-Turton, M., Luderer, U. 2005. Gonadotropin regulation of glutamate cysteine ligase catalytic and modifier subunit expression in the rat ovary is subunit and follicle stage-specific. *Am J Physiol* 289:E391-E402.
- Tsai-Turton, T.M. Luderer, U. 2006. Opposing effects of glutathione depletion and follicle-stimulating hormone on reactive oxygen species and apoptosis in cultured preovulatory rat follicles. *Endocrinol* 147(3):1224-36.
- Tsujimoto, Y. 1997. Apoptosis and necrosis-intracellular ATP levels as a determinant for cell death modes. *Cell Death Diff* 4:429-439.
- Van Wagenen, G. Simpson, M.E. 1965. Embryology of the ovary and testis; Homo sapiens and Macaca mulatta. Yale University Press. New Haven. C.T.
- Villavicencio, A., Iñiguez, G., Jonson, M., Gabler, F., Palomino, A., Vega, M. (2002). Regulation of steroid synthesis and apoptosis by insulin-like growth factor I and insulin-like growth factor binding proteins 3 in human corpus luteum during the midluteal phase. *Reprod* 124, 501 -508.
- Wan, G.H., Tsai, S.C., Chiu, D.T. 2002. Decreased blood activity of glucose-6 phosphate dehydrogenase associates with increased risk for diabetes mellitus. *Endocrine* 19, 191-195.
- Wandji, S.A., Srsen, V., Nathanielsz, P.W., Eppig, J.J, Fortune, J.E. 1997. Initiation of growth of baboon primordial follicles *in vitro*. *Hum Reprod* 12:1993–2001.

- Wang, N.T., Braunstein, J., Pang, K., Stuhlmeier, Q.C., Xi, X., Stanton, R.C. 1999. Importance of glucose 6-phosphate dehydrogenase activity for cell growth. *J Biol Chem* 273: 10609 – 10617.
- Wang, Y., Chan, S., Tsang, B.K. 2002. Involvement of inhibitory nuclear factor-KB (NFKB)-independent NFKB activation in the gonadotropin regulation of X-linked inhibitor of apoptosis expression during ovarian follicular development in vitro. *Endocrinol* 143:2732-2740.
- Webb, R., Campbell, B.K., Garverick, H.A., Gong, J.G., Gutierrez, C.G. Armstrong, D.G. 1999. Molecular mechanisms regulating follicular recruitment and selection. *J Reprod Fert Suppl* 54: 33-48.
- Willingham, M.C. 1999. Cytochemical methods for the detection of apoptosis. *J Histochem Cytochem* 47(9):1101-10.
- Woad, K.J., Baxter, G., Hogg, C.O., Bramley, T.A., Webb, R., Armstrong, D.G., 2000. Expression of mRNA encoding insulin-like growth factors I and II and the type 1 IGF receptor in the bovine corpus luteum at defined stages of the oestrous cycle. *J Reprod Fertil* 120(2):293-302.
- Yang, M.Y., Rajamahendran, R. 2000. Involvement of apoptosis in the atresia of nonovulatory dominant follicle during the bovine estrous cycle. *Biol Reprod* 63:1313-1321.
- Yang, M.Y., Rajamahendran, R. 2000. Morphological and biochemical identification of apoptosis in small medium and large bovine follicle and the effects of follicles stimulating hormone and insulin like growth factor I on spontaneous apoptosis in cultured bovine granulosa cell. *Biol Reprod* 62: 1209-1217.
- Yang, Q., Briehl, M., Crowley, C.L., Payne, C.M., Bernstein, H., Bernstein, C. 1999. The NAD<sup>+</sup> precursors, nicotinic acid and nicotinamide upregulate glyceraldehyde-3phosphate dehydrogenase and glucose-6-phosphate dehydrogenase mRNA in Jurkat cells. *Biochem Biophys Res Commun* 255: 133-136.
- Ying, Y., Liu, X.M., Marble, A., Lawson, K.A., Zhao, G.Q. 2000. Requirement of *Bmp8b* for the generation of primordial germ cells in the mouse. *Mol Endocrinol* 14:1053–1063.
- Yoshida, H., Takakura, N., Kataoka, H., Kunisada, T., Okamura, H., Nishikawa, S.I. 1997. Stepwise requirement of c-kit tyrosine kinase in mouse ovarian follicle development. *Dev Biol* 184:122-137.

- Yung, M.C., Vande-Haar, M.J., Fogwell, R.L., Sharma, B.K. 1996. Effect of energy balance and somatotropin on Insulin-like growth factor I in serum and on weight and progesterone of corpus luteum in heifers. *J Anim Sci* 74(9):2239-44.
- Zacks, D.N., Zheng, Q.D., Han, Y., Bakhru, R., Miller, J.W. 2004. FAS-mediated apoptosis and its relation to intrinsic pathway activation in an experimental model of retinal detachment. *Invest Ophthalmol Vis Sci* 45(12):4563-9.
- Zeleznik, A.J., Benyo, D.F. 1994. Control of follicular development, corpus luteum function, and the recognition of pregnancy in higher primates. In: Knobil E, Neill J. *The Physiology of Reproduction*. Raven Press, New York, pp 751–782.
- Zhang, F., Rincon, M., Flavell, R.A., Aune, T.M. 2000. High glucose inhibits glucose 6-phosphate dehydrogenase way cAMP in aortic endothelial cells. *J Immunol* 165: 1762-1770.
- Zhang, F.P., Poutanen, M., Wilbertz, J., Huhtaniemi, I. 2001. Normal prenatal but arrested postnatal sexual development of luteinizing hormone receptor knockout (LuRKO) mice. *Mol Endocrinol* 15:172–183.
- Zheng, J., Fricke, P.M., Reynolds, L.P., Redmer, D.A. 1994. Evaluation of growth, cell death in bovine corpora lutea throughout the estrous cycle. *Biol Reprod* 51(4): 623-32.
- Zumoff, B., Rosenfeld, R.S., Stain, G.W., Levin, J., Fukushima, D.K. 1980. Sex differences in twenty four hours mean plasma concentration of dehydroepiandrosterone (DHEA), and dehydroepiandrosterone sulfate (DHEAS) ratio in normal adults. *J Clin endocrinol Metab* 57:330-333.

## ABREVIATURAS

ACTH.....	Adrenocorticotrópica
AMPC.....	Adenosina monofosfato cíclico
AP.....	Activador del plasminógeno
BMP-4, -6, -7, 8 y -15.....	Proteína morfogénica del hueso-4, -6, -7, 8 y -15
BMPs.....	Proteínas morfogénicas del hueso
CG.....	Células de la granulosa
c-kit.....	Receptor de KL
CL.....	Cuerpo lúteo
COX-2.....	Ciclooxigenasa-2
CT.....	Células de la teca
Cu <sup>2+</sup> .....	Cobre
Cx43.....	Connexin 43
DCF.....	Diclorofluoresceína
DE.....	Desviación estándar
DHEA.....	Dehidroepiandrosterona
E <sub>2</sub> .....	Estradiol
EGF.....	Factor de crecimiento epidermal
ERO.....	Especies reactivas de oxígeno
ERβ.....	Receptor de estrógenos β
Fe <sup>2+</sup> .....	Fierro
FGF.....	Factor de crecimiento de fibroblastos
FGF-7.....	Factor de crecimiento fibroblástico-7
FGFb.....	Factor de crecimiento fibroblástico básico
FSH.....	Hormona folículo estimulante
G6PDH.....	Glucosa-6-fosfato deshidrogenasa
GDF-9.....	Factor de crecimiento diferencial -9
GH.....	Hormona de crecimiento
GnRH.....	Hormona liberadora de gonadotropinas

GSH.....	Glutati3n reducido
GSSG.....	Glutati3n oxidado
H <sub>2</sub> O <sub>2</sub> .....	Per3xido de hidrogeno
hCG.....	Gonadotropina cori3nica humana
HGF.....	Factor de crecimiento de hepatocitos
IGFBP-4.....	Prote3na de uni3n a IGF-4
IGF-I.....	Factor de crecimiento Insulinoide-I
IGF-II.....	Factor de crecimiento Insulinoide-II
IP.....	Ioduro de propidio
KGF.....	Factor de crecimiento de queratinocitos
KL.....	Steel/kit o kit ligando
LF.....	L3quido folicular
LH.....	Hormona lute3nizante
LIF.....	Factor Inhibidor de Leucemia
NADH.....	Nicotinamina adenina dinucle3tido fosfato
NADPH.....	Nicotinamina adenina dinucle3tido fosfato reducido
O <sub>2</sub> <sup>-</sup> .....	Ani3n super3xido
OMI.....	Inhibidor de la maduraci3n del ovocito
P <sub>4</sub> .....	Progesterona
PDGF.....	Factor de crecimiento derivado de plaquetas
PG-E.....	Prostaglandina E
PGF.....	Factor de crecimiento plaquetario
PGF <sub>2</sub> α.....	Prostaglandina F <sub>2</sub> α
PKA.....	Prote3na cinasa A
PMGs.....	C3lulas germinales primordiales
SOD.....	Super3xido dismutasa
TGF-β.....	Factor de crecimiento transformante- β
Ton.....	Tonelada
VEGF.....	Factor de crecimiento del endotelio vascular

## ÍNDICE DE TABLAS

<b>Tabla I.</b> Algunos factores que intervienen en la maduración folicular.....	27
<b>Tabla II A.</b> Clasificación y porcentaje de los folículos obtenidos .....	65
<b>Tabla II B.</b> Porcentaje de folículos sanos y atrésicos.....	65



## ÍNDICE DE FIGURAS

- Figura 1.** Índice de apoptosis. **(A)** Citograma representativo de cada grado de atresia. **(B)** porcentaje de apoptosis en las células de la granulosa (Anexina V<sup>+</sup> y Anexina V<sup>+</sup>/IP<sup>+</sup>), en relación al tamaño y grado de atresia folicular.....67
- Figura 2.** Actividad de G6PDH en células de la granulosa **(A)** y líquido folicular **(B)** en folículos con diferente tamaño (4-6mm y >6mm) y grado de atresia (1, 2 y 3).....69
- Figura 3.** Concentraciones de Glutati3n reducido en células de la granulosa **(A)** y líquido folicular **(B)**, en folículos con diferente tamaño (4-6mm y >6mm) y grado de atresia (1, 2 y 3).....71
- Figura 4.** Producci3n de Especies Reactivas de Oxígeno. **(A)** Histograma representativo de CG incubadas con DCF, en diferente estado de atresia folicular. **(B)** Porcentaje de células de la granulosa positivas a DCF, de acuerdo al grado de atresia.....73
- Figura 5.** Concentraci3n de grupos carbonilos en proteínas de células de la granulosa **(A)** y líquido folicular **(B)**, en folículos con diferente tamaño (4-6mm y >6mm) y grado de atresia (1, 2 y 3).....75
- Figura 6.-** Determinaciones de estradiol, progesterona y DHEA, en folículos pequeños (4-6 mm) y grandes (>6 mm), con diferente grado de atresia (1, 2 y 3).....77