

118
2ej.



UNIVERSIDAD NACIONAL AUTONOMA DE MEXICO

FACULTAD DE CIENCIAS

DETERMINACION DE LA ACTIVIDAD COLAGENOLITICA EN FOLICULOS OVARICOS



FACULTAD DE CIENCIAS
SECCION ESCUELAS

T E S I S
QUE PARA OBTENER EL GRADO DE :
B I O L O G O
P R E S E N T A :
FELIPE MOCTEZUMA CARDENAS

MEXICO, D. F.

MAYO DE 1994

**TESIS CON
FALLA DE ORIGEN**



Universidad Nacional
Autónoma de México



UNAM – Dirección General de Bibliotecas Tesis Digitales Restricciones de uso

DERECHOS RESERVADOS © PROHIBIDA SU REPRODUCCIÓN TOTAL O PARCIAL

Todo el material contenido en esta tesis 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.

DEDICADA A:

Mis padres, Carlos y Ma. de la Cruz,
quienes me han enseñado a valorar
todas los principios y logros que se
adquieran durante la vida y quienes
juntos han forjado un bello e incom-
parable hogar.

**Mis hermanos; Luis Enrique, Juan Carlos, Edgar,
Sandra, Gina y Mario Armando,** quienes me han apoyado
desinteresadamente durante toda mi vida
académica y a quienes quiero tanto.

Ana Laura, la persona que más adoro
en este mundo y que siempre me ha
impulsado a seguir adelante en este
increíble mundo. **Gracias MAMA AMOR.**

**Mis amigos; Humberto, Enrique, José Luis,
Luis Felipe, Ismael, Fernando y otros más**
con los que he compartido momentos patri-
simos e inigualables.

**Mis sobrinos; Yatzel, Carlitos, María,
Jorgito, el pequeño Quique y el nuevo
Brandon,** quienes son los niños más latosos
y bonitos que existen.

**ESTE TRABAJO SE REALIZO EN EL DEPARTAMENTO DE BIOLOGIA DEL
DESARROLLO DEL INSTITUTO DE INVESTIGACIONES BIOMEDICAS DE LA
U.N.A.M., BAJO LA DIRECCION DEL DR. LINO DIAZ DE LEON Y DE LA M. EN C.
HORTENSIA SOTO TREJO, A QUIENES EXPRESO MI AGRADECIMIENTO.**

AGRADEZCO A LOS MIEMBROS DEL JURADO, POR SUS APRECIABLES
CORRECCIONES Y EL VALIOSO TIEMPO DEDICADO A LA CULMINACION DE
ESTE TRABAJO;

Dr. Lino Díaz de León Hernández.

M. en C. Hortensia Soto Trejo.

Biól. Saúl Cano Colín.

Dr. Jesús Manuel León Cázares.

Biól. Carlos Alberto Castillo Pompeyo

MUCHAS GRACIAS

AGRADECIMIENTOS

Quiero agradecer de manera sobresaliente a mi querida maestra de hoy y siempre Hortensia Soto Trejo, quien siempre estuvo apoyándome en mi trabajo y cuya comprensión y fundamento teórico-practico estuvieron presentes durante la realización de este trabajo.

GRACIAS POR SIEMPRE HORTE

Agradezco al Dr. Lino Díaz por todo el apoyo y comprensión que siempre me ha brindado desde que ingresé al laboratorio, para seguir adelante con mis estudios.

Agradezco la ayuda de Violeta, quien durante mucho tiempo me ha auxiliado y por el diseño e impresión final de este trabajo.

Agradezco también la ayuda de Fernando Edgar Krötsch, quien revisó cuidadosamente el trabajo escrito en su primera versión.

Y por último a todos mis compañeros de laboratorio por sus consejos, críticas y comentarios durante mi trabajo. Dr. Lino, Hortensia, Ernesto, Laura, Francisco, Saúl, Edgar, Jesús, Tere, Sra. Chayo y todos los demás.....G R A C I A S.

I N D I C E

RESUMEN	1
INTRODUCCION	3
ANTECEDENTES	27
OBJETIVOS	30
MATERIALES Y METODOS	31
RESULTADOS	42
DISCUSION	56
CONCLUSIONES Y PERSPECTIVAS	63
REFERENCIAS	65

RESUMEN

Se obtuvieron folículos de cabras, los cuales fueron clasificados inicialmente por su tamaño en tres grupos; <3 mm, de 3 a 6 mm y >6 mm. El segundo y tercer grupo fueron separados de acuerdo a su grado de atresia. El subgrupo I consistió principalmente de folículos no atrésicos; el subgrupo II, de folículos en estadios tempranos de atresia, mientras que los subgrupos IIIa y IIb estuvieron formados por folículos atrésicos secundarios y terciarios respectivamente.

A los folículos previamente clasificados, se les extrajo el líquido folicular por punción con una aguja calibre 22. Se centrifugó el líquido, el sobrenadante fue desechado y el paquete celular se homogenizó y procesó para la extracción de muestras con actividad enzimática. De las fracciones purificadas se cuantificaron proteínas por el método de Lowry y también se utilizaron para las pruebas de actividad enzimática. En dichos ensayos se usó el compuesto Acetato Aminofenilmercúrico (APMA), con el fin de activar a las colagenasas latentes.

El sustrato que se utilizó fue colágena tipo I obtenida de piel de rata recién nacida y marcada uniformemente con anhídrido acético- H^3 . La colágena radiactiva fue incubada por 48 h con muestras que se obtuvieron del paquete celular (PC) y del saco folicular (S). Los productos de degradación fueron cuantificados en un contador de centelleo líquido para evaluar las fracciones con la mayor actividad degradativa.

Por otro lado para visualizar la actividad gelatinolítica se realizaron zimogramas en geles de poliacrilamida copolimerizados con gelatina al 0.2%. Los resultados obtenidos muestran una mayor actividad colagenolítica conforme el folículo incrementa su tamaño y

grado de atresia, además se detectó actividad gelatinolítica con pesos moleculares de aproximadamente 62 y 46 KD. Con base en el peso molecular encontrado y la inhibición por EDTA y o-fenantrolina, podemos sugerir que la actividad corresponde a colagenasa tipo IV.

INTRODUCCION

La mayoría de las células en animales multicelulares están organizadas en ensamblajes cooperativos denominados *tejidos*, los cuales a su vez están organizados en distintas formas como grandes unidades funcionales llamadas *órganos*. Las células en los tejidos están generalmente en contacto con una compleja red de macromoléculas extracelulares denominada *matriz extracelular* (MEC). La MEC ayuda a mantener células y tejidos juntos, además de proporcionar una red organizada dentro de la cual las células pueden migrar e interactuar mutuamente. En algunos casos las células están unidas a la matriz en regiones especializadas de su membrana plasmática.

Así, en el tejido conjuntivo, la MEC es abundante y las células están distribuidas de manera difusa dentro de ella. La MEC es rica en polímeros fibrosos, especialmente colágena, y es esta matriz, más que las propias células, la que recibe la mayoría de las presiones a las cuales el tejido esta sujeto (Alberts y col, 1983).

Por otro lado, el citoesqueleto, tipo celular, migración celular, control del crecimiento y diferenciación celular son procesos, entre otros que para entenderse los podemos referir hacia el conocimiento de la MEC. La MEC es un material estructural relativamente estable y de recambio continuo, pero la idea de que la MEC es un material de soporte inerte, creado por las células simplemente como una armazón o en el cuál sólo éstas residen, es ahora un concepto antiguo. De hecho, las colágenas son una fuente de tensión para los tejidos, la elastina y los proteoglicanos son esenciales para la elasticidad, y las glucoproteínas ayudan a la cohesividad del tejido. Pero las células que producen estas macromoléculas extracelulares e influyen en su ensamble de una u otra manera, no son independientes de las mismas. Las células continúan interactuando con sus propios productos y con la MEC producida por otras células. En la superficie celular los receptores

de matriz comunican la MEC al interior celular. El metabolismo y el destino de la célula, su forma y muchas otras de sus propiedades están estrechamente relacionadas y pueden depender de la composición y organización de la MEC (Hay, 1981).

LA COLAGENA ES LA PRINCIPAL PROTEINA DE LA MEC.

Las colágenas son una familia de proteínas fibrosas características encontradas en todos los animales multicelulares, además son las proteínas más abundantes en los mamíferos, constituyen hasta el 25% del total proteico del animal. La característica principal de todas las moléculas de colágena es su estructura de triple hélice. Las tres cadenas polipeptídicas, llamadas cadenas α , son helicoidales y están enrolladas una sobre otra de manera ordenada en una hélice regular de aproximadamente 300 nm de longitud y 1.5 nm de diámetro (Fig. 1). Hasta el momento se han descrito 17 tipos genéticamente diferentes de colágenas. Los tipos más abundantes son; las colágenas tipo I, II, III, IV y V. Los tipos I, II y III son las principales colágenas encontrados en tejidos conjuntivos y de estos la I es la más común, constituyen la mayoría de la colágena corporal. Los diferentes tipos pueden ser divididos en cuatro grandes grupos de acuerdo a su localización y función fuera de la célula:

1. La colágena intersticial fibrilar, que es el componente principal y más abundante en la mayoría de los tejidos conectivos, tales como la piel, el hueso, el tendón, el ligamento y el cartilago.
2. La segunda clase comprende a la colágena no fibrosa de las membranas basales.
3. La tercera clase está formada por un grupo menos definido de colágena pericelular, tal vez localizada en la parte externa del citoesqueleto.

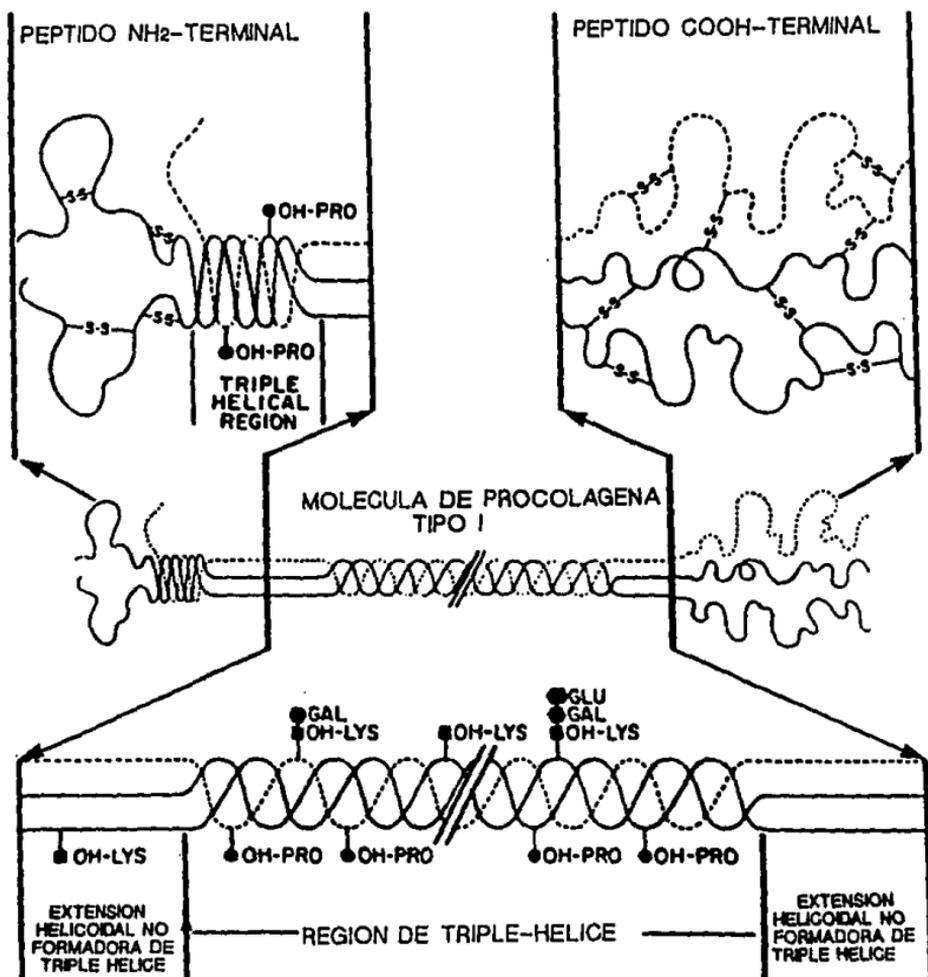


Figura 1. Diagrama de las principales características de la molécula de colágena tipo I

4. Además, existe una cuarta clase de colágena que comprende varios productos genéticos diferentes, de distribución variable, que no pueden ser clasificados entre los primeros tres grupos (Jiménez, 1988).

La secuencia característica de las colágenas refleja su organización genética. El gen que codifica para la cadena $\alpha 1(I)$ contiene 41 exones pequeños. La mayoría de ellos son de 54 pares de bases (pb), los cuales codifican una unidad primordial, que contiene seis repeticiones de una secuencia Gli-X-Y en tanto que tres aminoácidos forman una vuelta de la hélice. Otros exones codifican dos ó tres de esas unidades primordiales y los otros parece que han perdido durante su evolución 9 pb ó una unidad Gli-X-Y. Estos genes han sido desarrollados por duplicación y divergencia de una secuencia ancestral común, cada tipo tiene una estructura primaria única y ha sido identificado claramente como el producto de un gen en particular.

Los genes que codifican para las cadenas de algunos de los diferentes tipos de las colágenas en humanos se encuentran en la siguiente tabla;

CADENA Y TIPO DE COLAGENA	LOCUS CROMOSOMAL
Pro- $\alpha 1(I)$	17q21 - 17q22
Pro- $\alpha 2(I)$	7q21 - 7q22
Pro- $\alpha 1(II)$	12q13.1 - 12q13.2
Pro- $\alpha 1(III)$	2q24.3 - 2q31
Pro- $\alpha 1(IV)$	13q33 - 13q34
Pro- $\alpha 2(IV)$	13q33 - 13q34
Pro- $\alpha 2(V)$	2q24.3 - 2q31
Pro- $\alpha 1(VI)$	21q223
Pro- $\alpha 2(VI)$	21q223
Pro- $\alpha 3(VI)$	2q37
Pro- $\alpha 1(IX)$	6q
Pro- $\alpha 1(XI)$	1p21

(Sandell y Boyd, 1990)

CLASIFICACION DE LOS DIFERENTES TIPOS DE COLAGENAS.

COLAGENA TIPO I.

Es el más abundante en los organismos vertebrados. Es un heterotrímero que consiste de 2 cadenas $\alpha 1(I)$ idénticas y una $\alpha 2(I)$, posee un peso molecular (PM) de 300 Kilodaltones (Kd). La localización por microscopia electrónica muestra fibras con diámetro promedio de 40 a 60 nm y un bandeo cruzado en intervalos de 67 nm. La colágena tipo I se encuentra asociada a otras moléculas de colágena (tipos III, IV, VI, XII y XIV), así como a otras proteínas no colagénicas, generalmente en la matriz no cartilaginosa.

COLAGENA TIPO II.

Es la contraparte cartilaginosa al tipo I, ésta se encuentra predominantemente en cartilago hialino. Es un homotrímero que consiste en tres cadenas $\alpha 1(II)$, con un PM de 300 Kd. A diferencia del tipo I, la colágena tipo II aparece en cartilago como fibrillas de 25 nm de diámetro sin bandeo cruzado. Este tipo de colágena interacciona con otras proteínas y carbohidratos del cartilago (proteoglucanos, glucoproteínas estructurales y tipos IX, X y XI de colágena), para formar la matriz del cartilago.

COLAGENA TIPO III.

Se encuentra en asociación con fibras más grandes de colágena tipo I, en la mayoría de los tejidos conjuntivos extensibles como lo es la dermis. En contraste al procesamiento proteolítico de las procolágenas tipo I y II, las moléculas tipo III retienen el dominio globular N-terminal (en su estado de procolágena), observándose una periodicidad en "rosario". La molécula tipo III aparece como una especie homotrimerica $\alpha 1(III)_3$. El PM de

la molécula es de 300 Kd y se encuentra presente en piel, aorta, tendón, entre otros. Por otro lado, los residuos de cisteína en el extremo carboxilo terminal generan las interacciones disulfuro (S-S) que son las responsables del entrecruzamiento en dicha región.

COLAGENA TIPO IV.

Ha sido localizada en todas las membranas basales en asociación con otras proteínas (laminina, proteoglicanos de sulfato de heparan, entactina y nidógeno). Las moléculas de colágena tipo IV existen en dos formas; heterotrimeros $[\alpha 1(IV)]_2\alpha 2(IV)$ y homotrimeros $\alpha 1(IV)_3$, con un PM de 450 Kd. A diferencia de los tipos anteriores, al comparar las secuencias de aminoácidos de la cadena $\alpha 1(IV)$ y $\alpha 2(IV)$, se encontró una complejidad adicional para este tipo, que consiste en 21 aminoácidos en la cadena $\alpha 2(IV)$, los cuales forman una curvatura estabilizada por puentes disulfuro al final de la región helicoidal de la molécula. La asociación de las moléculas de la colágena tipo IV conforman un retículo más laxo que las fibras de las colágenas intersticiales. Esta característica junto con la susceptibilidad al ataque proteolítico, se debe a la presencia de dominios "no-helicoidales" en la molécula madura de colágena tipo IV.

COLAGENA TIPO V.

Un componente menor de la mayoría de los tejidos conjuntivos, la colágena tipo V, es sintetizada por todas las células somáticas. Tiene una localización característica pericelular en ciertos tipos celulares y participa en la formación del exoesqueleto de las células de músculo liso (Rhodes y Miller, 1978). Los filamentos tienen un grosor de 8 a 12 nm, han sido encontrados solamente en el intersticio y están estrechamente asociados con la membrana plasmática de las células del músculo liso. Existen al menos tres especies

moleculares del tipo V, la forma que prevalece es el heterotrímero compuesto por dos cadenas $\alpha 1(V)$ y una $\alpha 2(V)$ con un PM de 300 Kd.

COLAGENA TIPO VI.

Fue llamada inicialmente "colágena íntima". Los filamentos de colágena tipo VI se encuentran en mayor proporción en el intersticio y frecuentemente en estrecha asociación con colágena tipo I. La secuencia de aminoácidos, descrita recientemente junto con estudios del ADN recombinante, han confirmado la presencia de tres cadenas polipeptídicas diferentes $\alpha 1(VI)$, $\alpha 2(VI)$ y $\alpha 3(VI)$, con un PM de 570 Kd y se encuentra en la íntima de la aorta, placenta, piel, riñón y músculo. La molécula presenta secuencias de Arg-Gli-Asp con un núcleo central colagénico, las cuales son estructuras unidas potencialmente a células.

COLAGENA TIPO VII.

Fue aislada como un componente colagénico menor en las membranas placentarias. Su localización es discreta en órganos como la piel, sus dimensiones moleculares sugieren su participación única en las fibrillas de anclaje, donde toman lugar las interacciones con los tipos I, III y IV de colágena, así como con la lámina densa. Solamente se ha encontrado en forma homotrimérica, con un PM de 960 Kd.

COLAGENA TIPO VIII.

Fue descubierta primero como una proteína secretada en cultivos de células endoteliales y por esto fue inicialmente llamada colágena endotelial. Aunque existe alguna evidencia de la presencia de colágena tipo VIII en tejidos como la membrana de Descemet,

la información estructural y bioquímica disponible proviene de estudios *in vitro*. Esta colágena se encuentra como un homotrímero $\alpha 1(\text{VIII})_3$ con un PM de 500 Kd.

COLAGENA TIPO IX.

Es un componente menor del cartilago (junto con los tipos X y XI). Esta molécula está compuesta de tres dominios colagénicos espaciados por cuatro dominios no colagénicos. Se ha demostrado que la colágena tipo IX es un heterotrímero que consiste de tres cadenas polipeptídicas diferentes $\alpha 1(\text{IX})$, $\alpha 2(\text{IX})$ y $\alpha 3(\text{IX})$ con un PM de 500 Kd. La cadena $\alpha 2(\text{IX})$ es sustituida con una cadena simple del glucosaminoglucano sulfato de condroitina. Los estudios recientes han localizado a la colágena tipo IX en estrecha asociación con las fibras de colágena tipo II del cartilago. La digestión con pepsina del cartilago de esternón de pollo libera colágenas tipo II, IX y XI en proporción 8:1:1. Se han encontrado entrecruzamientos covalentes entre los tipos de colágena II y IX en el cartilago.

COLAGENA TIPO X.

Representa otra proteína específica del cartilago hipertrófico. Esta molécula es un homotrímero $\alpha 1(\text{X})_3$ con un PM de 180 Kd, el cual contiene un dominio corto helicoidal con un dominio globular en uno de sus extremos. Semejante a la colágena tipo IV, la colágena tipo X ha mostrado por estudios biosintéticos que no tiene un procesamiento proteolítico de las secuencias no helicoidales. A diferencia de las colágenas cartilaginosas, ésta se encuentra solamente presente en cartilago que contenga condrocitos hipertróficos, por ejemplo, en la placa de crecimiento y callo de la fractura. Las técnicas inmunohistológicas por microscopía electrónica (ME) indican que la localización de la colágena tipo X muestra fibrillas amorfas con un diámetro de aproximadamente 15 nm y algunas veces con una ligera periodicidad.

COLAGENA TIPO XI

Fue previamente referida como $\alpha 1 \alpha 2 \alpha 3$ o colágena tipo K, ha sido representada como un heterotrímero, que consiste de tres diferentes cadenas de colágena con un PM de 450 Kd. Además para cartilago hialino, la colágena tipo XI, se ha encontrado como un componente menor en el disco intervertebral, oreja, humor vítreo y la cubierta de la notocorda. Las cadenas de colágena tipo XI tienen ciertas similitudes a las cadenas de las colágenas II y V con respecto a sus características bioquímicas e inmunológicas.

COLAGENA TIPO XII.

Fue descubierta por clonación del ADNc del tendón de embrión de pollo en una genoteca. Recientemente, algunos fragmentos colagénicos identificados como colágena tipo XII han sido aislados, por digestión con pepsina, del tendón de embrión de pollo. Aunque homóloga a la colágena tipo IX a nivel genético, se requieren nuevos estudios para determinar si está estrechamente asociada a la colágena tipo I y/o si es análoga a los tipos IX/II en cartilago.

COLAGENA TIPO XIII.

Está descrita como una colágena de humano no fibrilar de bajo PM. Su aislamiento y caracterización parcial fue por clonación del ADNc de la cadena $\alpha 1$ de la colágena tipo XII. La síntesis de esta colágena se ha demostrado en cultivos de fibroblastos de piel normal de humanos y también en una línea celular tumoral de humanos, la HT-1080. Esos estudios revelan procesamientos distintos en el ARN mensajero (ARNm), lo que da origen a cuatro moléculas diferentes de la proteína (Stewart y col, 1989; Jimenez, 1988).

COLAGENA TIPO XIV.

Este tipo de colágena se encuentra en estudio, por lo que se sabe muy poco acerca de su estructura. La colágena tipo XIV tiene dominios de triple hélice homólogos en un 60% con los dominios de la colágena tipo XII; al menos la cadena $\alpha 1(\text{XIV})$ y $\alpha 1(\text{XII})$ son codificadas por una secuencia similar a nivel del ADNc.

Esta colágena junto con los tipos IX y XII forma un grupo aparte dentro de la superfamilia de las colágenas, estas se denominan CAFTI, Colágenas Asociadas a Fibrillas con Triple-hélices Interrumpidas, (FACIT, siglas en inglés). Las colágenas CAFTI (tipos IX, XII y XIV) han sido agrupadas juntas en una subclase especial debido a que comparten regiones con gran homología y tienen características estructurales únicas. La característica más relevante de este grupo, es que las moléculas presentan más de un dominio de triple hélice (con repetición de la secuencia Gli-X-Y característica de los dominios colagénicos), separado por segmentos que no son helicoidales. Estos tipos no tienen el procesamiento proteolítico (como ocurre en la forma precursora más grande) tal como las colágenas fibrilares y de esta manera no son secretadas como procolágenas. Además, las proteínas CAFTI no se presentan como polímeros solos, sino que están asociadas con fibrillas compuestas por colágenas fibrilares. Su localización y la diversidad de los dominios perifibrilares, sugieren que la expresión regulada de los diferentes componentes CAFTI pueden representar parte de las bases moleculares para la diversidad estructural de la colágena del tejido conectivo (Shaw y Olsen, 1991).

BIOSINTESIS DE LA COLAGENA.

La biosíntesis de los componentes colagénicos en tejidos conjuntivos implica la expresión regulada de los miembros de la superfamilia génica de las colágenas, así como interacciones complejas entre los productos de traducción primaria de procolágena y varias enzimas que modifican co-traduccionally y post-traduccionally la molécula (Fig. 2). Aunque el número total de genes que codifican para polipéptidos colagénicos no ha sido bien establecido, más de 28 genes han sido clonados y caracterizados y este número rápidamente se incrementa. Además entre los diferentes tipos de colágenas existen marcadas diferencias en estructura genómica, por ejemplo, mientras que las colágenas fibrilares son codificadas por secuencias genéticas grandes, las cuales contienen más de 50 exones, las colágenas de cadena corta (tipo VIII y X) son codificadas por genes que contienen un exón muy grande, junto con 2 o 3 exones pequeños.

A pesar de dicha complejidad, ciertos fenómenos biosintéticos básicos son compartidos por todos los tipos de colágenas. Esto es debido a que todas las colágenas al ser componentes de la MEC, son proteínas secretadas al espacio extracelular y además contienen dominios de triple hélice. Entonces, los productos de traducción primaria de las moléculas del ARNm contienen secuencias de señal hidrofóbica. Durante y después de la síntesis ribosomal las cadenas polipeptídicas son extensivamente modificadas por enzimas específicas. Estas modificaciones incluyen separación de las secuencias peptídicas de señal, así como hidroxilación, glucosilación y formación de puentes disulfuro. En el retículo endoplasmático rugoso (RER) o en el complejo de Golgi las cadenas hidroxiladas y glucosiladas adoptan su estructura característica de triple hélice y dominios globulares. Después de su secreción de las células, éstas moléculas son modificadas por proteasas extracelulares y lisil oxidasa (Hay, 1991).

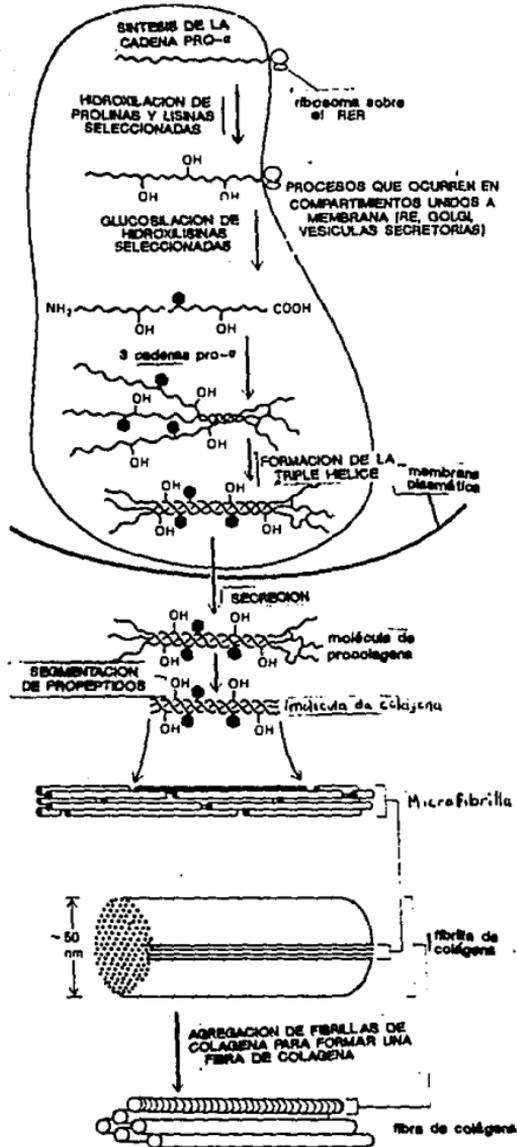


Figura 2. Los eventos intracelulares y extracelulares implicados en la formación de la fibra de colágeno.

Ciertos residuos de prolina en la colágena son convertidos a hidroxiprolina por la enzima *prolil hidroxilasa*, la cual tiene un ión ferroso en su sitio activo. El átomo de oxígeno que se une al C-4 de la prolina es del O₂. El otro átomo del oxígeno se une al succinato el cual es convertido a α -cetoglutarato, un sustrato obligatorio en esta reacción. Por lo tanto, la prolil hidroxilasa es una dioxigenasa. Una notable característica de esta reacción de hidroxilación es la necesidad de un agente reductor, tal como el ascorbato, el cual mantiene al átomo de hierro en el estado ferroso.

Esta reacción de hidroxilación es altamente específica, la prolina libre no es un sustrato, más bien la hidroxilación ocurre en sitios específicos sobre las grandes cadenas polipeptídicas antes de que formen la hélice. La prolina puede ser hidroxilada en el C-4 sólo si esta situada sobre el lado amino de un residuo de glicina. Además, algunos residuos de prolina son hidroxilados en el C-3 por una enzima diferente. En contraste la 3-hidroxiprolina se localiza en el lado carboxilo de los residuos de glicina.

Una pequeña porción de los residuos de lisina en la colágena llegan a ser hidroxilados en el C-5 por la acción de la *lisil hidroxilasa*. Como en la hidroxilación de la prolina, se requiere del oxígeno molecular, el α -cetoglutarato y el ascorbato. Las lisinas modificadas de esta manera están siempre en el lado amino de los residuos de glicina.

GLUCOSILACION.

Los residuos de hidroxilisina en la colágena están unidos covalentemente a unidades de carbohidrato. Se encuentra comúnmente un disacárido de glucosa y galactosa. Estos azúcares son unidos por la acción secuencial de las enzimas *galactosil transferasa* y *glucosil transferasa* y son específicas para residuos de hidroxilisina en las cadenas de colágena naciente antes de tomar su estructura helicoidal. El número de unidades de carbohidrato

depende del tejido, por ejemplo, las colágenas en fibras tienen pocos carbohidratos, en cambio aquellas de láminas son ricas en azúcares (Stryer, 1988).

SECRECIÓN DE LA PROCOLAGENA AL MEDIO EXTRACELULAR

Las cadenas polipeptídicas de colágena se sintetizan en los ribosomas unidos a la membrana para su posterior transferencia hacia el lumen del RER como precursores mayores, llamados cadenas pro- α . Estos precursores no sólo tienen el "peptido señal" requerido para atravesar la membrana del RE, sino que también presentan aminoácidos extras, llamados *peptidos de extensión* en ambas regiones terminales. En el lumen del RER, cada cadena pro- α , se combina con otras dos para formar la molécula trihelicoidal. La importancia de los péptidos de extensión es guiar la formación ordenada de la triple hélice.

Durante el proceso de secreción, los péptidos de extensión de las moléculas de procolágena-tipos I, II y III se eliminan por medio de enzimas proteolíticas específicas denominadas *procolágena peptidasas*. Este proceso convierte a los precursores en las moléculas de colágena (denominadas también tropocolágena), que luego se asocian en el espacio extracelular formando las fibrillas de colágena. El proceso de formación de las fibrillas está favorecido, en parte, por la tendencia de las moléculas de colágena a autoensamblarse. Sin embargo, las fibrillas se forman cerca de la superficie celular y es probable que la célula regule los lugares y las velocidades de ensamblaje de las fibras.

Los péptidos de extensión tienen por lo menos dos funciones; guiar la formación intracelular de las moléculas de colágena en triple hélice y evitar la formación intracelular de fibras de colágena, lo cual sería perjudicial para la célula. Sin embargo, es igualmente importante que los péptidos de extensión de las moléculas de colágena sean eliminados una vez que han realizado su función.

Al ME, las fibrillas aisladas de colágena, una vez fijas y contrastadas, muestran estriaciones transversales cada 67 nm, este patrón refleja la disposición de las moléculas de colágena dentro de la fibrilla. Probablemente para aumentar al máximo la resistencia del agregado a las fuerzas de tracción (extensión), las moléculas de colágena están apiladas, de tal forma que quedan desplazadas longitudinalmente casi una cuarta parte de su longitud. Mientras que los residuos de prolina, hidroxiprolina y glicina son los principales responsables de la formación de la triple hélice de colágena, se cree que las cadenas laterales de los otros aminoácidos son las principales responsables de la formación de las fibrillas. De hecho, los análisis por computadora de las secuencias de aminoácidos de las cadenas _ han demostrado que: 1) a lo largo de las cadenas se agrupan periódicamente residuos de aminoácidos con y sin carga, con una periodicidad de aproximadamente 67 nm (lo cual corresponde a unos 234 residuos de aminoácidos) y 2) se puede formar el máximo número de enlaces electrostáticos e hidrofóbicos entre las dos moléculas de colágena cuando están desplazadas, unas respecto a las otras, por múltiplos de 67 nm.

Después de haber sido formadas en el espacio extracelular, las fibrillas de colágena se refuerzan a través de la formación de enlaces covalentes cruzados entre las moléculas de colágena. Si se inhibe esta formación de enlaces cruzados, los tejidos con gran cantidad de colágena se vuelven frágiles y las estructuras como la piel, los tendones y los vasos sanguíneos tienden a desgarrarse. Los tipos de enlaces covalentes que intervienen en este proceso son característicos de la colágena (y de la elastina), y se forman en diferentes pasos. En primer lugar, ciertos residuos de lisina y de hidroxilisina se desaminan por acción de la enzima extracelular *lisil oxidasa*, que producen grupos aldehído altamente reactivos. Luego, los aldehídos forman enlaces covalentes entre sí o con otros residuos de lisina o de hidroxilisina. Algunos de estos enlaces son relativamente inestables y finalmente son modificados y forman una variedad de enlaces cruzados más estables. El grado y el tipo de

enlaces cruzados varía de un tejido a otro. Por ejemplo, la colágena muestra una cantidad especialmente elevada de enlaces cruzados en el tendón de Aquiles, donde es crucial la resistencia a la tracción.

DEGRADACION DE LA COLAGENA

Las colagenasas son enzimas específicas que rompen enlaces péptidos de las moléculas de colágena en estado nativo. La manera específica en la cual las colagenasas atacan un elemento estructural del tejido tan selectivamente para permitir el crecimiento y desarrollo ordenado, requiere un alto grado de especificidad por el sustrato, además de una precisa regulación en la síntesis, secreción, activación, inhibición y distribución de la enzima. El modo de interacción de la colagenasa con la colágena es obviamente un aspecto importante de este proceso.

Las enzimas colagenolíticas han sido obtenidas de cultivos de tejidos y celulares de un amplio número de especies animales, en los cuales la colágena es metabolizada bajo condiciones fisiológicas y patológicas. En general, estas enzimas tienen un número de propiedades fundamentales en común. Todas tienen un pH de acción óptimo cercano a la neutralidad, no son almacenadas para subsiguientes liberaciones, más bien, parece que son sintetizadas *de novo* y secretadas en forma activa ó inactiva (zimógenos), además de interactuar con su sustrato en un sitio específico de su estructura nativa. Las colagenasas de vertebrados tienen una fuerte preferencia por la molécula de colágena en su forma nativa, por lo tanto la colágena desnaturalizada es un sustrato pobre para su función. En general, son metaloenzimas, las cuales requieren calcio, además no son inhibidas por agentes bloqueadores de las serina y sulfidril proteasas. Son inhibidas por agentes quelantes, como el EDTA, 1,10-*o*-fenantrolina y cisteína, los cuales aparentemente pueden secuestrar el zinc, además de otros metales específicos de la enzima (Gross y col, 1980).

El recambio de las MECs que se presenta durante ciertos procesos como son: inflamación, angiogénesis, reabsorción de hueso, metástasis, cicatrización, reabsorción uterina, y ovulación, entre otros, incluye la degradación de las MECs y la biosíntesis coordinada de componentes nuevos de las mismas. Recientemente se han identificado varias enzimas, las cuales tienen como principal función degradar la MEC, estas enzimas han sido denominadas Metaloproteinasas Degradadoras de la Matriz (MMP's, Matrix-Degrading Metaloproteinasas, siglas en inglés). La expresión de tales enzimas puede ser controlada por un número de citocinas, factores de crecimiento, promotores de tumores, oncógenes y hormonas. Se ha sugerido que la regulación coordinada de las MMPs y sus inhibidores por los agentes antes mencionados modifican la integridad de la MEC (Matrisian, 1992).

Estas MMPs pueden ser divididas en tres principales grupos: las colagenasas intersticiales, las gelatinasas (colagenasas tipo IV) y las estromelinas (Tabla II).

TABLA II. PROPIEDADES BIOQUÍMICAS DE LAS MMPs

	Colagenasas(1) (Intersticial)	Gelatinasas(2) (Colagenasas tipo IV)	Estromelinas	PUMP(1)
A.	Zn²⁺ en el sitio activo, estabilizadas por Ca²⁺. Funcionan a pH neutro, son secretadas en forma latente la activación es por auto-segmentación. Inhibidas por TIMPs con la formación de un complejo estable.			
B.	55 kd (formas glucosiladas de M_r superior	72 Kd	57 Kd Formas glucosiladas de M _r superior	28 Kd
C.	75 Kd (Glucosilada) Un solo <i>locus</i> en colágenas intersticiales	95 Kd (Glucosilada) Locus específico en Colágena tipo IV.	57 Kd Proteína núcleo de proteoglucano, Regiones nohélico-	Similar a Estromelinas Elastina

nativas, tipos;
I, II, III, X.
Gelatinas (limitada
Proteína núcleo
de proteogluca-
no (limitado)

Colágenas des-
naturalizadas
(Gelatinas)
Regiones telopep-
tídicas de colá-
genas fibrilares.
Colágenas tipos
V, VII y XI

diales de Colágena
tipo IV (enlaces X)
Colágena tipo IX.
Laminina, Elastina, Fi-
bronectina, Gelatinas
(limitada) Elastina
Propéptidos de proco-
lágenas I,II,III.

- A. Características comunes para los 4 grupos
- B. Peso Molecular (Principal forma latente)
- C. Substratos

(Murphy y Reynolds, 1993)

Las enzimas dentro de cada grupo tienen estructuras primarias similares, con cerca del 70% de homología y existe una identidad de cerca del 50% entre los tres grupos (Murphy y Docherty, 1988; Goldberg y col, 1986; Whitman y col, 1986; Collier y col, 1988 y Muller y col, 1988).

La regulación de los componentes de la MEC está determinada por diferentes factores y bajo condiciones fisiológicas cada uno de los elementos que constituye o interacciona con la MEC permanecen constantes. Cada célula del tejido conjuntivo, contribuye a la producción de proteínas de la MEC o enzimas que la degradan; también secretan citocinas, hormonas o metabolitos que regulan la producción de estas proteínas por otras células. Así, tenemos que el Factor de Crecimiento Transformante β (TGF- β) estimula la producción de proteínas de la MEC. Como se mencionó anteriormente, la dinámica que juegan las MMPs en diferentes procesos es de vital importancia para mantener el equilibrio en diferentes estados fisiológicos. Desde este punto de vista la ovulación es un fenómeno biológico muy interesante.

OVULACION

En todos los embriones de vertebrados, determinadas células se diferencian durante las etapas iniciales del desarrollo como progenitoras de los gametos. Estas **células germinales primordiales (CGP)** migran hacia las gónadas en desarrollo (ovarios en las hembras, testículos en los machos) en donde, tras un periodo de proliferación mitótica sufren una meiosis y se diferencian a gametos maduros. Con la fusión del óvulo y el espermatozoide, después del apareamiento, empieza de nuevo el ciclo.

Por lo menos en un aspecto, los óvulos son las más notables de las células de los animales; una vez fecundados, pueden dar lugar a un nuevo individuo completo, es una cuestión de días o semanas. En los animales superiores, ésta es una propiedad única de los óvulos; la fusión con un espermatozoide durante la fecundación inicia un programa de desarrollo que se cumple progresivamente generando un nuevo individuo.

Si bien los detalles del desarrollo de los óvulos (**ovogénesis**) varían según la especie, las etapas generales son similares. Las CGP migran hacia la gónada en formación convirtiéndose en **ovogonias**; tras un periodo de proliferación mitótica, las ovogonias se diferencian en **ovocitos primarios**, los cuales llevan a cabo su primera división meiótica. El ácido desoxirribonucleico (ADN) se duplica de tal modo que cada cromosoma consiste de dos cromátidas, los cromosomas homólogos se aparean por sus ejes longitudinales y se produce el entrecruzamiento entre las cromátidas de estos cromosomas apareados. En este momento, la profase se detiene durante un periodo de tiempo que oscila entre unos cuantos días y muchos años, según la especie.

La siguiente fase del desarrollo del óvulo, denominada **maduración**, únicamente empieza con la madurez sexual del individuo. Bajo la influencia de las hormonas continúa la

división I de la meiosis; los cromosomas se recondensan, la envoltura nuclear se dispersa (hecho que suele considerarse como inicio de la maduración del óvulo) y los cromosomas homólogos duplicados se segregan a los dos núcleos hijos, cada uno de los cuales contiene la mitad del número original de cromosomas. Pero el citoplasma se divide de una manera muy asimétrica, produciendo dos **ovocitos secundarios** de un tamaño muy diferente; uno es un **pequeño corpúsculo polar** y el otro es una **gran célula** que contiene todo el potencial de desarrollo. Finalmente se produce la división II de la meiosis; las dos cromátidas hermanas de cada cromosoma adquirido en la división I se separan gracias a un proceso que es análogo a la anafase mitótica, salvo que en este caso solo existe la mitad del número diploide normal de cromosomas. Después de esta separación cromosómica, el citoplasma del ovocito secundario grande se divide de nuevo asimétricamente dando lugar a un óvulo maduro y a otro corpúsculo polar, cada uno con un número haploide de cromosomas. Debido a las dos divisiones asimétricas de su citoplasma, los ovocitos conservan su gran tamaño. Todos los corpúsculos polares son pequeños y más tarde degeneran. En algún momento de esta secuencia de crecimiento, momento que varía según la especie, el óvulo se libera del ovario en el proceso de la **ovulación** (Alberts y col, 1983).

Los folículos son las unidades funcionales principales del ovario del mamífero. La función de cada folículo es proporcionar el apoyo necesario a la célula germinal femenina (ovocito) para alcanzar su máximo potencial, que es el unirse con una célula germinal masculina (espermatozoide) para producir un embrión capaz de desarrollarse y nacer.

Las células del folículo, contribuyen de varias maneras para cumplir esta función esencial para la reproducción y sobrevivencia de las especies. Primero, proporcionan los requerimientos alimenticios para el crecimiento del ovocito y tal vez, el estímulo para iniciar su desarrollo. Posteriormente, controlan la maduración nuclear y citoplasmática del ovocito contenido en esos folículos que son seleccionados para la ovulación, además contribuyen a

la atresia y destrucción de los ovocitos restantes. Estos efectos directos de las células foliculares sobre el desarrollo y destino del ovocito, son mediados vía cambios que ocurren en el microambiente folicular, generados en gran parte, por productos que ellas secretan hacia el fluido folicular, que bañan al ovocito (Fig. 3). Además, las células especializadas de la granulosa (células del "cumulus") se encuentran en la capa más interna, rodeando al ovocito, están acopladas, metabólicamente a éste por uniones comunicantes, mediante las cuales, las sustancias nutritivas y las moléculas reguladoras son descargadas al ovoplasma.

Los productos mejor conocidos y caracterizados del folículo, son las hormonas esteroideas. Los esteroides foliculares cumplen un gran número de funciones importantes relacionadas con la reproducción. Funcionan como hormonas, en el sentido clásico, pues son transportadas por la circulación para actuar sobre una amplia variedad de tejidos "blanco", comprendiendo no sólo el sistema reproductor, sino también otros órganos y sistemas que incluyen el sistema nervioso central, el músculo esquelético, el cardiovascular, el inmune, el hígado y los tejidos cútaneo y adiposo. Las acciones hormonales, en muchos niveles contribuyen al éxito del proceso reproductivo, por ejemplo; por acción de los centros cerebrales que controlan la conducta sexual, aseguran que las hembras sean receptivas hacia el macho, durante los periodos de ovulación. La acción sobre los músculos y cilios del oviducto permiten al complejo cumulus-ovocito ser sujetado por las fibras y retenido en el sitio de la fecundación, mientras que, en ese instante se transporta el espermatozoide a este sitio. Los músculos lisos del oviducto y utero bajo la influencia de hormonas esteroideas, determinan el tiempo de entrada del huevo fecundado al utero, además estimulan los cambios endometriales requeridos para la implantación del embrión y su posterior desarrollo y mantenimiento para finalmente liberar un nuevo organismo.

En lo que respecta a la función hormonal sobre las estructuras del ovario, los esteroides producidos por las células foliculares actúan también localmente en el interior del

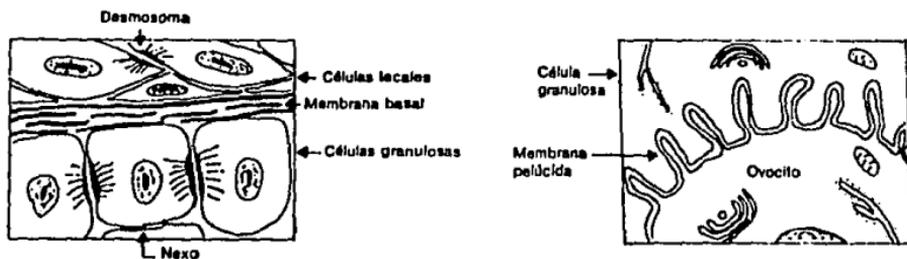
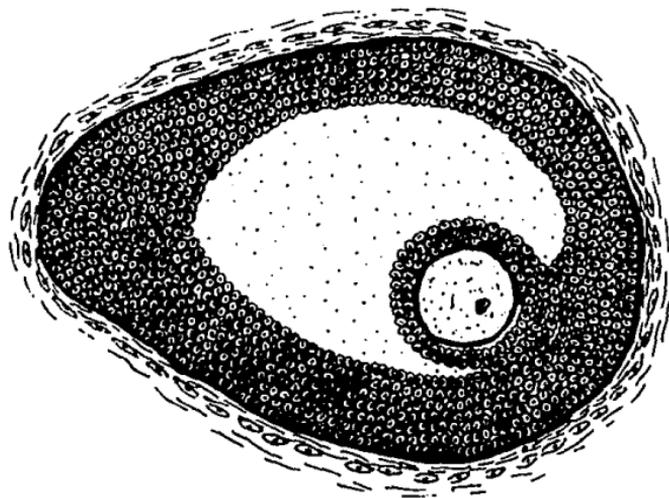


Figura 3. Representación esquemática del folículo ovárico.

fóliculo donde son producidas, ya sea como agentes "parácrinos" que actúan sobre las células adyacentes, o como agentes "autócrinos" actuando sobre o dentro de las células en donde son producidos (Gore-Langton, 1988).

Según Greenwald (1972): "Uno de los misterios más intrigantes en la fisiología del ovario, es qué factores determinan que un foliculo permanece inactivo, otro inicie su desarrollo pero más tarde se vuelva atrésico, mientras que uno más madure y ovule".

La ovulación marca el punto de culminación de una serie de fenómenos iniciados por la secreción de la hormona luteinizante (LH), por la continuación de la meiosis, rompimiento de la vesícula germinal, iniciación de la luteinización en las células de la granulosa, reestructuración de la pared folicular con ruptura folicular resultante y liberación de un óvulo maduro fertilizable. El estudio del control de la ovulación ha despertado gran interés recientemente, incluyendo controles hormonales, análisis bioquímico y morfológico detallado del foliculo preovulatorio. Durante el proceso de la ovulación, la MEC es degradada en el ápice folicular, facilitando la liberación del ovocito (Espey, 1980). La degradación del tejido conjuntivo apical del foliculo preovulatorio ocurre en parte por la acción de algunas metaloproteinasas. Los estudios bioquímicos han reportado un incremento en la actividad colagenolítica en la MEC durante el periodo preovulatorio (Curry y col, 1985; Fukumoto y col, 1981; Reich y col, 1985).

El incremento preovulatorio en la actividad colagenolítica es estimulado por el aumento en los niveles de LH, sin embargo, poco se conoce acerca de la regulación de la actividad enzimática en el espacio extracelular. El control de la colagenólisis en otros tejidos implica la acción de varias clases de inhibidores de metaloproteinasas (Murphy y Sellers, 1980).

El papel de las colagenasas ha sido corroborado por las siguientes observaciones: 1) una disminución en la fuerza tensil de la pared folicular antes de la ovulación (Espey, 1967; Rondell, 1970) la cual puede ser mimetizada *in vitro*, por incubación de la pared folicular con colagenasa. 2) una disminución en la colágena folicular y ovárica antes de la ruptura folicular (Morales y col, 1983; Reich y col, 1985) y 3) un bloqueo de la ovulación *in vitro* por inhibidores de colagenasas en ovarios (Ichikawa y col, 1983).

ANTECEDENTES

Los aspectos endocrinológicos del proceso de la maduración folicular han sido revisados extensamente por diversos grupos (Ainsworth y col, 1980; Channing y col, 1980; Bar Ami y Tsafiri, 1981); sin embargo, los aspectos bioquímicos que intervienen en este proceso no se han estudiado con profundidad. Algunos autores (Masui y Clarke, 1979) han dividido a la ovogénesis en tres etapas; la primera que es propiamente la ovogénesis y que comprende desde la formación de las células germinales y el inicio de la meiosis, hasta el momento en que el ovocito queda detenido en la fase de diploteno. La segunda etapa, se refiere al crecimiento del ovocito y la subsiguiente formación de la vesícula germinal y la tercera etapa que comprende la llamada maduración meiótica, iniciada por la estimulación gonadotrófica, a estas dos últimas etapas algunos autores las han denominado maduración folicular (Rosales y Rosado, 1989).

Durante la maduración folicular, ocurren tres procesos:

- a) El ovocito aumenta su diámetro, lo cual va acompañado de síntesis y acumulación de orgánulos y macromoléculas (Davidson, 1976).
- b) El ovocito al crecer, experimenta una diferenciación morfológica y bioquímica, adquiriendo la capacidad para terminar la meiosis (Huler y col, 1981).
- c) Foliculogénesis, se refiere a la generación de las capas celulares que rodean al ovocito y a la acumulación de líquido folicular, proceso que en conjunto genera al folículo.

La participación de algunas sustancias de estructura química bien conocida, como algunos oligopéptidos, las purinas y los glucosaminoglucanos, en el proceso de la

maduración folicular, han abierto camino para llegar en el futuro inmediato, a la identificación definitiva de los compuestos del líquido folicular que regulan el metabolismo de las células de la granulosa y de la teca, así como la interacción de estas células con el ovocito, que determinan qué ovocitos deberán iniciar su crecimiento, cuáles llegarán a la maduración y cuáles sufrirán el proceso de atresia. Sin embargo, el papel que desempeñan estos compuestos en la maduración folicular y la atresia se desconoce actualmente. Los compuestos anteriormente citados, están relacionados con el encontrado por Sato y Kaide (1984), que llamaron Factor Preventivo de la Maduración (OMPF; siglas en inglés). Pincus y Enzmann (1935) fueron los primeros en demostrar que los ovocitos del conejo, separados de su ambiente folicular, son capaces de madurar, cuando se colocan *in vitro* en un medio adecuado, aún desprovisto de hormonas. Esta observación ha sido confirmada y se ha hecho extensiva a otras especies de mamíferos (Biggers, 1972).

El hallazgo de estos péptidos foliculares, ha sugerido la posibilidad de estudiar otros parámetros bioquímicos en el líquido folicular que permitan la diferenciación entre folículos maduros y atrésicos (Bae y Channing, 1985; Billing y Magnusson, 1985). Recientemente se ha dado mucha importancia a la participación de algunos procesos proteolíticos, no sólo en el proceso de la ovulación (Espey, 1974; Strikland y Beers, 1976) sino también en el desarrollo del folículo maduro (Imoedemhe y Shau, 1986). Se sabe que durante la ovulación ocurre una remodelación del tejido conjuntivo de la pared apical del folículo. Las fibras de colágena sufren un adelgazamiento en folículos cercanos al periodo de la ovulación, así como una disminución en el número total de fibras (Espey, 1974). Las serino proteasas, han demostrado ser capaces de reducir la fuerza tensil de la pared folicular *in vitro* (Beers, 1975).

Por otro lado, Rosales y col (1990), han demostrado que el líquido folicular de cabra contiene un potente inhibidor de serina proteasas, cuya actividad está inversamente

relacionada con el tamaño folicular y el grado de atresia, siendo menor en los folículos grandes (>6 mm) y no atrésicos. Así mismo, se detectó actividad proteolítica después de eliminar al inhibidor en estos mismos folículos. Estos resultados, en relación con los de Imoedemhe y Shau (1986), sustentan la idea de que, en el líquido folicular existe una relación inversa entre la actividad de proteasa y antiproteasa conforme el folículo se aproxima a la maduración. La presencia de serina proteasa, en el tejido conjuntivo, ha sugerido que ésta, conduce a la activación de colagenasas latentes en el folículo, como fue anticipado por Morales y col (1983). Esta activación enzimática local puede alterar la integridad de la pared folicular y facilitar la ruptura del folículo. Los trabajos recientes demuestran que las colagenasas y otras enzimas colagenolíticas están presentes en varios estadios del desarrollo folicular y al momento de la ovulación (Morales y col, 1983; Reich y col, 1985).

Por otro lado, se sabe que los inhibidores de serina proteasas, entre los que se incluyen al activador del plasminógeno y a la plasmina, son capaces de influir en la activación de las colagenasas latentes (Reich y col, 1984); por lo tanto, es posible pensar que el inhibidor encontrado de las serina proteasas puede ser el causante de la no activación de las colagenasas y que debe existir cierta relación entre la concentración de este inhibidor y el crecimiento folicular, de manera que determinen cuáles folículos progresan y llegan a ovular y cuáles otros detengan su desarrollo y terminen por volverse atrésicos.

OBJETIVOS

Con los antecedentes planteados, los objetivos a cumplir fueron los siguientes:

- Clasificar folículos de cabra por tamaño y grado de atresia.
- Realizar determinaciones de actividad colagenolítica en líquido folicular, células de la granulosa y células de la teca de folículos que presentaron distintos tamaños y grados de atresia.
- Correlacionar las actividades enzimáticas con cada uno de los tamaños foliculares y grados de atresia.
- Conocer la influencia que tienen la atresia y el tamaño folicular sobre la actividad de estas enzimas en las estructuras foliculares.

MATERIALES Y METODOS

I- REACTIVOS

Los reactivos empleados se obtuvieron de fuentes comerciales y del mejor grado disponible, siendo la mayoría de grado analítico. El anhídrido acético [H^3](Solución en Tolueno 18.5 GBq/mmol, 500 mCi/mmol P2A ampollita de vidrio sellada) fue adquirido en Amersham Life Science Products. La cisteína, EDTA, o-fenantrolina, Fenilmetilsulfonil fluoruro (PMSF), la N-etilmaleimida (NEM), El Ditiotreitól (DTT), el Pepstatin y el Bórax (Tetraborato de Sodio) fueron de Sigma Chemical Company (St. Louis, MO). El acetato aminofenilmercúrico (APMA) fue obtenido de los laboratorios ICN-K & K (Plainview, NY). El NaCl fue adquirido en Baker. Los reactivos utilizados para los zimogramas fueron obtenidos de los laboratorios Bio-Rad (Richmond, CA), la caseína fue donada amablemente por el Dr Pablo Pérez Gavilán del IIBM. La colágena soluble en ácido fue extraída de piel de rata y acetilada con anhídrido acético [H^3], y tratada con pepsina (300 μ g/mg de colágena) para remover los telopéptidos (Dean and Woessner, 1985)

II- OBTENCION DE LOS FOLICULOS.

Se obtuvieron ovarios de cabras criollas adultas no gestantes, sacrificadas en el rastro de Ferreria, D.F. Las muestras se obtuvieron aproximadamente 15 minutos después de la muerte del animal, en el momento de la evisceración. Los ovarios se transportaron en solución salina de NaCl 0.15 M a 4°C al laboratorio. Una vez ahí, se enjuagaron 3 veces en la misma solución, para eliminar la mayor cantidad posible de sangre residual, después se procedió a efectuar la disección de los folículos.

El aislamiento y disección de los folículos se realizó bajo un microscopio estereoscópico, procurando eliminar la mayor cantidad de tejido estromal, a manera de poder hacer fácilmente la identificación y medición de los folículos. Durante toda la disección los folículos se mantuvieron en solución salina y a 4°C.

Una vez aislados los folículos, fueron clasificados por tamaño en 3 grupos; los <3 mm, de 3 a 6 mm y >6 mm; y después se clasificaron por su grado de atresia formando 4 grupos.

Los criterios para calificar la atresia fueron los descritos por Moor y col (1976) y aplicados a la especie caprina por Rosales y col (1990). Básicamente se consideraron 3 elementos; la continuidad de la capa granulosa, grado de vascularización tecal y presencia de acumulos de ovocitos, de tal manera que en el grupo I quedaron los folículos con apariencia brillante y translúcida, extensa vascularización y una capa granulosa regular. En el grupo II quedaron los folículos que presentaron algunos rasgos de atresia, como poca translucidez y aspecto grisáceo pero sin desprendimientos claros de granulosa. En el grupo III se incluyeron los folículos con apariencia opaca o grisácea, vascularización pobre y desprendimiento de la capa granulosa. Este último grupo se subdividió en un subgrupo IIIa, en donde estuvieron los folículos moderadamente atrésicos y un subgrupo IIIb, en donde estuvieron los folículos severamente atrésicos.

III- PURIFICACION DE LAS MUESTRAS. OBTENCION DE LAS FRACCIONES PARA ANALIZAR ACTIVIDAD ENZIMATICA.

Después de clasificar los folículos, se extrajo el líquido folicular, por punción con una aguja calibre 22, realizando delicadamente un lavado del interior del folículo mediante aspiración, inserción y reaspiración del líquido folicular, con esta forma de obtener el

líquido, aseguramos la recuperación del 85% de las células de la granulosa. Después de obtener el líquido se centrifugó a 3,500 x g durante 10 minutos, el líquido folicular se separó y se centrifugó nuevamente a 12,000 x g por 20 minutos.

El precipitado del primer sobrenadante se resuspendió en amortiguador de Tris-HCl, pH 7.4 y las células de la granulosa recuperadas se lavaron por centrifugación a 3,500 x g durante 10 minutos, el sobrenadante se descartó y el precipitado se resuspendió en 500 μ l de amortiguador Tris-HCl 0.05 M, pH 7.4 que contenía 0.01 M de CaCl_2 , 0.15 M de NaCl y 0.25% de Tritón X-100, se homogenizó utilizando un homogenizador Potter Ekvejem con émbolo de teflón. Parte del homogenado se utilizó para la determinación de proteínas por el método de Lowry y col (1951).

El resto del homogenado fue utilizado para hacer las determinaciones de la actividad colagenolítica; para lo cual, fue necesario primero extraer las enzimas. Esto se llevó a cabo, siguiendo el método descrito por Weeks y col (1976) y que consistió en centrifugar el homogenado a 36,000 x g durante 20 minutos a 28°C, el sobrenadante se utilizó para medir la actividad libre y los precipitados se resuspendieron en el volumen original con amortiguador de Tris-HCl 0.05 M pH 7.4, conteniendo 0.1 M de CaCl_2 , la suspensión se calentó a 60°C, durante 4 minutos con agitación manual. Después, los tubos se enfriaron con agua y se centrifugaron a 10,000 x g durante 20 minutos y a 4°C. Los sobrenadantes fueron dializados toda la noche contra Tris-HCl 0.04 M pH 7.4 con 0.15 M de NaCl, lo cual produjo una concentración final de calcio de 0.01 M y además redujo la concentración de Tritón X-100.

Después, se incubaron las muestras a 37°C durante 3 minutos y se agregó tripsina (1 mg/ml) para activar a las colagenasas y posteriormente se adicionó inhibidor de tripsina

de soya (3.6 mg/ml) para detener la actividad de la enzima y prevenir la digestión de las mismas enzimas.

IV- PURIFICACION DE LA COLAGENA

La purificación de la colágena implica, generalmente, varios pasos diferentes. Estos incluyen la adquisición y el procesamiento preliminar de un órgano o tejido apropiado, la extracción de la colágena y su purificación. Este último proceso no sólo requiere la eliminación de los componentes no colagénicos presentes en el extracto, sino también la separación selectiva de los otros tipos de colágena ahí presentes.

Los pasos implicados en la extracción y purificación se detallan a continuación:

Una rata hembra de 6 a 8 semanas de edad fue sacrificada, se obtuvo la piel del animal y se disgregó en fracciones de $\sim 1 \text{ mm}^2$. Se tomaron 8 g que fueron deslipidizados en 100 ml de etanol, por 3 horas con 3 cambios.

Este extracto fue homogenado en un politrón (PCU, power central Unit Drehzahlregler) en 100 ml de amortiguador de fosfatos salino (PBS, Phosphate buffer saline, siglas en inglés) el cual contenía NaCl al 25%, esta mezcla fue dejada toda la noche en agitación a 4°C.

Se lavó el extracto 3 veces con la solución de PBS + NaCl y en cada ocasión se centrifugó a 12,000 x g durante 30 minutos en cada ocasión.

El precipitado (pp) se lavó con agua bidestilada fría y se centrifugó a 12,000 x g por 30 minutos.

El pp fue resuspendido en un amortiguador Tris-HCl 0.05 M, con 0.45 M de NaCl, pH 7.4 y agitado durante 48 horas a 4°C.

Se centrifugó a 10,000 x g en un rotor HB4 (Beckman) durante 30 minutos y el sobrenadante (sn) fue desechado. En cambio el pp se resuspendió en ácido acético 0.5 M, dejado en agitación durante 48 horas a 4°C.

Se centrifugó nuevamente a 10,000 x g en el rotor HB4 por 30 minutos generándose un precipitado y un sobrenadante.

De las fracciones obtenidas (pp y sn), el pp se resuspendió en 100 ml de ácido acético 0.5 M, para realizar la segunda extracción. El sn se alcalinizó con NaOH 10 N, pH 6.2 y se le adicionó ácido etilen-diamino-tetracético (EDTA) 0.5 M (primera extracción).

Se realizaron 3 extracciones más de manera semejante a la primera.

Las 4 extracciones se juntaron y se dializaron, en 4 litros de amortiguador de fosfato de sodio (Na_2HPO_4) 0.02 M con 3 cambios durante 24 h a 4°C.

Por otro lado los 4 pp resultantes fueron resuspendidos en 100 ml de ácido acético 0.5 M y se les adicionaron 25 mg de pepsina (Whortinton) y se dejaron 90 minutos con agitación, posteriormente se centrifugaron a 10,000 x g durante 30 minutos en un rotor SS34 (Beckman). El sn obtenido fue etiquetado como 1a pepsina; el pp se resuspendió en 100 ml de ácido acético 0.5 M, se pepsinizó durante 90 minutos, y se siguió el procedimiento ya mencionado, obteniéndose así, la 2a y la 3a. pepsinas, que fueron marcadas con un asterisco.

Cada extracción fue dializada contra ácido acético 0.5 M por 24 horas.

Las extracciones con ácido acético se centrifugaron a 14,000 x g durante 30 minutos en el rotor SS34.

El pp se resuspendió en 200 ml de amortiguador Tris-HCl 0.05 M, con NaCl 0.45 M, pH 7.4.

Posteriormente se centrifugó a 17,000 x g en el rotor SS34 durante 30 minutos, el pp fue resuspendido en ácido acético 0.5 M y el sn se centrifugó a 45,000 x g durante 1 h en el rotor 50 Ti (Beckman).

El sn de este último paso fue precipitado diferencialmente en amortiguador Tris-HCl 0.05 M, con NaCl 1 M, pH 7.4, durante 48 horas con 2 cambios en 2 litros.

Se centrifugó a 17,000 x g durante 30 minutos, en el rotor SS34. El pp fue disuelto en ácido acético 0.5 M y el sn se puso a dializar contra 1.7 M de NaCl durante 24 h a 4°C.

Se centrifugó nuevamente en el rotor SS34 a 17,000 x g durante 30 minutos, al pp lo denominamos colágena Tipo III. En cambio el sn se dializó contra 2.7 M de NaCl por 24 h a 4°C.

Se centrifugó nuevamente en el rotor SS34 a 17,000 x g durante 30 minutos, el pp fue denominado colágena Tipo I, el sn se desechó.

Por otra parte, las 4 extracciones con pepsina (*) se juntaron después de la diálisis, se ajustaron a pH 7.4 y se les adicionaron inhibidores como el EDTA y el p-hidroximercuribenzoato (PHMB).

Después se dializaron contra Na_2HPO_4 0.02 M por 24 h. Se centrifugaron a 14,000 x g durante 30 minutos en el rotor SS34 y el pp fue resuspendido en Tris-HCl pH 7.4 0.05 M, y NaCl 0.45 M.

Se centrifugó a 17,000 rpm durante 30 minutos en el rotor SS34 y el pp se desechó y el sn se dializó contra 1 M de NaCl por 24 h a 4°C

Se centrifugó nuevamente el dializado a 17,000 x g durante 30 minutos en el rotor SS34, el pp se desechó y el sn se dializó en 1.7 M de NaCl durante 24 h. Transcurrido este tiempo, se centrifugó el dializado a 17,000 x g durante 30 minutos en el rotor SS34, el pp lo denominamos colágena Tipo III y el sn fue dializado contra 2.7 M de NaCl por 24 h a 4°C.

Se centrifugó nuevamente a 17,000 x g durante 30 minutos en el rotor SS34 y al pp lo denominamos colágena Tipo I.

Las colágenas Tipo I y Tipo III se sometieron a 2 diálisis más, la primera contra 0.5 M de ácido acético y la segunda contra 0.005 M de ácido acético, durante 24 h cada una y a 4°C.

Transcurrido ese tiempo fueron sometidas a una electroforesis en geles de poliacrilamida (EGPA), para observar el patrón de migración de las proteínas purificadas. Es importante aclarar que la colágena Tipo III debe ser reducida con Ditiotreitól (DTT) antes

de adicionar la muestra en el carril de corrida, ya que este tipo de colágena se encuentra unida por puentes disulfuro, localizados en la region carboxilo terminal.

V- MARCAJE RADIOACTIVO DE LA COLAGENA

La colágena tipo I fue dializada contra un amortiguador de Bórax (Tetraborato de Sodio) 0.02 M pH 9, con 0.05 M de CaCl_2 durante 24 horas.

A continuación fue marcada radiactivamente con anhídrido acético [H^3] (Solución con tolueno 500 mCi/mmol, 18.56 Bq/mmol). Se adicionó la marca radiactiva (3 ampolletas de 0.1 ml con 1 mCi/ml + 0.9 ml de tolueno; haciendo un volumen final de 1 ml por ampolleta) durante 3 h con agitación suave a 4°C (100 $\mu\text{l}/6$ min).

Luego de adicionarle toda la marca se dejó 1 h con agitación constante y a 4°C.

Se acidificó con 0.5 M de ácido acético y se dializó 2 veces; la primera en 0.5 M de ácido acético y la segunda en 0.005 M de ácido acético, cada una por 24 h y a 4°C.

Se tomaron alícuotas de 10 y 20 μl de la solución de diálisis, se les adicionaron 2.5 ml de Bray y se contaron en un contador de centelleo líquido, para determinar la cantidad de marca libre que no se incorporó en la proteína.

Se realizaron 4 o 5 diálisis más, hasta que se desechó toda la marca libre no incorporada.

Se tomaron alícuotas de 5, 10 y 20 μl de la colágena marcada y se contaron en el contador de centelleo (BECKMAN, modelo LS 1801) para analizar la cantidad de radiactividad incorporada al sustrato (colágena tipo I).

VI- PRUEBA DE ACTIVIDAD COLAGENOLITICA

Realizamos las pruebas de actividad colagenolítica en placas de 96 pozos (Costar) para lo cual el procedimiento fue el siguiente:

La colágena que previamente había sido marcada con anhídrido acético, fue mezclada con una solución de carbonato de sodio (Na_2CO_3) 1 M, pH 9 en proporción de 1:5 (10 μl de clg-H^3 /40 μl de Carbonato) y esta mezcla adicionada a cada pozo.

Los pozos fueron secados a vacío toda la noche, en un desecador a temperatura ambiente.

Posteriormente a esto, los pozos se enjuagaron 5 veces con agua destilada, para eliminar el exceso de sales.

Se adicionaron alícuotas de 10 μl de los extractos obtenidos de los folículos (paquete celular (PC) y del saco folicular (S)), por cuadruplicado de manera alternada, de cada serie, los dos primeros, no llevaron EDTA y los dos siguientes sí.

Las mezclas de reacción para cada pozo fueron las siguientes: para los pozos con EDTA (7.5 μl) se adicionaron 117.5 μl de amortiguador Tris-HCl 0.05 M pH 7.4, 15 μl de N-etilmaleimida (NEM) 0.05 M pH 7.4 y los 10 μl del extracto. En cambio, para los que

no llevaron EDTA fueron 125 μ l del mismo amortiguador Tris-HCl, 15 μ l de NEM y 10 μ l del extracto.

Una vez listas las placas, se incubaron a 35°C, durante 48 horas. Transcurrido este tiempo, la placa fue centrifugada a 1,000 x g 2 minutos para depositar en el pozo el material que se había condensado en la tapa de la placa.

Se tomaron de 140 a 150 μ l del sobrenadante y se les adicionaron 2.5 ml de líquido de centelleo (Bray) y se determinó la radiactividad en un contador de centelleo líquido. Esta se expresó como cuentas por minuto (cpm) por mg de proteína.

VII- ELECTROFORESIS EN GELES DE POLIACRILAMIDA (EGPA) COPOLIMERIZADA CON GELATINA

Las fracciones de folículo (saco y paquete celular) se ajustaron a una concentración final de 0.5 mg/ml con amortiguador de Tris-HCl 0.15 M, CaCl₂ pH 7.4. Se mezclaron alícuotas de 20 μ l de cada muestra con amortiguador de Tris-HCl 0.1 M, pH 6.8, SDS 2 % y glicerol al 20 % y se aplicaron a minigeles de poliacrilamida al 10 % (p/v), copolimerizados con 0.1 % (p/v) de gelatina (Heussen y Dowdle, 1980). Los geles se sometieron a corriente constante 25 mA/gel, posteriormente fueron lavados por 2 h en Tritón X-100 al 2.5 %, para eliminar el SDS, se enjuagaron tres veces con agua destilada y se incubaron durante 20 horas en amortiguador Tris-HCl 0.05 M, CaCl₂ 0.005 M, pH 8.0. Los geles fueron teñidos por 1 h en azul brillante de Coomassie 0.05 % en agua/metanol/ácido acético (6:3:1) y desteñidos por 1 h en la misma solución sin el colorante.

La actividad colagenolítica fue caracterizada por incorporación de inhibidores de proteasas en el amortiguador de incubación y se comparó con los controles. Los inhibidores utilizados fueron: EDTA (10 mM), DTT (5 mM), fenilmetilsulfonil fluoruro (PMSF) (1 mM), NEM (5 mM) y pepstatin A (1 µg/ml), y o-fenantrolina (5 mM). La actividad proteolítica también fue ensayada utilizando caseína como sustrato, incorporada en el gel; para esta determinación se utilizó la técnica descrita por Heussen, con algunas modificaciones (Pérez-Montfort y col, 1987). Inmediatamente después de la electroforesis, los geles fueron lavados con Tritón al 2.5 % con agua destilada e incubados con Tris-HCl 0.1 M, CaCl₂ 0.01 M, pH 7.4 por 10 minutos e inmediatamente puestos en contacto con otro gel de poliacrilamida al 7.5 % que contenía caseína. La solución de caseína fue preparada disolviendo 1 g en 20 ml de ácido bórico 0.2 M y NaCl 0.16 M, pH 8, por calentamiento en un baño María a ebullición durante 1 h. La caseína solubilizada se enfrió a temperatura ambiente y se centrifugó a 12,000 x g durante 30 minutos y se filtró con una membrana Millipore de 0.45 µm. Los geles fueron colocados entre dos placas de vidrio y envueltos en papel e incubados en una atmósfera húmeda a 37°C por 24 h. Posteriormente fueron fijados, teñidos y desteñidos como ya se mencionó.

RESULTADOS

LA ACTIVIDAD COLAGENOLITICA ES MAYOR EN EL SACO FOLICULAR EN COMPARACION CON LA DEL PAQUETE CELULAR.

Las fracciones marcadas como saco folicular (S) y paquete celular (PC), mostraron variaciones en cuanto a su actividad degradativa sobre colágena- H^3 cuando la prueba se realizó en placa de 96 pozos para microensayo. La figura 1 muestra que la actividad del PC no fue mayor de 2,000 cpm en cada una de las fracciones ensayadas. El grupo de folículos IIIb₃₋₆ fue el que mostró mayor actividad cuando se incubó durante 48 h a 35°C. Se observó que el grupo <3 mm no presentó actividad considerable, pero en los folículos de 3 a 6 mm la actividad disminuyó conforme el folículo maduraba. Por otro lado, los folículos mayores de 6 mm pero con diferentes grados de atresia (I, II y III) presentaron menor actividad enzimática que los ubicados entre 3 a 6 mm, con aumento en la misma conforme aumentó la atresia.

Cuando analizamos la actividad de S (Fig. 2) observamos que el grupo IIIa fue el más activo (~6,500 cpm) a diferencia del grupo IIIb cuya actividad decayó hasta un 30% del grupo anteriormente citado (~4,500 cpm). De la misma manera que el PC, el grupo <3 mm fue el de menor actividad (~2,500 cpm). Un dato interesante es que la actividad se incrementó de manera gradual en los grupos de 3 a 6 mm, a excepción del grupo IIIb 3-6 mm n donde la actividad disminuyó 1,500 cpm. Por otro lado, al confrontar la actividad mostrada en el PC vs S, se observó que en este último, hubo una actividad de hasta 3 veces más (comparando las figuras 1 y 2).

Para verificar estos resultados, decidimos cuantificar el porcentaje de degradación de la colágena-H³ en relación a las muestras anteriormente ensayadas, (Figs 3 y 4). En la figura 3 se observa que el PC mostró valores elevados de degradación, siendo el grupo II₃₋₆, aquel con mayor actividad sobre el sustrato (~6.5 % de degradación). El grupo IIIa₃₋₆ tuvo una actividad ligeramente inferior al anterior (~5.5 % de degradación); en cambio los demás grupos, a excepción del III>₆ (~5 % de degradación), mostraron una actividad muy pobre de degradación.

En cambio, las fracciones S se comportaron de manera muy diferente (Fig. 4). El grupo IIIb₃₋₆ tuvo la mayor actividad degradativa (~10.5 % de degradación) en cambio los siguientes tres grupos mostraron entre si una actividad degradativa muy semejante (I₃₋₆, II₃₋₆, IIIa₃₋₆, I>₆, II>₆ y III>₆).

Al comparar los resultados mostrados en las figuras 3 y 4, observamos que la mayor actividad enzimática se encontró en el saco folicular y preferencialmente en la fracción denominada IIIb₃₋₆.

CONFORME EL FOLICULO MADURA SE INCREMENTA LA ACTIVIDAD COLAGENOLITICA.

Para determinar el estado de crecimiento folicular en el cual la actividad colagenolítica se incrementó, decidimos analizar las fracciones ensayadas (PC y S) juntas, en cada uno de los grupos clasificados con base en su grado de atresia (Fig. 5). La actividad colagenolítica se incrementó conforme el foliculo va madurando, los foliculos más pequeños (<3mm) presentan la menor actividad enzimática sobre colágena-H³. Los foliculos de los grupos I₃₋₆ y II₃₋₆ presentan una actividad muy semejante (~6,500 y ~7,000 respectivamente), como se observa, la actividad del grupo II es ligeramente superior. El

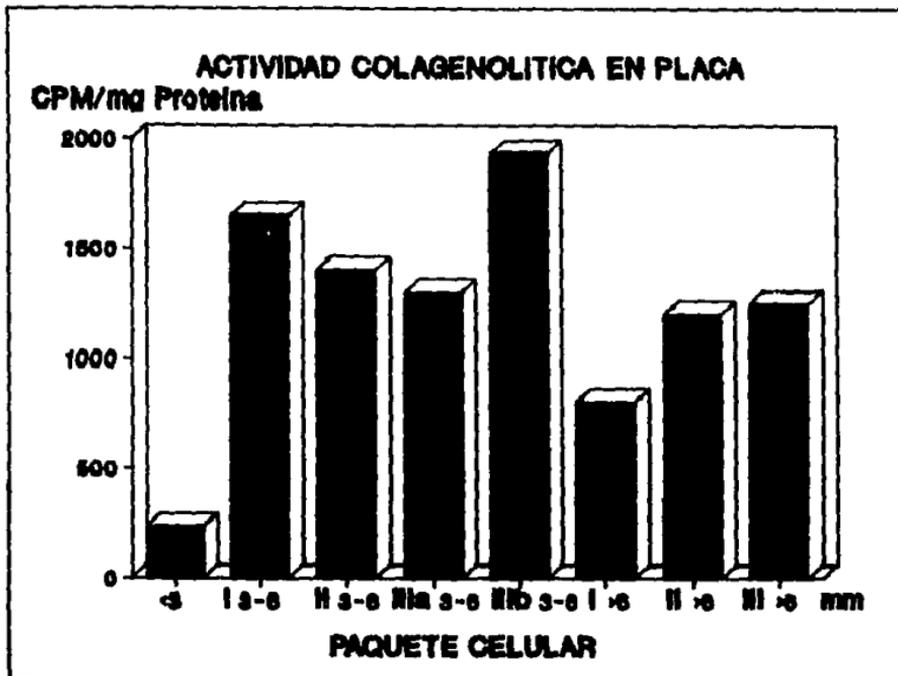


Figura 1. Actividad colagenolítica de extractos foliculares de cabra (paquete celular). 10 μ l del extracto fueron ensayados en placa, la actividad fue evaluada como cpm/mg de proteina de las diferentes fracciones obtenidas del foliculo. Los folículos fueron clasificados por su tamaño en tres grupos; <3 mm, de 3-6 mm y >6 mm. El segundo y tercer grupo fueron clasificados de acuerdo a su grado de atresia. El grupo III se dividió en dos subgrupos a y b, los cuales estuvieron formados por: a) folículos atrésicos secundarios y b) folículos atrésicos terciarios.

ACTIVIDAD COLAGENOLITICA EN PLACA
CPM/mg Prot x 1000

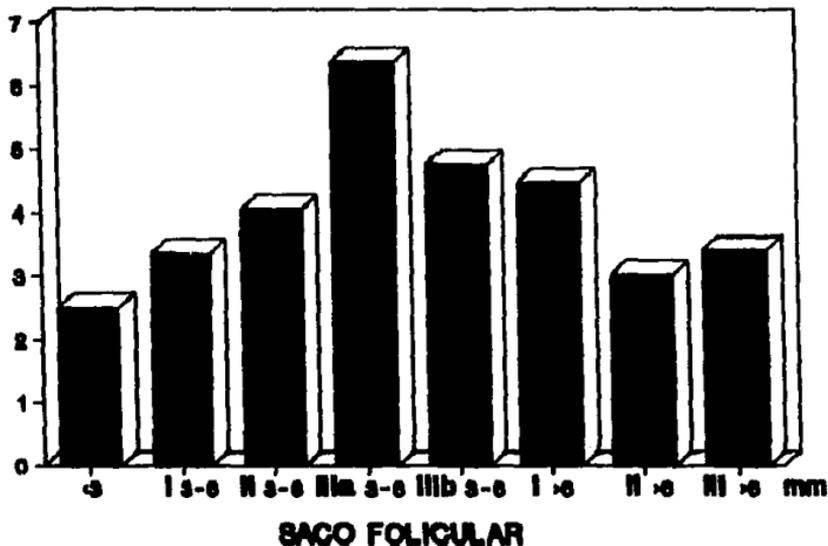


Figura 2. Actividad colagenolítica de extractos foliculares de cabra (saco folicular). 10 μ l del extracto fueron ensayados en placa, fueron evaluados de la misma manera que se describe en la figura anterior. Se observó que la actividad aumentó en los grupos I3-6, II3-6 y IIIa3-6; además de que fue mayor que la encontrada en el paquete celular (ver Fig 1). Los grupos I+6, II+6 y III+6 contrariamente a lo esperado, mostraron menor actividad que los folículos de tamaño 3-6 mm, sólo la fracción I+6 mm mostró actividad semejante a la del grupo IIIb3-6.

grupo con mayor actividad enzimática fue el IIIa₃₋₆ cuyo valor máximo fue de 11,500 cpm y aunque la actividad enzimática para el grupo IIIb₃₋₆ disminuyó hasta ~8,000 cpm todavía la podemos considerar como representativa.

LAS METALOPROTEASAS PARTICIPAN EN EL MECANISMO DE RUPTURA FOLICULAR

Las metaloproteasas son un grupo importante de enzimas asociadas a Zn⁺⁺, responsables de la degradación de componentes de la matriz extracelular en diferentes procesos fisiológicos y patológicos (Woessner, 1991; Matrisian, 1992). La determinación de las gelatinasas en las muestras de PC y S, por zimogramas sobre gelatina, revelaron la presencia de dos bandas de peso molecular de 62 y 46 Kd. Estas dos actividades fueron detectadas en todas las muestras analizadas (Fig. 6, 7 y 8)

Para caracterizar la actividad colagenolítica se incorporaron los inhibidores de proteasas (DTT, NEM, PMSF, o-Fenantrolina, EDTA y pepstatin B), en el amortiguador de incubación y se comparó con los controles. La figura 9 representa las EGPA's copolimerizadas con gelatina más la presencia de los diferentes inhibidores ya mencionados. Se observa que los químicos NEM Y PMSF no inhibieron la actividad enzimática de las fracciones ensayadas, el pepstatin B inhibió ligeramente a la enzima; contrariamente el DTT, la o-fenantrolina y el EDTA inhibieron totalmente la degradación del sustrato por parte de las fracciones ensayadas.

Por último se determinó la actividad proteolítica de las diferentes fracciones, utilizando caseína como sustrato, incorporada en el gel (Fig. 10). Sin embargo, no se detectó actividad degradativa de las fracciones trabajadas.

**ACTIVIDAD COLAGENOLITICA EN PLACA
%DEGRADACION**

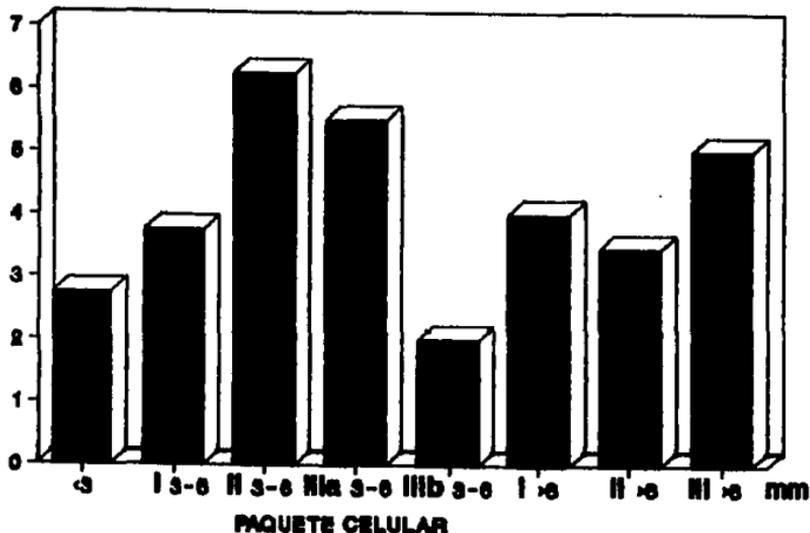


Figura 3. Actividad colagenolítica de varias fracciones del paquete celular de extractos foliculares de cabra, Porcentaje de degradación enzimático. Se observa que las fracciones de folículos del grupo 3-6 mm degradan más sustrato que sus similares del grupo de +6 mm a excepción del grupo III+6 en donde la actividad fue muy similar a aquellas ya mencionadas..

ACTIVIDAD COLAGENOLITICA EN PLACA

%DEGRADACION

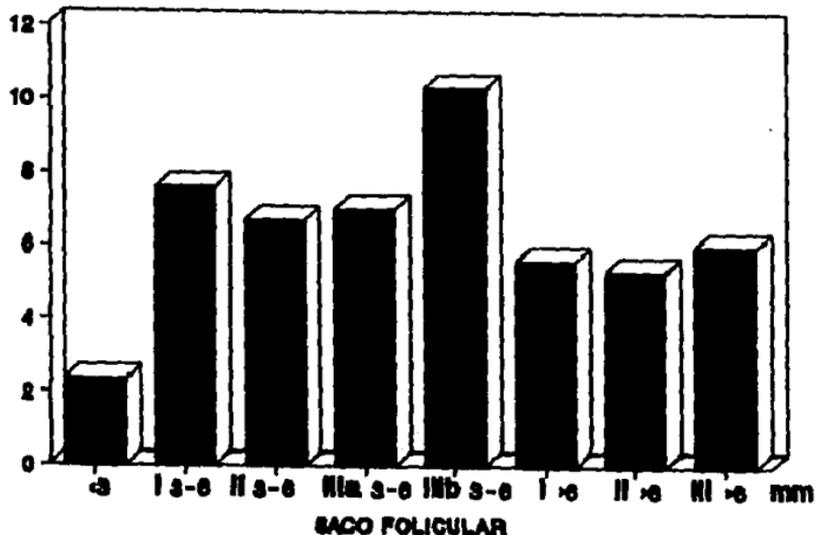


Figura 4. Actividad colagenolítica de varias fracciones del saco folicular. Porcentaje degradado del sustrato (colágena- H^3) en incubación a $35^{\circ}C$ durante 48 h. La actividad fue muy superior a las fracciones del paquete celular (ver Fig 3). Por otro lado, se observa que los folículos de los grupos I3-6, II3-6 y IIIa3-6 y IIIb3-6 mm mostraron mayor porcentaje degradativo que los grupos restantes.

ACTIVIDAD COLAGENOLITICA EN PLACA
CPM/mg Prot x 1000

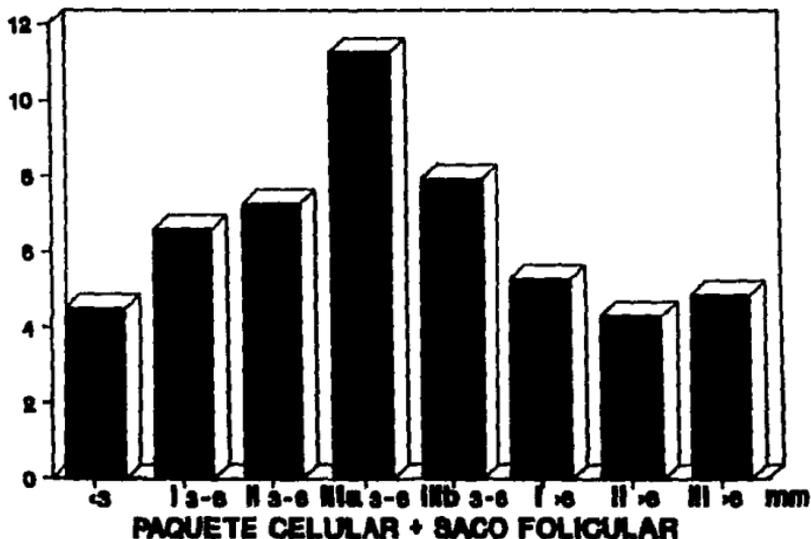


Figura 5. Actividad colagenolítica en paquete celular más saco folicular de cada uno de los grupos tratados. Se observa que existe una relación lineal entre la actividad enzimática y el desarrollo del folículo en las muestras <3, I3-6, II3-6 y III3-6 mm. Sin embargo, las fracciones I+6, II+6 y III+6 mm mostraron actividades hasta de un 40% menores en relación a los primeros grupos.

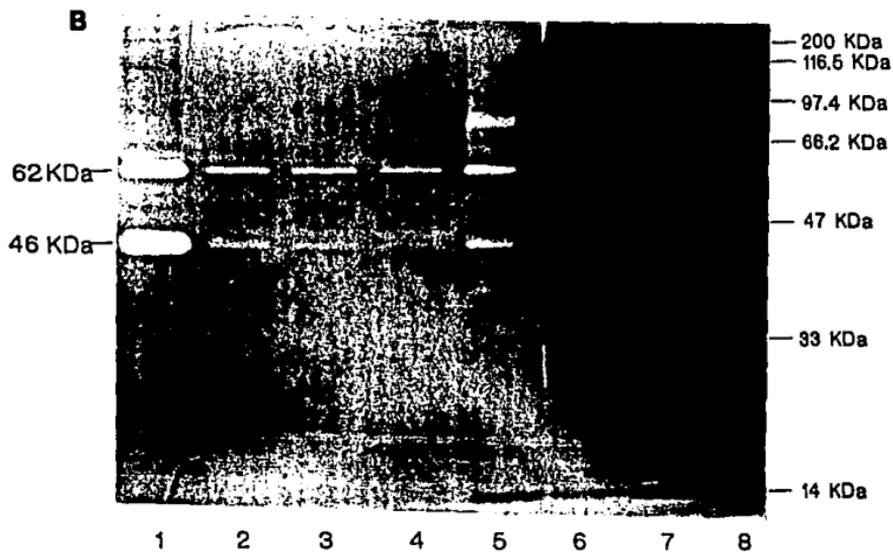
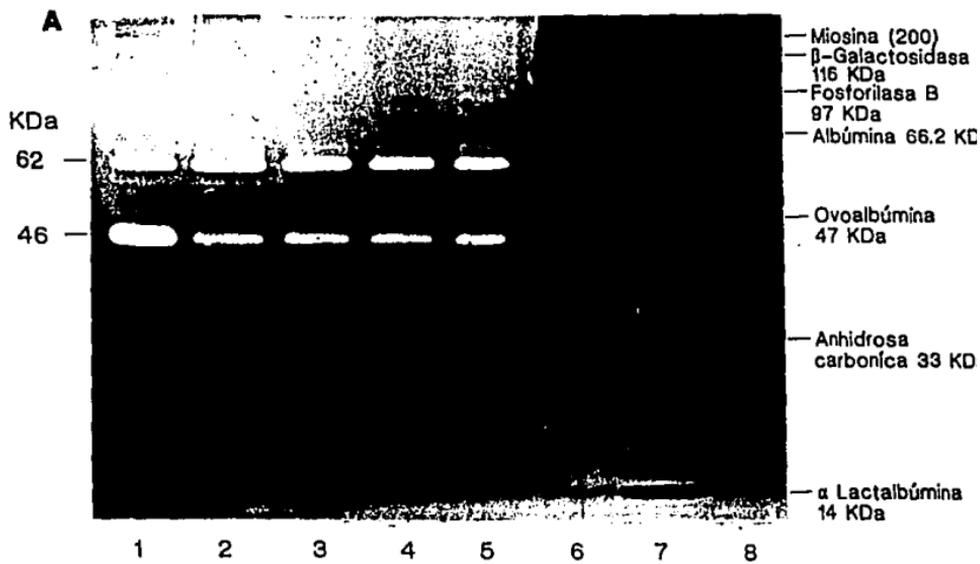


Figura 6. Zimogramas (EGPA copolimerizada con gelatina, de los extractos foliculares de cabra. (A) saco folicular y (B) paquete celular. Las muestras ensayadas fueron; 1, extracto folicular; 2, Grupo I+6; 3, Grupo II+6; 4, IIIa+6; 5, IIIb+6; 6 y 7 son los marcadores de Peso Molecular preteñidos y 8, Albúmina como control. La gelatinólisis es indicada por las zonas de lisis en el gel. Los números a la izquierda corresponden al Peso Molecular de la región degradada por la enzima. Adicionalmente a estas bandas, el carril 5 (IIIb3-6) del paquete celular mostró varias zonas de lisis, de PM mayor a 62 KDa, estas podrían corresponder a un precursor activado similar al sugerido por Woessner (1982).

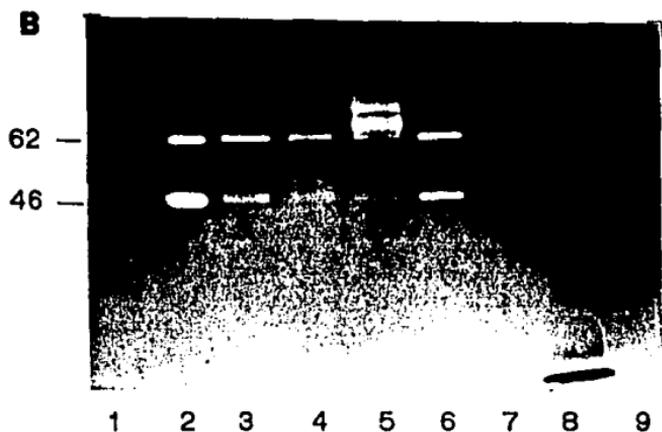
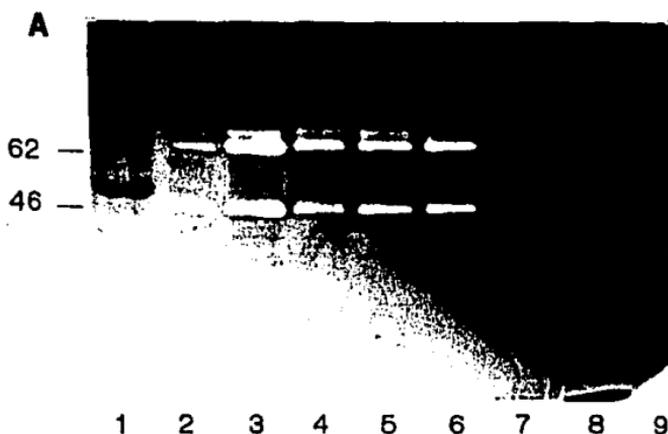


Figura 7. Zimogramas de extractos foliculares de ovario, (A) saco folicular y (B) paquete celular. Las muestras fueron; 1, Marcadores de Alto Peso Molecular; 2, extracto folicular; 3, Grupo <3; 4, Grupo I 3-6; 5, Grupo II 3-6; 6, Grupo IIIa 3-6; 7, Grupo IIIb 3-6; 8, marcadores de Bajo Peso Molecular y 9, Albúmina. La actividad degradativa representada por las zonas de lisis, es mayor en las fracciones del saco folicular, los pesos moleculares de la enzima, son registrados a la izquierda en KDa.

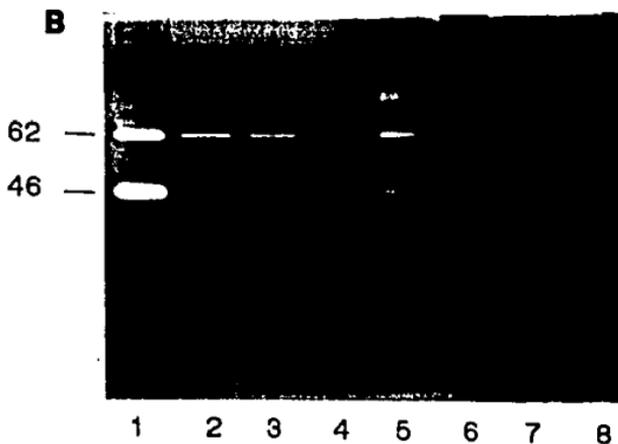
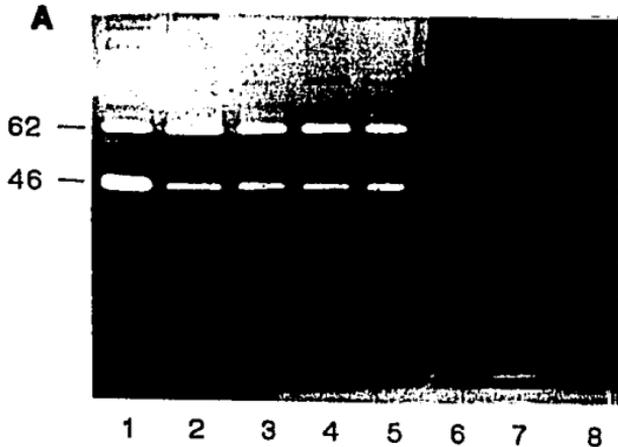


Figura 8. Zimogramas de extractos foliculares de ovarios de cabras. (A) Saco folicular y (B) Paquete celular. Las muestras fueron; 1, extracto folicular; 2, Grupo <3; 3, Grupo I 3-6; 4, Grupo II 3-6; 5, Grupo IIIa 3-6; 6 y 7 marcadores de Peso Molecular y 8, Albúmina.

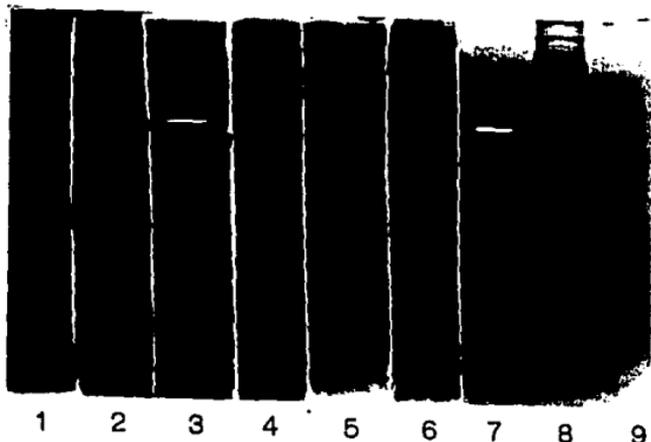


Figura 9. Zimogramas incubados con inhibidores; 1, Pepstatin (1 μ l/ml); 2, o-fenantrolina (5 mM); 3, PMSF (1 mM); 4, NEM (5mM); 5, EDTA (10 mM); 6, DTT (5mM); 7, Control; 8, Marcadores de Alto Peso Molecular y 9 Albúmina. La actividad gelatinolítica en los extractos es dependiente del metal, como se demostró por la inhibición completa de la actividad enzimática por la O-fenantrolina, el DTT y el EDTA. El Pepstatin solo inhibió ligeramente y los otros inhibidores no mostraron efecto sobre la enzima.



Figura 10. En cuanto a la actividad proteolítica sobre caseína. No se observaron bandas de actividad degradativa en la EGPA copolimerizada con caseína.

DISCUSION

El folículo ovárico es la unidad anatómico-funcional del ovario, a partir de la cual se originan los tres compartimentos del órgano; el folicular, el luteal y el intersticial. Sus funciones primordiales son liberar al ovocito y secretar las hormonas que estimulan el crecimiento y la diferenciación de los órganos del aparato reproductor.

El folículo está formado por el ovocito I, una membrana basal que aísla a las células de la granulosa del resto de los componentes del ovario y las células tecales, estas últimas conforman la denominada teca interna. Además de las células de la granulosa y las tecales, el folículo está rodeado por un complejo sistema de fibras de colágena, células del tejido conjuntivo, sustancia fundamental y fibras musculares lisas, todo lo anterior recibe el nombre de teca externa. Todos estos elementos forman una vaina fibrosa que al disgregarse, en un punto cercano a la superficie del ovario, forma un orificio por el cual saldrá el ovocito. Cabe señalar que el ovocito y las células foliculares no reciben riego sanguíneo en forma directa (Dominguez y col, 1990).

Schochet (1916) inició la investigación del o los mecanismos enzimáticos que intervienen en la ovulación, al demostrar que el líquido folicular podía atacar a la fibrina, el tejido conectivo hervido, músculo y tejido ovárico. Además el espectro de enzimas identificado en el líquido folicular de varios organismos es muy similar. El activador del plasminógeno en el líquido folicular (Beers y Strickland, 1978; Strickland y Beers, 1976), puede ser la enzima que inicia la cascada proteolítica y que en última instancia degrada la colágena y guía a la ruptura del folículo.

En el conejo y la rata, el volúmen del folículo preovulatorio se incrementa linealmente después de un estímulo coital o de gonadotropina coriónica humana (GCh) (Lipner y Greep, 1971). De acuerdo con el incremento en el volúmen folicular, se ha observado aumentada la hidroxiprolina ovárica 2 veces y posteriormente una declinación abrupta (Morales y col, 1983). Los folículos preovulatorios experimentan un periodo de aumento en la síntesis de colágena, seguido por la degradación de la misma.

Así, en nuestros resultados se observó que la actividad degradativa de la colágena aumentó conforme el folículo fue madurando y creciendo, ya sea representado por el grado de desarrollo (I, II y III), ó también al tamaño folicular (<3, 3-6 y >6 mm) debido probablemente al aumento de las fibras colagénicas alrededor del folículo.

La apariencia del folículo preovulatorio cercano a su ruptura ha sido descrita en gran detalle. En ratones (Byskov, 1978) y conejos (Cherney y col, 1975), el folículo sobresale hacia arriba de la superficie del ovario y éste incrementa su volumen, los capilares de la teca se "empaquetan" con los eritrocitos y el endotelio es aplanado; con el tiempo, aparecen perforaciones en las paredes capilares. Conforme el tiempo de ruptura se acerca, las células tecales en la base del folículo se rompen hacia la lámina propia y empiezan a entremezclarse con las células de la granulosa parietal, las cuales muestran un incremento en el retículo endoplasmático liso (REL), que señala su transformación a células luteinizantes. En el ápice, el epitelio germinal descansa sobre: a) una membrana basal que contiene fibroblastos (la teca) y b) una membrana basal, la lámina propia de la membrana granulosa. Los fibroblastos adyacentes no están presentes por mucho tiempo, pero las fibras de colágena si, las células de la teca debajo de la capa epitelial fragmentada se observan necróticas. Con la ruptura, las células de la teca se pierden como también la lámina propia de la membrana granulosa y las últimas células salen a través del punto de ruptura. Han sido descritos cambios similares en

el conejo y el humano, con la consideración de que la colágena en el ápice llega a dispersarse (Bjersing y Cajander, 1974a; 1974b; Espey, 1967; Okamura y col, 1980).

Las colágenas tipo I y III han sido identificadas por métodos inmunohistoquímicos en la teca de los folículos de Graaf (Palotie y col, 1984) y aparecen como haces de fibras distribuidas entre las células del músculo liso y fibroblastos, así como en la lámina propia, entre la teca interna y las células de la granulosa que contienen además colágena tipo IV (Bagavandoss y col, 1983).

Con base en estos datos, decidimos utilizar colágena tipo I para los ensayos de actividad degradativa en placa, para tratar de simular la colágena presente en las tecas (Figs. 1 a 5). Además, las actividades gelatinolíticas (colagenasa tipo IV) fueron detectadas en zimogramas (Figs. 6, 7 y 8), con lo cual se corrobora lo sugerido por la literatura.

Martin y Miller-Walker (1983) utilizaron una solución de dodecil sulfato de sodio (SDS) para incubar ovarios de hamster para eliminar el epitelio germinal situado encima de estos y examinar la distribución de las fibras de colágena en la pared folicular. De tal forma que observaron bandas de fibras paralelas arregladas en capas que inician en la base del folículo y que se extienden hacia el ápice, en donde se despliegan como abanico en la red que lo cubre. Aunque no se han realizado estudios similares sobre el folículo de otras especies, el estudio ultraestructural ha indicado que hay fibras de colágena. La presencia continua de colágena en la ovulación fue descrita en hamsters (Martin y Talbot, 1981) y en ratas (Tsujiyomo y col, 1982) y la disolución de las fibras de colágena ha sido reportada en ratas, (Curry y col, 1985; Morales y col, 1983; Okasaki y col, 1973; Parr, 1974; Reich y col, 1985) en humanos (Fukumoto y col, 1981; Okamura y col, 1980) y en conejos (Espey, 1967).

La degradación de la colágena puede seguir dos rutas; debido a que por su configuración de triple hélice es resistente a la proteólisis. La primera vía implica la acción de las colagenasas, que son metaloproteinasas específicas que escinden la molécula de colágena, produciendo dos fragmentos, uno de 3/4 y otro de 1/4 de la proteína nativa. A 37°C estos fragmentos se desnaturalizan, dando origen a 3 porciones de cadenas α de gelatina separadas, las cuales pueden ser rápidamente atacadas por proteasas extracelulares específicas. Una segunda ruta implica la fagocitosis granulocítica o fibroblástica y la degradación intracelular (Woessner, 1982). La sustancia basal que rodea las fibras de colágena es degradada por las serina proteasas y elastasas, esto contribuye probablemente a la proteólisis completa de las fibras de colágena inicialmente cortadas por las colagenasas (Murphy y Sellers, 1980).

Las fuentes de colagenasas más comunes comprenden dos tipos; las proteasas granulocíticas y las tisulares. Entre las primeras, el leucocito polimorfonuclear de humano, contiene en sus gránulos: a) proteasas neutras que muestran actividad de colagenasa asociada con otra metaloproteasa, b) serina proteasas, que exhiben actividad de elastasa y colagenasa a bajo nivel y c) catepsina G (proteína catiónica similar a la quimi tripsina). La colagenasa está fuertemente unida a la $\alpha 2$ -macroglobulina del plasma y ligeramente unida a la B1-anticolagenasa también del plasma. La elastasa está fuertemente unida a la $\alpha 1$ -antitripsina y al inhibidor I de *Mucus sp* y débilmente unida a la $\alpha 2$ -macroglobulina. La secreción de proteasas neutras es baja, excepto durante la fagocitosis y los inhibidores de proteasas normalmente mantienen sus niveles bajos, sin embargo, es posible lograr un incremento local en dicha actividad enzimática, cuando su producción o un acumulo local satura las concentraciones de los inhibidores, como se observó durante las reacciones de inflamación (Ohlsson, 1980).

Por otra parte, las colagenasas tisulares son producidas por una gran variedad de tipos celulares; a pesar de ello y a diferencia de los granulocitos, existe poca evidencia de un almacenamiento intracelular de colagenasas activas. La producción de colagenasas es dependiente de la inducción de síntesis mediada por el ADN más que una liberación de enzimas preformadas. Las colagenasas pueden ser sintetizadas y almacenadas en una forma inactiva, o también la enzima y un inhibidor pueden estar presentes simultáneamente en forma de complejos enzima-inhibidor, su liberación, debería prevenir la aparición de una enzima activa (Wolley y Evanson, 1980).

Murphy y Sellers (1980) hipotizaron que todos los tejidos conjuntivos sintetizan inhibidores de colagenasas, los cuales se unen a la enzima para formar un complejo y el resultado de este complejo, a su vez se une a la colágena. En esta forma latente, las colagenasas, no están sujetas a la inactivación por la α 2-macroglobulina, además las colagenasas latentes pueden ser proenzimas que requieren activación enzimática. Se ha demostrado que se requieren varias proteinasas endógenas para activar a las colagenasas latentes liberando un pequeño péptido. El activador endógeno puede estar presente también en una forma latente requiriendo plasmina, kaliceína o proteinasas lisosomales, tales como la catepsina B y la tripsina para su activación. La plasmina es un activador muy efectivo de las colagenasas latentes, sin embargo, sólo está presente en fluidos corporales en forma de plasminógeno inactivo y se requiere de la activación por el activador de plasminógeno o estreptokinasa. Las colagenasas latentes pueden ser activadas por reactivos de unión al grupo tiol, tales como el acetato aminofenilmercúrico (APMA), la N-etilmaleimida (NEM) y el p-cloromercuribenzoato (PCMB), entre otros.

La mayoría de extractos trabajados en nuestro ensayo fueron activados por el compuesto organomercurial, APMA; sin embargo los que no fueron tratados, tuvieron poca

actividad (datos no mostrados), con ello podemos sugerir que las enzimas presentes en los extractos se encontraban en forma latente.

Como se mencionó anteriormente las metaloproteinasas son un grupo importante de enzimas asociadas a Zn^{++} , responsables de la degradación de algunos componentes de la MEC, en diferentes procesos fisiológicos y patológicos (Woessner, 1991; Matrisian, 1992). La familia de las metaloproteasas comprende a las colagenasas, gelatinasas y estromelinas; las colagenasas incluyen a la colagenasa tipo I y colagenasa tipo IV. La colagenasa tipo IV presenta un interés particular, porque participa en la degradación de las membranas basales (colágena tipo IV) y adicionalmente presenta actividad gelatinolítica.

Las metaloproteasas participan en el mecanismo de folicular y se ha demostrado que las colagenasas ováricas aumentan durante el período preovulatorio (Morales y col, 1978, 1983; Curry y col, 1985). La determinación de gelatinasas en las muestras de paquete celular y saco, por zimogramas sobre gelatina, revelaron la presencia de dos bandas de peso molecular de 62 y 46 KD. Estas dos actividades fueron detectadas en todas las muestras analizadas y se observó una mayor proporción en todos los sacos (Figs. 6 a 8). Adicionalmente a las bandas mencionadas, algunas muestras presentaron bandas de peso molecular mayor a 62 KD, que comprendían de 80 a 70 KD. Las bandas de 62 y 72 KD podrían corresponder a colagenasa tipo IV, forma activa y precursora respectivamente, ya que estas dos formas han sido detectadas en folículos de ratas en períodos preovulatorios (Curry y col, 1992). La forma precursora de 72 KD presentó actividad, ya que se utilizó como agente activante al APMA; se ha propuesto que el mecanismo de activación por medio de este compuesto es debido a un cambio conformacional de la enzima, sin modificaciones en el peso molecular. Este cambio conformacional permite que enzimas como la tripsina, plasmina y kaliceína degraden al precursor para generar intermediarios activos de menor peso molecular y en un segundo paso, esta forma activa puede romperse autocatalíticamente

por las metaloproteasas activadas para eliminar el propéptido y conferirle actividad permanente (Sprigman y col, 1990).

Curry (1992), detectó en periodos preovulatorios en foliculo de rata una actividad gelatinolítica adicional de 42 KD que podria corresponder a la que nosotros detectamos con peso de 46 kD. Un dato interesante es que en los zimogramas se utilizó como control muestras obtenidas de miometrio uterino de rata posparto y las bandas más prominentes (72, 62 y 46 Kd) también fueron observadas en estas muestras (datos no mostrados).

La determinación de la actividad gelatinolítica en el fluido folicular sin activar, reveló que la enzima se encuentra totalmente en forma latente, dato que se correlaciona con lo descrito por Curry (1992), para la actividad presente en foliculo de rata, donde ésta se presenta en mayor proporción en estado latente. Para el caso de las muestras del paquete y saco, sólo fue posible para algunas preparaciones trabajar las muestras sin activar y activadas, en donde se observó que la forma latente fue la que predominó.

La utilización de distintos inhibidores para la caracterización de la enzima, nos sugiere que es una metaloproteasa, la cual es inhibida por EDTA, DTT y o-fenantrolina; mientras que el pepstatin B sólo mostró una ligera actividad. En contraste el NEM y el PMSF no mostraron actividad inhibidora sobre las muestras. Así mismo, las fracciones estudiadas no mostraron actividad sobre caseína, por lo que se demostró su especificidad.

CONCLUSIONES Y PERSPECTIVAS

Las evidencias presentadas en este trabajo, nos permitieron sugerir la existencia de una gran cantidad de factores que regulan la integridad y la ruptura de la pared folicular durante el proceso de la ovulación en mamíferos. Como se mencionó en un principio, se han realizado extensos estudios sobre los mecanismos hormonales que regulan la maduración folicular en ovarios. En el aspecto bioquímico los estudios recientes han abierto la puerta hacia el conocimiento detallado de los factores que controlan la integridad física de la pared folicular y su posterior degradación durante el fenómeno de la ovulación. Es en este escenario, en donde los componentes de la MEC interaccionan entre ellos y con las entidades celulares presentes. Nuestro estudio apoya la teoría sobre una actividad colagenolítica aumentada conforme el folículo alcanza su maduración, además con base en nuestros resultados podemos sugerir que el saco folicular es quien se encarga de ejercer la mayor actividad degradativa sobre la pared folicular en el proceso de liberación del óvulo durante su maduración. Probablemente esta actividad enzimática es realizada por dos metaloproteinasas cuyos pesos moleculares son de aproximadamente 62 y 46 KD, las que fueron inhibidas por EDTA, o-fenantrolina y DTT.

Los mecanismo implicados en la regulación del remodelamiento tisular y los fenómenos patológicos son complejos, pero es claro, que las proteinasas y sus inhibidores, citocinas, factores de crecimiento y hormonas, por mencionar algunos, son piezas fundamentales en dichos procesos. Varios diseños experimentales para dilucidar los mecanismos reguladores se encuentran en etapas iniciales y están proporcionando información importante que auxiliará en la aplicación de nuevas terapias, así como al mayor entendimiento hacia las bases genéticas y etiológicas en muchos procesos fisiológicos celulares.

La investigación a nivel molecular está explorando los procesos que regulan la degradación tisular y los resultados indican que el control de la integridad tisular es ejercida, no sólo a nivel genético sino también postranscripcionalmente.

Sin embargo, aún existen dudas considerables en cuanto a la activación fisiológica de las metaloproteinasas. ¿Cuáles son los pasos limitantes para el inicio en la degradación de la MEC? ¿Qué factores extracelulares determinan que una enzima sea separada de su inhibidor? ¿Cómo se regula la expresión de proteínas durante un proceso de remodelación tisular?. Conforme se obtenga más información con respecto a la participación de la maquinaria degradativa *in vivo*, algunas de estas preguntas serán contestadas. La aplicación del análisis genético y molecular a estos problemas, ya sea *in vivo* o *in vitro*, rápidamente generará nuevos conceptos que facilitarán la comprensión de los mecanismos encargados en la remodelación tisular en procesos fisiológicos y patológicos.

REFERENCIAS

- Ainsworth, L., Tsang, B. K., Downey, D. R., Marcus, G. L. y Armstrong, D. T., (1980). Interrelationships between follicular fluid steroid levels, gonadotropic stimuli and oocyte maturation. *Biol. Reprod.* **23**:621-627.
- Alberts, B., Bray, D., Lewis, J., Raff, M., Roberts, K. y Watson, J. D., (1983). *Molecular Biology of the Cell*. pp 673-683. Garland Publishing, Inc. New York and London.
- Bae, I. y Channing, C. P., (1985). Effect of calcium on the maturation of cumulus in closed pig follicular oocytes isolated from medium sized graafian follicles. *Biol. Rep.* **33**:79-87.
- Bagavandoss, P., Midgley, A. R. Jr. y Wicha, M., (1983). Developmental changes in the ovarian follicular basal lamina detected by immunofluorescence and electron microscopy. *J. Histochem. Cytochem.* **31**: 633-640.
- Bar-Ami, S. y Tsafiri, A., (1981). The acquisition of meiotic competence in the rat, role of gonadotropin and strogen. *Gamet. Res.* **4**:463-472.
- Beers, W. H., (1975). Follicular plasminogen and plasminogen activator and the effects of plasmin on ovarian follicle wall. *Cell* **6**:379-384.
- Beers, W. W. y Strickland, S., (1978). A cell culture assay for follicle-stimulating hormone. *J. Biol. Chem.* **253**: 3877-3881.
- Biggers, J. F., (1972). Metabolism of the oocyte. En: *Oogenesis*, (Eds. J. D. Biggers y A. W. Schultz) University Park Press, Baltimore, pp 241-251.
- Billing, H. y Magnusson, C., (1985). Gonadotropic-induced inhibition of oxigen consumption in rat oocyte-cumulus complex; relief by adenosine. *Biol. Reprod.* **33**: 890-898.
- Bjersing, L. y Cajander, S., (1974a). Ovulation and the mechanism of follicle rupture. I. Ligth microscopic changes in the rabbit ovarian follicles prior to induced ovulation. *Cell Tissue Res.* **149**: 287-300.
- Bjersing, L. y Cajander, S., (1974b). Ovulation and the mechanism of follicle rupture. VI. Ultrastructure of theca interna and the inner vascular network surrounding rabbit graafian follicles prior to induced ovulation. *Cell Tissue Res.* **153**: 31-44.
- Byskov, A. G., (1970). Follicular atresia. En: *The vertebrate ovary. Comparative Biology and Evolution*. Edited by R. E. Jones, pp. 533-562. Plenum, New York.
- Channing, C. P., Schaerf, F. W., Anderson, L. D. y Tsafiri, A., (1980). Ovarian follicular and luteal physiology. En: *Reproductive Physiology III. International review of physiology*. (Eds. R. O. Greep) Vol. 22 University Park Press, Baltimore, pp 118-201.

- Cherney, D. D., Didio, L. J. A. y Motta, P., (1975). The development of rabbit ovarian follicles following copulation. *Fertil. Steril.* **26**: 257-271.
- Collier, I. E., Wilhem, S. M., Eisen, A. Z., Marmer, B. L., Grant, G. A., Seltzer, J. L., Kronberger, A., He, C., Bauer, E. A., Goldberg, G. I., (1988). H-ras oncogene-transformed human branchial epithelial cells (TBE-1) secrete a single metalloprotease capable of degrading basement membrane collagen. *J. Biol. Chem.* **263**: 6579-6587.
- Curry, T. E. Jr., Dean, D. D., Woessner, J. F. Jr. y LeMaire W. J., (1985). The extraction of a tissue collagenase associated with ovulation in the rat. *Biol. Reprod.* **33**: 981-991.
- Curry, T. E. Jr., Mann, J. S., Huany, M. H. y Keeble, S. C., (1992). Gelatinase and proteoglycanase activity during the periovulatory period in the rat. *Biol. Reprod.* **46**: 256-264.
- Davidson, E. H., (1976). Gene activity in early development. 2nd. ed. Academic Press, New York.
- Dean, D. D. y Woessner, J. F. Jr., (1985). A sensitive, specific assay for tissue collagenase using telopeptide-free [³H]-acetyl-collagen. *Anal. Biochem.* **148**: 174-181.
- Dominguez, R., Chávez, R. y Cruz, M. E., (1990). La regulación del crecimiento y del desarrollo del folículo ovárico. Cap. 2. En: Tópicos Selectos de Biología de la Reproducción. M. A. Porrúa Editor pp 396, México, D. F.
- Espey, L. L., (1967). Ultrastructure of the apex of the rabbit Graafian follicle during the ovulatory process. *Endocrinology* **81**: 267-276.
- Espey, L. L., (1974). Ovarian proteolytic enzymes and evolution. *Biol. Reprod.* **10**: 216-235.
- Espey, L. L., (1978). Ovulation. En: The Vertebrate Ovary, edited by R. E. Jones, pp 503-532, Plenum Press, New York.
- Espey, L. L., (1980). Ovulation as an inflammatory process a hypothesis. *Biol. Reprod.* **22**: 73-106.
- Fukumoto, M., Yajima, Y., Okamura, H. y Midorikawa, O., (1981). Collagenolytic enzyme activity in human ovary: an ovulatory enzyme system. *Fertil. Steril.* **36**: 746-750.
- Goldberg, G. I., Wilhelm, S. M., Kronberger, A., Bauer, E. A., Grant, G. A., Eisen, A. Z., (1986). Human fibroblast collagenase. Complete primary structure and homology to an oncogene transformation induced rat protein. *J. Biol. Chem.* **261**: 6600-6605.
- Gore-Langton, R. E., (1988). Follicular steroidogenesis and its control. Cap. 10, En: The Physiology of Reproduction. Raven Press pp 1390.
- Greenwald, G. S., (1972). Of eggs and follicles. *Am. J. Anat.* **135**: 1-4.
- Gross, J., Highberger, J. H., Johnson-Wint, B. y Biswas, Ch., (1980). Mode of action and regulation of tissue collagenases. Cap. 2 En: Collagenase in normal and pathological connective tissues. Editado por: D. E. Wolley y J. M. Evanson, John Wiley & Sons Ltd.

- Hay, E. D., (1981). *Cell Biology of Extracellular Matrix*. pp 1-4 2nd Edition Plenum Press, New York.
- Heussen, C. y Dowdle, E. B., (1980). Electroforetic analysis of plasminogen activators in polyacrylamide gel containing sodium dodecyl sulfate and copolymerized substrates. *Anal. Biochem.* **102**: 196-202.
- Huler, D. T., Cahill, D. M. y Schtz, R. M., (1981). Biochemical studies of mammalian oogenesis; metabolism cooperativity between granulosa cells and growing mouse oocytes. *Dev. Biol.* **84**: 452-464.
- Ichikawa, S., Morioka, H., Ohta, M., Oda, K., Murao, S., (1983). Blockage of ovulation in the explanted hamster ovary by a collagenase inhibitor. *J. Reprod. Fertil.* **68**: 17-29.
- Imoedemhe, D. y Shaw, R. W., (1986). Follicular fluid 1-alfa antitrypsin correlation with fertilizing capacity of oocytes. *J. Obstet. Gynecol.* **93**: 863-868.
- Jimenez, S. A., (1988). *Primer on Rheumatic Diseases*. H. Ralph-Schumacher, Jr. M.D. Published by the Arthritis Foundation. Atlanta, Georgia.
- Lipner, H. y Greep, R. O., (1971). Inhibition of steroidogenesis at various sites in the biosynthetic pathway and the relationship to induced ovulation. *Endocrinology* **88**: 602-607.
- Lowry, O. H., Rosenbrough, N. J., Fara, A. L. y Randall, R.J., (1951). Protein Measurement With the folinphenol reagent. *J. Biol. Chem.* **193**: 265-275.
- Martin, G. G. y Talbot, P., (1981). The role of follicular smooth muscle cells in hamster ovulation. *J. Exp. Zool.* **216**: 469-482.
- Martin, G. G. y Miller-Walker, W. C., (1983). Visualization of the 3-dimensional distribution of collagen fibrils over pre-ovulatory follicles in the hamster *Nasoceratus auratus*. *J. Exp. Zool.* **225**: 311-320.
- Masui, Y. y Clarke, J. H. (1979). Oocyte maturation. *Int. Rev. Cytol.* **57**: 185-282.
- Matrisian, L. M., (1992). The Matrix Degrading Metalloproteinases and Their Inhibitors in Connective Tissue Remodeling. *FASEB, J.* **5**: 2145-2154.
- Moor, R. M., Hay, M. F. y Cran, D. G., (1976). Macroscopic identification and steroidogenic function of atretic follicles in sheep. *J. Endocrinology.* **77**: 309-318.
- Morales, T., Woessner, F., Howell, D., Marsh, J. y LeMaire, W., (1978). Microassay for the direct demonstration of collagenolytic activity in Graafian follicles of the rat. *Biochimica et Biophysica Acta.* **524**: 428-234.
- Morales, T. I., Woessner, J. F. Jr., Marsh, J. M. y LeMaire, W. J., (1983). Collagen, collagenases and collagenolytic activity in rat Graafian follicles during follicular growth and ovulation. *Biochim. Biophys. Acta.* **756**: 119-122.
- Muller, D., Quantin, D., Gesnel, M. C., Millan-Collard, R., Abecassis, J., Breathnach, R., (1988). The collagenase gene family in humans consists of at least four members. *J. Biochem.* **253**: 187-192.

- Murphy, G. y Sellers, A., (1980). The extracellular regulation of collagenase activity. En: Collagenase in normal and pathological connective tissues. edited by D. E. Wolley y J. M. Evanson, pp 65-81, John Wiley & Sons, New York.
- Murphy, G. y Docherty, A. J. P., (1988). Molecular studies on the connective tissue metalloproteinases and their inhibitor TIMP. En: The control of tissue Damage. Glovert, A. M. Editor, pp. 223-241, Elsevier, Amsterdam.
- Murphy, G. y Reynolds, J. J., (1993). Extracelular Matrix Degradation. Cap. 9 En: Collagenase in Normal and Pathological Connective Tissues, edited by D. E. Wolley y J. M. Evanson, pp 209-222. John Wiley & Sons, New York.
- Olhsson, K., (1980). Polymorphonuclear leucocyte collagenase. En: Colagenase in Normal and Pathological Connective Tissues, edited by D. E. Wolley y J. M. Evanson, pp 209-222. John WEiley & Sons, New York.
- Okamura, H., Takenaka, A., Yajima, Y. y Nishimura, T., (1980). Ovulatory changes in the wall at tha apex of the human Graafian follicle. *J. Reprod. Fertil.* **58**: 153-155.
- Okazaki, K. T., Okamura, H. y Nishimura, T., (1973). Collagenolytic activity in rat ovary during ovulation. *Acta Obstet. Gynecol. Jpn.* **80**: 112-117.
- Palotie, A., Peltene, L., Foidart, J. M. y Rajaniemi, H., (1984). Immunohistochemical localization of basement membrane components and interstitial collagen types in preovulatory rat ovarian follicles. *Cell Relat. Res.* **4**: 279-287.
- Parr, E. L., (1974). Histological examination of the rat ovarian follicle wall prior to ovulation. *Biol. Reprod.* **11**: 483-503.
- Pérez-Montfort, R., Ostoa-Saloma P., Velazquez-Medina, L., Montfort, I. y Beker, I., (1987). Catalytic classes of proteinases of *Entamoeba histolytica*. *Mol. and Biochemical Parasitology.* **26**: 87-98.
- Pincus, G. y Enzmann, E. V., (1935). The comparative behavior of mammalian eggs *in vivo e in vitro*. I. the activation of ovarian eggs. *J. Exp. Med.* **62**: 665-675.
- Reich, R., Miskin, R. y Tsafiri, A., (1984). Follicular plasminogen activator involvement in ovulation. *Endocrinology.* **116**: 516-519.
- Reich, R., Tsafiri, A. y Mechanic, G. L., (1985). The involvement of collagenolysis in ovulation in the rat. *Endocrinology* **116**: 522-527.
- Rhodes, R. K. y Miller, E. J., (1978). Physicochemical characterization and molecular organization of the collagen A and B chains. *Biochem.* **17**: 3442-3448.
- Rondell, P., (1970). Biophysical aspects of ovulation. *Biol. Reprod.* **2**: 64-89.
- Rosales, A. M. y Rosado A., (1989). Bioquímica de la maduración folicular en el mamífero. *Ciencia* **40**: 273-288.
- Rosales, A. M., Hernández-Pérez, O., Domínguez, R., Mercado, E. y Rosado, A., (1990). Proteolytic and antiproteolytic activities in goat antral follicles. *Anim. Rep. Sci.* **23**: 213-222.

- Sandell, L. J. y Boyd, Ch. D., (1990). Extracellular Matrix Genes. Academic Press. Inc., pp237.
- Sato, E. y Kaide. S. S., (1984). Forskolin and mouse oocyte maturation *in vitro*. *J. Expe. Zool.* 230: 125-129.
- Schochet, S. S., (1916). A suggestion as to the process of ovulation and ovarian cyst formation. *Anat. Rec.* 10: 447-457.
- Shaw, L. M. y Olsen, B. R., (1991). FACIT Collagens; Diverse Molecular Bridges in Extracellular Matrices. *TIBS.* 16: 191-194.
- Sprigman, E. B., Angleton, E. L., Birkedal-Hansen, H. y Van Wart, H. E., (1990). Multiples modes of activation of latent human fibroblast collagenase; evidence for the role of a Cis 73 active-site zinc complex in latency and a "cysteine switch" mechanism for activation. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 87: 364-368.
- Stewart, T. E., Gay, R. E. y Gay, S., (1989). Clinical impact of bone and connective tissue markers. En: The Collagens. Academic Press, New York.
- Srickland, S. y Beers, W. H., (1976). Studies on the role of lasminogen activator in ovulation. *In vitro* response of granulosa cells to gonadotropins, cyclic nucleotides and prostaglandins. *J. Biol. Chem.* 251: 5694-5702.
- Stryer, L., (1988). Biochemistry. 3rd, edition. Published by W. H. Freeman and Company. New York.
- Tsujimoto, D., Katayama, K., Tojo, S. y Mizoguti, H., (1982). Scanning electron microscopic studies on stigmas in rat ovaries. *Acta Obstet. Gynecol. Scand.* 61: 269-273.
- Weeks, J., Halme, J. y Woessner, F., (1976). Extraction of collagenase from the involuting rat uterus. *Bioch. et Biophysica Acta.* 445: 205-214.
- Whitman, S. E., Murphy, G., Angel, P., Rahmsdorf, H. L., Smith, B. J., Lyons, A., Harris, T. J. R., Reynolds, J. J., Harrlich, P., Docherty, A. J. P., (1986). Comparison of human stromelysin and collagenase by cloning and sequence analysis. *Biochem. J.* 240: 913-916.
- Woessner, J. F. Jr., (1982). Enzymatic mechanisms for the degradation of connective tissue matrix. En; Symposium on Idiopathic low back pain, edited by A. White y S. L. Gordon pp. 391-400. Mosby, St. Louis.
- Woessner, J. F. Jr., (1991). Matrix Metalloproteinases and Their Inhibitors in Connective Tissue Remodeling. *FASEB J.* 5: 2145-2154.
- Wolley, D. E. y Evanson, J. M., (1990). Presente status and future prospects in collagenase research. En: Collagenase in Normal and Pathological Connective Tissues, editeb by D. E. Wolley y J. M. Evanson, pp 241-250, John Wiley & Sons, New York.