

03068

1
2ej.



**UNIVERSIDAD NACIONAL AUTONOMA
DE MEXICO**

COLEGIO DE CIENCIAS Y HUMANIDADES
UNIDAD ACADÉMICA DE LOS CICLOS PROFESIONAL
Y DE POSGRADO
CENTRO DE NEUROBIOLOGIA

**CINETICA DE LA PROLIFERACION CELULAR EN
OVARIOS DE RATAS INMADURAS
HIPOFISECTOMIZADAS TRATADAS CON DOSIS
UNICAS DE LA HORMONA ESTIMULANTE DEL
FOLICULO RECOMBINANTE HUMANA.**

T E S I S

QUE PARA OBTENER EL GRADO DE:

MAESTRA EN CIENCIAS FISIOLÓGICAS

P R E S E N T A :

BIOL. JORGELINA BARRIOS DE TOMASI

L

MEXICO, D. F.

1998.

**TESIS CON
FALLA DE ORIGEN**

267981



Universidad Nacional
Autónoma de México

Dirección General de Bibliotecas de la UNAM

Biblioteca Central



UNAM – Dirección General de Bibliotecas
Tesis Digitales
Restricciones de uso

DERECHOS RESERVADOS ©
PROHIBIDA SU REPRODUCCIÓN TOTAL O PARCIAL

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

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

A mi familia que siempre han sido mis mejores amigos.

A mis amigos que siempre han sido como una gran familia.

El presente trabajo de tesis se llevó a cabo en los Departamentos de Biología de la Reproducción del Instituto Nacional de la Nutrición "Salvador Zubirán", y de Biología Celular del Instituto de Investigaciones Biomédicas, UNAM, bajo la tutoría del Dr. Alfredo Ulloa-Aguirre y la cotutoría del Dr. Horacio Merchant-Larios. La presente tesis tuvo apoyo financiero del Consejo Nacional de Ciencia y Tecnología (CONACyT, No. 93800).

AGRADECIMIENTOS

Quisiera agradecer profundamente al Dr. Alfredo Ulloa Aguirre por su asesoría y dirección, básica en esta etapa de mi desenvolvimiento profesional, así como a cada uno de los integrantes del Departamento de Biología de la Reproducción y muy especialmente al laboratorio de Mecanismo de Acción Hormonal II, que me demostraron que no nada más podemos ser compañeros sino también amigos.

Al Dr. Fernando Larrea Gallo por permitirme realizar este trabajo en el departamento a su cargo.

Expreso mi gratitud de igual manera al Dr. Horacio Merchant y al personal a su cargo en el Departamento de Biología Celular del Instituto de Investigaciones Biomédicas por su apoyo y alegría que hicieron más fáciles los momentos difíciles.

Finalmente agradezco al Dr. Andrés Quintanar-Stephano, de la Universidad Autónoma de Aguascalientes, que sin su apoyo hubiera sido imposible la elaboración de este trabajo.

ÍNDICE

RESÚMEN.....	1
SUMMARY.....	2
INTRODUCCIÓN.....	3
• Crecimiento y desarrollo folicular.....	3
Estructura de los folículos ováricos.....	3
Función de las gonadotropinas en el crecimiento y desarrollo de los folículos.....	9
Gonadotropinas hipofisarias.....	9
A. Hormona estimulante del folículo.....	9
B. Hormona luteinizante.....	11
Desarrollo folicular.....	11
A. Folículos preantrales.....	11
B. Folículos antrales.....	12
C. El folículo dominante.....	12
D. El folículo preovulatorio.....	13
Otros reguladores del desarrollo y crecimiento folicular.....	13
A. Prolactina.....	13
B. Esteroides ováricos.....	14
Estrógenos.....	14
Andrógenos.....	14
C. Péptidos ováricos.....	14
Inhibina.....	15
Activina.....	15
Folistatina.....	16
D. Factores de crecimiento semejantes a insulina.....	16
E. Factor de crecimiento endotelial vascular.....	16
• Estudios morfológicos en la síntesis de ADN.....	17
• La atresia folicular ovárica es un proceso mediado por apoptosis.....	18
• Control hormonal de la apoptosis gonadal.....	20
A. Gonadotropinas.....	20
B. Factores de crecimiento y citoquinas.....	20
C. Esteroides sexuales.....	21
• Mecanismos intraováricos involucrados en la atresia folicular.....	21
JUSTIFICACIÓN.....	24
HIPÓTESIS.....	25
OBJETIVOS.....	26
MATERIALES Y MÉTODOS.....	27
• Animales.....	27
• Hipofisectomía por vía parafaríngea.....	27
• Efectos subagudos: proliferación celular de células foliculares.....	27
• Procesamiento de tejidos.....	27
• Autorradiografía.....	28

• Análisis microscópico.....	29
• Análisis estadístico.....	29
RESULTADOS.....	30
DISCUSIÓN.....	44
ANEXO I.....	48
• Hipofisectomía por vía parafaríngea.....	48
• Cuidados postoperatorios.....	49
ANEXO II.....	50
• Tratamiento de tejidos.....	50
Fijación.....	50
Deshidratación.....	50
Impregnación.....	50
BIBLIOGRAFÍA.....	51

RESUMEN

La conversión de un folículo primordial en folículo primario es aparentemente un proceso independiente de gonadotropinas, ya que puede llevarse a cabo aún después de la hipofisectomía. Aunque el desarrollo de los folículos hasta el estadio antral se puede dar en ausencia de gonadotropinas, este proceso puede estar fuertemente inhibido por la ausencia del efecto trófico. Cuando un folículo alcanza el estadio antral y las concentraciones de FSH exceden cierto valor umbral, el desarrollo a la fase preovulatoria continúa. Por otra parte, si se ha alcanzado el estadio antral, pero las concentraciones de FSH no son suficientes, los folículos se vuelven atrésicos. El objetivo principal de este trabajo fue analizar cuál es el efecto de la FSHrec (ORG32489) en el desarrollo folicular así como en el rescate de la atresia que permitan analizar los efectos *in vivo* de los diferentes análogos de la FSH. La determinación del efecto de la FSHrec en el desarrollo folicular del ovario fue analizada empleando ratas hembras de 21 días de edad, hipofisectomizadas quirúrgicamente y tratadas (6 horas posthipofisectomía) con dos diferentes dosis únicas de FSHrec (2.5 y 8.0 UI). Se estudiaron así mismo, grupos de animales hipofisectomizados que recibieron únicamente el vehículo, animales a los cuales se les realizó una falsa hipofisectomía y animales intactos. Los animales fueron decapitados a las 6, 12 y 18 horas después de haber recibido la inyección. Una hora antes del sacrificio cada animal recibió 2.5 $\mu\text{Ci/g}$ de peso de [^3H]-timidina. Los ovarios fueron procesados para autorradiografía. Los folículos se clasificaron con base en el diámetro folicular mayor. Se contaron las células de la granulosa con núcleos marcados así como las células con núcleos picnóticos. Resultados: No hubo cambios significativos en los animales estimulados con las diferentes dosis de FSHrec ni en el porcentaje de folículos antrales ni en el diámetro mayor folicular, sin embargo, indujo decrementos significativos dosis-dependientes en el porcentaje de folículos atrésicos. Así mismo, a mayor tiempo transcurrido después de la administración de FSHrec, mayor porcentaje de atresia, a excepción de la dosis más alta, donde no hubo variaciones en los diferentes tiempos. En términos generales se encontró que para los diferentes tamaños de folículos hubo un incremento en el número de células marcadas conforme aumenta la dosis. Los hallazgos de la presente tesis nos permiten concluir la importancia de la FSHrec en el efecto agudo de la privación de gonadotropinas en el desarrollo folicular al rescatar a los folículos ováricos de la atresia e inducir la proliferación celular en las células de la granulosa; siendo la FSH indispensable para la maduración de los folículos en estadios tempranos del desarrollo. El modelo parece ser adecuado para el análisis de los efectos *in vivo* de diferentes análogos de la FSH.

SUMMARY

The conversion of primordial into primary follicle is thought to be gonadotropin-independent, since this process continues normally after hypophysectomy (hypox). The further development of growing follicles up to the antral stage can occur in the absence of gonadotropins, although quantitatively this process will be strongly inhibited. Whenever a follicle reaches the antral stage and the level of FSH exceeds a certain threshold value, the follicle continues its development to the preovulatory stage. However, if the antral stage is reached and FSH levels are insufficient, follicles become atretic. The current study was undertaken to gain further knowledge about the role of recFSH activity in follicular cell proliferation and atresia.

Immature female Wistar rats (38-48g, 21 days old) were hypophysectomized, 6 hours later treatment was started by a single s.c. injection of recFSH (doses: 2.5 and 8.0 IU). Control animals were treated with vehicle solution only and shams were included in the study. Animals were treated with a i.p. injection of ^3H -thymidine and killed after 6, 12 and 18 hours of treatment. Ovaries were fixed, embedded and then sectioned at $1\mu\text{m}$ for histological and autoradiography examination. Three follicle size classes ($50\text{-}199\mu\text{m}$, $200\text{-}400\mu\text{m}$ and $> 400\mu\text{m}$) were used to describe stages of follicle development. Granulosa cells were counted in every tenth section using the nucleolus of the oocyte as a marker. For each ovary the following characteristics were evaluated: a) percentage of follicles with or without antral cavity, b) percentage of healthy and atretic follicles (more than 3 pycnotic nuclei) and, c) number of labelled cells with ^3H -thymidine per follicle (cell proliferation).

The current study in immature, hypox rats demonstrates that recFSH, in the complete absence of LH, increases the percentage of healthy follicles and diminishes the incidence of atresia in these follicles, by increasing the number of labelled cells with ^3H -thymidine.

On the other hand, 2.5 IU recFSH were not enough to rescue from atresia 18 h later.

We concluded that recFSH rescues from atresia and induces granulosa cell proliferation in the gonadotropin deprivation acute effect, being FSH necessary for follicular maturation.

INTRODUCCIÓN

Los sistemas nervioso y endócrino constituyen un sistema morfofuncional interdependiente y especializado en la recepción-emisión de señales y mensajes intercelulares; es decir, constituyen un sistema encargado de la intercomunicación celular. Las células de este sistema neuroendócrino sintetizan y secretan diversos mensajeros extracelulares químicamente heterogéneos, los cuales en conjunto coordinan muchos de los procesos homeostáticos del organismo.

Existe una estructura neuroendócrina que desempeña un papel muy importante en la regulación del fenómeno reproductivo, el hipotálamo, el cual tiene la característica (entre muchas otras) de sintetizar y secretar la hormona liberadora de gonadotropinas (GnRH). Bajo la influencia de la GnRH hipotalámica, la hipófisis anterior sintetiza y secreta dos gonadotropinas: la hormona estimulante del folículo (FSH) y la hormona luteinizante (LH), cuyos órganos blanco son las gónadas. En la hembra, la FSH está estrechamente ligada con la regulación y el mantenimiento de procesos reproductivos esenciales tales como la gametogénesis, el crecimiento folicular, la maduración del ovocito y la ovulación. La LH es la principal responsable de la ovulación, de la producción de los precursores necesarios para la síntesis de estrógenos y del mantenimiento de la producción de progesterona por el cuerpo lúteo.

CRECIMIENTO Y DESARROLLO FOLICULAR

ESTRUCTURA DE LOS FOLÍCULOS OVÁRICOS

Hay numerosas formas de clasificar los folículos, pero desde el punto de vista de un folículo que está en continuo cambio tanto en forma como en función, es conveniente clasificar los folículos en primordiales, primarios, preantrales, antrales y preovulatorios. La maduración de los folículos ováricos involucra una serie de estadios secuenciales: iniciación, crecimiento, selección, ovulación y luteinización. Durante la fase folicular del ciclo se suscitan una serie de eventos que aseguran que un número de folículos maduren y se preparen para la ovulación o la atresia. En el caso del humano, este desarrollo folicular culmina con la maduración de un solo folículo. Este proceso está caracterizado por una serie de efectos secuenciales regulados por las diversas hormonas hipofisarias y gonadales,

permitiendo que el folículo destinado a ovular se transforme de un folículo primordial a un folículo primario, preantral, antral y finalmente preovulatorio (Speroff, Glass, Kase, 1989) (Figura I).

La foliculogénesis se inicia con la fragmentación de los cordones sexuales del ovario embrionario. Una vez iniciada la meiosis en la región medular, los ovocitos mantienen una capa de células epiteliales. Después en la corteza del ovario, los ovocitos se dividen por mitosis dos o tres veces, inician la meiosis y forman una segunda generación de folículos primordiales (Merchant-Larios, 1984). Los folículos con una capa simple de epitelio cúbico alrededor del ovocito son llamados folículos primordiales (Freeman, 1994). El ovario fetal contiene en su mayoría folículos primordiales, aunque la transformación a folículos preantrales ocurre en algunos folículos en este período. El epitelio cúbico se ensancha para formar una capa simple de epitelio columnar que rodea el ovocito. Los folículos primordiales se conocen entonces como folículos primarios, los cuales representan el primer estadio de crecimiento y diferenciación. El folículo primario consiste en un ovocito detenido en el diploteno de la profase meiótica, rodeado por una capa simple de células de la granulosa. La iniciación del crecimiento folicular es aparentemente independiente de la estimulación de las gonadotropinas; sin embargo, el evento hormonal más importante es el incremento en la concentración plasmática de FSH. Hay algunas células de la teca que se acomodan alrededor de las de la granulosa, pero aún no constituyen una capa bien definida. El ovocito también crece durante este período. El epitelio columnar simple comienza a dividirse formando un epitelio cúbico estratificado, llegando a formar hasta ocho capas alrededor del ovocito. En este estadio las células epiteliales se reconocen como células de la granulosa y los folículos se identifican como folículos secundarios; tanto las células de la granulosa como las de la teca continúan proliferando, de tal forma que al final del estadio preantral se han desarrollado completamente ambas capas. Una vez que el crecimiento se ha iniciado, el folículo evoluciona al estado preantral, en el cual el ovocito aumenta de tamaño y es rodeado por una membrana constituida por mucopolisacáridos, la zona pelúcida. Las células de la granulosa comienzan a proliferar, siendo este crecimiento dependiente de las gonadotropinas y está correlacionado con el incremento en la producción de estrógenos. Las células en el folículo preantral sintetizan tres clases de esteroides: estrógenos, andrógenos y progestinas. La aromatización, que es el mecanismo mediante el cual los andrógenos se transforman en estrógenos, es inducida o activada por la FSH (Speroff *et al.*, 1989). La FSH junto con los estrógenos ejercen sinérgicamente una acción mitótica en las células de la granulosa y estimulan su proliferación. Tanto la



Figura I. Ciclo de vida del ovario de rata. (Freeman, 1994).

FSH como los estrógenos promueven una rápida acumulación de receptores de la FSH, reflejándose esto en el aumento del número de células de la granulosa. Bajo la influencia del estradiol y la FSH, hay un incremento en la producción del líquido folicular, el cual se acumula progresivamente formando una cavidad; a este estadio se le conoce como folículo antral, en el cual los receptores para la LH se encuentran exclusivamente en las células de la teca, mientras que los receptores para la FSH se encuentran en las de la granulosa (Speroff *et al*, 1989). En respuesta a la LH, la teca es estimulada y produce andrógenos, los cuales son transformados, mediante la aromatización, en estrógenos (Figura II).

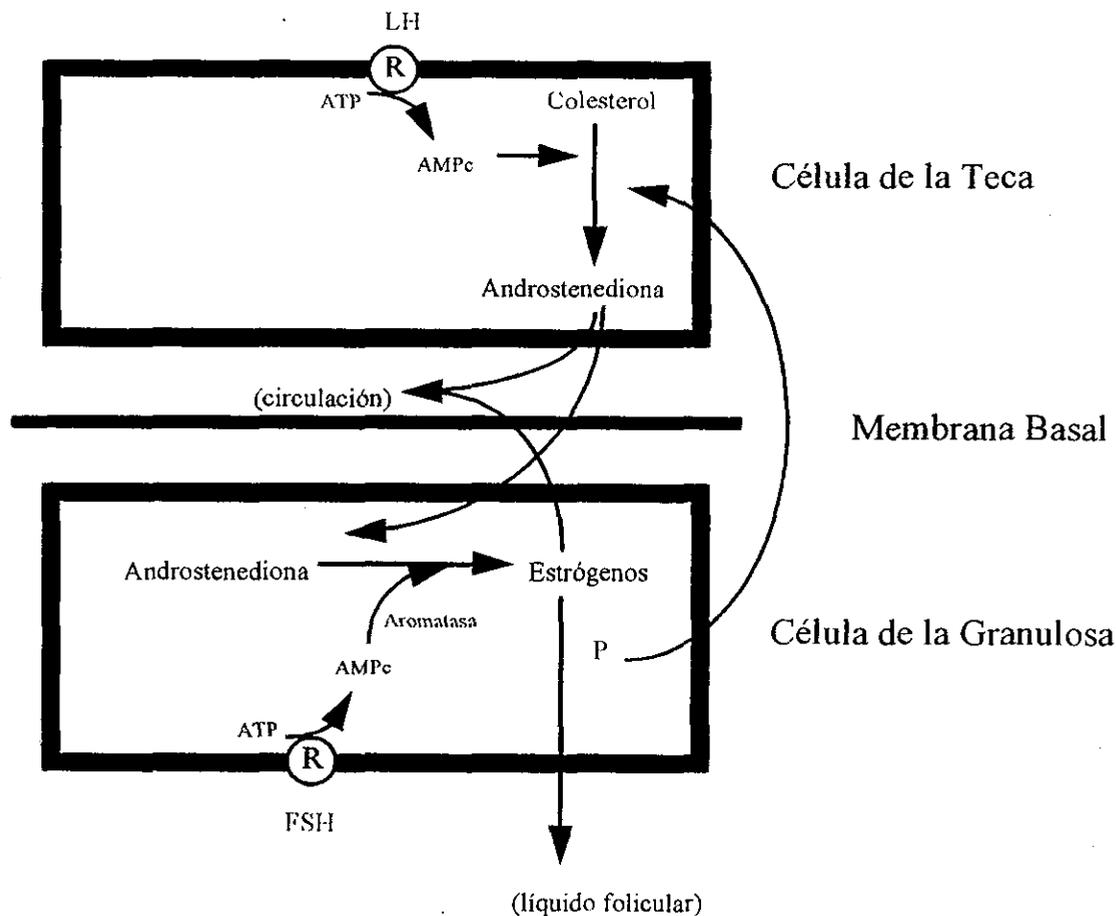


Figura II. Teoría de las dos células-dos gonadotropinas. De acuerdo a esta teoría, la LH estimula la biosíntesis de andrógenos a partir de colesterol en el compartimento de la teca interna. Los andrógenos difunden a través de la membrana basal y son transformados en estrógenos dentro de las células de la granulosa. Las células de la granulosa secretan progesterona en respuesta a las gonadotropinas, la cual se difunde hacia las células de la teca para servir como sustrato para la biosíntesis de andrógenos. Las células de la teca secretan principalmente androstenediona y la participación de la 17β -hidroxiesteroide deshidrogenasa en las células de la granulosa es requerida para la biosíntesis de estradiol y para la mutua relación entre ambas células. LH, hormona luteinizante; FSH, hormona foliculo estimulante; P, progesterona; ATP, adenosin trifosfato; AMPc, adenosin monofosfato cíclico; R, receptor.

Mientras que los estrógenos constituyen un estímulo activador en el folículo maduro, hay una retroalimentación negativa a nivel hipotálamo-hipofisiario dando como resultado el retiro del soporte gonadotrópico al resto de los folículos menos desarrollados. Posteriormente, la FSH induce el desarrollo de receptores de la LH en las células de la granulosa de los folículos antrales, promoviendo la luteinización de la granulosa en el folículo dominante y también la síntesis de progesterona, la cual es requerida para inducir la máxima secreción de la FSH en el medio ciclo. La concentración de la LH en el plasma aumenta en la fase folicular tardía estimulando la producción de andrógenos en la teca (Speroff *et al.*, 1989).

El ovocito junto con las células de la granulosa que lo rodean, que en un principio se encontraba en el centro del folículo, se vuelve excéntrico, formando el *cumulus oophorus*. Las células de la granulosa que encapsulan al ovocito forman la corona radiada. En este momento se le reconoce al folículo como preovulatorio. El fluido contenido en el antro, el líquido folicular, incrementa su volumen conforme la ovulación se aproxima. El ensanchamiento de la capa de las células de la granulosa está acompañado del desarrollo de una capa externa que deriva del estroma y cubre al folículo. Esta capa constituye la teca, que puede ser dividida en teca interna y teca externa. La teca interna crece rápidamente, sus células adquieren una forma poligonal y tienen un citoplasma vacuolado y un núcleo vesicular. Estas células se encuentran en una red reticular fibrosa que contiene un plexus de capilares sanguíneos y linfáticos. Esta capa se hipertrofia conforme el proestro avanza y es uno de los sitios de mayor producción de estrógenos durante el ciclo. La teca externa contiene fibras de tejido contráctil, formadas por células mioideas que desempeñan un rol en la ovulación (Freeman, 1994). La concentración máxima de ambas gonadotropinas estimula una serie de sucesos que llevan a la ovulación, la liberación física del ovocito y las células de la granulosa circundantes. La máxima concentración de LH inicia tanto la reanudación de la meiosis en el ovocito como la luteinización en las células de la granulosa y la producción de prostaglandinas necesarias para la ruptura folicular. La liberación del óvulo está asociado con cambios degenerativos en la colágena de la pared folicular. La LH, la progesterona, o ambas aumentan la actividad de enzimas proteolíticas que degradan la colágena, incrementando la distensión de la pared folicular. En respuesta a la máxima concentración de gonadotropinas, tanto las células de la granulosa como las de la teca sintetizan el activador de plasminógeno. El aumento en la concentración del activador de plasminógeno lleva al incremento intrafolicular de las concentraciones de plasmina, la cual junto con otras proteasas llevan a la degradación del tejido conectivo de la pared del folículo. La producción del activador de plasminógeno es más sensible a la FSH que a la LH. Después de la ruptura

del folículo y la liberación del óvulo, las células de la granulosa aumentan de tamaño llevando a la formación del cuerpo lúteo, el cual es el origen principal de las hormonas esteroideas sexuales secretadas por el ovario durante la fase postovulatoria o lútea del ciclo menstrual (Speroff *et al*, 1989).

El crecimiento folicular ha sido descrito como un proceso continuo (Peters, Byskov, Himmelstein-Braw y Faber, 1975). Los folículos comienzan a desarrollarse y no cesan de hacerlo hasta que ovulan o se atrofian. Así, el número de folículos en cualquier estado de crecimiento está determinado por: 1) la proporción de folículos en reposo que inician su crecimiento, 2) la velocidad de crecimiento de los folículos y 3) la proporción de pérdida de folículos por atresia. Si fuera constante el número de folículos que comienzan a crecer, así como la velocidad de crecimiento y la proporción de folículos que se atrofian, el número de folículos de todos los tamaños sería constante. Sin embargo, al variar alguno de estos tres procesos durante el ciclo estral, permite que haya ondas de folículos en crecimiento y, por lo tanto, el número de folículos de un determinado tamaño es diferente durante el ciclo estral (Hirschfield y Midgley, 1978).

El desarrollo folicular normalmente termina en atresia; para que se de la ovulación los folículos deben ser "rescatados" del proceso atrésico. La atresia parece ser el final del crecimiento folicular y los folículos que ovulan son la excepción, no la regla (Hirschfield y Midgley, 1978). Se ha estimado que a lo largo de la vida reproductiva, un 99.9% de todos los folículos se atrofian y sólo un 0.1% eventualmente ovulan (Ingram, 1962). Schwartz (1974) sugirió que durante la concentración máxima de FSH de un ciclo, se seleccionan los folículos que ovularán durante el subsecuente ciclo; solamente los folículos que fueron rescatados continuarán su crecimiento hasta el final del desarrollo, preparándose para la ovulación del siguiente estro (Hirschfield y Midgley 1978).

En los folículos preantrales, las capas de células de la granulosa que rodean a los ovocitos tienen una forma cúbica y cada folículo es rodeado por una masa compacta de células intersticiales (Centola, 1983). En cierto momento del desarrollo folicular, estas células se diferencian formando la teca. En cortes ováricos de rata teñidos con hematoxilina y eosina se observó que se forman estructuras parecidas a la teca alrededor de los folículos con 3 a 4 capas de células de la granulosa (Hirschfield, 1991). Estas células intersticiales se organizan alrededor de los folículos al inicio del desarrollo folicular y no hay una asociación estrecha entre estas células y la membrana basal folicular sino hasta que los folículos adquieren cierto grado de madurez en respuesta a las gonadotropinas. Los componentes de la matriz extracelular, tales como la colágena y la fibronectina, desempeñan un papel importante en la

comunicación celular. Las gonadotropinas deben afectar la composición de la membrana basal folicular e iniciar la diferenciación de la teca (Bagavandoss Midgley y Wicha, 1983).

Las células de la granulosa en los folículos preantrales tienen una forma polihédrica o cúbica, con un núcleo grande y el citoplasma escaso (Bjersing, 1978). La zona pelúcida aparece por primera vez cuando las células de la granulosa rodean el ovocito y son completamente cúbicas. La zona pelúcida se ha descrito como una capa de glicoproteínas originada tanto por el ovocito como por la granulosa. El complejo de Golgi y el ovocito maduran simultáneamente, sugiriendo que éste desempeña un papel importante en la formación de la zona pelúcida.

Conforme los folículos crecen, se incrementa gradualmente el número de mitocondrias, ribosomas libres, retículo endoplásmico y gotas lipídicas; sin embargo, declinan gradualmente las figuras mitóticas (Bjersing, 1978). Las células de la granulosa que rodean al ovocito son principalmente proliferativas, mientras que las células más diferenciadas se localizan cerca de la membrana basal (Roy, 1994). Este fenómeno genera dos subtipos de células de granulosa en un folículo. Aún no se conoce como interactúa la teca con la membrana basal para la diferenciación de la granulosa. Sin embargo, solamente se presentan receptores para la LH en las células de la granulosa murales (Oxberry y Greenwald, 1982). Conforme se va desarrollando la cavidad antral, las células de la granulosa murales se van elongando, con núcleos irregulares, y el número de gotas lipídicas y del retículo endoplásmico liso (características de las células esteroideogénicas) se incrementan dramáticamente (Albertini y Anderson, 1974).

FUNCIÓN DE LAS GONADOTROPINAS EN EL CRECIMIENTO Y DESARROLLO DE LOS FOLÍCULOS

Desde hace algunos años se piensa que el crecimiento folicular es dependiente de gonadotropinas (Eshkol, Lunenfeld y Peters, 1970), sin embargo, hay una serie de factores, que junto con las gonadotropinas regulan el desarrollo del folículo. Muchos de estos regulan inhibiendo o estimulando el desarrollo del folículo, y hay varios más cuyo efecto aun se desconoce.

GONADOTROPINAS HIPOFISIARIAS

A. HORMONA ESTIMULANTE DEL FOLÍCULO

La hormona folículo estimulante (FSH) es el principal factor que promueve el crecimiento y desarrollo del folículo. La función principal de la FSH es estimular el proceso de aromatización, en el cual los

andrógenos son transformados en estrógenos en las células de la granulosa (Dorrington, Moon y Armstrong, 1975). Además, la FSH estimula la producción de un mayor número de receptores de FSH y de receptores para la hormona luteinizante (LH) en las células de la granulosa (Richards y Midgley, 1976). La FSH estimula la producción de inhibina, activina y del factor de crecimiento semejante a la insulina I (IGF-I), estimulando o inhibiendo el crecimiento folicular (Bley, Simon, Estaves, Jiménez de Asua y Barao, 1992). También hay evidencias de que la FSH estimula la división celular de las células de la granulosa (Yong, Baird, Yates, Reichert y Hillier, 1992).

Al igual que la LH, la gonadotropina coriónica (CG) y la tirotrópina (TSH), la FSH es una glicoproteína heterodimérica compuesta por las subunidades: α y β (Pierce y Parsons, 1981). En una misma especie animal, la síntesis de las subunidades α de estas glicoproteínas está codificada por el mismo gen y por lo tanto presentan una secuencia de aminoácidos casi idéntica (Fiddes y Talmadge, 1984). Por el contrario, las subunidades β son codificadas por diferentes genes y le confieren a la hormona especificidad inmunológica y biológica. La estructura de la subunidad α consta de 92 a 96 residuos de aminoácidos y tiene dos cadenas de oligosacáridos complejos unidos a asparagina a través de enlaces N-glicosídicos en las posiciones Asn 52 ó 56 y Asn 78 u 82. La subunidad β presenta 111-112 residuos de aminoácidos y contiene también dos sitios de glicosilación localizados en las posiciones Asn 6,7 ó 13 y Asn 23, 24 ó 30 (Smith, Bishop, DeKroon, Wright, Cerpa-Poljak y Schofield, 1992). Las variaciones en la estructura y distribución de los oligosacáridos sializados, y en menor grado de los sulfatados, constituyen la base química más importante de las diferencias entre sus isoformas y son las responsables de la extensa heterogeneidad por carga que las caracteriza (Baenziger y Green ED, 1988, Zambrano, Olivares, Diaz-Cueto, Méndez, Veldhuis y Ulloa-Aguirre, 1995). Después de su síntesis y secreción, la mezcla de isoformas llega a los tejidos blanco (las células de la granulosa en el ovario o las células de Sertoli del túbulo seminífero), en donde modula una gran variedad de procesos biológicos tales como el crecimiento y la proliferación celular, la esteroidogénesis y la síntesis de diversas proteínas. La contribución relativa de las isoformas de la FSH (y de la LH) a esta mezcla circulante varía según el estado fisiológico del donador (Ulloa-Aguirre, Espinoza, Damian-Matsumura y Chappel, 1988). Así, las isoformas ácidas, con un mayor contenido de ácido siálico, tienen una mayor vida media circulante, una reducida unión al receptor y actividad biológica *in vitro* y, son producidas y secretadas preferencialmente durante el desarrollo folicular y posiblemente proveen al ovario de un estímulo de acción prolongada que permite la maduración. Por el contrario, la vida media de las isoformas menos ácidas es significativamente menor que la de sus análogos más ácidos debido al

menor contenido de ácido siálico de las primeras; presentan, sin embargo, una mayor actividad biológica *in vitro* así como una mayor unión al receptor, siendo selectivamente producidas y secretadas inmediatamente antes de la ovulación y posiblemente inducen efectos agudos tales como la ruptura folicular (Padmanabhan, Lang, Sonstein, Kelch y Beitinis, 1988; Ulloa-Aguirre, Damian-Matsumura, Espinoza, Dominguez, Morales y Flores, 1990; Wide y Bakos, 1993; Zambrano *et al.*, 1995). De esta manera, los cambios en la distribución relativa de las isoformas circulantes podrían modular selectivamente los diversos efectos biológicos netos de la hormona en su tejido blanco.

B. HORMONA LUTEINIZANTE

La hormona luteinizante (LH) estimula a las células de la teca para la producción de andrógenos, principalmente de androstendiona (A), la cual cruza la membrana basal hasta llegar a las células de la granulosa donde es aromatizada a estrona en presencia de FSH (Mills, 1975). A la mitad del ciclo menstrual la concentración máxima de LH es la responsable de la ovulación. Además la LH es responsable de transformar a las células de la granulosa durante el proceso de luteinización (Richards, 1980).

La función de las gonadotropinas en la estimulación del crecimiento folicular en estadios tempranos del desarrollo es controversial. Se piensa que el crecimiento folicular de los folículos preantrales es independiente de gonadotropinas (Peters, 1979), se desconoce con precisión qué inicia el crecimiento de los folículos primordiales a preantrales.

DESARROLLO FOLICULAR

A. FOLÍCULOS PREANTRALES

Los receptores para la FSH se encuentran presentes en los folículos preantrales, no es así los de la LH (Zeleznik, Schuler, Reichert, 1981) por lo que el folículo preantral es incapaz de sintetizar estradiol. Como resultado, la mayoría de los folículos preantrales llevan a cabo la atresia. La FSH estimula el desarrollo de receptores tanto para FSH como para LH en las células de la granulosa. En el momento en que la concentración máxima de FSH en el medio ciclo se presenta, aquellos folículos que han alcanzado el estadio preantral serán los únicos que desarrollen receptores para FSH y para LH, necesarios para la producción de estradiol y continuar el crecimiento (Gougeon, 1981; Greenwald y Roy, 1994). Así, se forma una cohorte de folículos de los cuales uno se seleccionará en el ciclo subsecuente. Sin embargo, la mayoría

de los folículos preantrales no son capaces de secretar estrógenos suficientes y se vuelven atrésicos (Taymor, 1996).

B. FOLÍCULOS ANTRALES

Los folículos antrales y preantrales tardíos tienen gran cantidad de receptores para FSH y para LH; la capa de la teca se encuentra así mismo bien desarrollada, y es necesaria para la secreción de andrógenos que serán aromatizados subsecuentemente en la granulosa (Ellenwood, McClellan, Brenner y Resko, 1983). La concentración de FSH se incrementa unos días antes de que termine el ciclo y continúa aumentando durante los siguientes 5 o 6 días del siguiente ciclo. La caída en las concentraciones de estradiol, inhibina y posiblemente P, marcan la regresión del cuerpo lúteo, lo cual permite que las concentraciones de FSH se incrementen (Le Nestour, Marraoui, Lahlou, Roger, De Ziegler y Bouchard, 1993). Durante este período y bajo la influencia de las concentraciones crecientes de FSH, hay una continua transformación de folículos preantrales a antrales (Zeleznik, Hutchinson, Schuler, 1987). Esta progresión provee de un número de folículos de los cuales se seleccionará uno para ovular. Otra manera de describir este fenómeno es que uno y sólo uno de los folículos será rescatado del destino natural de los folículos: la atresia (Taymor, 1996). El rescate se da cuando el primer folículo que esté un poco más avanzado o sea un poco más grande que sus vecinos, entra en contacto con la FSH, cuya concentración es suficiente para continuar la estimulación del crecimiento de ese folículo (Taymor, 1996).

C. EL FOLÍCULO DOMINANTE

¿Qué es lo que hace que un folículo en desarrollo se seleccione o se rescate permitiendo que se vuelva un folículo dominante a pesar del decremento en las concentraciones de FSH? La respuesta es que los reguladores intraováricos, incluyendo esteroides y péptidos, hacen al folículo más sensible a la baja exposición a FSH. En primer lugar, la exposición a altas concentraciones de FSH previas producen un gran número de receptores para la FSH, los cuales pueden continuar respondiendo a bajas concentraciones de FSH subsecuentes y, así la aromatización continúa. La concentración relativamente baja de FSH plasmática es a su vez facilitada por la acción del factor de crecimiento endotelial vascular, el cual concentra la FSH en la vecindad del folículo seleccionado (Taymor, 1996). Mientras tanto, el E_2 producido continúa estimulando la actividad mitogénica. La activina y el factor de crecimiento-1 semejante a la insulina (IGF-1) aumentan los efectos de la FSH (Taymor, 1996). La activina potencia su efecto amplificando la esteroidogénesis y la mitogénesis; el IGF-1 amplifica la aromatización y el

crecimiento de las células de la granulosa (Taymor, 1996). Además incrementa la producción de andrógenos en las células de la teca, las cuales proveen de suficiente sustrato para la aromatización (Taymor, 1996). Finalmente, tanto la FSH como el E_2 incrementan la producción de IGF-1, el cual a su vez aumenta la producción de FSH y E_2 , teniendo como resultado un efecto autoperpetuante (Taymor, 1996).

Se ha postulado que el folículo dominante inhibe el crecimiento de otros folículos a través de la inhibina y andrógenos, lo cual provoca la atresia de los folículos en desarrollo una vez que se ha seleccionado el folículo dominante (Hodgen, 1982). Sin embargo, también se piensa que la inhibición en la producción de FSH, efecto provocado por la secreción de E_2 por el folículo dominante, impide el desarrollo de otros folículos en la fase lútea media. Además, la LH se sigue secretando en esta fase y como resultado provee de un ambiente rico en andrógenos que inhibe el crecimiento de los folículos pequeños.

D. EL FOLÍCULO PREEVULATORIO

El folículo dominante crece de manera acelerada. Los receptores para la LH estimulan el desarrollo de las células de la granulosa, bajo la influencia de la FSH, aunque aun las concentraciones de LH son demasiadas bajas para tener un efecto significativo. Conforme van incrementando las concentraciones de LH, comienza la producción de P. El IGF-1 sinergiza la acción de la FSH y de la LH en la producción de E_2 y P, respectivamente. La activina inhibe la acción prematura de la P y la luteinización espontánea. Conforme se acerca la ovulación, la secreción de P reduce el número de receptores para la FSH, y las concentraciones de E_2 declinan (Taymor, 1996).

La estimulación para la secreción de factores que atraviesan la pared del folículo está dada por el incremento inicial de P que se da poco antes de la ovulación, preparando al folículo para la ovulación (Yen, 1991). La máxima concentración de LH acelera la maduración del ovocito y conforme el folículo se rompe, sólo un ovocito maduro se libera del ovario (Hotchkiss y Knobil, 1994).

OTROS REGULADORES DEL DESARROLLO Y CRECIMIENTO FOLICULAR

A. PROLACTINA

Una de las funciones de la prolactina (PRL) en roedores es incrementar y mantener el número de receptores para LH en el cuerpo lúteo (Richards, 1980; Paquette, La Polt, Okawa y Hsueh, 1991), el cual mantendrá

la alta producción de progesterona (P). Las bajas concentraciones de PRL en el folículo preovulatorio inhiben el activador de plasminógeno (Yoshimura, Nakamura, Yamada, Ando, Ubukuta y Oda, 1991).

B. ESTEROIDES OVÁRICOS

ESTRÓGENOS

Los estrógenos desempeñan una función importante en el desarrollo folicular ya que inhiben la secreción de gonadotropinas en la hipófisis anterior. El incremento en las concentraciones de E_2 en la fase folicular media del ciclo llevan a reducir las concentraciones plasmáticas de FSH (Byrnes y Meyer, 1951). Esta reducción en la concentración de FSH podría ser la responsable de la selección de un solo folículo dominante, en la mujer. Por otra parte, el E_2 tiene actividad parácrina dentro de las células de la granulosa. Se ha demostrado que los estrógenos incrementan la capacidad de respuesta a gonadotropinas en los folículos ováricos de la rata (Pencharz, 1940, Bradbury, 1961). El E_2 estimula la proliferación de las células de la granulosa, aunque esto podría ser un efecto indirecto mediado por IGF-1. También, el estradiol causa un incremento en el número total de receptores para FSH debido al aumento en la cantidad de células de la granulosa y en el número de receptores por célula (Taymor, 1996). Finalmente el E_2 aumenta la actividad de la aromatasa.

ANDRÓGENOS

Los andrógenos son producidos en la teca bajo la estimulación de la LH. El principal andrógeno es A. Este precursor cruza la membrana basal hacia las células de la granulosa, donde, bajo la influencia de la FSH, es convertido en estrona (Armstrong y Papkof, 1976). Si no hay suficiente cantidad de FSH para aromatizar todos los andrógenos producidos, el exceso de A es transformado a productos 5 alfa reducidos, los cuales inhiben el crecimiento, dando lugar a la atresia folicular (Louvet, Harman, Schreiber y Ross, 1975, Taymor, 1996).

C. PEPTIDOS OVÁRICOS

Las hormonas peptídicas secretadas en el ovario están involucradas principalmente en la selección y el mantenimiento de un folículo dominante único. Estas hormonas peptídicas son producidas en las células de la granulosa y en las de la teca. Su efecto puede ejercerse en las mismas células donde son producidas (efecto autócrino), en las células vecinas (efecto parácrino) o en glándulas distantes (efecto endócrino) (Taymor, 1996). Los principales son la activina y la inhibina. Estas son glicoproteínas diméricas

que poseen una subunidad α común. La estimulación gonadotrópica es necesaria para la producción de ambas (Mills, 1975; Dye, Rabinovici y Jaffee, 1992; Baird y Smith, 1993; Taymor, 1996).

INHIBINA

En 1985 la inhibina se extrajo del líquido folicular y se encontró que inhibía la síntesis de FSH (Robertson, Foulds, Leversha, Morgan, Hearn y Burger, 1985). En un principio se pensó que la inhibina reducía las concentraciones de FSH en la fase media folicular del ciclo. Sin embargo, en estudios más recientes no se ha observado un aumento progresivo de inhibina en la fase folicular como sucede con el E_2 (McLachlin, Robertson, Healy, de Kretser y Burger, 1996), por lo que actualmente se piensa que el estradiol es el principal supresor de la secreción de FSH en la fase folicular del ciclo. La inhibina probablemente tenga una función complementaria (Taymor, 1996).

Durante la fase lútea, la inhibina es secretada por el cuerpo lúteo (Tsonis, Hillier y Baird, 1987); tiene un efecto aditivo al E_2 en la supresión de la secreción de FSH y LH en esta parte del ciclo. Durante la fase media lútea, tanto el E_2 como la inhibina se encuentran a altas concentraciones mientras que la FSH se encuentra a bajas concentraciones determinándose así el crecimiento folicular. Posteriormente en la fase lútea tardía, cuando la función del cuerpo lúteo decae, tanto las concentraciones de E_2 como de inhibina disminuyen. Esta disminución permite un aumento gradual en las concentraciones plasmáticas de FSH al iniciarse un nuevo ciclo (Taymor, 1996).

ACTIVINA

La activina es el antagonista funcional de la inhibina; estimula la secreción de FSH (Ling, Ying, Ueno, Shimaski, Esch y Hotta, 1986). La activina tiene una similitud estructural con el factor de crecimiento transformante (TGF), el cual es otro factor ovárico que estimula la secreción de FSH (Ying-Yao, Becker, Baird, Ling, Ueno y Esch, 1994; Taymor, 1996).

La activina es un regulador autócrino que estimula la aromatización en las células de la granulosa (Di Simone, Lanzone, Petraglia, Ronsisville, Caruso y Mancuso, 1994) y promueve la mitogénesis de éstas (Ying, Becker, Ling, Ueno y Guillemin, 1986). Otros efectos de la activina son menos claros y aparentemente dependen del estadio en el que se encuentren las células de la granulosa. Así, la activina estimula la secreción de P, la cual promueve la producción de receptores para FSH y LH en células de la granulosa indiferenciadas (Hutchinson, Findlay, de Vos, Robertson, 1987). Por otra parte, en las células de la granulosa de folículos

preovulatorios, la activina inhibe la secreción de P y previene de la luteinización espontánea (Shukosvski y Findlay, 1990; Taymor, 1996).

FOLISTATINA

La folistatina es un péptido cuya estructura es similar a la activina y a la inhibina. Su función es básicamente de antagonista de la activina. Es producida en las células de la granulosa y su secreción es regulada por la FSH (Scito, Nakamura, Titani y Sugino, 1991). Su efecto endócrino es regular la liberación de FSH en las células de la hipófisis de la rata (Ying, Becker, Swanson, Tan, Ling y Esch, 1987). Su efecto autócrino es reducir el número de receptores inducidos por la activina. También hay evidencias de que la folistatina es una proteína que captura la activina (Xaio, Robertson y Findlay, 1992), regulando de esta manera la secreción de FSH (Taymor, 1996).

D. FACTORES DE CRECIMIENTO SEMEJANTES A LA INSULINA

Los factores de crecimiento semejantes a la insulina fueron originalmente descritos como polipéptidos que inician y mantienen el crecimiento del tejido mesenquimatoso del organismo. Posteriormente se estudió la función de éstos en la inhibición o estimulación del crecimiento folicular. La mayoría de los trabajos se han concentrado en IGF-1 el cual es producido en las células de la granulosa. Su secreción es incrementada por la acción de la FSH (Hsu y Hammond, 1987). Tiene un efecto autócrino sobre la granulosa aumentando la aromatización de andrógenos (Erikson, Garzo y Magoffin, 1989) mediada por la FSH y estimulando la mitogénesis en las células de la granulosa (Adashi, Resnick, Hurwitz, Ricciarelli, Hernández y Roberts, 1991). En la fase folicular tardía, el IGF-1 potencia el efecto de la FSH para inducir la producción de receptores para LH, así como la secreción de P por las células de la granulosa. Así mismo, el IGF-1 ejerce un efecto parácrino en la teca, sinergizando la acción de la LH en la producción de A (Bergh, Carlsson, Olsson, Selleskog y Hillensjö, 1993; Taymor, 1996).

E. FACTOR DE CRECIMIENTO ENDOTELIAL VASCULAR

El factor de crecimiento endotelial vascular, aislado de células foliculares hipofisarias (Leung, Cachianes, Kuang, Goeddel y Ferrara, 1989), mantiene el soporte de vasos sanguíneos portales en la hipófisis. Se produce en monocitos y macrófagos. Posteriormente fue encontrado en el ovario de primates (Ravindrath, Little-Ihrig, Phillips, Ferrara y Zeleznik, 1992). Este factor contribuye al crecimiento del folículo aumentando el suministro de sangre al folículo. Así que, a pesar de que las concentraciones de FSH disminuyen como resultado

de la inhibición por el E₂ en la hipófisis, en la fase folicular media del ciclo, el incremento en el suplemento sanguíneo lleva FSH adicional al folículo seleccionado.

ESTUDIOS MORFOLÓGICOS EN LA SÍNTESIS DE DNA Y PROLIFERACIÓN CELULAR DEL FOLÍCULO

Se ha empleado como un índice de proliferación celular la incorporación de [³H]-timidina en el DNA para estudiar la cinética del crecimiento folicular. El dogma existente en relación a la regulación hormonal del desarrollo folicular sugiere que los folículos preantrales son independientes de las gonadotropinas. Sin embargo, se han realizado estudios donde se demuestra que el desarrollo de los folículos preantrales pequeños, en roedores de laboratorio, dependen de las gonadotropinas, especialmente de la FSH (Greenwald y Terranova, 1988).

En la rata, tanto la FSH como el 17β-estradiol incrementan significativamente la incorporación de [³H]-timidina en las células de la granulosa (Rao *et al*, 1978). Chiras y Greenwald (1978) demostraron que la FSH, pero no la LH, inducen un aumento en el índice de proliferación en folículos preantrales del criceto. En la rata, el 17β-estradiol y el dietilstilbestrol, por sí solos o con gonadotropinas inducen significativamente la proliferación celular de las células de la granulosa (Bradbury, 1961; Meyer y Bradbury, 1963; Smith y Bradbury, 1963). Estudios realizados con inmunocitoquímica demostraron que en el epitelio germinal del ovario de monos se encuentran receptores tanto para estrógenos como para progesterona, sin embargo, no se encuentran receptores para estrógenos en la granulosa, en la teca o en células del estroma (Hild-Petito *et al*, 1988). Por el contrario, hay receptores de progesterona en las células de la teca y sólo en las células de la granulosa de folículos primordiales y primarios (Hild-Petito *et al*, 1988). Estos resultados sugieren que existe una regulación progestacional más que una estrogénica en la función ovárica del mono.

Iwai *et al* (1990) demostraron que en el humano, las células de la granulosa poseen únicamente receptores para estrógenos antes de la concentración máxima o pico de secreción durante la fase preovulatoria de la LH, sin embargo, éstos van disminuyendo en cantidad mientras que los receptores para progesterona aumentan. Por otra parte, estudios realizados en ratas el día del proestro y con exposiciones continuas de [³H]-timidina, revelan que hay una intensa incorporación de [³H]-timidina en el *cumulus oophorus* y en las células de la granulosa antrales comparado con las células de las capas murales (Hirschfield, 1986). Las gonadotropinas suministradas tanto de manera endógena como exógena,

de la inhibición por el E₂ en la hipófisis, en la fase folicular media del ciclo, el incremento en el suplemento sanguíneo lleva FSH adicional al folículo seleccionado.

ESTUDIOS MORFOLÓGICOS EN LA SÍNTESIS DE DNA Y PROLIFERACIÓN CELULAR DEL FOLÍCULO

Se ha empleado como un índice de proliferación celular la incorporación de [³H]-timidina en el DNA para estudiar la cinética del crecimiento folicular. El dogma existente en relación a la regulación hormonal del desarrollo folicular sugiere que los folículos preantrales son independientes de las gonadotropinas. Sin embargo, se han realizado estudios donde se demuestra que el desarrollo de los folículos preantrales pequeños, en roedores de laboratorio, dependen de las gonadotropinas, especialmente de la FSH (Greenwald y Terranova, 1988).

En la rata, tanto la FSH como el 17β-estradiol incrementan significativamente la incorporación de [³H]-timidina en las células de la granulosa (Rao *et al*, 1978). Chiras y Greenwald (1978) demostraron que la FSH, pero no la LH, inducen un aumento en el índice de proliferación en folículos preantrales del criceto. En la rata, el 17β-estradiol y el dietilstilbestrol, por sí solos o con gonadotropinas inducen significativamente la proliferación celular de las células de la granulosa (Bradbury, 1961; Meyer y Bradbury, 1963; Smith y Bradbury, 1963). Estudios realizados con inmunocitoquímica demostraron que en el epitelio germinal del ovario de monos se encuentran receptores tanto para estrógenos como para progesterona, sin embargo, no se encuentran receptores para estrógenos en la granulosa, en la teca o en células del estroma (Hild-Petito *et al*, 1988). Por el contrario, hay receptores de progesterona en las células de la teca y sólo en las células de la granulosa de folículos primordiales y primarios (Hild-Petito *et al*, 1988). Estos resultados sugieren que existe una regulación progestacional más que una estrogénica en la función ovárica del mono.

Iwai *et al* (1990) demostraron que en el humano, las células de la granulosa poseen únicamente receptores para estrógenos antes de la concentración máxima o pico de secreción durante la fase preovulatoria de la LH, sin embargo, éstos van disminuyendo en cantidad mientras que los receptores para progesterona aumentan. Por otra parte, estudios realizados en ratas el día del proestro y con exposiciones continuas de [³H]-timidina, revelan que hay una intensa incorporación de [³H]-timidina en el *cumulus oophorus* y en las células de la granulosa antrales comparado con las células de las capas murales (Hirschfield, 1986). Las gonadotropinas suministradas tanto de manera endógena como exógena,

inducen la proliferación celular de la granulosa, la cual cesa gradualmente conforme el folículo crece (Roy, 1994).

Aún queda por determinar cual es la proporción crítica de FSH:LH que determine el desarrollo folicular normal. Gruenberg *et al* (1983) demostraron que el desarrollo folicular normal y la ovulación ocurren *in vitro* en ovarios perfundidos de rata al cambiar las proporciones de FSH:LH. Usando cultivos a largo plazo de folículos preantrales intactos, se ha demostrado (Roy y Greenwald, 1989), que la FSH incrementa significativamente los índices de proliferación de folículos preantrales en varios estados de desarrollo e induce la transición de folículos preantrales a folículos antrales, mientras que la LH ejerce un efecto mínimo.

Debido a que la administración de gonadotropinas tanto *in vivo* como *in vitro* influyen en la síntesis de ADN folicular, en la proliferación celular y en la esteroidogénesis, es lógico asumir que los folículos presenten sitios de unión a las gonadotropinas. Midgley (1973) fue el primero en demostrar la presencia de receptores de la LH y de la FSH en los folículos ováricos. Mientras que los receptores para la FSH se localizan en las células de la granulosa, los receptores para la LH se encuentran principalmente en la teca y en las células intersticiales. Oxberry y Greenwald (1982) sistemáticamente demostraron que en el criceto, la unión de FSH ocurre en las células de la granulosa tanto en los folículos antrales como en los preantrales, mientras que los receptores para la LH se presentan principalmente en la teca y en las células de la granulosa murales de los folículos más grandes.

LA ATRESIA FOLICULAR OVÁRICA ES UN PROCESO MEDIADO POR APOPTOSIS

En el ovario de la mujer se encuentran alrededor de 2 millones de ovocitos al nacer, este número disminuye a 400,000 folículos al comienzo de la pubertad, de los cuales, solo 400 normalmente ovulan durante el período reproductivo. En la menopausia no se observan ni folículos ni ovocitos en el ovario, por lo tanto, más del 99.9% de los folículos humanos pasan por cambios degenerativos, siendo este proceso una parte integral de la función normal del ovario. Lo mismo sucede en otras especies de mamíferos, entre el 70 y 99.9% de los folículos son funcionalmente eliminados antes de alcanzar la ovulación y sólo el 0.1% de los folículos ovularán, por lo que la ovulación se podría considerar como la excepción y no la regla (Hsueh, Billig y Tsafiri, 1994). El

inducen la proliferación celular de la granulosa, la cual cesa gradualmente conforme el folículo crece (Roy, 1994).

Aún queda por determinar cual es la proporción crítica de FSH:LH que determine el desarrollo folicular normal. Gruenberg *et al* (1983) demostraron que el desarrollo folicular normal y la ovulación ocurren *in vitro* en ovarios perfundidos de rata al cambiar las proporciones de FSH:LH. Usando cultivos a largo plazo de folículos preantrales intactos, se ha demostrado (Roy y Greenwald, 1989), que la FSH incrementa significativamente los índices de proliferación de folículos preantrales en varios estados de desarrollo e induce la transición de folículos preantrales a folículos antrales, mientras que la LH ejerce un efecto mínimo.

Debido a que la administración de gonadotropinas tanto *in vivo* como *in vitro* influyen en la síntesis de ADN folicular, en la proliferación celular y en la esteroidogénesis, es lógico asumir que los folículos presenten sitios de unión a las gonadotropinas. Midgley (1973) fue el primero en demostrar la presencia de receptores de la LH y de la FSH en los folículos ováricos. Mientras que los receptores para la FSH se localizan en las células de la granulosa, los receptores para la LH se encuentran principalmente en la teca y en las células intersticiales. Oxberry y Greenwald (1982) sistemáticamente demostraron que en el criceto, la unión de FSH ocurre en las células de la granulosa tanto en los folículos antrales como en los preantrales, mientras que los receptores para la LH se presentan principalmente en la teca y en las células de la granulosa murales de los folículos más grandes.

LA ATRESIA FOLICULAR OVÁRICA ES UN PROCESO MEDIADO POR APOPTOSIS

En el ovario de la mujer se encuentran alrededor de 2 millones de ovocitos al nacer, este número disminuye a 400,000 folículos al comienzo de la pubertad, de los cuales, solo 400 normalmente ovulan durante el período reproductivo. En la menopausia no se observan ni folículos ni ovocitos en el ovario, por lo tanto, más del 99.9% de los folículos humanos pasan por cambios degenerativos, siendo este proceso una parte integral de la función normal del ovario. Lo mismo sucede en otras especies de mamíferos, entre el 70 y 99.9% de los folículos son funcionalmente eliminados antes de alcanzar la ovulación y sólo el 0.1% de los folículos ovularán, por lo que la ovulación se podría considerar como la excepción y no la regla (Hsueh, Billig y Tsafiriri, 1994). El

proceso degenerativo por el cual los folículos son eliminados antes de alcanzar la ovulación se le conoce como atresia.

La palabra "atresia" deriva del griego (a = sin; tresia = perforación) y se ha empleado para describir el cierre de una abertura natural. Estrictamente hablando, la atresia es el proceso mediante el cual los folículos antrales sobrellevan cambios degenerativos antes de su ruptura en la ovulación. Sin embargo, este término también se ha utilizado para describir los cambios degenerativos durante el desarrollo ovárico. Una probable ventaja evolutiva de este desgaste pudiera ser la selección de folículos que contengan ovocitos sanos para ovular. El mecanismo de selección de los folículos en la vida reproductiva normal es dado por la exposición a la hormona folículo estimulante (FSH) en un momento determinado de su desarrollo. Los folículos que no tengan este soporte hormonal durante este período crítico estarán destinados a la atresia (Hsueh *et al.*, 1994).

Durante el desarrollo ovárico en los mamíferos hay por lo menos cuatro estadios degenerativos que involucran la pérdida masiva de células ováricas (Hsueh *et al.*, 1994). En primer lugar, esta pérdida se observa durante la migración de las células primordiales germinales desde el saco vitelino a la cresta genital, a menos que haya un rescate por factores de sobrevivencia (Hsueh *et al.*, 1994). Segundo, una vez que las células germinales inician su meiosis, hay un desgaste previo a la formación de los folículos. En tercer lugar, los folículos en estadios antrales tempranos pueden diferenciarse o sobrellevar la atresia. Cuarto, después de la ovulación, el cuerpo lúteo comienza la luteolisis (Hsueh *et al.*, 1994).

Las características morfológicas de la atresia se han descrito como cambios progresivos en todos los tipos celulares del folículo. Una señal temprana de la atresia es la presencia de núcleos picnóticos dentro de la granulosa. La picnosis es la condensación y reducción del tamaño de una célula o su núcleo, generalmente asociadas con hiperchromatosis, es decir, a una forma de degeneración del núcleo celular, en la que éste se llena de partículas pigmentarias. Conforme progresa la atresia se va dando el desprendimiento de las células de la granulosa de la membrana basal, fragmentación de la lámina basal y la presencia de *debris* celular en el antro folicular. También se ha informado la reducción en la síntesis de ADN y proteínas en las células de la granulosa de los folículos atrésicos (Hsueh, *et al.*, 1994). El ovocito se va desprendiendo del cumulus y posteriormente se fragmenta (Hsueh *et al.*, 1994). Estos cambios morfológicos que se observan durante la atresia folicular son semejantes a los de las células en apoptosis (Hsueh *et al.*, 1994). La

fragmentación característica del ADN en células apoptóticas se observa de igual manera en las células de la granulosa que inician la atresia.

CONTROL HORMONAL DE LA APOPTOSIS GONADAL

Dentro de las gónadas hay diversas hormonas y factores que actúan como factores de sobrevivencia inhibiendo la apoptosis y hay factores apoptóticos que inducen la muerte celular mediante mecanismos endócrinos, parácrinos y autócrinos. La acción de estos factores depende del estado de diferenciación de las células gonadales.

A. Gonadotropinas.

En la rata, la hipofisectomía ha sido una técnica empleada para estudiar el efecto de las gonadotropinas en las gónadas. La disminución en las concentraciones en suero de gonadotropinas como resultado de la hipofisectomía, desencadena una atresia masiva en los folículos preovulatorios en el proestro. Sin embargo, el proceso de la atresia parece no estar estrictamente relacionado con los niveles de gonadotropinas, ya que se pueden encontrar todos los estadios foliculares en el ciclo reproductivo.

Estudios realizados por Billig *et al* (1994) demostraron que al tratar ratas prepúberes hipofisectomizadas con FSH tuvieron una disminución en la fragmentación del ADN en las células de la granulosa. En cultivos de folículos tratados con FSH y gonadotropina coriónica humana (hCG), se observó de igual manera una disminución en la fragmentación del ADN, principalmente en los folículos antrales pequeños, así como en los preovulatorios, demostrando un papel importante de las gonadotropinas como factores de sobrevivencia (Billig, Furuta y Hsueh, 1994).

B. Factores de crecimiento, y citocinas

Los cultivos de células de la granulosa tratados con factor de crecimiento epidérmico (EGF), factor de crecimiento transformante α (TGF α) o con factor básico de crecimiento de fibroblastos (bFGF) tuvieron una disminución en la fragmentación del ADN apoptótico (Hsueh *et al*, 1994). Es probable que la muerte celular apoptótica en las células de la granulosa sea prevenida por la acción

paracrina de EGF/TGF α secretados por las células de la teca o por la acción autocrina de bFGF sintetizado por la misma granulosa.

Por otra parte, el ovario expresa un factor de crecimiento semejante a insulina (IGF-1), su receptor (IGF-1R), las proteínas que lo unen (IGFBP) y las proteasas que degradan IGFBP (Hsueh *et al*, 1994). La producción local de IGF-1 juega un papel importante potenciando la acción de las gonadotropinas en la diferenciación del folículo (Hsueh *et al*, 1994). También se ha demostrado la presencia de receptores de IGF-1 en las células de la granulosa y el incremento de IGF-1 ovárico con la estimulación de FSH y de la hormona del crecimiento (GH) (Hsueh *et al*, 1994). A pesar que las IGFBP prolongan la vida media de las IGF, éstas proteínas inhiben la acción de IGF. IGFBP-4 y -5 son producidos por las células de la granulosa, el tratamiento con FSH disminuye la secreción de estas proteínas en los ovarios de ratas (Hsueh *et al*, 1994).

También se ha encontrado que las células de la granulosa producen interleucina-6 (IL-6). IL-6 estimula la fragmentación apoptótica del ADN en estas células, sugiriendo que esta citocina es un factor atretogénico intrafolicular (Hsueh *et al*, 1994).

C. Esteroides sexuales

Los esteroides sexuales en el ovario tienen un papel en la regulación de la atresia folicular. Cuando ratas hipofisectomizadas son tratadas con estrógenos, muy pocos folículos inician la atresia. En los ovarios de humanos, ovinos y porcinos, la producción de estradiol por los folículos atrésicos disminuye, mientras que la producción de andrógenos se ve incrementada.

MECANISMOS INTRA-OVÁRICOS INVOLUCRADOS EN LA ATRESIA FOLICULAR

Basándose en estudios realizados con folículos pre-ovulatorios en la rata, Hsueh *et al* (1994), postularon un modelo de regulación de la apoptosis folicular involucrando diversos factores de crecimiento. Sugieren que debido a que las células de la granulosa son las únicas que llevan a cabo la apoptosis en el ovario, tanto señales endócrinas como parácrinas convergen para regular este proceso. Por otra parte, los cultivos de células de la granulosa indican que el uso de FSH, LH/HCG e IGF-1 no son eficientes en la prevención de la apoptosis, lo que sugiere la existencia de una estrecha inter-relación con las células de la teca (Hsueh *et al*, 1994). La FSH o la LH pudieran

actuar en las células de la granulosa para producir un factor estimulante de las células de la teca; este factor incrementaría la secreción de EGF o $TGF\alpha$ en las células de la teca, los cuales se difundirían a través de la membrana basal hacia la granulosa para inhibir la apoptosis. Debido a que bFGF se sintetiza en la granulosa, éste pudiera ser un factor autócrino en la regulación de la apoptosis folicular (Hsueh *et al*, 1994).

La granulosa es el sitio principal de síntesis de IGF-1 en el ovario de la rata, por lo que algunos autores postulan que las gonadotropinas estimulan la producción de IGF-1 en la granulosa, y que la secreción de éste actúa en la teca estimulando para la producción de EGF/ $TGF\alpha$ (Hsueh *et al*, 1994). Una vez más, EGF/ $TGF\alpha$ producidos en la teca, difundirían hacia la granulosa inhibiendo la apoptosis. Para asegurar la sobrevivencia de los folículos seleccionados para ovular podrían estar involucrados otros mecanismos preventivos de la apoptosis folicular (Figura III) (Hsueh *et al*, 1994).

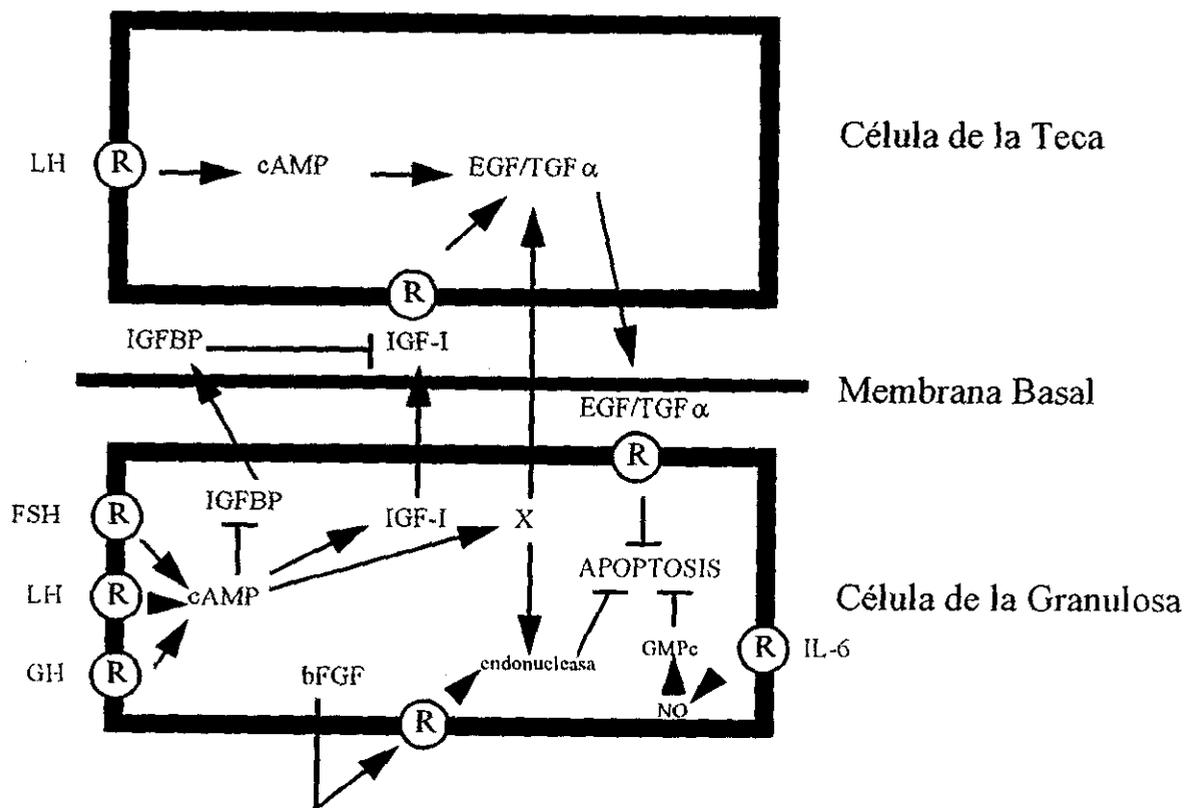


Figura III. Mecanismos intra-ováricos involucrados en la atresia folicular: factores de crecimiento y su control gonadotrópico. Las gonadotropinas y la hormona del crecimiento (GH) actúan en la granulosa estimulando la producción del factor de crecimiento semejante a insulina (IGF-1) y suprimiendo la producción de las proteínas que unen IGF (IGFBP). El IGF-1 actúa en la teca y estimula la producción de factores de sobrevivencia, tales como el factor de crecimiento epidérmico y el factor de crecimiento transformante α (EGF/ $TGF\alpha$) los cuales actuarán en la

granulosa inhibiendo la apoptosis. Por otra parte, las gonadotropinas estimulan la liberación de un factor de supervivencia (X) que estimula la secreción de EGF/EGF α en la teca. El factor básico de crecimiento fibroblástico (bFGF) y TGF α pueden ser producidos en la granulosa suprimiendo a su vez la apoptosis por un mecanismo autócrino y parácrino. La LH incrementa la producción de interleucina (IL-1 β) en la teca. Esta citocina promueve la liberación de óxido nítrico (NO) en la granulosa, permitiendo la inhibición de la apoptosis (Hsueh *et al.*, 1994).

Además de la estimulación para producir IGF-1 y la inhibición de IGFBP, las gonadotropinas incrementan la producción folicular de interleucina-1 β (IL-1 β), la cual aumenta la producción de óxido nítrico (NO). La elevación intracelular de NO activa una forma soluble de la guanilato ciclasa, la cual genera GMPc suprimiendo la apoptosis (Hsueh *et al.*, 1994).

JUSTIFICACIÓN

El empleo de la hormona foliculo estimulante de origen recombinante (FSHrec) ha sido ampliamente utilizado para estudiar el efecto de la FSH, en ausencia de la actividad de la LH. Al tener un preparado libre de LH se abre la posibilidad de definir cual es la función de cada una de estas gonadotropinas en el desarrollo y crecimiento folicular.

La función que desempeña la LH durante la foliculogénesis aun se desconoce, se sabe que las células de la granulosa de folículos en desarrollo adquieren receptores para LH solamente en la etapa antral y en respuesta a la FSH y al E_2 . Recientemente se ha demostrado que las preparaciones recombinantes de la hormona foliculo estimulante (FSHrec), sin la actividad de la LH, estimulan el crecimiento folicular al estado preovulatorio en ratas hipofisectomizadas inmaduras, mientras que la concentración circulante de E_2 permanece baja. Sin embargo, la mayoría de estos estudios se han realizado varios días después de la hipofisectomía.

La presente tesis se realizó con la finalidad de obtener un mayor conocimiento sobre la función de la FSH, en el crecimiento folicular y en la atresia de las células de la granulosa en el ovario de ratas hipofisectomizadas tratadas en forma aguda con FSHrec después de pocas horas de privación de la hormona endógena.

HIPÓTESIS

La administración de FSHrec en forma aguda después de la hipofisectomía, disminuye la atresia folicular y aumenta la proliferación celular de una manera dosis y tiempo dependiente.

OBJETIVOS

OBJETIVO GENERAL:

Estudiar los efectos biológicos agudos de la hormona estimulante del folículo de origen recombinante (FSH rec) en la proliferación celular empleando un sistema *in vivo*.

OBJETIVO PARTICULAR:

- 1) Analizar la acción biológica *in vivo* de la FSHrec, mediante el estudio de sus efectos en la proliferación y la atresia de las células de la granulosa del ovario de rata prepúber hipofisectomizada.
- 2) Comparar los efectos biológicos *in vivo* de la FSHrec administrada a dos diferentes dosis únicas a lo largo del tiempo.

MATERIALES Y MÉTODOS

I. ANIMALES

Se utilizaron ratas hembras prepúberes (38.9 ± 3.5 g, 21 días de edad) de la cepa Wistar mantenidas bajo condiciones estándares de luz (12L:12O) a 21°C. Los animales tuvieron libre acceso a la comida peletizada y al agua.

Previamente a la anestesia con éter etílico, se procedió a inyectar atropina (40 mg/100 g de peso) por vía subcutánea.

II. HIPOFISECTOMÍA POR VÍA PARAFARÍNGEA

La hipofisectomía se realizó por vía parafaríngea mediante la técnica previamente descrita por Quintanar y Quintanar (1994) (Anexo 1).

III. EFECTOS SUBAGUDOS: PROLIFERACIÓN CELULAR DE CÉLULAS FOLICULARES

Seis horas después de la hipofisectomía grupos de cuatro ratas fueron tratadas con dos diferentes dosis de FSH recombinante (2.5 y 8.0 UI) administrada por vía subcutánea. Se incluyeron así mismo, grupos de animales hipofisectomizados que recibieron únicamente el vehículo (testigo salino) (n=2). Los animales fueron decapitados después de 6, 12 y 18 horas de haber recibido la última inyección. Una hora antes del sacrificio, cada animal recibió por vía intraperitoneal 2.5 μ Ci/g de peso de [³H]-timidina (Amersham International, Inglaterra). Se incluyeron grupos de animales a los cuales se les realizó una hipofisectomía ficticia, provocándose el trauma operatorio pero sin extraer la hipofisis. Así como los testigos intactos, a los cuales no se les realizó la hipofisectomía.

IV. PROCESAMIENTO DE TEJIDOS

Después de la decapitación, se colectó la sangre de las ratas, permitiendo que coagulara; posteriormente, cada muestra se centrifugó a 185 g durante 10 minutos. Se obtuvieron los sueros

y fueron almacenados a -20°C para su análisis posterior. Los ovarios se extrajeron asépticamente, se disecaron en solución salina y se fijaron inmediatamente con la solución de Karnovsky (Karnovsky, 1965). Para el procesamiento de tejidos se siguió el procedimiento descrito en el anexo II.

Posteriormente a la inclusión se procedió a cortar los ovarios. Se obtuvieron cortes semifinos de $1\ \mu\text{m}$ de grosor, con un ultramicrotomo Nova (LKB, Bromma). De cada 10 secciones se tomaron dos cortes, uno para la autorradiografía y otro que fue teñido con azul de toluidina 1%. Para el análisis histológico los cortes fueron observados al microscopio óptico (Nikon HFX-DX). Se tomaron 18 cortes por bloque (36 en total), los cuales fueron montados en laminillas de vidrio para la autorradiografía.

V. AUTORRADIOGRAFÍA

La autorradiografía se realizó mediante la técnica descrita por Rogers AW (Rogers, 1979), para lo cual se empleó la emulsión autorradiográfica NTB2 (Eastman Kodak, Rochester, NY) a una dilución 1:1 con agua desionizada. Las laminillas se sumergieron hasta cubrir los cortes con la emulsión y se dejaron secar verticalmente quitando el exceso de emulsión que hubiera permanecido. Los cortes se expusieron en oscuridad a 4°C de tres a cuatro semanas. El tiempo de exposición fue variable, por lo que cada semana se reveló una laminilla para monitorear la intensidad de la marca. Para el revelado de las laminillas se empleó el revelador D-11 (Eastman Kodak, Rochester, NY) a una dilución 1:1 con agua bidestilada por 4 minutos; las laminillas fueron fijadas en el fijador de Kodak por 4 minutos a temperatura ambiente. Finalmente se lavaron con agua destilada y se tiñeron con azul de toluidina 1% a temperatura ambiente en cámara húmeda durante 15 minutos. Posteriormente, se lavaron con ácido acético diluido y se montaron con la resina acrílica antioxidante Accu-Mount 60 (Baxter Scientific Products, USA) para su observación posterior.

VI. ANÁLISIS MICROSCÓPICO

Se utilizó el diámetro folicular mayor como parámetro para clasificar los folículos dado que: 1) dicho parámetro permite medir de manera rápida y exacta, 2) no se imponen límites arbitrarios para el desarrollo continuo del folículo, y 3) el diámetro folicular está estrechamente relacionado con el número de células de la granulosa, el cual es un índice importante en el desarrollo y crecimiento folicular (Hirschfield y Midgley, 1978).

VII. ANÁLISIS ESTADÍSTICO

Para comparar las diferencias entre las proporciones de folículos sanos y atrésicos, así como de los antrales y preantrales se utilizó la prueba paramétrica de ji-cuadrada. Para analizar las diferencias en cuanto a la incorporación de [³H]-timidina en cada uno de los diferentes grupos estudiados (dosis y tiempos de exposición) se realizó mediante un ANOVA no paramétrico (Kruskal-Wallis), cuando esta prueba encontró diferencias se empleó una prueba para dos muestras (U-Mann Whitney) utilizando un nivel de significancia $p < 0.05$.

VI. ANÁLISIS MICROSCÓPICO

Se utilizó el diámetro folicular mayor como parámetro para clasificar los folículos dado que: 1) dicho parámetro permite medir de manera rápida y exacta, 2) no se imponen límites arbitrarios para el desarrollo continuo del folículo, y 3) el diámetro folicular está estrechamente relacionado con el número de células de la granulosa, el cual es un índice importante en el desarrollo y crecimiento folicular (Hirschfield y Midgley, 1978).

VII. ANÁLISIS ESTADÍSTICO

Para comparar las diferencias entre las proporciones de folículos sanos y atrésicos, así como de los antrales y preantrales se utilizó la prueba paramétrica de ji-cuadrada. Para analizar las diferencias en cuanto a la incorporación de [³H]-timidina en cada uno de los diferentes grupos estudiados (dosis y tiempos de exposición) se realizó mediante un ANOVA no paramétrico (Kruskal-Wallis), cuando esta prueba encontró diferencias se empleó una prueba para dos muestras (U-Mann Whitney) utilizando un nivel de significancia $p < 0.05$.

RESULTADOS

El efecto de las diferentes dosis de FSHrec (0, 2.5 y 8.0 UI) durante 6, 12 y 18 horas de exposición en el peso ovárico y corporal de las ratas inmaduras hipofisectomizadas se muestra en la Tabla 1. Se observó que en los animales con hipofisectomía negativa (testigos negativos, es decir, aquellos animales a los cuales se les realizó la cirugía sin la extracción de la hipófisis), presentaron un mayor peso ovárico, así como una mayor relación entre el peso ovárico/peso corporal con respecto a aquellos con hipofisectomía positiva (en los cuales se extrajo la hipófisis).

Tabla 1. Efecto de la FSHrec en ratas hipofisectomizadas inmaduras tratadas con diferentes dosis y tiempos de estimulación.

TRATAMIENTO dosis (UI) y tiempo (h)	N ³	Peso corporal (g)	Peso ovárico ⁴ (mg)	ovario/animal
hipox (-) ¹ 6h	8	45.5 ± 2.4	11.0 ± 2.3 ^u	0.24
hipox (+) ² 6h 0 UI	4	36.5 ± 0.70	5.5 ± 0.5 ^{ab}	0.15
hipox (+) 6h 2.5 UI	8	41.5 ± 1.47	4.6 ± 0.8 ^b	0.11
hipox (+) 6h 8.0 UI	8	41.12 ± 1.03	7.3 ± 2.0 ^a	0.17
hipox (-) 12h	8	41.12 ± 5.02	10.9 ± 1.2 ^b	0.26
hipox (+) 12h 0 UI	4	34.5 ± 2.12	4.2 ± 0.6 ^a	0.12
hipox (+) 12h 2.5 UI	8	36.12 ± 1.31	4.8 ± 1.3 ^a	0.13
hipox (+) 12h 8.0 UI	8	36.9 ± 3.2	5.5 ± 1.3 ^a	0.15
hipox (-) 18h	6	42.66 ± 2.36	11.8 ± 1.7 ^c	0.28
hipox (+) 18h 0 UI	4	39.5 ± 7.8	4.5 ± 1.4 ^{ab}	0.11
hipox (+) 18h 2.5 UI	8	37.12 ± 1.34	3.8 ± 1.6 ^b	0.10
hipox (+) 18h 8.0 UI	8	37.57 ± 2.45	5.8 ± 1.7 ^a	0.15

¹ Hipofisectomía negativa.

² Hipofisectomía positiva.

³ N representa el número de ovarios analizados por grupo.

⁴ $\bar{x} \pm E.E$

^{a,b,c} Las letras diferentes en cada panel indican la existencia de diferencias estadísticamente significativas ($p < 0.05$)

De igual manera, el testigo intacto (sin hipofisectomía, ni trauma quirúrgico) presentó una relación peso ovárico/peso corporal mayor que los estimulados con diferencias significativas en los tres tiempos de exposición. Por otra parte, se observó una tendencia al incremento, dosis dependiente,

en los animales estimulados; a mayor dosis y tiempo de exposición hubo un mayor peso ovárico, sin embargo, fue no significativo estadísticamente ($p < 0.05$) al compararlo con el testigo positivo. El efecto de las diferentes dosis de la FSHrec y del tiempo de exposición al estímulo en el porcentaje total de folículos sanos y atrésicos se encuentran en la Tabla 2 y en la Figura 1A. Sólo se incluyeron en este estudio los folículos que presentaban sus ovocitos cuyo nucleolo fuera visible microscópicamente; se consideró un folículo como atrésico (en proceso de atresia) cuando presentaba tres o más células picnóticas, indicadoras de muerte celular, y como sano cuando presentaba menos de tres.

Tabla 2. Efecto de la FSHrec en el porcentaje de folículos sanos y atrésicos en ratas hipofisectomizadas inmaduras.

TRATAMIENTO dosis (UI) y tiempo (h)	N ³	No de folículos ⁴	Porcentaje de folículos		
			Atrésicos ⁵	Sanos ⁶	S/A ⁷
hipox (-) ¹ 6h	8	45	8.89 ^{ab}	91.11	10.25
hipox (+) ² 6h 0 UI	4	125	16.80 ^a	83.2	4.95
hipox (+) 6h 2.5 UI	8	125	17.6 ^a	82.4	4.68
hipox (+) 6h 8.0 UI	8	93	4.3 ^b	95.7	22.25
hipox (-) 12h	8	39	17.98 ^b	82.05	4.56
hipox (+) 12h 0 UI	4	47	57.45 ^a	42.55	0.74
hipox (+) 12h 2.5 UI	8	106	16 ^b	84	5.25
hipox (+) 12h 8.0 UI	8	165	16.96 ^b	83.04	4.90
hipox (-) 18h	6	49	4.08 ^b	95.92	23.50
hipox (+) 18h 0 UI	4	98	48 ^a	52	1.08
hipox (+) 18h 2.5 UI	8	162	60.5 ^a	39.5	0.65
hipox (+) 18h 8.0 UI	8	118	14.41 ^b	85.59	5.94

¹ hipofisectomía negativa

² hipofisectomía positiva

³ N representa el número de ovarios por grupo

⁷ S/A representa la relación de folículos sanos sobre los atrésicos

⁴ No total de folículos cuyos ovocitos contuvieron el nucleolo

⁵ folículos con más de tres células picnóticas

⁶ folículos con menos de tres células picnóticas

^{a,b,c} Las letras diferentes en cada panel indican la existencia de diferencias estadísticamente significativas ($p < 0.05$)

Después de 6 horas de exposición a FSH, se observó aumento en el porcentaje total de folículos sanos y disminución en los atrésicos, estadísticamente significativo ($p < 0.05$) para la dosis de 8.0 UI con respecto a 0 UI y 2.5 UI (83.2%, 82.4%, 95.7% y 91.11% en 0 UI, 2.5 UI, 8.0 UI e hipox

(-) respectivamente para los folículos sanos y 16.8%, 17.6%, 4.3% y 8.89% para 0 UI, 2.5 UI, 8.0 UI e hipox (-) respectivamente para los folículos atrésicos). A las 12 horas de estimulación se observó un aumento en el porcentaje de folículos sanos (42.55%, 84%, 83.04% y 82.05% para 0 UI, 2.5 UI, 8.0 UI e hipox (-), respectivamente) y disminución en el porcentaje de los atrésicos (57.45%, 16%, 16.96% y 17.98% para 0 UI, 2.5 UI, 8.0 UI e hipox (-) respectivamente) estadísticamente significativo ($p < 0.05$) al comparar 0 UI con respecto a 2.5 UI, 8.0 UI y el testigo negativo. A las 18 horas de estimulación se observó que la dosis de 8.0 UI mantiene el porcentaje de folículos sanos mientras que la de 2.5 UI presenta una disminución en el porcentaje de sanos y un aumento en la atresia (85.59%, 39.5% respectivamente).

Por otra parte, se observó que a mayor tiempo de exposición con 0 UI hubo una disminución en el porcentaje de folículos sanos siendo estadísticamente significativo ($p < 0.05$) a las 6 horas con respecto a las 12 y 18 horas de estimulación (83.2% *versus* 42.55% y 52% respectivamente). La dosis de 2.5 UI mantuvo el porcentaje de folículos sanos a las 6 y 12 horas (82.4% y 84% respectivamente) sin diferencia significativa; sin embargo, se observó que a las 18 horas hubo una disminución significativa (39.5%) ($p < 0.05$). Con 8.0 UI se observó una disminución a las 12 y 18 horas con respecto a las 6 horas ($p < 0.05$) (83.04%, 85.59% *versus* 95.7%, respectivamente) No se observaron diferencias significativas entre los animales con hipofisectomía negativa.

Con respecto a los folículos preantrales se observó que en los testigos salinos hubo una disminución en el porcentaje de los folículos sanos con respecto al tiempo. Con 2.5 UI se observó una diferencia significativa 18 horas después del estímulo. Mientras que con 8.0 UI no hubo diferencias significativas, manteniéndose el porcentaje de folículos sanos con respecto al tiempo. (Figura 1B)

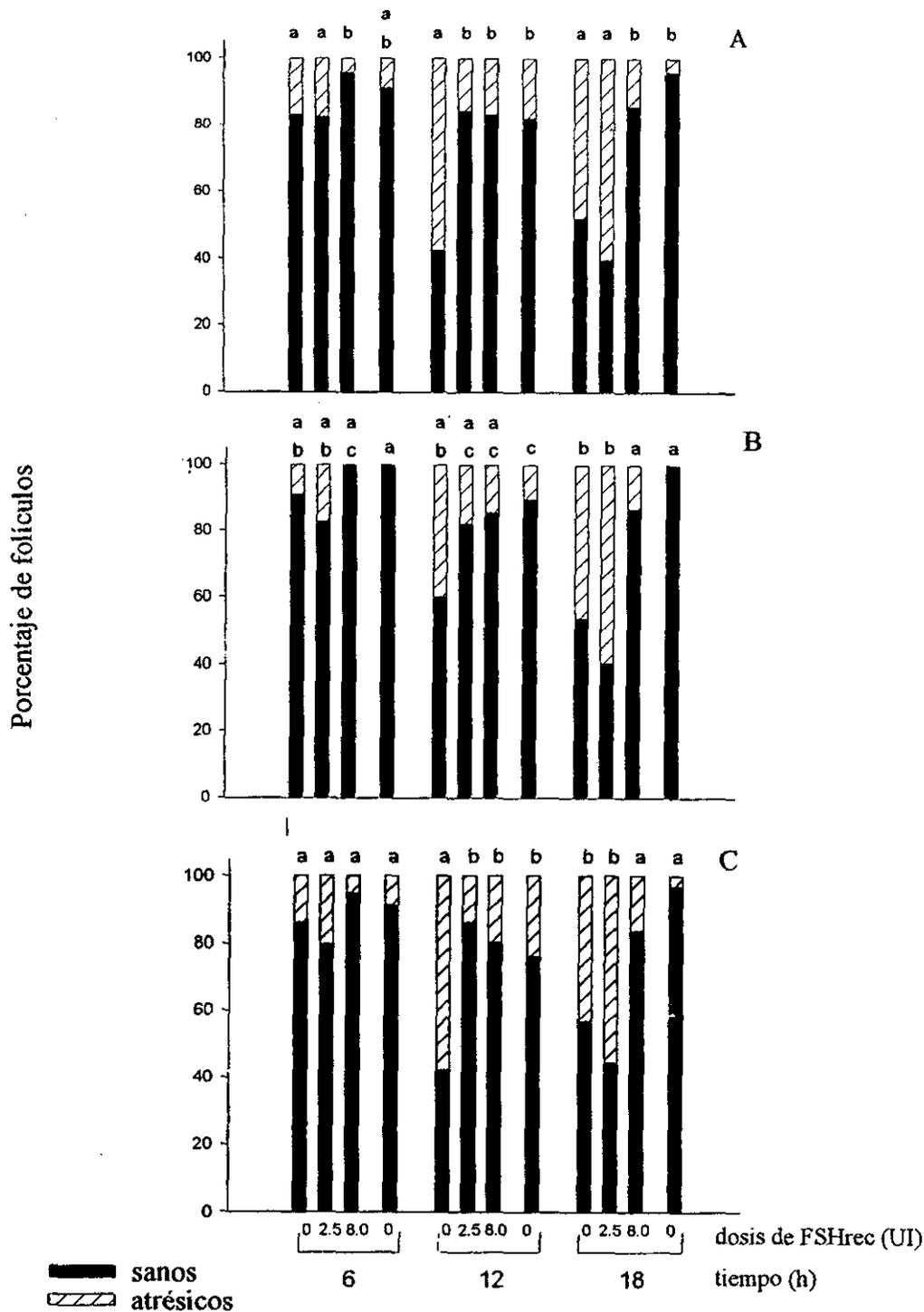


Figura 1. A) Porcentaje total de folículos sanos y atrésicos de ratas inmaduras hipofisectomizadas y tratadas con 0, 2.5 y 8.0 UI de FSHrec y sacrificadas a diferentes tiempos de estimulación. B) Porcentaje de folículos preantrales sanos y atrésicos de ratas inmaduras hipofisectomizadas y tratadas con las mismas dosis y tiempos de estimulación, y C) Porcentaje de folículos antrales sanos y atrésicos en los mismos animales. En cada grupo de 4 barras, la barra derecha representa el testigo negativo. Las letras diferentes encima de cada barra indican la existencia de diferencias significativas ($p < 0.05$) en cada panel.

Por otro lado, con los folículos antrales se observaron muy pocas diferencias significativas dosis-dependientes. A las 12 horas de estimulación hubo una diferencia significativa entre el testigo salino y la dosis de 2.5 UI y 8.0 UI, donde se observó un menor porcentaje de folículos sanos. A las 18 horas de estimulación, el testigo salino y las dosis de 2.5 UI son diferentes significativamente con la dosis de 8.0 UI y los animales con hipofisectomía negativa. Mientras que con respecto al tiempo tuvieron un comportamiento similar al de los folículos preantrales y al del porcentaje total de folículos, donde se observó que los testigos salinos a las 12 h y 18 h después del estímulo tuvo un descenso significativo en el porcentaje de folículos sanos. Con el estímulo de 2.5 UI se mantuvo el porcentaje de éstos pero disminuyó significativamente a las 18 horas. Con 8.0 UI se mantuvo el porcentaje hasta las 18 horas después de la estimulación.

El efecto de las diferentes dosis de la FSHrec con diferentes tiempos de exposición en el porcentaje de folículos antrales y preantrales se muestra en la Tabla 3 y en la Figura 2.

Tabla 3. Efecto de la FSHrec en el número de folículos antrales y preantrales en ratas hipofisectomizadas inmaduras.

TRATAMIENTO dosis (UI) y tiempo (h)	N ³	No de folículos ⁴	Porcentaje de folículos	
			Antrales ⁵	Preantrales ⁶
hipox (-) ¹ 6h	8	45	80 ^c	20
hipox (+) ² 6h 0 UI	4	115	60.87 ^a	39.13
hipox (+) 6h 2.5 UI	8	126	48.41 ^{ab}	51.59
hipox (+) 6h 8.0 UI	8	92	43.48 ^b	56.52
hipox (-) 12h	8	42	54.76 ^a	45.24
hipox (+) 12h 0 UI	4	51	56.86 ^a	43.14
hipox (+) 12h 2.5 UI	8	122	48.36 ^a	51.64
hipox (+) 12h 8.0 UI	8	165	50.3 ^a	49.7
hipox (-) 18h	6	48	72.92 ^b	27.08
hipox (+) 18h 0 UI	4	91	48.35 ^a	51.65
hipox (+) 18h 2.5 UI	8	155	42.58 ^a	57.42
hipox (+) 18h 8.0 UI	8	117	53.85 ^a	46.15

¹ hipofisectomía negativa

² hipofisectomía positiva

³ N representa el número de ovarios por grupo

^{a,b,c} Las letras diferentes en cada panel indican la existencia de diferencias estadísticamente significativas (p<0.05)

⁴ No total de folículos cuyos ovocitos contuvieron el nucleolo

⁵ folículos con cavidad antral

⁶ folículos sin cavidad antral

A las 6 horas de estimulación entre 0 UI y 2.5 UI no hubo diferencias significativas en el porcentaje de folículos antrales (60.87% y 48.41% respectivamente); sin embargo, si las hubo con respecto a 8.0 UI *versus* 0 UI (43.48% y 60.87% respectivamente). Los tres grupos experimentales fueron significativamente diferentes ($p < 0.05$) con respecto al testigo negativo (80%). A las 12 horas de estimulación no hubo diferencias significativas entre las diferentes dosis. A las 18 horas de estimulación sólo hubo diferencia significativa cuando se compararon las tres dosis de estimulación con respecto al testigo negativo (48.35%, 42.58%, 53.85% y 72.92% para 0 UI, 2.5 UI, 8.0 UI e hipox negativa, respectivamente).

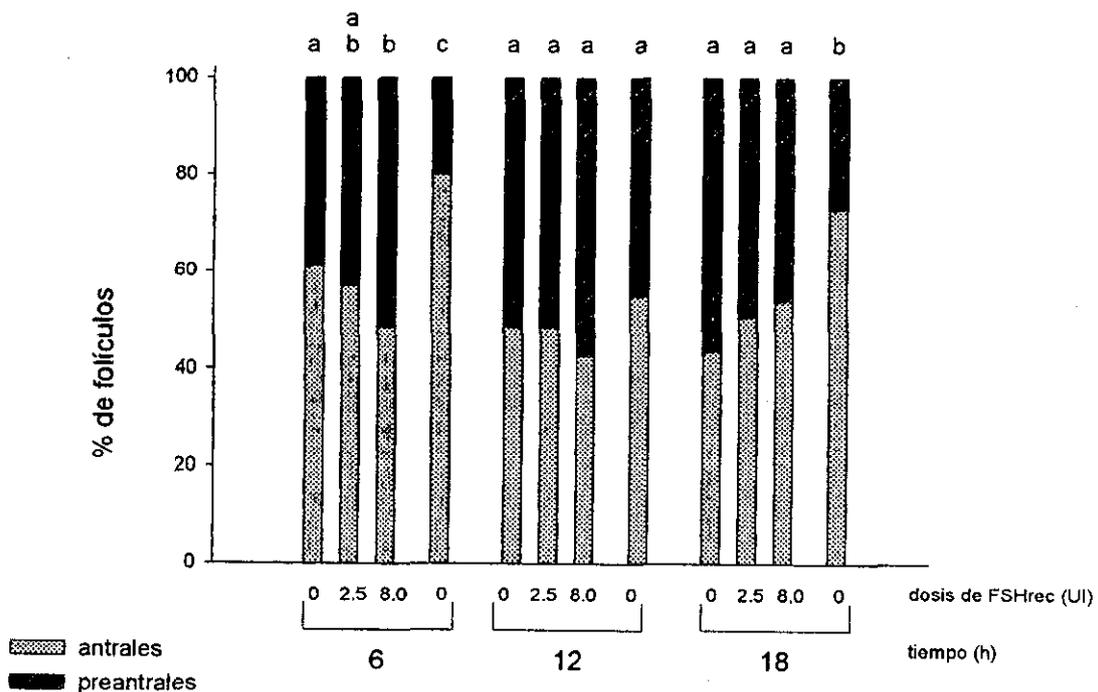


Figura 2. Porcentaje de folículos antrales y preantrales de ratas inmaduras hipofisectomizadas y tratadas con 0, 2.5 y 8.0 UI de FSHrec y sacrificadas a diferentes tiempos de estimulación. En cada grupo de 4 barras, la barra derecha

representa el testigo negativo. Las letras diferentes encima de cada barra indican la existencia de diferencias significativas ($p < 0.05$) en cada panel.

El efecto de las diferentes dosis (0, 2.5 y 8.0 UI) de la FSHrec y tiempos de exposición (6, 12 y 18 horas) en el número de células que incorporaron [^3H]-timidina, (indicador de proliferación celular), en los folículos con un diámetro de 50 a 199 μm se encuentra en la tabla 4 y en la Figura 3A. Al comparar las diferentes dosis a las 6 horas de estimulación se observó un aumento significativo ($p < 0.05$) entre las dosis de 0 UI (10.34 ± 0.83 células marcadas) y 2.5 UI (9.84 ± 0.76 células marcadas) con respecto a la dosis 8.0 UI (15.83 ± 1.52 células marcadas). El testigo negativo no tuvo diferencias significativas con los grupos experimentales. A las 12 horas de estimulación hubo un incremento dosis dependiente (3.83 ± 0.70 , 11.43 ± 0.97 y 17.44 ± 1.52 células marcadas para cada dosis). El testigo negativo (10.59 ± 2.52 células marcadas) no presentó diferencias significativas con 2.5 UI pero si las presentó ($p < 0.05$) al compararlo con las dosis de 0 UI y 8.0 UI. A las 18 horas de estimulación se observó un aumento significativo ($p < 0.05$) dosis dependiente (5.55 ± 0.97 , 9.57 ± 0.92 y 20.72 ± 2.15 células marcadas para cada dosis). El testigo negativo (15.83 ± 2.44 células marcadas) fue significativamente diferente ($p < 0.05$) con respecto a las dosis 0 UI y 2.5 UI.

Tabla 4. Efecto de la FSHrec en la proliferación celular en folículos de 50-199 μm de ratas hipofisectomizadas inmaduras.

TRATAMIENTO dosis (UI) y tiempo (h)	N ³	No de folículos ⁴ (50 - 199 μm)	Número de células marcadas ⁵
hipox (-) ¹ 6h	8	25	15.24 \pm 3.12 ^{ab}
hipox (+) ² 6h 0 UI	4	100	10.34 \pm 0.83 ^a
hipox (+) 6h 2.5 UI	8	102	9.84 \pm 0.76 ^a
hipox (+) 6h 8.0 UI	8	64	15.83 \pm 1.52 ^b
hipox (-) 12h	8	17	10.59 \pm 2.52 ^{bd}
hipox (+) 12h 0 UI	4	40	3.83 \pm 0.70 ^a
hipox (+) 12h 2.5 UI	8	89	11.43 \pm 0.97 ^b
hipox (+) 12h 8.0 UI	8	127	17.44 \pm 1.52 ^c
hipox (-) 18h	6	24	15.83 \pm 2.44 ^c
hipox (+) 18h 0 UI	4	77	5.55 \pm 0.97 ^a
hipox (+) 18h 2.5 UI	8	124	9.57 \pm 0.92 ^b
hipox (+) 18h 8.0 UI	8	86	20.72 \pm 2.15 ^c

¹ hipofisectomía negativa

² hipofisectomía positiva

³ N representa el número de ovarios por grupo

⁴ No total de folículos cuyos ovocitos contuvieron el nucleolo

⁵ Incorporación de ³H-timidina ($\bar{x} \pm \text{E.E}$)

^{a,b,c} Las letras diferentes en cada panel indican la existencia de diferencias estadísticamente significativas ($p < 0.05$)

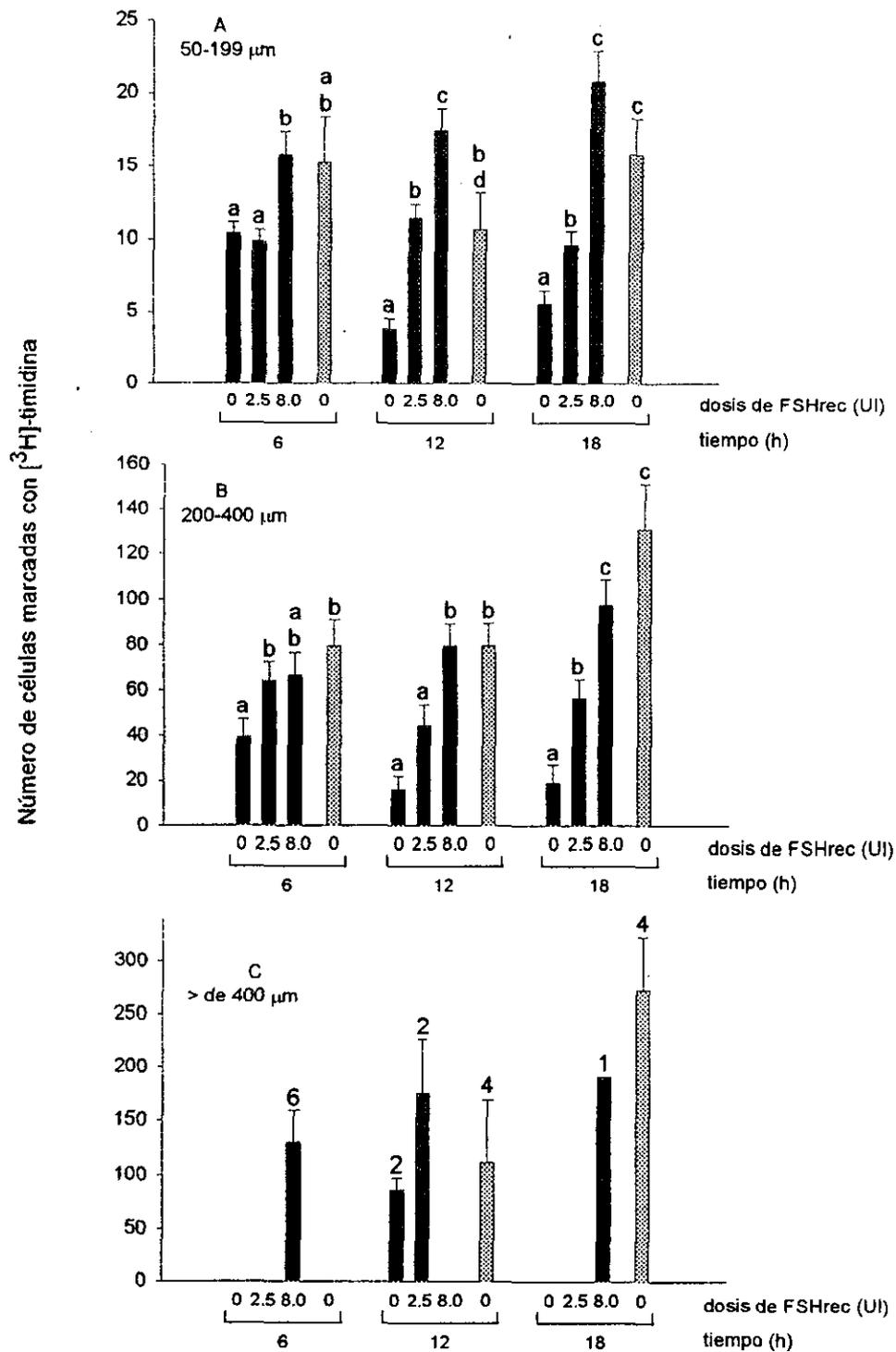


Figura 3. Número de células marcadas con $[^3\text{H}]$ -timidina (media \pm E.E) en folículos de un diámetro de A) 50-199 μm B) 200-400 μm y, C) > de 400 μm , de ovarios de ratas inmaduras hipofisectomizadas tratadas con 0, 2.5 y 8.0 UI de FSHrec y sacrificadas a diferentes tiempos de estimulación. En cada grupo de 4 barras, la barra derecha representa el testigo negativo. Las letras diferentes sobre las barras representan la existencia de diferencias significativas ($p < 0.05$) en cada panel.

Por otra parte, cuando se compararon los diferentes tiempos de exposición, a la dosis de 0 UI se observó una disminución en el número de células marcadas (10.34 ± 0.83 células) con respecto a las 12 y 18 horas (3.83 ± 0.70 y 5.55 ± 0.97 células marcadas, respectivamente). Con la dosis de 2.5 UI no hubo diferencias estadísticamente significativas así como en los testigos negativos. Con la dosis de 8.0 UI hubo un aumento significativo a las 18 horas de estimulación (20.72 ± 2.15 células marcadas) con respecto a las 6 y 12 horas de estimulación (15.83 ± 1.52 y 17.44 ± 1.52 células marcadas, respectivamente).

Tabla 5. Efecto de la FSHrec en la proliferación celular en folículos de 200-400 μm de ratas hipofisectomizadas inmaduras.

TRATAMIENTO dosis (UI) y tiempo (h)	N ³	No de folículos ⁴ (200 - 400 μm)	Número de células marcadas ⁵
hipox (-) ¹ 6h	8	20	79.44 ± 11.32^b
hipox (+) ² 6h 0 UI	4	11	39.18 ± 8.0^a
hipox (+) 6h 2.5 UI	8	22	64.32 ± 8.56^b
hipox (+) 6h 8.0 UI	8	21	66.86 ± 9.97^{ab}
hipox (-) 12h	8	19	79.56 ± 9.64^b
hipox (+) 12h 0 UI	4	3	16.33 ± 5.55^a
hipox (+) 12h 2.5 UI	8	20	44.7 ± 9.19^a
hipox (+) 12h 8.0 UI	8	36	79.5 ± 9.64^b
hipox (-) 18h	6	20	131.3 ± 20.39^c
hipox (+) 18h 0 UI	4	11	19.06 ± 8.20^a
hipox (+) 18h 2.5 UI	8	35	56.57 ± 8.54^b
hipox (+) 18h 8.0 UI	8	30	97.27 ± 11.31^c

¹hipofisectomía negativa

²hipofisectomía positiva

³N representa el número de ovarios por grupo

⁴No total de folículos cuyos ovocitos contuvieron el nucleolo

⁵Incorporación de ³H-timidina ($\square \pm E.E$)

^{a,b,c} Las letras diferentes en cada panel indican la existencia de diferencias estadísticamente significativas ($p < 0.05$)

El efecto de la FSHrec en el número de células que incorporaron [³H]-timidina en folículos cuyo diámetro mayor fue entre 200 y 400 μm se encuentra en la Tabla 5 y en la Figura 3B. A las 6 horas de estimulación se observó que con el vehículo (0 UI) hubo un menor número de células marcadas, a diferencia de 2.5 UI, 8.0 UI y el testigo negativo (39.18 ± 8.0 , 64.32 ± 8.56 , 66.86 ± 9.97 y $79.44 \pm$

11.32 células marcadas, para cada grupo respectivamente). A las doce horas de estimulación, no hubo diferencias significativas entre 0 UI y 2.5 UI (16.33 ± 5.55 y 44.7 ± 9.19 células marcadas respectivamente) ni entre 8 UI y el testigo negativo (79.50 ± 9.64 y 79.56 ± 9.64 células marcadas respectivamente). Las dosis de 0 UI y 2.5 UI fueron significativamente diferentes ($p < 0.05$) con respecto a 8.0 UI y al testigo negativo. A las 18 horas de exposición hubo un incremento significativo ($p < 0.05$), dosis dependiente (19.06 ± 8.20 , 56.57 ± 8.54 y 97.27 ± 11.31 células marcadas), para cada una de las dosis. El testigo negativo (131.3 ± 20.39 células marcadas) no tuvo diferencias significativas con respecto a 8.0 UI pero sí con las otras dos dosis (0 UI y 2.5 UI).

Por otra parte, al comparar los diferentes tiempos de exposición con 0 UI y 2.5 UI no hubo diferencias significativas entre 6, 12 y 18 horas (39.18 ± 8.0 , 16.33 ± 5.55 y 19.06 ± 8.20 células respectivamente para 0 UI; 64.32 ± 8.56 , 44.7 ± 9.19 y 56.57 ± 8.54 células respectivamente para 2.5 UI); con 8.0 UI hubo diferencias estadísticamente significativas entre 6 y 18 horas (66.86 ± 9.97 y 97.27 ± 11.31 células respectivamente). Los testigos negativos presentaron diferencias significativas ($p < 0.05$) a las 6 y 12 horas con respecto a las 18 horas de exposición (79.44 ± 11.32 , 79.56 ± 9.64 y 131.3 ± 20.39 células respectivamente).

El efecto de la FSHrec en el número de células que incorporaron [^3H]-timidina en folículos cuyo diámetro mayor fue mayor de $400 \mu\text{m}$ se encuentra en la Tabla 6 y en la Figura 3C. Debido a que se localizaron muy pocos folículos con un diámetro mayor a $400 \mu\text{m}$ no se realizaron pruebas estadísticas. La Figura 4 muestra las secciones histológicas de los ovarios de las ratas hipofsectomizadas expuestas durante diferentes tiempos a varias dosis de FSHrec. Se pueden observar las células que incorporaron [^3H]-timidina, en forma de gránulos de plata, en las células de la granulosa en los cortes de ovarios de los animales estimulados, así como las células picnóticas, en los cortes de ovarios de los animales no estimulados (testigos positivos).

Tabla 6. Efecto de la FSHrec en la proliferación celular en folículos mayores de 400 μm de ratas hipofisectomizadas inmaduras.

TRATAMIENTO dosis (UI) y tiempo (h)	N ³	No de folículos ⁴ (> de 400 μm)	Número de células marcadas ⁵
hipox (-) ¹ 6h	8	0	-----
hipox (+) ² 6h 0 UI	4	0	-----
hipox (+) 6h 2.5 UI	8	0	-----
hipox (+) 6h 8.0 UI	8	6	129.67 \pm 29.13
hipox (-) 12h	8	4	110.75 \pm 58.82
hipox (+) 12h 0 UI	4	2	86.50 \pm 10.50
hipox (+) 12h 2.5 UI	8	2	176.0 \pm 50.0
hipox (+) 12h 8.0 UI	8	0	-----
hipox (-) 18h	6	4	273.48 \pm 49.64
hipox (+) 18h 0 UI	4	0	-----
hipox (+) 18h 2.5 UI	8	0	-----
hipox (+) 18h 8.0 UI	8	1	190.5

¹ hipofisectomía negativa

² hipofisectomía positiva

³ N representa el número de ovarios por grupo

⁴ No total de folículos cuyos ovocitos contuvieron el nucleolo

⁵ Incorporación de ³H-timidina ($\bar{x} \pm \text{E.E}$)

^{a,b,c} Las letras diferentes en cada panel indican la existencia de diferencias estadísticamente significativas ($p < 0.05$)

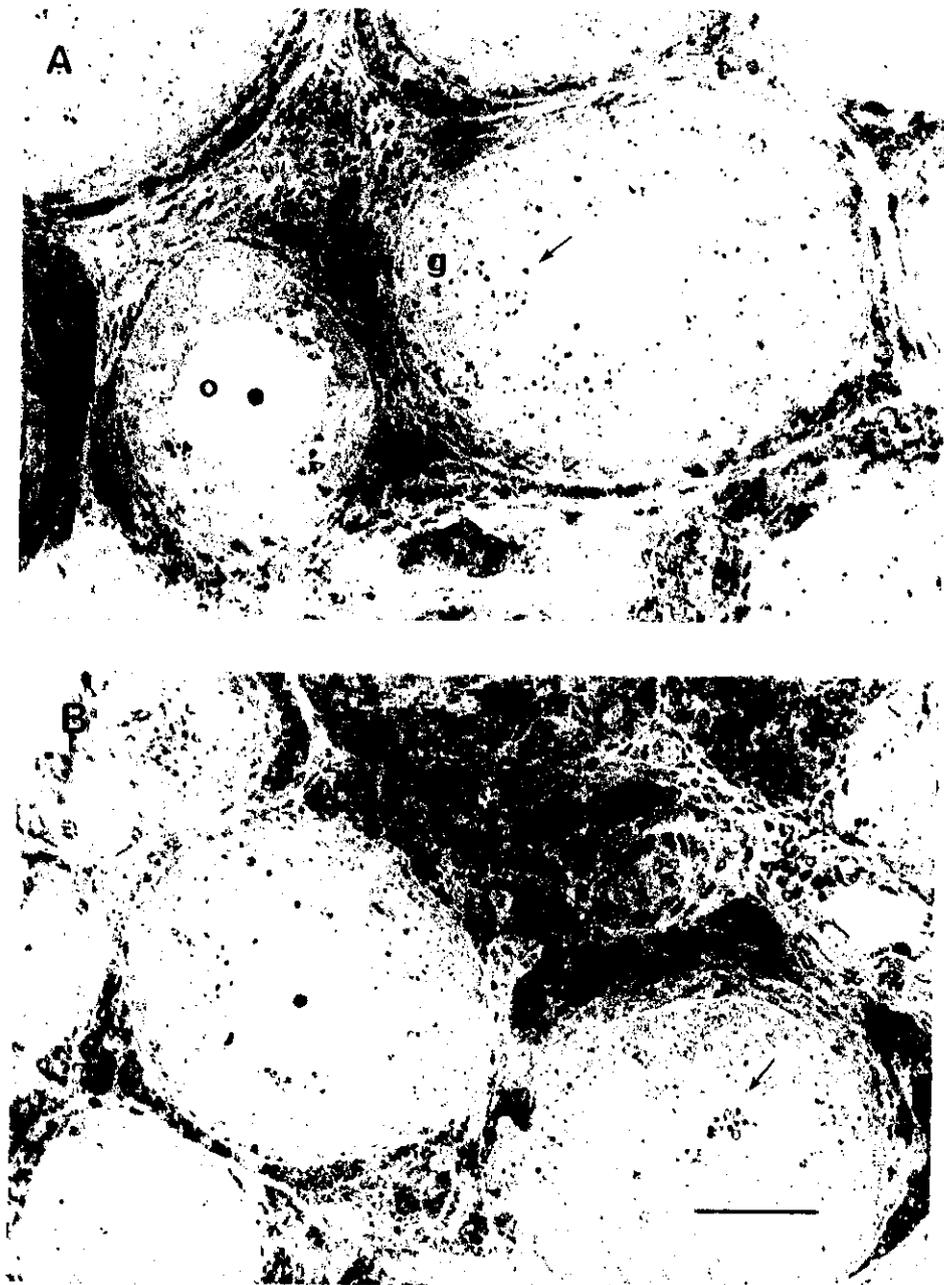
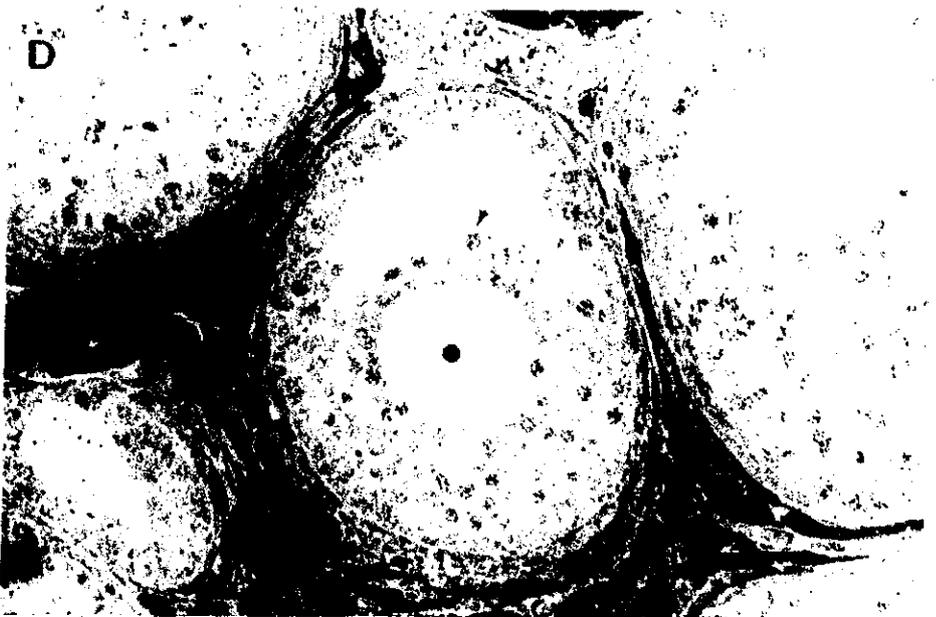
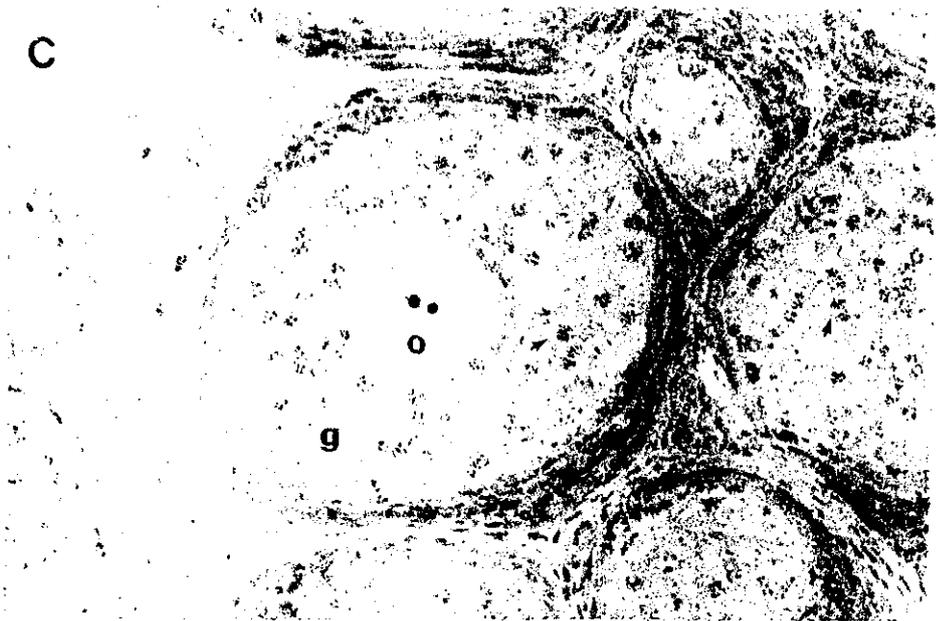


Figura 4. A y B) Cortes histológicos de ovarios de ratas hipofisectomizadas (testigos positivos), 18 horas después de la inyección del vehículo. Los folículos atrésicos contienen grupos de células de la granulosa picnóticas indicadas con flechas. C) Corte histológico de ovarios de ratas hipofisectomizadas estimuladas con 8.0 UI de FSHrec y sacrificadas después de 12 horas de estimulación. D) Corte histológico de ovarios de ratas hipofisectomizadas estimuladas con 8.0 UI de FSHrec y sacrificadas 18 horas después de la inyección. Las células que incorporaron $[^3\text{H}]$ -timidina están indicadas con las puntas de las flechas. El segmento representa 70 μm . o=ovocito, g=célula de la granulosa, t=célula de la teca.



DISCUSIÓN

Los hallazgos del presente estudio demostraron la capacidad de la FSHrec de contrarrestar el efecto de la privación aguda de gonadotropinas al rescatar los folículos ováricos de la atresia e inducir la proliferación celular en las células de la granulosa, siendo la FSH indispensable para la maduración de los folículos en estadios tempranos del desarrollo. Los primeros estudios que demostraron los efectos sinérgicos de la FSH y de la LH en ratas inmaduras hipofisectomizadas datan de 1940 (Fevold, 1941). Posteriormente se han realizado experimentos similares; sin embargo, los resultados han sido un tanto contradictorios debido a que las preparaciones de FSH empleadas contenían actividad variable de la LH (Richards, 1980). Mediante la tecnología recombinante se ha podido obtener FSH humana pura, a través de la expresión de FSH en células huésped de mamíferos y bacterias, lo cual permite elucidar la acción específica de la FSH durante el desarrollo folicular y la esteroidogénesis (Mannaerts, de Leeuw, Geelen, van Ravestein, van Wezenbeek, Schuurs y Kloosterboer, 1991).

En el presente estudio realizado en ratas inmaduras hipofisectomizadas se demostró que la FSHrec, disminuye la atresia folicular posthipofisectomía, sin cambios significativos en el número de folículos antrales. La hipofisectomía en las ratas prepúberes tuvo un efecto significativo en el desarrollo folicular; por ejemplo, en las ratas control (expuestas únicamente a solución salina) se indujo atresia folicular en el ovario que presentó una disminución en el porcentaje de folículos sanos y un aumento en el de los atrésicos a las 12 horas después del estímulo (es decir, 18 horas post-hipofisectomía), lo cual fue un cambio significativo no descrito previamente. Esta disminución continuó hasta las 18 horas de exposición (24 horas post-hipofisectomía). Estos cambios en la atresia fueron similares a los descritos anteriormente en animales adultos (Braw, Bar-Ami y Tsafiriri, 1981), en los que se observaron cambios morfológicos a las 24 horas y signos de atresia avanzada 48 horas después de la hipofisectomía. Por otra parte, el tratamiento con dosis únicas de FSHrec incrementó el porcentaje de folículos sanos. Una dosis única de 2.5 UI de FSHrec mantuvo el porcentaje de folículos sanos hasta las 12 horas de exposición; sin embargo, 18 horas después, se presentó una disminución drástica en el porcentaje de los folículos sanos. Por el

contrario, con 8.0 UI de FSHrec se mantuvo el porcentaje de folículos sanos incluso hasta las 18 horas de exposición.

En la presente tesis, se observó que el estímulo con FSHrec *in vivo*, aumentó significativamente el porcentaje de folículos sanos de una manera dosis-dependiente. Se demostró que la FSHrec, en ausencia de actividad de la LH, disminuye la incidencia de la atresia, aumentando el porcentaje de folículos sanos, sin cambios notorios en el porcentaje de los folículos antrales y preantrales. Conforme transcurrió un mayor tiempo de exposición aumentó el porcentaje de folículos atrésicos en aquellos animales que fueron inyectados con solución salina (0 UI), debido a la falta de FSH para continuar y mantener al folículo sano. La dosis de 2.5 UI mantuvo el porcentaje de folículos sanos sin diferencias con respecto al testigo negativo (hipox -) a las 6 y 12 horas de estimulación; sin embargo, a las 18 horas se observó una disminución significativa en el porcentaje de folículos sanos. Por otra parte, la dosis de 8.0 UI mantuvo el porcentaje de folículos sanos y atrésicos inclusive hasta las 18 horas, donde permaneció sin diferencias significativas con respecto al testigo negativo (hipox -). Estos datos nos permiten concluir que el estímulo de 2.5 UI fue suficiente dentro de las primeras 12 horas; sin embargo, no tiene ningún efecto posteriormente, ya que no es una dosis suficiente para mantener el estímulo.

El tratamiento con FSHrec previno la atresia folicular, manteniendo la fracción de folículos no atrésicos, pero sin cambios significativos en el número total de folículos antrales y preantrales. En un estudio previo (Mannaerts, Uilenbroek, Schot y DeLeeuw, 1994) se demostró que en ratas prepúberes hipofisectomizadas y estimuladas con varias dosis de FSHrec cuatro días después de la hipofisectomía, la FSHrec incrementó el número de folículos antrales, disminuyendo la incidencia de la atresia en estos folículos. También se encontró que el efecto sobre la atresia fue más aparente en los folículos de menor tamaño, indicando que la FSH induce un desarrollo folicular múltiple al prevenir que los folículos antrales de menor tamaño entren en atresia. Además, la FSHrec por sí sola indujo el crecimiento de los folículos hasta el estado preovulatorio. Las diferencias entre ambos estudios podrían ser atribuidas a los diferentes diseños experimentales y dosis de FSHrec empleadas.

El número de células que incorporaron [³H]-timidina, indicativo de proliferación celular, se incrementó significativamente de una manera dosis-dependiente en los dos tamaños foliculares estudiados, con algunos cambios significativos cuando se realizó el análisis en relación al tiempo, en el

cual, hubo una disminución significativa en la proliferación celular de folículos de menor tamaño 12 horas después del estímulo, con respecto a las 6 horas, en los animales que fueron expuestos a solución salina en los folículos de menor tamaño, pero no en los mayores. Esto último indica que la hipofisectomía disminuye el número de células que están proliferando después de las 6 horas de exposición. Con 2.5 UI no hubo diferencias significativas en ninguno de los dos tamaños, ni de los animales a los cuales se les realizó la hipofisectomía negativa en los folículos más pequeños, mientras que en los mayores se observó un incremento en el número de células que incorporaron [³H]-timidina 18 horas después del estímulo. La dosis de 8.0 UI incrementó la proliferación celular hasta 18 horas después del estímulo.

La atresia folicular es un proceso mediado por la apoptosis que podría estar regulado *in vivo* por diversas vías, por un lado la FSH y los estrógenos inhiben la apoptosis mientras que los andrógenos y la hormona liberadora de gonadotropinas (GnRH) incrementan la fragmentación internucleosomal del ADN (Billig, *et al*, 1994). Sin embargo, el mecanismo molecular de la fragmentación del DNA asociado a la atresia folicular aún se desconoce. Los folículos que presentaron atresia contenían numerosas células de la granulosa con núcleos picnóticos y gotas lipídicas, así como cuerpos apoptóticos compuestos de núcleos picnóticos con fragmentos de citoplasma dentro o en la periferia del antro folicular. Se observó una tendencia en la disminución de figuras mitóticas conforme se observaba mayor atresia. En estados más avanzados de atresia se observó que el *cumulus oophorus* se desintegraba, formando una especie de laguna en un principio en las células del *cumulus* y posteriormente en el ovocito. La lámina basal permaneció intacta en los folículos examinados, sin embargo, en estados avanzados de atresia hubo una invasión de células, probablemente macrófagos y células de tejido conectivo que invaden la granulosa con un rompimiento de la lámina basal, en estos casos fue difícil observar los límites del folículo y como era de esperar hubo una gran cantidad de células picnóticas. Durante la atresia folicular, a pesar de observar cambios degenerativos en la granulosa, no se observaron cambios aparentes en la teca interna. En estudios previos se demostró un incremento en la invasión de macrófagos conforme progresaba la atresia (Gaytán, Morales, Bellido, Aguilar y Sánchez-Criado, 1998).

La FSHrec humana que es producida por las células de la línea celular del ovario de criceto chino (CHO) tiene ciertas diferencias en el perfil de distribución por carga con el perfil de la FSH aislada de extractos hipofisarios no purificados, con el suero de mujeres a lo largo del ciclo menstrual, el suero de mujeres menopáusicas, así como el de preparaciones comerciales de FSH urinaria (Ulloa-Aguirre, Timossi, Zambrano, Damián-Matsumura, Quintanar, Mussi y Domínguez-González, 1997). En el perfil de distribución por carga de la FSHrec se observa un patrón poco frecuente o carente de las isoformas menos ácidas de FSH y está limitado a un rango pequeño de pH (Ulloa-Aguirre, Midgley, Beitins y Padmanabhan, 1995). Estas diferencias podrían deberse a la restricción en la glicosilación presentada por las células CHO.

Como se ha demostrado previamente, las isoformas intrahipofisarias con menor contenido de ácido siálico, menos ácidas, son biológicamente más potentes *in vitro*, pero tienen una menor vida media plasmática y potencia biológica *in vivo* que sus análogos más ácidos, altamente sializados (Baenzinger y Green, 1988). La FSHrec al presentar un patrón carente de isoformas menos ácidas, presenta una actividad biológica *in vitro* mayor que algunas preparaciones con patrones predominantemente ácidos, exhibiendo una vida media plasmática menor, así como una mayor velocidad de depuración plasmática (Ulloa-Aguirre *et al* 1997). Los hallazgos de la presente tesis serán de gran utilidad como referencia para estudios posteriores sobre el efecto de las diferentes isoformas moleculares de la FSH natural en la proliferación celular de las células de la granulosa, estudio indispensable para el análisis de la importancia fisiológica del polimorfismo de estas gonadotropinas.

HIPOFISECTOMÍA POR VÍA PARAFARÍNGEA

La hipofisectomía se realizó mediante la técnica descrita por Quintanar y Quintanar (1994). El instrumental se lavó perfectamente y se enjuagó con una solución concentrada de cloruro de benzalconio y posteriormente con alcohol. Se rasuró al animal en la cara anterior del cuello y se fijó la rata en decúbito dorsal sobre la mesa de operaciones. Para entubar la tráquea se inclinó la mesa de operaciones en un ángulo aproximado de 70° iluminando de frente la zona del cuello con una lámpara y con la ayuda de un abatelenguas se observó la apertura intermitente de la glotis. Se canuló la tráquea introduciendo el catéter y asegurándose que haya quedado en la vía aérea.

La cara anterior del cuello se limpió con cloruro de benzalconio y se realizó una incisión de 2 a 3 cm en la línea media de la piel, desde el borde inferior de la mandíbula hasta el mango del esternón. Se cortó la fascia superficial que recubre a los músculos digástricos y esternohioideos. Se tomó como referencia el tendón central del músculo digástrico izquierdo y con los disectores rectos se hizo una separación roma de las siguientes estructuras: vena yugular interna izquierda y cara interna del músculo masetero del mismo lado y hacia el centro el músculo digástrico y los conductos faringoesofágico y laringotraqueal. Una vez realizado lo anterior se procedió a trabajar bajo el microscopio estereoscópico con lámpara integrada con un aumento de 10x. Con el separador curvo se jaló las estructuras interna hacia la línea media hasta observar el piso de la nasofaringe, de la que sobresale el extremo distal de la apófisis pterigoidea izquierda, la cual se toma como referencia para desplazarse 1.5 cm hacia abajo y hacia el centro. En este punto se encuentra el hueso basioccipital, el cual se legra con el mismo disector, hasta llegar a la cresta del occipital la cual se limpia en ambos lados en dirección anterior, hasta llegar a la articulación esfeno-occipital, la cual se identifica como una línea transversal, generalmente de color azul claro, que corresponde a dicha articulación. Se colocaron los separadores romos de metal de tal manera que se pudiera realizar con buena visibilidad las maniobras posteriores. Para evitar un daño por compresión, y evitar la ruptura de la nasofaringe, fue importante que los separadores no quedarán excesivamente apretados. El número de separadores y el lugar de su localización dependió de la visibilidad de la zona operatoria. Con una broca se trepanó el hueso basioccipital en la parte media e inmediatamente por delante de la cresta y posterior de la línea azul, hasta llegar a la duramadre

cuidando de no romperla. Con la legra para hueso, se levantaron y se desprendieron los restos de la lámina interna del hueso y se redondean los bordes del orificio, hasta que quedara con un diámetro final de 3 mm aproximadamente. Con la aguja para meninges se rompió la duramadre y se extrajo la hipófisis con un aspirador de hipófisis conectada al vacío. Después de la hipofisectomía, se presentaba una pequeña hemorragia acompañada de líquido cefalorraquídeo que cesaba en unos momentos. La hipófisis extirpada y atrapada en la malla de nylon se observó al microscopio y se determinó si la hipofisectomía fue completa. Una vez que la hemorragia cesó, se aspiró el coágulo, hasta asegurar que no hubiera hemorragia. Finalmente se procedió a retirar los separadores de metal y a suturar la piel.

CUIDADOS POSTOPERATORIOS

Se retiró la cánula traqueal y el animal se colocó en una caja de cuidados intensivos, formada por un colchón térmico en una atmósfera de gas carbógeno (95% O₂, 5% CO₂). Como el primer efecto de la hipofisectomía es la poliuria, que aparece entre los 40-90 minutos después de la operación, es importante que la rata tenga libre acceso a agua glucosada (10%) para evitar la muerte por deshidratación. Una temperatura de 28-30°C y una dieta constituida de agua glucosada, alimento molido y pan humedecido con leche fueron importantes para la supervivencia postoperatoria.

Se comprobó que la extracción de la hipófisis fuera completa durante la necropsia.

Tratamiento de Tejidos

FIJACIÓN:

El tejido se aisló e inmediatamente se fijó en la solución de Karnovsky modificado (Karnovsky, 1965), (Paraformaldehído 1%, Glutaraldehído 2.5% en amortiguador de cacodilato de Sodio 0.2M a pH 7.4 sin Ca^{++}), de 1 a 12 horas a 4°C. Posteriormente se hacen tres cambios de 15 minutos con cacodilato de sodio 0.1M al término de la fijación a 4°C. La post-fijación se realiza con tetróxido de osmio (1% OsO_4 en amortiguador de Zetterqvist (Zetterqvist, 1956) una hora. Finalmente se hacen tres lavados con agua bidestilada.

DESHIDRATACIÓN:

Posteriormente el tejido se deshidrató haciendo lavados sucesivos con etanol de diferentes graduaciones, se inició con etanol al 70% y 80% a 4 °C, 90%, 95% y 100% a temperatura ambiente. Finalmente, se cambiaron a óxido de propileno 20 minutos a temperatura ambiente.

IMPREGNACIÓN:

La impregnación se realizó con una mezcla de óxido de propileno y epon 812 1:1 una hora, agitando suavemente a temperatura ambiente. Posteriormente, se cambió por una mezcla de epon y óxido de propileno 2:1 una hora, agitando suavemente a temperatura ambiente y finalmente se dejó con epon puro 12 horas, en agitación suave a temperatura ambiente.

La inclusión se llevó a cabo en moldes debidamente etiquetados con epon puro a 60°C 24 horas.

BIBLIOGRAFÍA

Adashi EY, Resnik CE, Hurwitz A, Ricciarelli E, Hernandez ER, Roberts CT. (1991): Insulin-like growth factors: the ovarian connection. *Hum. Reprod.*, **6**:1213-9.

Armstrong DT, Papkof FH. (1976): Stimulation of aromatization of exogenous and endogenous in ovaries of hypophysectomized rats *in vivo* by follicle-stimulating hormone. *Endocrinology.*, **99**:1144-51.

Baenzinger JU, Green ED. (1988): Pituitary glycoprotein hormone oligosaccharides: structure, synthesis and function of the asparagine-linked oligosaccharides on lutropin, follitropin and thyrotropin. *Biochem. Biophys. Acta.*, **947**:287-306.

Bagavandoss P, Midgley AR, Wicha M. (1983): Developmental changes in the ovarian follicular basal lamina detected by immunofluorescence and electron microscopy. *J. Histochem. Cytochem.*, **31**:633-640.

Baird DT, Smith KB. (1993): Inhibin and related peptides in the regulation of reproduction. *Oxf. Rev. Reprod. Biol.*, **15**:191-232.

Billig H, Furuta Y, Hsueh AJW. (1994): Gonadotropin-releasing hormone directly induces apoptotic cell death in the rat ovary: biochemical *in situ* detection of deoxyribonucleic acid fragmentation in granulosa cells. *Endocrinology.*, **134**(1):245-252.

Bley MA, Simon JC, Estavez Ag, Jimenez de Asua L, Barrarao JL. (1992): Effect of follicle-stimulating hormone on insulin growth factor-1 stimulated rat granulosa cell deoxyribonucleic acid synthesis. *Endocrinology.*, **131**:1223-9.

Bradbury JT. (1961): Direct action of estrogen on the ovary of the immature rat. *Endocrinology.*, **68**:115-20.

Braw RH, Bar-Ami S, Tsafiriri A. (1981): Effect of hypophysectomy on atresia of rat preovulatory follicles. *Biol Reprod.*, **25**:989-996.

Byrnes WW, Meyer RR. (1951): Effect of physiologic amounts of estrogen on the secretion of follicle-stimulating and luteinizing hormone. *Endocrinology.*, **49**:449-60.

Bradbury JT. (1961): Direct action of estrogen on the ovary of the immature rat. *Endocrinology.*, **68**:115-120.

Centola, GM. (1983): Structural changes: Follicular development and hormonal requirements. En: **The ovary**. G.B. Serra, (Ed). Raven Press, New York, pp. 95-111.

Chiras DD, Greenwald GS. (1978): Effects of steroids and gonadotropins on follicular development in the hypophysectomized hamster. *Am. J. Anat.*, **152**:307-320.

Di Simone N, Lanzone A, Petraglia F, Ronsisville E, Caruso A, Mancuso S. (1994): Effect of activin-A on progesterone synthesis in human luteal cells. *Fertil. Steril.*, **62**:1157-61.

Dorrington JH, Moon YS, Armstrong DT. (1975): Estradiol 17 β biosynthesis in cultured granulosa cells from hypophysectomized immature rats: stimulation by follicle-stimulating hormone. *Endocrinology.*, **97**:1328-31.

Dye RB, Rabinovici J, Jaffee RB. (1992): Inhibin and activin in reproductive biology. *Obstet. Gynecol. Surv.*, **47**:173-85.

Ellenwood WM, McClellan MC, Brenner RM, Resko JA. (1983): Estrogen synthesis by fetal monkey ovaries correlates with antral follicular formation. *Biol. Reprod.*, **28**:505-16.

Erikson GF, Garzo VG, Margoffin SA. (1989): Insuline-like growth factor-1 regulates aromatase activity in human granulosa and granulosa luteal cells. *J. Clin. Endocrinol. Metab.*, **69**:716-24.

Eshkol A, Lunenfeld B, Peters H. (1970): Ovarian development in mice. In: Butt WR, Crooke AC, Ryl M, (eds). **Gonadotrophins and ovarian development**. Livingston: London, 249-58.

Fevold HL. (1941): Synergism of follicle stimulating and luteinizing hormone in producing estrogen secretion. *Endocrinology.*, **28**:33-36.

Fiddes JC, Talmadge K. (1984): Structure, expression and evolution of genes for the human glycoprotein hormones. *Recent Prog. Horm. Res.*, **40**:43-78.

Freeman ME. (1994): The neuroendocrine control of the ovarian cycle of the rat. In: Knobil E, Neil JD. (Eds). *The physiology of reproduction*. Vol. 1. 2nd ed. Raven Press, Ltd., New York, pp 613-658.

Galway AB, Lapolt PS, Tsafiriri A, Dargan CM, Boime I, Hsueh AJW. (1990): Recombinant follicle-stimulating hormone induces ovulation and tissue plasminogen activator expression in hypophysectomized rats. *Endocrinology.*, **127**:3023-3028.

Gaytán F, Morales C, Bellido C, Aguilar E Sánchez-Criado JE. (1998): Ovarian follicle macrophages: is follicular atresia in the immature rat a macrophage-mediated event?. *Biol Reprod.*, **58**:52-59.

Gougeon A. (1981): Rate of follicular growth in the human ovary. In: Rolland A, van Hall EV, Hillier SG, McNatty KP, Schoemaker J. (Eds.). *Follicular maturation and ovulation*. Proceedings of the 4th Renier de Graaf Symposium. Excerpta Medica, Princeton (NJ), pp 155-63.

Greenwald GS, Roy SK. (1994): Follicular development and its control. In: Knobil E, Neil JD. (Eds.). *The physiology of reproduction*. Vol. 1. 2nd ed. Raven Press, New York, pp 629-724.

Greenwald GS, Terranova PF. (1988): Follicular selection and its control. En: The physiology of reproduction, Vol 1, E Knobil and J Neill, eds. Raven Press, New York, pp. 387-445.

Gruenberg ML, Sterger RW, Peluso JJ. (1983): Follicular development, steroidogenesis and ovulation within ovaries exposed *in vitro* to hormone levels which mimic those of the rat estrous cycle. Biol. Reprod., **29**:1265-1275.

Hirschfield AN, Midgley AR Jr. (1978): Morphometric analysis of follicular development in the rat. Biol. Reprod., **19**:597-605.

Hirschfield AN. (1991): Theca cells may be present at the outset of follicular growth. Biol. Reprod., **44**:1157-1162.

Hodgen GD. (1982): The dominant follicle. Fertil. Steril., **38**:281-300.

Hotchkiss J, Knobil E. (1994): The menstrual cycle and its control. In: Knobil E, Neil JD. (Eds.). The physiology of reproduction. Vol. 1. 2nd ed. Raven Press Ltd., New York, pp 711-49.

Hsu CJ, Hammond JM. (1987): Gonadotropins and estradiol stimulation immuno-reactive insuline-like growth factor-1 production by porcine granulosa cells *in vitro*. Endocrinology., **120**:198-207.

Hsueh AJW, Billig H, Tsafirri A. (1994): Ovarian follicle atresia: a hormonally controlled apoptotic process. Endocr. Rev., **15**(6):707-724.

Hutchinson LA, Findlay AK, de Vos FC, Robertson DM. (1987): Effects of bovine inhibin, transforming growth factor-beta and bovine activin-A in granulosa cell differentiation. Biochem. Biophys. Res. Commun., **146**:1405-12.

Ingram DL. (1962): Atresia. En: The Ovary. S Zuckerman ed. Academic Press, New York. pp. 247-273.

Karnovsky, M.J. (1965). A formaldehyde-glutaraldehyde fixative of high osmolality for use in electron microscopy. *J. Cell. Biol.*, **27**:137A.

Le Nestour E, Marraoui J, Lahlou N, Roger M, DeZiegler D, Bouchard P. (1993): Role of estradiol in the rise of follicle-stimulating hormone levels during the luteal-follicular transition. *J. Clin. Endocrinol. Metab.*, **77**:439-42.

Leung DW, Cachianes G, Kuang WJ, Goeddel DV, Ferrara N. (1989): Vascular endothelial growth factor is a secreted angiogenic mitogen. *Science.*, **246**:1306-9.

Ling N, Ying SY, Ueno N, Shimaski S, Esch F, Hotta M. (1986): Pituitary FSH is released by a heterodimer of the beta-subunit from the two forms of inhibin. *Nature.*, **321**:779-82.

Louvet JP, Harman SM, Schreiber JR, Ross GT. (1975): Evidence of a role of androgens in follicular maturation. *Endocrinology.*, **97**:366-72.

Mannaerts B, de Leeuw R, Geelen J, van Ravestein A, van Wezenbeek P, Schuurs A, Kloosterboer H. (1991): Comparative *in vitro* e *in vivo* studies on the biological characteristics of recombinant human follicle-stimulating hormone. *Endocrinology.*, **129**:2623-2630.

Mannaerts B, Uilenbroek J, Schot P, de Leeuw R. (1994): Folliculogenesis in hypophysectomized rats after treatment with recombinant human follicle-stimulating hormone. *Biol. Reprod.*, **51**:72-81.

McLachlin RI, Robertson DM, Healy DL, de Kretser DM, Burger HG. (1996): Plasma inhibin levels during gonadotropin induced ovarian hyperstimulation. A new index of follicular function. *Lancet* **1**:1233-4.

Merchant-Larios H. (1984): Germ and somatic cell interactions during gonadal morphogenesis. In: Van Blerkom J, and Motta PM, (eds). **Ultrastructure of reproduction**. The Netherlands, 19-30.

Meyer JE, Bradbury JT. (1960): Influence of stilbestrol on the immature rat ovary and its response to gonadotropin. *Endocrinology.*, **66**:121-128.

Midgley AR Jr. (1973): Autoradiographic analysis of gonadotropin binding to rat ovarian tissue sections. *Adv. Exp. Med. Biol.*, **36**:365-378.

Mills TM. (1975): Effects of luteinizing hormone and cyclic adenosine 3'5'-monophosphate on steroidogenesis in the ovarian follicle of the rabbit. *Endocrinology.*, **96**:440-5.

Oxberry BA, Greenwald GS. (1982): An autoradiographic study of the binding of 125I-labeled follicle stimulating hormone, luteinizing hormone and prolactin to the hamster ovary throughout the estrous cycle. *Biol. Reprod.*, **27**:505-516.

Padmanabhan V, Lang LL, Sonstein J, Kelch RP, Beitins IZ. (1988): Modulation of serum follicle-stimulating hormone bioactivity and isoform distribution by estrogenic steroids in normal women and in gonadal dysgenesis. *J. Clin. Endocrinol. Metab.*, **67**:465-473.

Paquette GN, La Polt PS, Okawa M, Hsueh AJ. (1980): Regulation of luteinizing hormone receptor messenger ribonucleic acid levels by gonadotropins, growth factor and gonadotropin releasing hormone in cultured rat granulosa cells. *Endocrinology.*, **128**:2449-56.

Pencharz RI. (1940): Effects of estrogens and androgens alone and in combination on the ovary of the hypophysectomized rat. *Science.*, **91**:554-5.

Peters H. (1979): Some aspects of early follicular development. In: Midgley AR Jr, Sandler WA (Eds). *Ovarian follicular development and function*. Raven Press, New York, pp 1-13.

Peters H, Byskov AG, Himelstein-Braw R, Faber M. (1975): Follicular growth: The basic event in the mouse and human ovary. *J. Reprod. Fert.*, **45**:559-566.

Pierce JG, Parsons TF. (1981): Glycoprotein hormones: structure and function. *Ann. Rev. Biochem.*, **50**:465-495.

Quintanar-Stephano, A., Quintanar-Stephano, J.L. (1994). Hipofisectomía transfaríngea en la rata (Descripción de la técnica). *Vet. Méx.*, **25**(1):13-17.

Ravindrath N, Little-Ihrig L, Phillips HS, Ferrara N, Zeleznik AJ. (1992): Vascular endothelial growth factor messenger ribonucleic acid in the primate ovary. *Endocrinology.*, **131**:254-60.

Richards JS. (1980): Maturation of ovarian follicles: actions and interactions of pituitary and ovarian hormones on follicular cell differentiation. *Physiol. Rev.*, **60**:51-89.

Richards JS, Midgley AR Jr. (1976): Protein hormone action : a key to understanding follicular and luteal cell development. *Endocrinology.*, **97**:1174-84.

Robertson DM, Foulds LM, Leversha L, Morgan FJ, Hearn MTW, Burger HG. (1985): Isolation of inhibin from bovine follicular fluid. *Biochem. Biophys. Res. Commun.*, **126**:220-226.

Rogers AW. (1979). *Techniques of Autoradiography*. 3rd De. New York: Elsevier/North-Holland.

Roy SK. (1994): Regulation of ovarian follicular development: A review of microscopic studies. *Micr. Res. Tech.*, **27**:83-96.

Schwartz NB. (1974): The role of FSH and LH and their antibodies on follicle growth and on ovulation. *Biol. Reprod.*, **10**:236-272.

Scito S, Nakamura T, Titani K, Sugino H. (1991): Production of activin binding protein by rat granulosa cells *in vitro*. *Biochem. Biophys. Res. Commun.*, **176**:413-22.

Shukosvski L, Findlay JK. (1990): Activin-A inhibits oxytocin and progesterone production by luteinized granulosa cells *in vitro*. *Endocrinology.*, **126**:2222-4.

Smith BD, Bradbury JT. (1963): Ovarian response to gonadotropins after pretreatment with diethylstilbestrol. *Am. J. Physiol.*, **204**:1023-1027.

Smith GM, Bishop LA, DeKroon R, Wright G, Cerpa-Poljak A, Schofield PR. (1992): Purification and characterization of recombinant human FSH. In: Hunzicker-Dunn M, Schwartz NB (Eds) Follicle stimulating hormone. Regulation of secretion and molecular mechanisms of action. Serono Symposia USA, Proceedings. Springer-Verlag, New York, pp 335-338.

Speroff L, Glass RH, Kase NG. (1989): *Clinical Gynecologic Endocrinology and Infertility*. Fourth Edition. Williams & Wilkins, Maryland, USA. 668 pp.

Taymor ML (1996): The regulation of follicle growth: some clinical implications in reproductive endocrinology. *Fertil. Steril.*, **65**(2):235-247.

Tsonis CG, Hillier SE, Baird DT. (1987): Production of inhibin bioactivity by human granulosa-lutein cells: stimulation by LH and testosterone *in vitro*. *J. Clin. Endocrinol. Metab.*, **112**:11-4.

Ulloa-Aguirre A, Damian-Matsumura P, Espinoza P, Dominguez R, Morales L, Flores A. (1990): Effects of neonatal androgenization on the chromatofocusing pattern of anterior pituitary FSH in the female rat. *J. Endocrinol.*, **126**:323-332.

Ulloa-Aguirre A, Espinoza R, Damian-Matsumura P, Chappel SC. (1988): Immunological and biological potencies of the different molecular species of gonadotropins. *Human Reprod.*, **3**:491-501.

Ulloa-Aguirre A, Midgley RAJr, Beitins IZ, Padmanabhan V. (1995): Follicle-stimulating hormone: characterization and physiological relevance. *Endocr. Rev.*, **16**(6):765-787.

Ulloa-Aguirre A, Timossi C, Zambrano E, Damián-Matsumura P, Quintanar A, Mussi N and Domínguez-González R. (1997). Physicochemical and biological attributes of recombinant human follicle-stimulating hormone. In: New horizons in reproductive medicine. Coutifaris C, Mastroiani L (Eds). Parthenon Publishing. Carnforth, England, pp 153-163.

Wide L, Bakos O. (1993): More basic forms of both human follicle-stimulating hormone and luteinizing hormone in serum at midcycle compared with the follicular or luteal phase. *J. Clin. Endocrinol. Metab.*, **76**:885-889.

Xiao S, Robertson DM, Findlay JK. (1992): Effects of activin and follicle-stimulating hormone (FSH) suppressing protein/follistatin on FSH receptors and differentiation of cultured rat granulosa cells. *Endocrinology.*, **131**:1009-16.

Yen SCC (1991). The human menstrual cycle. In: Yen SCC, Jaffe RB. (Eds.). Reproductive endocrinology. 3rd ed. WB Saunders eds, Philadelphia.

Ying SY, Becker A, Ling N, Ueno N, Guillemin LR. (1986): Inhibin and G-type transforming growth factor have opposite modulating effects on the follicle-stimulating hormone (FSH) induced aromatase activity of cultured granulosa cells. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* **136**:969-75.

Ying SY, Becker A, Swanson G, Tan L, Ling N, Esch F. (1987): Follistatin specifically inhibits pituitary follicle-stimulating release *in vitro*. *Biochem. Biophys. Res. Commun.*, **149**:133-9.

Ying-Yao S, Becker A, Baird A, Ling N, Ueno N, Esch F. (1986): Type beta transforming factor (TGF- β) is a potent stimulator of the basal secretion of follicle-stimulating hormone (FSH) in a pituitary monolayer system. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* **135**:950-6.

Yong EL, Baird DT, Yates R, Reichert LE Jr, Hillier SG. (1992). Hormonal regulation of the growth and steroidogenic function of human granulosa cells. *J. Clin. Endocrinol. Metab.*, **74**:842-9.

Yoshimura Y, Nakamura Y, Yamada H, Ando M, Ubukuta Y, Oda T. (1991): Possible contribution of prolactin in the process of ovulation and oocyte maturation. *Horm. Res.*, **35**(Suppl):22-32.

Zambrano E, Olivares A, Diaz-Cueto L, Mendez JP, Veldhuis JD, Ulloa-Aguirre A. (1995): Dynamics of basal and GnRH releasable serum FSH charge isoform distribution throughout the human menstrual cycle. *J. Clin. Endocrinol. Metab.*, **80**(5):1647-1656.

Zetterqvist, H. (1956). The ultrastructural organization of the columnar absorbing cells of the mouse jejunum. Ph. D. Thesis. Karolinska Institute, Stockholm.

NO TE SALVES

No te quedes inmóvil
al borde del camino
no congeles el júbilo
no quieras con desgana
no te salves ahora
ni nunca

no te salves
no te llenes de calma
no reserves del mundo
sólo un rincón tranquilo
no dejes caer los párpados
pesados como juicios
no te quedes sin labios
no te duermas sin sueño
no te pienses sin sangre
no te juzgues sin tiempo

pero si

pese a todo
no puedes evitarlo
y congelas el júbilo
y quieres con desgana
y te salvas ahora
y te llenas de calma
y reservas del mundo
sólo un rincón tranquilo
y dejas caer los párpados
pesados como juicios
y te secas sin labios
y te duermes sin sueño
y te piensas sin sangre
y te juzgas sin tiempo
y te quedas inmóvil
al borde del camino
y te salvas

entonces

no te quedes conmigo.

Mario Benedetti