

870106

5

219

---

---

# UNIVERSIDAD AUTONOMA DE GUADALAJARA

Incorporada a la Universidad Nacional Autónoma de México

---

---

ESCUELA DE BIOLOGIA



TESIS CON  
FALSA FE ORIGIN

CONCENTRACION DE CATIONES DIVALENTES Y PROTEINAS  
EN EL LIQUIDO FOLICULAR DE CERDO DURANTE  
LA MADURACION FOLICULAR.

---

---

## TESIS PROFESIONAL

QUE PARA OBTENER EL TITULO DE

B I O L O G O

P R E S E N T A

MARGARITA CONTRERAS MARMOLEJO

GUADALAJARA, JAL. 1988

---

---



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

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

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

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

## I N D I C E

	Pag.
INTRODUCCION. . . . .	1
ANTECEDENTES. . . . .	5
MATERIAL Y METODO. . . . .	35
RESULTADOS. . . . .	39
DISCUSION. . . . .	57
CONCLUSIONES. . . . .	63
RESUMEN. . . . .	65
BIBLIOGRAFIA. . . . .	67

## INTRODUCCIÓN

En mamíferos el desarrollo del folículo ovárico y su diferenciación constituye un proceso altamente integrado y selecto. Esto último evidenciado por las diferentes etapas a través de las cuales se desarrolla el folículo y al hecho de que solamente un número pequeño del total de la población de folículos llegan a un completo desarrollo. La fase terminal del crecimiento folicular se lleva a cabo normalmente en asociación con el proceso ovulatorio y en respuesta a una estimulación de las hormonas gonadotróficas. Los folículos completamente maduros y desarrollados se caracterizan por la presencia de componentes somáticos que recubren al folículo capaces de realizar la esteroidogénesis y la presencia de óvulos cuya división meiótica está detenida en la profase. En base a lo anteriormente expuesto, se puede señalar que los procesos locales interováricos e intrafoliculares juega un papel sumamente importante en la maduración del óvulo y en la diferenciación folicular, sin que en la actualidad se conozcan los mecanismos que gobiernan dichos procesos.

Así mismo, una de las etapas del crecimiento folicular la constituye la acumulación del líquido folicular dentro del folículo ovárico; sin que a la fecha se conozca con exactitud el proceso fisiológico y celular involucrado en dicha acumulación. Sin embargo, se ha descrito que el lí-

quido folicular sufre cambios muy importantes en sus propiedades físicas y químicas que aparentemente son trascendentales para su acumulación en el folículo y por ende, en el proceso del crecimiento folicular.

Es por lo tanto importante que se considere el líquido-folicular como un complejo formado por los componentes del suero y las secreciones sintetizadas por el folículo, por lo cual, el líquido folicular no se puede considerar como un simple trasudado de la sangre como se pensó alguna vez. Este último determinado por el uso de diversos métodos analíticos que han reportado al líquido folicular como una solución cuya composición química es sumamente compleja y en donde algunos compuestos químicos son parecidos en composición y concentración a los reportados en el suero: carbohidratos (Lutwak-Mann 1954), proteínas (Shivers, et al. 1964; McGaughey y Daniel 1972; Pascus, et al. 1971; Manurang-Pangan y Mergé, 1971), lípidos (Zachariae y Jensen, 1958), esteroides - - - (McKerns, 1969, Sommerville, 1969), gonadotropinas (Eshkol, et al. 1970 y Chang, et al. 1975), nucleótidos cíclicos - - (Chang, et al. 1976), glicosaminoglicanos (Zachariae y Jensen, 1958) y iones como sodio, potasio, calcio y magnesio (Shalgi, et al. 1972; Lutwak-Mann 1954; Pascus et al. 1969). En lo tocante a los iones, existen muy pocos estudios que establezcan su concentración; así como su posible participación durante las diferentes etapas del desarrollo folicular. Sin embargo, en el líquido folicular del cerdo se ha reportado -

que en gran parte los iones monovalentes son los que determinan la presión osmótica del folículo, estableciendo que - el potasio está en una concentración de 15.9 mM ( $K^+$ =5.2 mM - en suero y el sodio de 128.4 mM 142.6 mM en el suero). En lo referente a los iones divalentes sólo existen reportes - en los bovinos en donde los valores del líquido folicular - son similares a los del suero (Lutwak-Mann 1954, Pascus y - colaboradores 1969). Curiosamente, en lo que respecta al - calcio, existen numerosos estudios que involucran a este - elemento como un factor esencial durante la maduración fo- llicular y nuclear del ovocito de invertebrados (Steinhardt- et al. 1974, Schuetz 1975, Baker y Whitaker 1978, Gilkey et al. 1978) y de algunos mamíferos (Tsafriri y Bar-Ami 1978, - Leibfried y First 1979, Paleos y Powers 1980, 1981; Sato et al. 1980, Jagiello et al. 1982), cuando la maduración ha si- do inducida a través de la maduración con progesterona. Ade- más, se ha demostrado también que la presencia del calcio - es esencial para el rompimiento de la vesícula germinal, via- bilidad del óvulo y la formación del cuerpo polar en los óvu- los de cerdo y ratón (Paleos y Powers 1980, Sato et al. - - 1980).

Por lo tanto, este trabajo tiene como propósito: A) - Evaluar la relación entre las concentraciones de  $Ca^{++}$ ,  $Mg^{++}$ ,  $Zn^{++}$ ,  $Fe^{++}$  y la de proteínas durante el Statu Quo folicular. B) Elucidar los cambios en  $Ca^{++}$ ,  $Mg^{++}$ ,  $Zn^{++}$ ,  $Fe^{++}$  total du-

rante la maduración folicular y su posible relación al tamaño y volumen folicular. C) Evaluar la relación entre el número de células de la granulosa y el tamaño-volumen folicular.

## ANTECEDENTES.

Chang (1955), hizo estudios en óvulos obtenidos de conejas no apareadas, pseudopreñadas y preñadas, los cuales fueron cultivados en suero diluido de conejo o transferidos a las trompas de falopio de conejas pseudopreñadas, apareadas o inseminadas artificialmente para estudiar la maduración, fertilización o actividad del óvulo de mamíferos.

Se menciona que cuando los óvulos fueron cultivados en el suero diluido de conejas, la maduración nuclear (la formación del primer cuerpo polar), fue observada en la mayoría de los óvulos cultivados sin tener en cuenta el origen del óvulo. El tiempo de maduración fue el mismo que el del óvulo in situ después de la copulación; esto es, se observó la formación de tétradas o el uso de la primera maduración alrededor de 6 horas después del cultivo y la formación del primer cuerpo polar antes de 10 horas de cultivo. Pero cuando los óvulos fueron transferidos a las trompas de conejas no apareadas o pseudopreñadas, la maduración de los óvulos también se llevó a cabo como los del cultivo. La división de los óvulos transferidos fue bastante común (14 - 25%), y un 4% de los óvulos transferidos se desarrollaron como blastocistos partenogenéticos 6 días después y cuando los óvulos mantenidos a 10°C durante un día y transferidos solo el 1% se desarrolló como blastocisto. Cuando los óvu-



los fueron transferidos a las trompas de una coneja apareada alrededor del 35% de los óvulos llegaron a ser fertilizados eventualmente y la fertilización no ocurrió después de haber sido transferidos, más bien después de la formación del primer cuerpo polar. Cuando se transfirieron a las trompas de conejas inseminadas artificialmente, el porcentaje de fertilización fue relativamente bajo (19%), probablemente debido a la carencia de la estimulación de la gonadotropina o al tratamiento con progesterona de las conejas receptoras. La proporción de óvulos fertilizados fue muy alta (81%). Cuando los óvulos fueron cultivados por 12 horas y transferidos, sólo 1 de 39 óvulos de éstos se desarrolló en una cría normal y sólo 2 de 47 óvulos fertilizados y transferidos en conejas apareadas se desarrollaron en crías normales; una gran proporción de óvulos transferidos, los cuales fueron transferidos eventualmente, se desarrollaron en varios estados durante el desarrollo. La adquisición y desaparición de la fertilidad y el factor determinante para el futuro desarrollo normal de óvulos fertilizados son considerados en conjunto como una propiedad fisiológica del ooplasma, mas bien que de la maduración nuclear del óvulo.

En un trabajo en donde se estudió la composición de calcio y proteínas del líquido folicular del cerdo en relación al tamaño del folículo, se encontró que el volumen del líquido folicular y el peso del folículo ovárico disecado -

presentaba una alta correlación; y esta correlación fue usada para determinar el tamaño de los folículos no disecados. También midieron la concentración de sodio, potasio, calcio y proteínas en el líquido folicular; tomado de folículos ováricos de varios tamaños. La concentración mM de los átomos que encontraron en el líquido folicular fue  $\text{Na}^+$  ( $128.4 \pm 4.5$ ),  $\text{K}^+$  ( $15.9 \pm 0.06$ ) y  $\text{Ca}^{++}$  ( $2.34 \pm 0.04$ ). La concentración de proteínas en el líquido folicular fue de 65 mg/ml. Observaron que la concentración de los iones y las proteínas permaneció estable en todos los folículos de diferente tamaño que fueron analizados; aunque todos los componentes presentaron una correlación negativa con el incremento en el tamaño del folículo ovárico. Cuando analizaron la concentración de  $\text{K}^+$  en los folículos más grandes, encontraron la mitad de la concentración de la que se ha observado en los otros folículos. Cuando realizaron un análisis de regresión, éste indicó que la disminución de  $\text{K}^+$  y  $\text{Ca}^{++}$  fueron estadísticamente significativas y cuando los folículos del ovario se incubaron en solución salina fisiológica (NaCl 9%) observaron una pérdida de iones calcio del líquido folicular.

Con estos datos se sugiere que una parte del crecimiento folicular ocurre sin marcadas alteraciones en la concentración de la osmolaridad de los átomos activos de  $\text{Na}^+$  y  $\text{K}^+$ . Sin embargo, ellos también postulan que los niveles elevados de los átomos de potasio en el líquido folicular pueden indicar qué mecanismos de secreción están involucrados en la

acumulación del líquido folicular (Schuetz y Anisowicz, - 1974).

McGaughey (1975) realizó análisis de electroforesis y filtración en gel para comparar la concentración y composición de proteínas en el suero de cerdo en los folículos - - grandes, pequeños y en los folículos de ovarios císticos de cerdo. El resultado de estos análisis señalan que el líquido folicular de los folículos grandes, pequeños y el fluido cístico tuvieron una concentración más baja que el total de proteínas encontradas en el suero. Además, todo el líquido folicular tuvo una concentración más alta de albúmina que - en el suero, encontrándose en mayor cantidad las alfa-globulinas y en menor cantidad las gamma-globulinas y en la mayoría del líquido de los folículos pequeños mostraron una alfa-globulina de migración rápida, la cual estuvo ausente en la mayoría de los folículos grandes que mostraron una alfa-globulina de migración lenta y no se observó en el líquido de la mayoría de los folículos pequeños. También se observó que la maduración del óvulo in vitro ocurrió en un medio que contenía líquido de los folículos pequeños, cuyos óvulos endógenos habían permanecido en el estado de vesícula germinal. En una cantidad del fluido de los folículos grandes que contenían óvulos inmaduros cuando se recuperaron, la maduración de estos óvulos fue totalmente inhibida - - in vitro. Por lo tanto, el líquido de los folículos de cer

do en diferentes estados fisiológicos mostraron diferencias en su patrón de proteínas, el cual puede estar relacionado con la maduración del óvulo.

Para conocer el mecanismo preovulatorio y ovulatorio en la maduración del óvulo, se propone que el estudio de los efectos de las gonadotropinas en el cumulus y en el óvulo o en los folículos completos in vitro ofrecen una buena herramienta para comprender el mecanismo de la maduración del óvulo y la habilidad que tienen los folículos de diferentes tamaños para responder a las gonadotropinas y al proceso de atresia. Además el origen de crías normales de óvulos intrafolliculares maduros in vivo, proporcionaron pruebas que para las técnicas in vitro son valiosas, ya que mantuvo la integridad folicular durante todo el período de cultivo (Thibault et al. 1975).

Chang y colaboradores (1976), estudiaron la composición química del líquido folicular porcino en diferentes estadios de desarrollo del folículo. De los análisis reportados descubrieron que la glucosa aumenta y las concentraciones de fosfatasa alcalina, transaminasa glutámico-oxalacético, fósforo y calcio decrece con la maduración folicular. También reportaron que los triglicéridos, fosfolípidos y colesterol están presentes en menor concentración en el líquido folicular que en el suero y disminuyen su concentración con la maduración del folículo. Además el suero porcino -

contiene lipoproteínas de muy baja y alta densidad; pero so lo estas últimas fueron encontradas en el líquido folicular con una concentración más baja que el total del colesterol presente en el suero. El análisis de las enzimas colesterol éster hidrolasa disminuyó con la maduración folicular siendo 1.0, 0.1 y 0.06 Pmoles/mg proteína/hora para los folículos pequeños, medios y grandes respectivamente, mientras que la actividad de la lecitina-colesterol acetiltransferasa no cambió con la maduración folicular. Por otro lado, la taurina, ácido aspártico y glutámico, asparagina mas glutamina, prolina, glicina, alanina, ácido alfa aminoadípico, cistofna, metionina, tirosina, fenilalanina, lisina, arginina, fosfoetanolamina, treonina, ácido alfa-amino-n-butírico y beta alanina mostraron una disminución progresiva en la concentración con la maduración folicular, pero presentaron una concentración más alta en el líquido folicular que en el suero y sólo la citrulina, ornitina y carnosina tienen una concentración más baja en el líquido folicular que en el suero y por último, también encontraron que las concentraciones del AMPc, progesterona, estrógenos y testosterona tienen un aumento progresivo con la maduración folicular en donde la magnitud del cambio en término del contenido folicular para el estrógeno fue 300 veces para el folículo más grande y para la progesterona 22 veces para el folículo más pequeño.

En el estudio de la maduración en los óvulos de hámster se encontró que cuando los folículos preovulatorios de estos animales fueron cultivados in vitro, los óvulos quedaron en el estado de vesícula germinal y la detención de la maduración fue en parte superada por el lavado de los folículos después de su cultivo o por la adición de LH al medio. El efecto reversible de la LH en óvulos inmaduros fue también inducida en óvulos aislados al cultivarlos con el cumulus oophorus o con el líquido folicular de hámster colectado antes de la maduración y el efecto inhibitorio del líquido folicular no fue especie-específica, ya que la inhibición del efecto reversible de la LH fue solo producida por el líquido folicular de origen bovino. También presentan la evidencia en la que la inhibición es debida a un péptido lábil al calor; con un peso molecular entre 1000 y 10,000 y que la LH tal vez induce la maduración del óvulo actuando sobre el mismo, así que éste ya no es sensible al inhibidor (Gwatkin y Andersen 1976).

En 1977 McGaughey hizo estudios en los óvulos inmaduros de porcino en el estado de vesícula germinal, los cuales fueron cultivados en un medio que contenía ya sea albúmina de suero bovino, polivinilpirrolidona o dextrán T 70 como complemento macromolecular; también cultivó óvulos maduros y desnudos (sin células de la granulosa) en el mismo medio pero con una pequeña cantidad de polivinilpirrolidona. Óvulos maduros y desnudos en una incidencia óptima fueron -

cultivados en un medio con una osmolaridad calculada de 285 mOsm. Los óvulos sufrieron una maduración degenerativa (por ejemplo: óvulos en maduración presentaron una cromatina granular) o una incidencia reducida de maduración en el medio conteniendo concentraciones disminuídas o incrementadas de NaCl o de todas las sales inorgánicas, en relación al medio de control.

Para el estudio del efecto inhibitorio del líquido folicular humano en la maduración de los óvulos de cerdo en cultivo se colectó líquido folicular humano de folículos de 5 - 15 mm. de ovarios por laparotomía, agregando líquido folicular humano o una fracción de bajo peso molecular del mismo medio de cultivo; se encontró que sí inhibió la maduración espontánea del óvulo rodeado de cumulus, de porcino. También se encontró que el líquido folicular humano inhibió la secreción de progesterona por las células del cumulus. En otras especies de mamíferos indican que también en el humano, un inhibidor específico es responsable para mantener al óvulo en una meiosis detenida (Hillensjo y colaboradores 1978).

Van Blerkom y McGaughey (1978) realizaron estudios sobre la maduración del citoplasma y del núcleo cultivado in vitro e in vivo por medio de criterio citogenético y electroforético. Los resultados no solo indican que la maduración in vivo como in vitro son directamente compara---

bles cuando son observados en electroforesis bidimensional en gel de poliacrilamida de alta resolución que (1) ambos - cambios cuantitativos y cualitativos en el patrón de la síntesis de polipéptidos ocurren durante la maduración (2), - que estos patrones son directamente comparados en óvulos - que han sido maduros in vivo o in vitro y (3) que cada estado de maduración está asociado con la aparición de polipéptidos específicos en el patrón autorradiográfico y deducen que las mayores diferencias entre los óvulos maduros bajo - estas dos condiciones son: 1) que varios polipéptidos no - aparecen en la maduración del óvulo in vitro, en el momento que sí son detectados in vivo y 2) que la síntesis de algunos polipéptidos es prolongada in vitro comparado a la maduración del óvulo in vivo.

En el estudio de la composición de los elementos en líquido antral de conejo, se realizaron microanálisis para determinar las concentraciones de  $\text{Na}^+$ ,  $\text{Cl}^+$ ,  $\text{K}^+$ ,  $\text{Ca}^{++}$ ,  $\text{Mg}^{++}$ ,  $\text{S}^{--}$  y  $\text{P}^{4-}$  en muestras de líquido folicular, suero venoso - ovárico y suero venoso periférico obtenido de conejas vírgenes a intervalos de 2 hasta 10 horas después de la inyección de HCG, durante estas 10 horas, la composición de los elementos del líquido folicular fue el mismo que el suero sanguíneo. No obstante, el calcio mostró una significante caída en el líquido folicular en relación a la sangre durante el período de 10 horas y ésto puede estar relacionado con la



bles cuando son observados en electroforesis bidimensional. en gel de poliacrilamida de alta resolución que (1) ambos - cambios cuantitativos y cualitativos en el patrón de la síntesis de polipéptidos ocurren durante la maduración (2), - que estos patrones son directamente comparados en óvulos - que han sido maduros in vivo o in vitro y (3) que cada esta do de maduración está asociado con la aparición de polipép- tidos específicos en el patrón autorradiográfico y deducen- que las mayores diferencias entre los óvulos maduros bajo - estas dos condiciones son: 1) que varios polipéptidos no - aparecen en la maduración del óvulo in vitro, en el momento que sí son detectados in vivo y 2) que la síntesis de algu- nos polipéptidos es prolongada in vitro comparado a la madu ración del óvulo in vivo.

En el estudio de la composición de los elementos en lí quido antral de conejo, se realizaron microanálisis para de terminar las concentraciones de  $\text{Na}^+$ ,  $\text{Cl}^+$ ,  $\text{K}^+$ ,  $\text{Ca}^{++}$ ,  $\text{Mg}^{++}$ ,  $\text{S}^{-}$  y  $\text{P}^{4-}$  en muestras de líquido folicular, suero venoso - ovárico y suero venoso periférico obtenido de conejas vírge nes a intervalos de 2 hasta 10 horas después de la inyección de HCG, durante estas 10 horas, la composición de los ele- mentos del líquido folicular fue el mismo que el suero san- guíneo. No obstante, el calcio mostró una significativa caí da en el líquido folicular en relación a la sangre durante- el período de 10 horas y ésto puede estar relacionado con la

regulación de la maduración del óvulo. También se encontraron diferencias significativas en las concentraciones de  $K^+$  y  $P^{4-}$  entre los folículos del conejo (Burgoyne y colaboradores 1979).

Ainsworth y colaboradores (1980), trataron cerdas prepubertales con 750 UI de gonadotropina de suero de yegua preñada (PMSG) y 72 horas después con 500 UI de gonadotropina coriónica humana (HCG) para inducir el crecimiento folicular y la ovulación. A un grupo de 4 ó 5 cerdas se les practicó laparotomía y 24, 28, 72, 76, 88, 96, 102 ó 108 horas después del tratamiento con PMSG, el líquido folicular fue aspirado de los folículos en crecimiento. En la mayoría de los casos el líquido folicular colectado de cada ovario en cerdas individuales fue juntado y la concentración de estrona ( $E_1$ ), estradiol-17 beta ( $E_2$ ), androstendiona (A), testosterona + 5 alfa-dihidrotestosterona (T+DHT) y progesterona (P) se determinó en cada muestra por radioinmunoensayo. Las concentraciones de A y T+DHT en el líquido folicular permanecieron relativamente constantes durante todo el desarrollo preovulatorio de los folículos de Graaf, la concentración de  $E_1$  y  $E_2$  y P aumentaron hasta las 72 horas después de la administración de PMSG siguiendo el tratamiento con HCG las concentraciones de  $E_1$  y  $E_2$  en el líquido folicular declinaron rápidamente a niveles más bajos de los observados 24 horas después del tratamiento con PMSG y así permanecieron mientras que los niveles de P fueron relativamente

constantes hasta las 30 horas después de que la HCG fue administrada y entonces aumentaron rápidamente. La reanudación de la meiosis evidente a las 16 horas después de la inyección de HCG, coincidió con la disminución de la concentración de estrógeno del líquido folicular. Estos resultados indican que el microambiente de los folículos de Graaf durante el crecimiento y su desarrollo sufrieron una secuencia de cambios ordenados en la concentración de hormonas esteroideas, las cuales parecen estar moduladas por la exposición del folículo en desarrollo al estímulo de las gonadotropinas.

En la determinación del efecto del líquido folicular in vitro, en la maduración de los óvulos de bovinos, el líquido folicular fue colectado de folículos de bovinos de 2- a 5 mm. de diámetro. El medio de cultivo fue la solución salina de Hank's suplementada con 10% de suero fetal de ternera (HBME) y los grupos tratados fueron: HBME, HBME + 50% de suero fetal de ternera y HBME + 50% de líquido folicular de bovino no se observaron diferencias entre los diferentes tratamientos, así es que realizaron un segundo estudio usando líquido de dos diferentes tamaños de folículos de bovino. El medio fue TC-199 con 50% de suero de sangre de bovino o 50% de líquido folicular de folículos de 2 a 5 ó 6 mm de diámetro; nuevamente el líquido folicular no inhibió la maduración de los óvulos de bovino in vitro. Se sabe que el

líquido folicular de porcino no contiene un inhibidor de -  
maduración del óvulo el cual es efectivo en otras especies,  
con éste podría demostrarse que los óvulos de bovino están  
sujetos a la acción del inhibidor de la maduración. Los -  
óvulos de bovino fueron cultivados en el medio HBME + 50%-  
de suero porcino, HBM + 50% de líquido folicular porcino -  
de 5 a 5mm de diámetro. Los óvulos de bovino maduraron -  
normalmente en las tres situaciones. Ni el líquido folicu  
lar de bovino, ni el de porcino inhibieron la maduración -  
espontánea del óvulo de bovino. En el modelo porcino se -  
cree que las células de la granulosa son la fuente del inhi  
bidor de maduración y el medio más efectivo de prevenir la  
reanudación de la meiosis in vivo. Se encontraron porcenta  
jes comparables de la maduración de los óvulos cuando és-  
tos fueron cultivados en el medio solo, o con linfocitos -  
de hígado o células de la granulosa. Las células de la -  
granulosa in vitro no previnieron la reanudación de la me-  
iosis de los óvulos de bovino. En un esfuerzo para aclara  
r las diferencias entre los modelos porcino y bovino, -  
los autores realizaron tres estudios para verificar la ha  
bilidad de los componentes del líquido folicular de porci  
no para inhibir la maduración de los óvulos in vitro. El -  
líquido folicular cuando se encontraba en una concentra---  
ción entre los 50 y 75% en el medio de cultivo, no inhibió  
la reanudación de la meiosis en los óvulos de porcino. Las  
células de la granulosa también fueron efectivas en inhi-

bir la maduración de los óvulos in vitro (Leibfried y First 1980).

Centola y colaboradores (1981), dicen que para determinar el origen del inhibidor de la maduración del óvulo - (OMI), fueron cultivados óvulos de porcino rodeados de cumulus provenientes de folículos medios por dos días; solo en el medio 199 o con fracciones de bajo peso molecular (2000-daltons) del líquido folicular porcino o con extractos de células de la granulosa de folículos antrales pequeños - (1-2mm), medios (3-5mm) y grandes (6-12mm). Además, el complejo cumulus-óvulo fue creciendo en la presencia de la fracción de bajo peso molecular de un medio condicionado de cultivo, con una suspensión de células de la granulosa de folículos medios; el porcentaje de maduración con una porción de bajo peso molecular fue significativamente menor ( $p < 0.001$ ) que la del control. Similarmente la adición de los extractos de las células de la granulosa en una dilución 1:20, tuvo una reducción significativa en el porcentaje de la maduración del óvulo al compararlo con los controles, el porcentaje de maduración después de agregar el medio condicionado fue igualmente reducido ( $p < 0.001$ ). Estos resultados sugieren que las células de la granulosa probablemente sintetiza y secretan al OMI, el cual inhibe la maduración del óvulo in vitro además, parece que el contenido del OMI en las células de la granulosa decrece con los folículos maduros.

Para la identificación de proteínas en la zona pelúcida de cerdo y conejo se aisló la zona pelúcida de óvulos obtenidos de ovarios de porcino y conejas y las proteínas de cada uno fueron comparadas con las del líquido folicular, suero porcino y células ováricas de porcino, (incluyendo granulosa, cuerpo lúteo y células del cumulus). Realizaron pruebas con electroforesis en gel de una dimensión donde demostraron que los pesos moleculares de los componentes importantes de la zona pelúcida de coneja son más grandes que los de la zona pelúcida de porcino, aunque ambos mostraron una microheterogeneidad considerable, presumiblemente debido a los carbohidratos y grupos sulfatos de las proteínas de la zona pelúcida. El método de electroforesis en gel de dos dimensiones fue usada para determinar esta proteína más claramente y para examinar la naturaleza de esta heterogeneidad. Estos estudios de la zona pelúcida de porcino y coneja demostraron que está compuesta de tres proteínas principales, caracterizadas por una marcada heterogeneidad en tamaño y carga. Los aparentes pesos moleculares de la serie de proteínas aumenta en la parte terminal ácida del gel de electroenfoque debido a una alteración del dodecilsulfato de sodio. El peso molecular de las proteínas de la zona pelúcida fueron determinadas por referencia con los estándares de las proteínas del corazón de ratón y la posición del punto isoeléctrico fueron comparadas usando gliceraldehído-3-fosfato deshidrogenasa carbamilada como un estándar inter

no, inmunolectroforesis cruzada de los componentes de la zona pelúcida de porcino separadas por el punto isoeléctrico, demostraron que las proteínas de cada serie de peso molecular son una especie antigénica (Dunbar et al. 1981).

Moor y colaboradores (1981), usaron las hormonas gonadotrópicas individuales para examinar el grado en el cual los cambios en el acoplamiento intercelular entre las células somáticas y las células germinales, inician la maduración meiótica, regulan la síntesis de proteínas o alteran la ultraestructura del óvulo de los bovinos. La hormona foliculo estimulante (FSH 50 ng/ml) suprimió el acoplamiento intercelular en el mismo grado como el observado durante la maduración del óvulo in vivo, pero a una baja concentración de FSH no lo hizo, sin embargo, inició la reanudación de la meiosis. Por lo contrario, la hormona luteinizante (LH - 100-500 ng/ml) invariablemente inició la meiosis en los óvulos cultivados dentro de los folículos, pero no interrumpió el acoplamiento intercelular y concluyen que la maduración nuclear no es dependiente de la interrupción del contacto celular entre el óvulo y las células foliculares que están alrededor. Por otro lado, el perfil de proteínas sintetizada por óvulos no tratados difirió ampliamente de los óvulos maduros por 18 horas en folículos tratados con una combinación de FSH y LH. Los folículos pretratados con FSH o LH a una baja concentración dió como resultado la síntesis de -

un patrón intermedio y más variable de proteínas y no hubo correlación entre el cambio de la síntesis de proteínas y el grado de comunicación entre las células del cumulus y el óvulo. La vesiculación de la membrana y los cambios lisosomales en los procesos transzonales son cambios estructurales tempranos asociados con la supresión del acoplamiento intercelular en el óvulo. Estos cambios en la unión probablemente resulten en la relocalización de los organelos intracelulares en los estadios finales de la maduración del óvulo.

La regulación del tiempo de acoplamiento de las células del cumulus con el óvulo fue correlacionada con la maduración meiótica del óvulo y en la expansión del cumulus oophorus usando ratones inmaduros tratados con gonadotropinas (HCG). Tres horas después de la inyección de una dosis ovulatoria de HCG más del 90% de los óvulos aislados los folículos de Graff más grandes sufrieron el rompimiento de las vesículas germinales indicando que la maduración meiótica del óvulo había sido iniciada. Sin embargo, la no expansión o reducción del acoplamiento intercelular fue detectada en este momento. Seis horas después de la inyección de HCG, el índice de acoplamiento de las células del cumulus con el óvulo no fue menor del que se encontró en el complejo de las células del cumulus con el óvulo aislado del ratón control que no recibió HCG. La expansión del cumulus



a las seis horas post-HCG, fue limitado a las células del cumulus externas, mientras que las adyacentes al óvulo aún estaban fuertemente empaquetadas. La expansión de las células del cumulus fue completa 9 horas después de la HCG y el índice de acoplamiento de las células del cumulus con el óvulo ampliamente reducido. Estos resultados muestran que la maduración meiótica del óvulo en el ratón no es iniciada por una reducción del acoplamiento de las células del cumulus por el óvulo o por la expansión del cumulus. Sin embargo, los resultados sugieren que la reducción del acoplamiento intercelular in vivo puede ser un resultado de la expansión del cumulus (Eppig 1982).

Iwao (1982), estudió los óvulos de sapos Bufo bufo japonicus en varios estadios de maduración inducida con progesterona, que fueron estimulados por punción o tratados con el ionóforo de Ca A23187. Los óvulos estimulados por punción 14 horas después del tratamiento con hormonas sufrieron una respuesta de activación secuencial tales como el desarrollo de una activación potencial, el rompimiento de los gránulos corticales y la formación de un espacio perivitelino semejante a los óvulos maduros (18 horas de tratamiento hormonal), cuando los óvulos fueron puncionados a las 14 horas de tratamiento hormonal tomaron alrededor de 10 minutos para que la señal del acoplamiento de los gránulos corticales se extendiera en toda la superficie del óvulo,

en contraste con el caso de los óvulos maduros tomaron alrededor de 150 sec. El rango en el rompimiento de los gránulos corticales fue significativamente menor en el polo vegetal que en el polo animal en los óvulos maduros e inmaduros. El tratamiento con A23187 (1 micromolar) por 5 minutos indujo una activación potencial y la formación del espacio perivitelino por los óvulos tratados hormonalmente por 10 horas del cual fue 3-4 horas antes de tiempo cuando estas respuestas pudieron ser inducidas por punción. Los óvulos tratados hormonalmente por 8-9 horas también mostraron el rompimiento de los gránulos corticales en respuesta al A23187 pero sin formación de una activación potencial. Varias partes del espacio perivitelino causados por la no propagación del rompimiento de los gránulos corticales fueron observados en óvulos tratados con el ionóforo después de 5-7 horas de tratamiento hormonal. Cuando fue empleada una concentración alta del A23187 (10 micromolar), se indujo el rompimiento de los gránulos corticales sin la formación del espacio perivitelino aún en óvulos a las cero horas de inducción hormonal. Estos resultados indican que la sensibilidad del  $Ca^{++}$  surge como un prerequisite para el rompimiento de los gránulos corticales y el origen de una activación potencial es adquirida para las respectivas respuestas en diferentes estados de maduración del óvulo.

En el estudio de la maduración de óvulos se menciona -

que los avances recientes en microscopía de luz son discutidos con respecto a su aplicación pura en el estudio de la superficie celular; el citoesqueleto y el cambio de los organelos que ocurren durante la maduración meiótica de los óvulos de mamíferos y se consideran tres técnicas: 1) se usan múltiples marcadores fluorocromo en pruebas de inmunocitoquímica o farmacológicas para analizar la disposición espacial y temporal de los componentes celulares en el óvulo fijado en varios estadios de la meiosis, 2) el uso de colorantes fluorescentes vitales para estudiar el movimiento actual de los organelos en el óvulo viviente y 3) el uso de microscopía de intensificación de videoimágenes de células vivientes para el registro de los cambios dinámicos celulares con el aumento de la capacidad óptica de la microscopía de contraste de interferencia diferencial, polarización y fluorescencia; además, se describe un método para la localización simultánea de cromosomas, microtúbulos y F-actín de óvulos fijados de roedores usando Hoechst 33258, anticuerpos de antitubulina y falicidín-NBD respectivamente, también son empleados los colorantes vitales naranja de acridina y el colorante láser Rhodamina 123 para visualizar los lisosomas y mitocondrias respectivamente, en óvulos de rata que sufrieron una maduración meiótica. Finalmente se discute la aplicación de la microscopía de intensificación de videoimágenes para el estudio de los componentes marcados - -

fluorescentemente en lapsos de tiempo con referencia especial en el monitoreo de los organelos celulares para el análisis de los movimientos dinámicos de los constituyentes del óvulo durante la maduración (Albertini 1984).

Eppig y Downs (1984), su objetivo fue estudiar la naturaleza y función de las señales químicas involucradas en la adquisición de competencia para la reanudación de la meiosis y el mantenimiento de la meiosis detenida en los folículos antrales y discuten que algunas evidencias indican que las gonadotropinas no son requeridas para el desarrollo de competencia de los óvulos que sufren una maduración espontánea. Sin embargo, las gonadotropinas pueden promover condiciones óptimas para el desarrollo del óvulo por acción de una vía dependiente de estrógenos en las células foliculares y también se discute la participación del AMPc esteroides y un pequeño factor de la maduración que mantienen la meiosis detenida en el óvulo de mamíferos. No obstante, parece que el AMPc juega un papel crítico en el mantenimiento de la meiosis detenida al actuar sobre las células del cumulus, las de la granulosa y sobre el óvulo. Sin embargo, el AMPc no parece equilibrarse entre las células del cumulus y el óvulo en la relación celular de la granulosa/células del cumulus, el AMPc puede promover la generación y activación de un factor inhibidor de la maduración que es transferido al óvulo. El AMPc del óvulo parece ser

producido por el mismo óvulo y el supuesto factor de inhibición de la maduración puede estar mantenido en una forma activa por un proceso dependiente del AMPc en el óvulo. Alternativamente, el supuesto factor de inhibición de la maduración puede jugar un papel en el mantenimiento de los niveles del AMPc en el óvulo. Algunas hormonas esteroideas actúan sinérgicamente con un proceso dependiente del AMPc en el mantenimiento de la meiosis detenida.

Se llevó a cabo un estudio del efecto del ion calcio en la maduración folicular de óvulos rodeados de cumulus de cerdo; para lo cual los óvulos de tamaño medio (3- 5 mm de diámetro se cultivaron en la solución balanceada de Hank's (modificada); en donde el piruvato, lactato y glucosa fueron agregados como fuente de energía y la albúmina de suero de bovino al 0.4% como fuente proteica. Estos óvulos fueron cultivados a 37°C durante 42 horas en una atmósfera de CO<sub>2</sub> al 5%. En este medio los óvulos de porcino sufrieron una maduración del 80 al 90%, después de las 42 horas de cultivo. También se cultivaron óvulos en la solución de Hank's con varias cantidades de CaCl<sub>2</sub>, así como la presencia de verapamil, un bloqueador del canal de calcio y el cationóforo divalente A23187. En este procedimiento se encontró que la mínima concentración de calcio requerida para la maduración del óvulo fue alrededor de 0.0265 - 0.053 mM, esta concentración de calcio se mantuvo en el medio -

hasta la metafase II. Si el calcio fuera omitido durante las últimas 4 horas de cultivo, los cromosomas de la metafase II aparecerían extremadamente condensados o degenerados. El verapamil a una concentración de 0.2 mM, inhibió el rompimiento de las vesículas germinales o resultaron de generadas, mientras que la mínima concentración no afectó la maduración del óvulo; por lo tanto, a una concentración de 0.02 mM de verapamil no afectó la maduración del óvulo rodeado de cumulus, pero sí inhibió la maduración del óvulo desnudo. Por otro lado, a una concentración más pequeña de  $3.8 \times 10^{-7}$  M. del cationóforo divalente no inhibió la maduración del óvulo y sugiere que para mantener al óvulo en un estado no degenerado, también se requiere la constante presencia del calcio en el medio de cultivo (Bae y Channing 1985).

Foxcroft y Hunter (1985) proponen que el cerdo es un animal excelente para realizar estudios sobre el control de la foliculogénesis y especies polítoicas y particularmente para examinar la interrelación entre los folículos del mismo animal. El reestablecimiento de los folículos ocurre en los días 14 y 16 del ciclo estral. El crecimiento de los folículos seleccionados por ovulación está asociado con una rápida atresia de los folículos más pequeños y un bloqueo a su substitución en el grupo en proliferación. Sin embargo, hay un considerable rango en el desa

rollo morfológico y bioquímico de los folículos dominantes en la fase folicular temprana, sugiriendo que los grupos son reestablecidos en diferentes estados de desarrollo o que el reestablecimiento continúa hasta la fase folicular. Una relación significativa y predecible ha sido establecida entre el diámetro folicular y el volumen del fluido folicular y una comparación de estas dos características demuestra un incremento gradual en el volumen del tejido folicular como una proporción del volumen total. El crecimiento de los folículos de 2 a 4 mm está asociado con un incremento proporcional en el número de células de la granulosa, pero arriba de 4 mm la relación es muy variable aún en folículos seleccionados que son esteroidogénicamente activos. Por ello, el número de células de la granulosa no puede ser usado como un indicador de atresia en los folículos de cerdo. Por otro lado, los receptores de LH están presentes en el tejido tecal durante todo el desarrollo; alcanzando el nivel máximo en el día 20 del ciclo estral y declinando en el día 21. Las células de la granulosa poseen receptores para LH solo en los estados tardíos de maduración y otra vez éstos son máximos en el día 20. El patrón de esteroidogénesis en los folículos de cerdo es consistente con la teoría de dos células de la esteroidogénesis en que el andrógeno producido por la teca es aromatizado a estrógeno por células de la granulosa. Sin embargo, a diferencia de muchas especies, la teca del cerdo también produce estradiol en

cantidades comparables a las secretadas por la granulosa.- En el desarrollo morfológico la población seleccionada de folículos preovulatorios muestra un rango considerable del desarrollo bioquímico y los folículos de tamaño idéntico - pueden mostrar gran disimilaridad en la concentración de - esteroides en el líquido folicular y enlaces para LH y la - disponibilidad de los andrógenos más que la actividad de - la aromatasu puede ser el factor limitante para la esteroi - dogénesis. También hay varios factores no esteroidales, - los cuales han sido aislados de tejido porcino y juegan un papel en la maduración folicular. Aunque las gonadotropi - nas exógenas son efectivas para promover el desarrollo fo - licular, otros factores intra o extraováricos pueden origi - nar un límite folicular sensible a las gonadotropinas. Fi - nalmente sugieren que la relación interfolicular en anima - les politocos puede diferir a los monotocos; y en el cerdo los folículos dominantes pueden promover la maduración de - los folículos pequeños en diferencia a su efecto inhibito - rio en otras especies. Esto también puede ser llevado a - cabo por estrógenos secretados por los folículos dominan - tes pasando a la arteria ovárica vía un mecanismo de inter - cambio o contracorriente sub-ovárica.

Se examinó el papel del calcio en la ovulación in vi - tro en ovarios perfundidos de conejas con el ácido n,n'-te traacético etilenglicol-bis(beta-aminoetil-éter). En este



trabajo se estudiaron dos grupos de conejas: en el primer grupo se usó el hidrocioruro de verapamil  $10^{-4}$  mol/L, un - bloqueador del canal de calcio junto con gonadotropina coriónica humana (50 UI) en el medio. En donde el verapamil no tuvo efecto aparente sobre la gonadotropina coriónica humana que induce la ovulación. Pero el tratamiento con verapamil sin embargo redujo significativamente el porcentaje de ovulación (68.8%), en comparación con los producidos en ovarios control tratados con gonadotropina coriónica humana (95%). En el segundo grupo experimental, el ácido etilenglicol bis (beta-aminoetil éter) n,n'-tetraacético (2 mmol/L.) y un quelador del ion calcio fueron inducidos en el medio con gonadotropina, este ácido redujo significativamente la eficiencia ovulatoria (16.7%  $\pm$  9.43%) en comparación a los controles que solo tenían gonadotropina coriónica humana (79.5%  $\pm$  11.11%), además la ovulación - - ocurrió en un tiempo temprano en los ovarios perfundidos con el ácido etilenglicol bis-(beta-aminoetil éter)n,n'-tetraacético; sin embargo, 4 ovulaciones ocurrieron en estos ovarios y los óvulos fueron inmaduros, éstos probablemente reflejan el tiempo temprano de ovulación; también el verapamil y el ácido etilenglicol bis (beta-aminoetil éter)- - n,n'-tetraacético bloquearon las contracciones del músculo liso del ovario durante la perfusión del óvulo. Estos datos mantienen el concepto de que la dinámica del calcio influye en el proceso de ovulación y la maduración del óvulo.

Además, las contracciones del músculo liso del ovario no parecen ser esenciales para la ovulación de este modelo (Kittai y colaboradores 1985).

Capony y colaboradores (1986), investigaron los cambios en el grado de fosforilación de las proteínas y su posible correlación con los cambios en la actividad del factor promovedor de la maduración (MPF) a través de la maduración meiótica y con la consiguiente activación de los óvulos de antibios y estrellas de mar. A pesar de varias excepciones en el patrón de la fosforilación de las proteínas individuales, se encontraron niveles altos y bajos en la fosforilación de proteínas para ser correlacionados con los niveles altos y bajos de la actividad del factor promovedor de la maduración. Se encontró que el grado de fosforilación de las proteínas y la actividad del factor promovedor de la maduración disminuye en la actividad partenogenética y más tarde en el ciclo sincrónico de los antibios. Por el contrario, no se observó disminución en la actividad del MPF ni en el grado de fosforilación de las proteínas en la activación de los óvulos de la estrella de mar con el inóforo A23187. Esto sugiere que los cambios en la fosforilación de las proteínas y la actividad del MPF están más bien relacionados con la progresión del ciclo celular que con la activación de reacciones dependientes del calcio. En los antibios la actividad de la proteína-quinasa en homogenados se encontró que disminuye con la actividad del MPF en la acti-

vación. Los cambios de la relación de la serina también fue investigado durante el curso de la maduración meiótica en los óvulos de anfibios y de estrella de mar. Los cambios en la actividad del MPF se encontraron ser mejor correlacionados con los cambios de treonina que con la fosforilación de la serina.

El efecto del calcio en la acumulación de la progesterona y la maduración del óvulo en folículos cultivados de Rana pipens fue estudiado y se encontró que el homogenizado de la pituitaria de la rana provoca una cascada de respuestas en el folículo ovárico de anfibios, culminando en la biosíntesis de la progesterona y en la maduración del óvulo. Propone que el calcio podría jugar un papel importante como segundo mensajero intracelular en la regulación de estas respuestas fisiológicas. Realizaron cultivos de folículos aislados de Rana pipens para valorar el efecto del calcio extracelular en la acumulación de progesterona-folicular y la maduración del óvulo. Encontraron que un aumento del calcio extracelular de los folículos hormonalmente no estimulados producen un aumento significativo de la progesterona en los extractos metanólicos de los folículos después de 4 horas de cultivo y en algunos casos también provocó la maduración del óvulo después de 24 horas de cultivo. En ningún caso se elevó la concentración del calcio, sólo se estimuló la acumulación máxima de progesterona cuando se comparó con los folículos estimulados con -

homogenado de pituitaria. El ionóforo de calcio A23187 - igualmente aumentó la acumulación de la progesterona a una manera de dosis-dependiente cuando se introdujo (anfibios) en Ringer's (1.35 mM  $Ca^{++}$ ) pero inhibió la elevación de la progesterona causada por el incremento de la concentración de calcio en el medio de cultivo y por la estimulación con homogenados de pituitaria. La disminución del calcio libre del medio de cultivo con dosis graduales del quelador-EGTA, disminuyó la acumulación de progesterona inducida - por homogenados de pituitaria e inhibió la maduración de - los óvulos inducida por homogenados de pituitaria y por - progesterona. El verapamil bloqueador del calcio, también inhibió la acumulación de progesterona y la maduración del óvulo inducida por el homogenado de la pituitaria a manera de dosis-dependiente, mientras que no tiene efecto en la - reiniciación de la meiosis inducida por progesterona. Estos datos implican que los niveles intracelulares de calcio regulan la producción de progesterona por las células-foliculares del ovario y la subsecuente maduración del óvulo (Kleis - San Francisco y Schuetz 1986).

Ford y La Barbera (1987) encontraron que el  $Mg^{2+}$  aumenta la fijación de la hormona foliculo estimulante a los receptores unidos a la membrana, también aumenta la actividad de la adenil ciclasa. Ellos examinaron el efecto de - los iones mono y divalentes en la fijación de la FSH a los receptores en células de la granulosa en los folículos in-

maduros de porcino y encontraron que los cationes divalentes y monovalentes aumenta la fijación del ( $^{125}\text{I}$ ) iodo-porcino FSH ( $^{125}\text{I}_p$  FSH), pero los cationes divalentes  $\text{Mg}^{2+}$ ,  $\text{Ca}^{2+}$  y  $\text{Mn}^{2+}$  aumentan la fijación específica a un máximo de 45 veces a una concentración de 10 mM. El  $\text{Mg}^{2+}$  causó la fijación a una concentración de 0.6 mM; mientras que el Calcio y el Magnesio su mitad máxima efectiva fue a una concentración de 0.7 mM y 0.8 mM respectivamente y el catión monovalente Potasio aumentó la fijación a un máximo de 1.5 veces a una concentración de 50 mM, mientras que para el Sodio no aumentó la fijación a ninguna concentración probada. La diferencia entre Potasio y Sodio tuvo un efecto negativo que suprime su efecto positivo. Por otro lado el Acido etilen diamino tetra-acético un quelador de Magnesio inhibió la fijación del  $^{125}\text{I}_p$  FSH solo en la presencia de Magnesio, mientras que el suero gonadotrópico de hembra preñada; un competidor de FSH para el receptor inhibieron la fijación en ausencia y presencia del Magnesio. El guanil-5' ilimidofosfato ( $\text{G}_{pp}(\text{NH})_p$ ) inhibió la fijación de  $^{125}\text{I}_p$  FSH en ausencia o presencia de Magnesio, pero solo a concentraciones mayores de 1 mM. También usaron Magnesio para determinar si los cationes divalentes aumentaron la fijación de FSH para aumentar la afinidad de los receptores o por el incremento aparente del número de los sitios de enlace; pero el Magnesio no aumentó los enlaces  $^{125}\text{I}_p$  FSH por la alteración del rango de asociación y diso-

ciación, por lo tanto el equilibrio de saturación de los -  
enlaces estudiados indicaron que el Magnesio aumentó la fi  
jación de  $^{125}\text{I}_p$  FSH por el aumento en el número aparente -  
de los sitios de unión.

## MATERIAL Y METODO

### OBTENCION DE LAS MUESTRAS BIOLOGICAS

Los ovarios de cerdo se obtuvieron inmediatamente después de sacrificar a los animales en el Rastro Municipal de la Ciudad de Guadalajara, se colocaron en hielo y se transportaron hasta el laboratorio.

Cada ovario se pesó con una balanza granataria, se le midió largo, ancho y el diámetro de cada folículo con un vernier. Se les extrajo el líquido folicular midiéndolo con una microjeringa; a cada muestra se le agregó 1 ml de NaCl al 0.9%, colocándola en tubos de ensayo previamente tratados con ácido nítrico 3 M y silicón al 1%. Los folículos opacos y hemorrágicos fueron desechados. Las muestras fueron centrifugadas a 3 000 rpm durante 15 minutos, para separar el líquido folicular de las células de la granulosa, estas últimas fueron resuspendidas en 0.1 ml de la solución de NaCl al 0.9% para determinar su número en cada folículo.

DETERMINACION DE PROTEINAS EN EL LIQUIDO FOLICULAR SEGUN EL METODO LOWRY ET AL. (1951).

Esta determinación está basada en la reacción de oxidoreducción del complejo formado entre los residuos triptófa-

no-tirosina y los iones de  $\text{Cu}^{++}$  con el reactivo de folin - (ácido fosfomolibdicofosfotúngstico), que desarrolla un color azul que es directamente proporcional a la concentración de proteínas.

Se prepara una curva patrón de la solución de albúmina (500 microgramos/ml), con concentraciones de 0 a 50 microgramos en 200 microlitros del amortiguador de carbonatos - 0.2 M pH 10.1. Para la determinación de proteínas en el líquido folicular, se midieron diferentes alícuotas y se diluyeron en 200 microlitros con la solución amortiguadora de carbonatos 0.2 M pH 10.1 añadiendo 1 ml. del reactivo - "C" ( $\text{NaCO}_3$  al 2% y  $\text{NaOH}$  0.1N,  $\text{CuSO}_4$  0.01% y tartrato de sodio y potasio al 0.02% preparada recientemente), se agita la muestra y se adiciona 100 microlitros del reactivo - de folin 1 N. dejando reposar en la obscuridad por 30 minutos y por último se lee a 750 nm. en el espectofotómetro - (Coleman Junior IIA).

#### DETERMINACION DEL NUMERO DE CELULAS DE LA GRANULOSA

La cuantificación del número de células de la granulosa se llevó a cabo por el método propuesto por Belsey et al. (1980), que consiste en el uso de la cámara de Neubauer y la micropipeta para glóbulos blancos, con esta última se aspira la suspensión celular problema de volumen conocido hasta el aforo I y se completa hasta el aforo II



con la solución diluyente (violeta de genciana al 0.01% en ácido acético glacial al 2%). La pipeta se agita perfectamente con el objeto de homogenizar las células y se desechan las tres primeras gotas. La cámara del hemocitómetro se llena con la suspensión celular y se deja reposar de 5 a 10 minutos. El número de células se determina contando 5 cuadros de los 25 de la cuadrícula central de la cámara de Neubauer. El resultado final se multiplica por 10, ya que es la dilución de las células en la pipeta, por 5 debido a que se contó solo la quinta parte de la cuadrícula y por 10 000 ya que el volumen de la cámara es de  $10^{-4}$  ml., así se obtiene el número de células de la granulosa, expresada en millones por mililitro en la suspensión celular - problema.

#### DETERMINACION DE LA CONCENTRACION DE LOS IONES $Ca^{++}$ , $Fe^{++}$ , $Mg^{++}$ y $Zn^{++}$ EN EL LIQUIDO FOLICULAR POR ESPECTROFOTOMETRIA DE ABSORCION ATOMICA.

Las mediciones espectrofotométricas cuantitativas se basan en que la energía de absorción de la luz en cualquier longitud de onda depende solo de la concentración del material absorbente y la longitud del paso de la luz a través del medio absorbente.

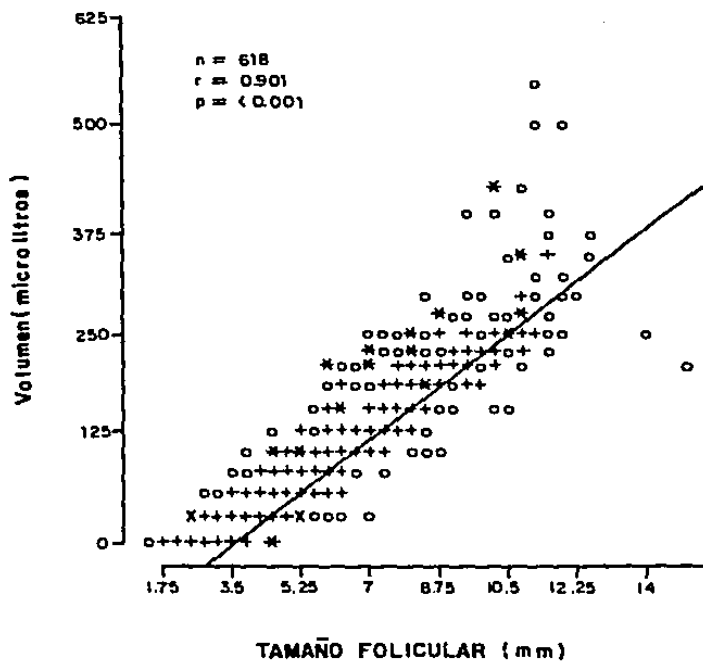
Para la determinación de los iones se prepara una curva patrón de cada una de las siguientes soluciones:  $CaCO_3$  -

(500 microgramos/ml),  $Mg^{++}$  (1 microgramo/ml),  $Fe^{++}$  (500 - - mg/ml) y  $Z^{++}$  (20 mg/100 ml) con concentraciones de 0 a 1, - 0 a 5, 0 a 1 y 0 a 1 ppm respectivamente, y para la determi nación de estos iones en el líquido folicular se diluyeron las muestras con agua desionizada y se tomó una alícuota de 1 ml para leerse en el espectrofotómetro de absorción atómi ca (Perkin-Elmer 403, al mismo tiempo se leyeron las curvas patrón de cada ión empleando lámparas de cátodo hueco para  $Ca^{++}$ ,  $Fe^{++}$ ,  $Mg^{++}$  y  $Zn^{++}$  (Perkin-Elmer).

## RESULTADOS

El líquido folicular (L.F.) fue colectado de 702 folículos provenientes de 72 ovarios y de 36 animales para ser analizados en lo referente al tamaño, volumen, proteínas y concentración de iones divalentes. El tamaño de los folículos fue en el rango de 1 mm a 12 mm de diámetro con un promedio de  $6.49 \pm 2.55$  mm de diámetro, mientras que el promedio del volumen folicular fue de  $124.8 \pm 97.4$  microlitros. Dentro de cada uno de los ovarios de donde se pudo colectar el fluido folicular se pudo observar que por lo general los folículos fueron de un tamaño uniforme, prevaleciendo folículos preovulatorios de tamaño grande. Sin embargo, todos los ovarios contenían también numerosos folículos vesiculares pequeños de los cuales no fue posible colectar muestras adecuadas de líquido folicular. El análisis estadístico de muestra que la correlación entre el tamaño y el volumen folicular es positiva y altamente significativa ( $r = 0.903$ ;  $p < 0.001$ ) (Fig. 1).

De los 580 casos estudiados el promedio de la concentración expresada en miligramos por mililitro de L.F. para proteínas y en microgramos del ion por mililitro de L.F. se obtuvieron los siguientes valores:  $63.6 \pm 46.8$  proteína;  $74.2 \pm 77.6$  calcio;  $26.0 \pm 17.9$  magnesio;  $4.13 \pm 6.0$  fierro y  $3.2 \pm 7.6$  para zinc.



La relación entre el tamaño folicular y la concentración de iones en el líquido folicular fue examinado de acuerdo a dos modalidades: a) Examinando en conjunto los 580 casos y b) examinando los 580 casos después de agruparlos en 3 grupos de acuerdo al tamaño folicular; 1 - 3 mm, 3.1 - 6.0 mm y 6.1 - 12.0 mm de diámetro (Tabla 1). En el primer caso el análisis estadístico de los 580 casos en conjunto demuestra una correlación logarítmica negativa y altamente significativa. Resaltando el hecho de que el  $Fe^{++}$  ( $r = -0.684$ ;  $p < 0.001$ ) tiene la correlación más alta entre los iones, mientras que el  $Ca^{++}$  ( $r = -0.406$ ;  $p < 0.001$ ) la menor (Tabla 2).

Al analizar la segunda modalidad en la cual los 580 casos se dividieron en 11 clases diferentes de acuerdo a su tamaño por rangos y éstos a su vez se agruparon en 3 diferentes categorías (Tabla 1) donde se pudieron observar fluctuaciones tanto en las concentraciones de proteínas como en la de los iones, destacando el hecho de que las concentraciones mayores se encontraron presentes en los folículos de menor tamaño (1 - 3 mm de diámetro)  $Ca^{++}$  205.10  $\pm$  184.25;  $Mg^{++}$  59.17  $\pm$  32.54;  $Fe^{++}$  16.71  $\pm$  11.95;  $Zn^{++}$  17.35  $\pm$  19.47 y proteínas 106.57  $\pm$  96.32 microgramos/ml de L.F. (Tabla 3). En cambio, en los folículos medianos (3.1 a 6.0 mm de diámetro) disminuyen dichas concentraciones para estabilizarse posteriormente en los folículos grandes (6.1 a 12 mm de diámetro) en donde la concentra---

TABLE 1

CONCENTRACION DE IONES DEVALIANTES Y PROTEINA EN EL LIQUIDO FOLICULAR DEL UTERO.

RANGOS (mm)	CALCIO	MAGNESIO	hierro	ZINC	PROTEINA
1.1 - 2.0	364.8 ± 236.3 (13)	82.5 ± 16.9 (13)	26.9 ± 15.0 (13)	29.7 ± 18.1 (13)	110.1 ± 127.3 (13)
2.1 - 3.0	356.4 ± 131.5 (41)	51.7 ± 27.6 (41)	11.4 ± 8.7 (41)	11.4 ± 18.4 (41)	105.4 ± 86.1 (41)
3.1 - 4.0	81.5 ± 50.7 (64)	32.3 ± 15.6 (64)	7.1 ± 4.5 (64)	3.6 ± 2.9 (64)	83.9 ± 66.3 (65)
4.1 - 5.0	57.1 ± 25.4 (82)	25.7 ± 12.3 (82)	3.8 ± 2.9 (82)	2.5 ± 2.1 (82)	65.5 ± 38.7 (82)
5.1 - 6.0	71.1 ± 59.3 (74)	22.9 ± 16.1 (74)	7.1 ± 3.3 (75)	1.4 ± 1.1 (75)	57.9 ± 33.5 (76)
6.1 - 7.0	61.3 ± 34.0 (74)	20.7 ± 10.3 (74)	1.9 ± 1.5 (75)	1.1 ± 0.7 (75)	49.4 ± 18.9 (75)
7.1 - 8.0	60.8 ± 30.5 (84)	18.9 ± 5.9 (85)	1.7 ± 0.7 (86)	0.9 ± 0.4 (85)	54.8 ± 18.9 (88)
8.1 - 9.0	47.3 ± 25.4 (58)	19.7 ± 6.8 (58)	1.8 ± 0.6 (58)	1.1 ± 0.5 (57)	51.6 ± 19.6 (59)
9.1 - 10.0	47.6 ± 25.1 (55)	20.5 ± 8.5 (55)	2.1 ± 0.5 (56)	1.1 ± 0.4 (55)	50.7 ± 31.3 (57)
10.1 - 11.0	56.2 ± 16.5 (32)	20.7 ± 7.0 (32)	1.9 ± 0.4 (33)	1.3 ± 0.5 (33)	53.6 ± 12.8 (33)
11.1 - 12.0	57.3 ± 20.4 (19)	19.4 ± 6.6 (19)	1.5 ± 0.6 (19)	1.3 ± 0.4 (19)	47.0 ± 16.8 (19)

Los datos expresan el promedio ± la desviación estándar del número de casos indicados en el paréntesis. La concentración de iones está expresada en microgramos y la de proteínas en miligramos por mililitro de líquido folicular. El tamaño folicular está expresado en milímetros y por rangos.

T A B L A 2

CORRELACIONES LOGARITHICAS ENTRE LOS IONES DIVALENTES Y EL TAMAÑO FOLICULAR, VOLUMEN FOLICULAR, PROTEINAS Y NUMERO DE CELULAS DE LA GRANULOSA. LOS DATOS REPRESENTAN LOS VALORES ( $r$ ) ENTRE CADA UNO DE LOS PARAMETROS ESTUDIADOS.

	CALCIO	FIERRO	ZINC	MAGNESIO
TAMAÑO FOLICULAR	- 0.4059**	- 0.6841**	- 0.6268**	- 0.5185
VOLUMEN FOLICULAR	- 0.4638**	- 0.7819**	- 0.7404**	- 0.6339**
PROTEINA (mg/ml L.F.)	0.2063**	0.3563**	0.3877**	0.4211**
NUMERO DE CELULAS DE LA GRANULOSA	0.0535	0.027	0.0494	0.0626

\*\* Significancia  $p < 0.001$

T A B L A 3.

GRUPOS FOLICULARES DE ACUERDO AL TAMAÑO FOLICULAR,  
A LAS CONCENTRACIONES DE IONES Y PROTEINAS.

Los datos expresan el promedio  $\pm$  la desviación estándar de las concentraciones de iones (microgramos/mililitro de líquido folicular) y proteínas (mg/ml de líquido folicular). El número de casos está indicado en el parentesis.

TAMAÑO FOLICULAR (mm)	CALCIO	MAGNESIO	FIERRO	ZINC	PROTEINA
1.1 - 3.0	205.09 $\pm$ 184.25 <sup>a</sup> (54)	59.17 $\pm$ 32.54 <sup>b</sup> (54)	16.71 $\pm$ 11.95 <sup>c</sup> (54)	17.34 $\pm$ 19.47 <sup>d</sup> (54)	106.57 $\pm$ 96.33 <sup>e</sup> (54)
3.1 - 6.0	68.98 $\pm$ 47.51 <sup>a</sup> (220)	26.74 $\pm$ 15.11 <sup>b</sup> (220)	4.25 $\pm$ 3.70 <sup>c</sup> (221)	2.48 $\pm$ 2.29 <sup>d</sup> (221)	68.32 $\pm$ 47.12 <sup>e</sup> (223)
6.1 - 12.0	55.79 $\pm$ 28.56 <sup>a</sup> (322)	19.94 $\pm$ 7.86 <sup>b</sup> (323)	1.87 $\pm$ 0.93 <sup>c</sup> (327)	1.15 $\pm$ 0.53 <sup>d</sup> (324)	52.93 $\pm$ 21.38 <sup>e</sup> (331)

a, b, c, d, e. Los datos en cada columna (promedio  $\pm$  desviación estándar) indican una diferencia significativa ( $p < 0.001$ ) cuando son comparados con el mismo carácter sobrescrito (prueba-t no pareada).



ción de calcio  $55.7 \pm 29.3$ ; magnesio  $19.9 \pm 7.9$  fueron 3 veces menores que la de los folículos chicos, mientras que para los casos de  $Fe^{++}$   $1.89 \pm 0.9$  y  $Zn^{++}$   $1.14 \pm 0.5$  fue de 9 a 15 veces menor respectivamente. En el caso de las proteínas fue de  $52.93 \pm 21.38$  que es 2 veces menos que los folículos pequeños (Tabla 3).

Al realizar el análisis estadístico en cada uno de los grupos formados se demuestra que el primer grupo (1 - 3 mm) las correlaciones entre los iones versus el tamaño folicular que se obtiene son iguales que a los de la primera modalidad (conjunto de 580 casos) en ser negativa y altamente significativa, situación que conforme aumenta el tamaño del folículo, la correlación disminuye hasta que por último, en el grupo de folículos grandes (6.1 - 12.0 mm) prácticamente no existe correlación ni significancia alguna (Tabla 4). Esto último también es válido para el número de células de la granulosa y la concentración de proteínas (Tabla 4). Resultados que corroboran la no participación de los iones en el crecimiento y aumento del volumen folicular. Sin embargo, nos permite observar que en los folículos de menor tamaño (1 - 3.0 mm) la concentración de los iones estudiados es alta para disminuir en los folículos medianos y estabilizarse en los folículos de 6.1 mm en adelante (Tabla 1).

Con el objeto de dilucidar si entre los iones estudia-

TABLA 4.  
 CORRELACIONES ENTRE IONES Y TAMAÑO FOLICULAR,  
 PROTEINAS Y NUMERO DE CELULAS DE LA GRANULOSA  
 DE CADA UNO DE LOS GRUPOS FOLICULARES.

Los datos representan los valores de (r) entre  
 cada uno de los parámetros estudiados.

GRUPOS FOLICULARES		CALCIO	MAGNESIO	FIERRO	ZINC
I 1.1-3.0 mm (54)	TAMAÑO FOLICULAR	- 0.5713**	- 0.5002**	- 0.5940**	- 0.6164**
	PROTEINA (mg/ml L.F.)	0.2031	0.2030	0.1182	0.0374
	NUMERO CELULAS DE LA GRANULOSA	- 0.2031	- 0.3415*	- 0.3397*	- 0.1050
II 3.1-6.0 mm (221)	TAMAÑO FOLICULAR	- 0.1391	- 0.3044**	- 0.5396**	- 0.3752**
	PROTEINA (mg/ml L.F.)	0.1448	0.4780**	0.4363**	0.3810**
	NUMERO CELULAS DE LA GRANULOSA	0.2416**	- 0.0148	0.0023	- 0.0166
III 6.1-12.0 mm (330)	TAMAÑO FOLICULAR	- 0.1170	- 0.0208	0.0043	0.1465*
	PROTEINA (mg/ml L.F.)	0.0261	0.1756**	0.0422	0.1880**
	NUMERO CELULAS DE LA GRANULOSA	0.1976**	0.0333	0.2369**	0.0439

\* Significancia  $p < 0.001$

\*\* Significancia  $p < 0.001$

dos existe un efecto sinérgico que pudiera influir tanto en el desarrollo folicular como en el aumento del volumen, se estudió en ambas modalidades la posible correlación entre cada uno de ellos (Tabla 5), así como la correlación entre el índice ion/ion contra el tamaño y el volumen folicular (datos no presentados). El análisis estadístico en la modalidad del conjunto de casos (600) entre los iones demostró una correlación positiva y altamente significativa entre cada uno de los iones estudiados, v.gg.  $Fe^{++}/Mg^{++}$  ( $r = 0.7905$   $p < 0.001$ ) (Tabla 5). Sin embargo, podría considerarse que los valores más altos de todas las correlaciones se observan en el caso del hierro con los demás iones (Fig. 2,3,4), aunque prácticamente exista el mismo valor en todos los casos (Tabla 5). Esto último a pesar de que las concentraciones de hierro y zinc sean menores (3-12 veces) que las de calcio y magnesio. Cuando el análisis estadístico se realiza de acuerdo a la segunda modalidad (por grupos) se puede observar que el grupo donde existen correlaciones altas, positivas y altamente significativas ( $Fe^{++}/Mg^{++}$   $r = 0.8529$ ;  $p < 0.001$ ) es en el grupo de folículos pequeños para disminuir en el grupo de folículos medios (3.1 - 6.0 mm) y desaparecer en los folículos grandes (6.1 - 12 mm) (datos no presentados). En relación a los resultados obtenidos en las correlaciones entre el índice de ion/ion versus el tamaño y volumen folicular tampoco se obtuvo correlación alguna (datos no presentados), lo cual nos permite asegurar que -

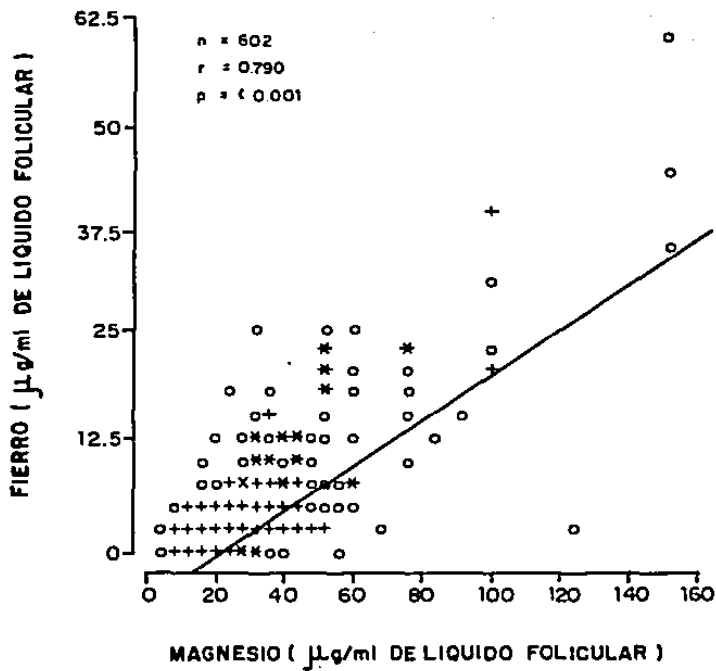
T A B L A 5.

## CORRELACIONES ENTRE CALCIO Y FIERRO, ZINC, MAGNESIO.

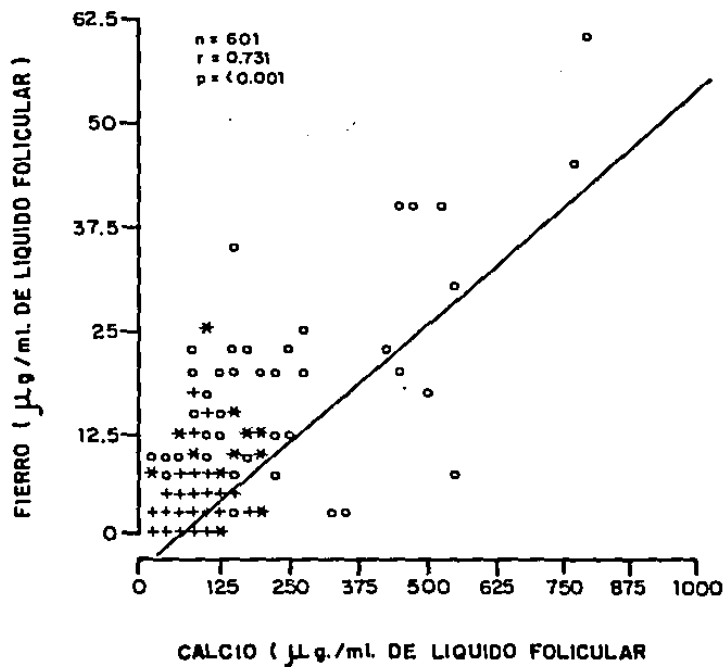
Los datos representan los valores de (r) entre cada uno de los parámetros estudiados.

	CALCIO	FIERRO	ZINC	MAGNESIO
CALCIO	1.0000**	0.7331**	0.7391**	0.7042**
FIERRO		1.0000**	0.7546**	0.7905**
ZINC			1.0000**	0.6491**
MAGNESIO				1.0000**

\*\* Significancia  $p < 0.001$







los iones estudiados se comportan independientemente a la -  
zaduración folicular.



## DISCUSION

El líquido folicular está constituido por el exudado del plasma sanguíneo y por las secreciones intrafoliculares, de donde se ha sugerido que el flujo de los constituyentes sanguíneos hacia el folículo en crecimiento se realiza a través de un proceso trasudativo, el cual constituye la explicación más sencilla para dilucidar el mecanismo de la formación del líquido folicular (Edwards, R.G. 1974). No obstante a lo anteriormente expuesto, al analizar el líquido folicular de 702 folículos de acuerdo a la primera modalidad se pudo constatar que tanto las concentraciones de los iones como las de proteínas en el líquido folicular son menores o semejantes a las reportadas en el suero (Gürtler, H. 1976), lo cual implica que el folículo mantiene su concentración de iones y proteínas en contra de una concentración más elevada, lo que representa un argumento en contra del mecanismo anterior.

Al comparar los fluidos de cada uno de los folículos de diferentes tamaños de acuerdo a la segunda modalidad en base a las concentraciones de proteínas y los iones estudiados se integraron tres grupos diferentes de folículos (Tabla 1): folículos pequeños (1-3 mm de diámetro), folículos medianos (3.1 - 6.0 mm de diámetro) y folículos grandes (6.1 - 12 mm de diámetro (Tabla 3): lo que nos permi-

te firmar que el orden en que se encuentran los iones es el siguiente:



Más aún, se observó un resultado sobresaliente que consiste en que tanto las proteínas como los iones se encuentran en una concentración muy elevada en los folículos pequeños para disminuir en los folículos medianos y por último estabilizarse en los folículos grandes (Tablas 1 y 3).- Resultados que avalan el argumento en contra de un proceso trasudativo y que nos permite explicar que además no existe un fenómeno de dilución durante el crecimiento folicular debido a que la disminución en la concentración de  $\text{Ca}^{++}$  es de 4 veces menor en el folículo grande que en el pequeño, mientras que para el  $\text{Mg}^{++}$  es de 3 veces,  $\text{Fe}^{++}$  es de 9 veces,  $\text{Zn}^{++}$  es de 15 veces y para las proteínas de 2 veces. Más aún, en el caso del  $\text{Fe}^{++}$  su concentración en el suero sanguíneo es de 110 veces más alta que en el líquido folicular (1800 microgramos/ml en suero Vs 16.7 microgramos/ml en L.F.), lo cual demuestra que a pesar de que existe un gradiente de concentración sumamente elevado en el suero, la concentración de  $\text{Fe}^{++}$  en el líquido folicular se mantiene y se exporta hasta que en los folículos grandes se estabiliza quedando una concentración de 962 veces más grande en el suero. Fenómeno que se repite en el caso del  $\text{Zn}^{++}$  -

aunque en menor proporción (100 veces más alta la concentración en el suero). Evidencia que aunada a las anteriores nos permite inferir que no existe el mecanismo trasudativo para la formación del líquido folicular.

Por otro lado, existe suficiente evidencia en apoyo al hecho de la disminución y estabilización de las concentraciones de las proteínas y los iones divalentes, puesto que otros autores reportan la disminución de la fosfatasa alcalina, transaminasa glutámico-oxalacético, calcio, colesterol éster hidrolasa, aminoácidos, fosfolípidos, triglicéridos, (Ghang, 1976).

Sin embargo, el hecho de que tanto los iones como las proteínas alcanzan un nivel y no disminuyen durante el crecimiento folicular podrían explicar los reportes que demuestran que tanto In vivo como In vitro el  $Ca^{++}$  es necesario para mantener la maduración del oocito, así como la presencia de  $Mg^{++}$ ,  $Mn^{++}$ ,  $K^+$  y  $Na^+$  son necesarios para aumentar la fijación de la FSH e inducir la activación de la adenil ciclasa el crecimiento folicular (Bluestein, 1981; Ford, K.A. y LaBarbera, A.R. 1987).

Por otro lado, al correlacionar logarítmicamente las concentraciones de iones versus el tamaño y el volumen folicular (Tabla 2) se pudo observar que el calcio en ambos casos tiene una correlación baja, negativa pero altamente

significativa ( $r = -0.4638$ ;  $r = -0.4059$ ). Mientras que en el caso del hierro y del zinc (Tabla 2), la correlación es mediana, negativa y altamente significativa, lo cual nos indica que a mayor volumen existe una concentración menor de los iones, de donde se puede inferir que ninguno de los iones que fueron analizados participan en el crecimiento folicular. Más aún, ni siquiera en el caso de un posible efecto sinérgico de iones versus volumen o tamaño (datos no presentados) se pudo constatar la participación de los iones o proteínas a pesar de que la correlación entre ion-ion es positiva y altamente significativa (Tabla 5).

Cuando se correlaciona el número de células de la granulosa versus la concentración de iones (Tabla 2) se observa una falta de correlación absoluta, lo cual es indicativo de que contrario a lo que sucede para el potasio (Schuetz 1974), las células de la granulosa no contribuyen de una forma significativa en la concentración de los iones divalentes del líquido folicular durante el desarrollo y crecimiento del folículo.

En lo referente a las concentraciones de proteínas en el líquido folicular se puede mencionar que, de acuerdo a la primera modalidad ( $65.6 \pm 46.8$  mg/ml) muestra resultados que concuerdan con los de David, et al. 1973, en donde encuentran que las concentraciones de proteínas en el lí-

quido folicular y suero en el conejo y en el humano no varían significativamente. Sin embargo, cuando se analiza de acuerdo a la segunda modalidad (por grupos) nuestros datos para los grupos de folículos pequeños y medianos concuerdan con los de Schuetz y Anisowicz 1974 en donde las concentraciones de proteínas son altas en comparación a las del suero del puerco (107 mg/ml en L.F. Vs 75 mg/ml proteína en el suero) (Gürtler, H. 1976), que hacen imposible pensar en la posibilidad de que existe un mecanismo de trasudación para la formación del líquido folicular. Estos resultados también están de acuerdo con los reportados con otras especies (Caravaglios y Cilotti, 1975; Zachariae y Jensen, 1958). Más aún, no solamente representan un argumento más en contra de dicho mecanismo, sino que representa la evidencia de la posibilidad de que la síntesis de proteínas se incremente y algunas sean liberadas por las células de la granulosa y además de que exista una exportación de proteínas del folículo. El hecho de que la concentración total de proteínas sea mayor en los folículos pequeños y disminuya en los folículos medianos para estabilizarse en los folículos grandes (9 mm de diámetro) concuerda con el reporte que el factor inhibidor de la maduración folicular (OMI) se libera cuando los folículos alcanzan cierto grado de maduración (Centola, et al. 1981). Por otro lado, se ha reportado en los óvulos de rana y estrella de mar la presencia de un factor de maduración (MPF) -

(Capony, et al. 1986), lo que nos permite sugerir que posiblemente durante la síntesis de proteínas se produzca un factor de maduración folicular.

Al correlacionar las concentraciones de proteínas (mg/ml L.F.) versus las concentraciones de los iones (Tabla 4) se observa una falta total de relación, motivo por el cual podemos sugerir que el mecanismo que mantiene constante a las proteínas y los iones divalentes es de naturaleza intrafolicular, siendo mecanismos independientes al proceso de crecimiento y desarrollo folicular.

## CONCLUSIONES

10. Existe una correlación positiva y altamente significativa entre el tamaño y el volumen folicular.
20. En la formación del líquido folicular no existe un proceso de trasudación de los constituyentes sanguíneos hacia el folículo.
30. En base a las diferencias altamente significativas de las concentraciones de iones y proteínas se integraron tres grupos de folículos de acuerdo a su tamaño: 1. (1.0-3.0 mm), 2. (3.1-6.0 mm) y 3. (6.1-12.0 mm).
40. El orden en que se encuentran los iones divalentes en el líquido folicular en base a su concentración es la siguiente:  $Ca^{++} > Mg^{++} > Fe^{++} > Zn^{++}$ .
50. Tanto las proteínas como los iones se encuentran en una concentración muy elevada en los folículos pequeños para disminuir en los folículos medianos y por último estabilizarse en los folículos grandes.
60. No existe un fenómeno de dilución iónica y proteica durante el crecimiento folicular.

- 7o. La concentración de los iones divalentes no participan en el crecimiento folicular.
- 8o. No existe un efecto sinérgico de los iones contra el volumen o el tamaño folicular.
- 9o. Las células de la granulosa no contribuyen de una forma significativa en la concentración de los iones divalentes del líquido folicular.
- 10o. El número de células de la granulosa no correlaciona con el desarrollo folicular.
- 11o. Existe exportación de iones y proteínas del folículo durante su maduración.



## RESUMEN

El líquido folicular fue colectado de folículos de cerdo de diferentes tamaños. Las concentraciones de proteínas  $\text{Ca}^{++}$ ,  $\text{Fe}^{++}$ ,  $\text{Mg}^{++}$ ,  $\text{Zn}^{++}$ , y el número de las células de la granulosa fueron determinadas. El volumen y tamaño folicular promedio fue de  $124.8 \pm 97.4$  microlitros y  $6.49 \pm 2.55$ -mm respectivamente. La correlación entre ambos parámetros fue alta, positiva ( $r = 0.903$ ) y muy significativa - - - ( $p < 0.001$ ) usándose posteriormente para estimar el volumen folicular. El promedio de la concentración de proteínas (mg/ml) y de los iones divalentes (ug/ml) en el líquido folicular fue: proteínas ( $63.6 \pm 46.8$ ),  $\text{Ca}^{++}$  ( $74.2 \pm 77.6$ ),  $\text{Mg}^{++}$  ( $26.0 \pm 4.13$ ),  $\text{Fe}^{++}$  ( $4.13 \pm 6$ ) y  $\text{Zn}^{++}$  ( $3.2 \pm 7.6$ ). Las concentraciones de estos componentes en el líquido folicular son menores o semejantes a las del suero, por lo que se concluye que no existe un proceso de trasudación para la formación del líquido folicular. Los folículos fueron divididos en tres categorías de acuerdo a las concentraciones de los iones y proteínas en: pequeños (1 - 3 mm), medianos (3.1 - 6 mm) y grandes (6.1 - 12 mm). Encontrándose que estas concentraciones están elevadas en los folículos pequeños, para disminuir en los medianos y estabilizarse en los grandes. No se encontró correlación entre el tamaño folicular, la concentración de los iones divalentes y las protef-

nas. Por lo tanto, se concluye que ninguno de estos parámetros influye en el crecimiento folicular.

## BIBLIOGRAFIA

- Ainsworth, L., B.K. Tsang, B.R. Downey, G.J. Marcus and -  
D.T. Armstrong (1980). Interrelationships between  
follicular steroid levels, gonadotropic stimuli and -  
oocyte maturation during preovulatory development of  
porcine follicles. Biol. Reprod. 23: 621-627.
- Albertini, D.F. (1984). Novel morphological approaches -  
for the study of oocyte maturation. Biol. Reprod. 30:  
13-28.
- Bae, I. H. and C.P. Channing (1985). Effect of calcium ion  
on the maturation of cumulus-enclosed pig follicular-  
oocyte isolated from medium-sized graafian follicles.  
Biol. Reprod. 33: 79-87.
- Baker, P.F. and M.J. Whitaker (1978). Influence of ATP -  
and calcium on the cortical reaction in sea urchin -  
eggs. Nature. 76: 513-515.
- Belsey, N.A., R. Eliasson, A.J. Gallegos, K.S. Moghissi,-  
C.A. Paulsen and M.R.N. Prasad (1980). En: Laboratory  
manual for examination of human semen and semen-servi  
cal mucus interaction. Press Concern Singapore, - -  
World Health Organization Switzerland. pp 11-12.
- Bluestein, B.I. and J.L. Vaitukaitis. (1981). The effect-  
of ionic environment of specific FSH binding to - - -  
plasma membrane receptor. J. Receptor Res. 2: 245-266.

- Burgoyne, P.S., R.M. Borland, J.D. Biggers and C.P. - -  
 Lechene. (1979). Elemental composition of rabbit - -  
 antral fluid during preovulatory follicular swelling-  
J. Reprod. Fert. 57: 515-523.
- Caravaglios, R. and R. Cilotti (1957). A study of the - -  
 proteins in the follicular fluid of the cow. J. Endoc.  
15: 273-278.
- Capony, J.P., A. Picard, G. Peaucellier, J.C. Lable and -  
 M. Dorée. (1986). Changes in the activity of the - -  
 maturation promoting factor during meiotic maturation  
 and following activation of amphibian and starfish -  
 oocyte: their correlations with protein phosphoryla-  
 tion. Dev. Biol. 117: 1-12.
- Centola, G.M., L.D. Anderson and C.P. Channing (1981). -  
 Oocyte maturation inhibitor (OMI) activity in protein  
 granulosa cell. Gamete Res. 4: 451-461.
- Chang, M.C. (1955). The maturation of rabbit oocytes in-  
 culture and their maturation, activation, fertiliza-  
 tion and subsequent development in the fallopian tubes.  
J. Exp. Zool. 128: 379-399.
- Chang, M.C., K. Niwa and D.M. Hunt. (1975). Fertilizing -  
 capacity of spermatozoa and fertilizable life of eggs  
 from immature and mature rabbits and rats. In: Blandan  
 R.J., Basel, A.G. Skarger. (Eds). Again Gametes. pp -  
 166-178.

- Chang, S.C.S., J.D. Jones, R.D. Ellefson and R.J. Ryan. -  
(1976). The porcine ovarian follicle. I. Selected - -  
chemical analisis of follicular fluís at different -  
developmental stages. Biol. Reprod. 15: 321-328.
- David, A., G. Frenkl and P.F. Kraicer. (1973). Chemical -  
composition of rabbit follicular fluid. Fertil and -  
Steril. 24: 227-229.
- Dumbar, B.S., C. Liu and D.W. Sammons (1981). Identifica-  
tion of the three major proteins of porcine and rabbit  
zonae pellucidae by high resolution gel electrophore-  
sis: comparison with serum, follicular fluid and ova-  
rian cell protein. Biol. Reprod. 24: 1111-1124.
- Edwards, R.G. (1974). Follicular fluid. J. Reprod. Fert. -  
37: 189-219.
- Eppig, J.J. (1982). The relationship between cumulus cell-  
oocyte coupling, oocyte meiotic maturation and cumulus  
expantion. Dev. Biol. 89: 268-272.
- Eppig, J.J. and S.M. Dowens. (1984). Chemical signals - -  
that regulate mammalian oocyte maturation. Biol. - -  
Reprod. 30: 1-11.
- Eshkol, A., B. Lunenfeld and H. Peters. (1970). Ovarian -  
development in infant mice. Dependence on gonadotrophic  
hormones. In: Butt, W.R., A.C. Crooke and M. Ryle - -  
(Eds.) Gonadotrophins and ovarian development. Living-  
stone, Edimburgh. pp. 249.

ESTA TESIS NO DEBE  
SALIR DE LA BIBLIOTECA

- Ford, K.A. and A.R. LaBarbera (1987). Cationic modulation of follicle-stimulating hormone binding to granulosa cell receptor. Biol. Reprod. 36: 643-650.
- Foxcroft, G.R. and M.G. Hunter (1985). Basic physiology of follicular maturation in the pig. J. Reprod. Fert., - Suppl. 33: 1-19.
- Gürtler, R.B., H.A. Ketz, E. Kolb, L. Schröder and H. - - Seidel. (1976). Fisiología de los líquidos corporales. In: Erich Kolb (Eds). Fisiología Veterinaria. Ed. - - Acribia. pp. 420-492.
- Gwatkin, R.B. and O.F. Andersen (1976). Hamster oocyte - maturation In vitro: inhibition by follicular compo--- nents. Life Science. 19: 527-536.
- Gilkey, J.C., L.F. Jaffe, F.B. Ridway and G.T. Reynolds. - (1978). A free calcium wave traverses the activating - egg of the Medaka Oruzias latipes. J. Cell Biol. 76: 448-466.
- Hillensjö, T., S.K. Batta, A.C. Wentz, J. Sulewski and - - C.P. Channing (1978). Inhibitory effect on human - - - follicular fluid upon the maturation of porcine oocyte in culture. J. Clin. Endocrinol. Met. 47: 1332-1335.
- Iwao, Y. (1982). Differential emergence of cortical granule breakdown and electrophysiological responses during - meiotic maturation of toad oocytes. Develop. Growth and Differ. 24: 467-477.

- Jagiello, G., M.B. Ducayen, R. Downey and A. Jonassen. - -  
 (1982). Alterations of mammalian oocyte meiosis I - -  
 with divalent cations and calmodulin. Cell Cal. 3: - -  
 153-162.
- Kitai, H., R. Santulli, K.H. Wright and E.E. Wallach - - -  
 (1985). Examination of the role of calcium in ovula---  
 tion in the In vitro perfused rabbit ovary with use of  
 ethyleneglycol-bis (beta-aminoethyl ether)-n,n'-tetra-  
 acetic acid and verapamil AM. J. Obst. Gynecol. 152: -  
 705-708.
- Kleis-San Francisco, S. and A.W. Schuetz (1986). Calcium -  
 effects on progesterone accumulation and oocyte matura  
 tion in cultured follicles of Rana pipiens. J. Exp. -  
Zool. 240: 265-273.
- Leibfried, L. and N.L. First. (1979). Effects of divalent-  
 cations on In vitro maturation of bovine oocytes. J. -  
Exp. Zool. 210: 575-580.
- Leibfried, L. and N.L. First. (1980). Effect of bovine and  
 porcine follicular fluid and granulosa cell on matura-  
 tion of oocytes In vitro. Biol. Reprod. 23: 699-704.
- Lowry, O.H., N.J. Rosebrough, A.L. Farr and R.J. Randall -  
 (1951). Protein measurement with the folin phenol - -  
 reagent. J. Biol. Chem. 193: 265-275.
- Lutwak-Mann, C. (1954). Note on the chemical composition -  
 of bovine follicular fluid. J. Agric. Sci. 44: 77.

- Manarang-Pangan, S. and A.C. Merge. (1971). Immunologic studies on human follicular fluid. Fert. Steril. 22: 367.
- McGaughey, R.W. (1975). A comparison of the fluids from small and large ovarian follicles of the pig. Biol. Reprod. 13: 147-153.
- McGaughey, R.W. (1977). The maturation of porcine oocytes in minimal, defined culture media with varied macromolecular supplements and varied osmolarity. Exp. Cell Res. 109: 25-30.
- McGaughey, R.W. and J.C. Daniel (1972). Protein patterns of ovarian follicular fluid from pigs. Biol. Reprod. 8: 128.
- McKerns, K.W. Ed. (1969). The gonads. Northholland publishing Co. Amsterdam.
- Moor, R.W., J.C. Osborn, D.G. Cran and D.E. Walters. (1981) Selective effect of gonadotrophins on cell coupling, nuclear maturation and protein synthesis in mammalian oocytes. J. Embryol Exp. Morph. 61: 347-365.
- Paleos, G.A. and R.D. Powers (1980). The role of calcium in the control of germinal vesicle breakdown in the mouse oocyte. J. Cell Biol. 87: G1123
- Paleos, G.A. and R.D. Powers (1981). The effect of calcium on the first meiotic division of the mammalian oocyte. J. Exp. Zool. 217: 409-416.



- Pascus, T., D. Mihai and H. Lunca. (1969). Concentration du sodium et du potassium dans le liquide folliculaire - - normal et dans le liquide des kystes folliculaires - - ovariens, ainsi que dans le sang des memes vaches. Recl Méd. Vét. Ec. Alfort. 145: 1283.
- Pascus, T., R. Tudoracus, N. Stancioiu and H. Lunca (1971). Concentrations des protéines totales et des fractions - protéiques dans le liquide folliculaire normal, pendant les différentes phases du cycle oestral, et dans le - - liquide des kystes folliculaires ovariens, ainsi que - dans le sag des memes vaches. Rcl. Méd. Vét. Ec. Alfort 147: 979.
- Sato, E., A. Iritani and Y. Nashikawa (1980). Mechanism of inhibition of germinal vesicle breakdown in the - - - follicular oocyte with special reference to the role of granulosa cell layer. Jpn. J. Fertil. Steril 25: 229- - 233.
- Schuetz, A.W. (1975). Induction of nuclear breakdown and - meiosis in Spisula solidissima oocytes by calcium - - - inophore. J. Exp. Zool. 191: 433-440.
- Schuetz, A.W. and A. Anisowicz (1974). Cation and protein - composition of ovarian follicular fluid of the pig: - - relation to follicles size. Biol. Reprod. 11: 64-72.
- Shalgi, R., P.F. Kaicer and N. Soferman. (1972). Gases and electrolytes of human follicular fluid. J. Reprod. Fert. 28: 335-340.

- Shivers, C.A., C.B. Metz and C. Lutwak-Mann (1964). Some properties of pig follicular fluid. J. Reprod. Fert. 8: 115.
- Sommerville, J.F. (1969). Steroid analysis in the study of ovarian function in: W. Inguilla and R.B. Greenblatt and C.C. Thomas (Eds). The Ovary. Springfield.
- Steinhardt, R.A., D. Epel, E.J. Carrol and R. Yanagimachi. (1974). Is calcium inophore a universal activator of unfertilized eggs? Nature. 252: 41-43.
- Thibault, C., M. Gerard and Y. Menezo. (1975). Preovulatory and ovulatory mechanisms in oocyte maturation. J. Reprod. Fert. 45: 605-610.
- Tsafriri, A. and S. Bar-Ami (1978). Role of divalent cations in the resumption of meiosis of rat oocytes. J. Exp. Zool. 205: 293-300.
- Van Blerkom, J. and R.W. McGaughey (1978). Molecular differentiation of the rabbit ovum. I. During oocyte maturation In Vivo and In Vitro. Develop. Biol. 63: 139-150.
- Zachariae, F. and C.E. Jensen (1958). Studies on the mechanism of ovulation: histochemical and physico-chemical investigations on genuine follicular fluids. Acta Endocr., Copenh. 27: 343.