



UNIVERSIDAD NACIONAL AUTÓNOMA DE MÉXICO

POSGRADO EN CIENCIAS DE LA PRODUCCIÓN Y SALUD ANIMAL

REPRODUCCIÓN ANIMAL

FACULTAD DE MEDICINA VETERINARIA Y ZOOTECNIA

**Efecto de las gonadotropinas en relación a VEGF y NOTCH durante la
transición de folículo preantral a antral en la rata infantil**

T E S I S

QUE PARA OPTAR POR EL GRADO DE

DOCTORA EN CIENCIAS DE LA PRODUCCIÓN Y SALUD ANIMAL.

PRESENTA:

Minerva Carolina Torres Ortiz

Director de tesis:

Dr. José Gerardo Perera Marín: Facultad de Medicina Veterinaria y Zootecnia.

Miembros del comité tutor

Dr. Gabriel Gutiérrez Ospina: Instituto de Investigaciones Biomédicas.

Dr. Rogelio Alonso Morales: Facultad de Medicina Veterinaria y Zootecnia.



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.

I. DEDICATORIAS

A mis hijos. Atenea e Iván, les dedico esta tesis, ustedes son el principal motivo de mi superación, son lo que tanto anhele y hoy gracias a muchas circunstancias puedo compartir con ellos cada momento, también se merecen una disculpa por los días en que mi atención no fue enteramente para ustedes, espero que algún día con orgullo digan: mi mami es Doctora, ¡los amo!

A mi esposo. Porque desde que nos conocimos mi vida cambio para bien, por todo tu apoyo tanto en el aspecto familiar como en lo personal, por ayudarme a formar nuestra familia, en realidad estos renglones son pocos para poder agradecerte por todo lo que haces para que siempre estemos bien y mejor. También muchas gracias a tu familia por todo su apoyo. Esta tesis está dedicada también a ti, por cada palabra de ánimo y por creer en mí siempre, ¡Te amo!

A mi mamá. Mami te doy las gracias por cada día de mi vida, porque siempre estas a mi lado, apoyándome incondicionalmente, gracias por cuidar a mis pequeños cuando por algún motivo no pude hacerlo yo. ¡Mami eres la mejor, te amo!

A mis hermanos, Tatiana y Omar, gracias por su apoyo y espero que sigamos siempre unidos. ¡Los quiero mucho!

Y finalmente doy gracias a mis sobrinos, Mildred, Iyari y Santiago porque son otro buen motivo para superarme y ser un ejemplo para ustedes. ¡Los adoro!

II. AGRADECIMIENTOS

Agradezco a mi Comité Tutor, integrado por los:

Dr. José Gerardo Perera Marín

Dr. Gabriel Gutiérrez Ospina

Dr. Rogelio Alonso Morales

Agradezco a la Dra. Margarita Gómez Chavarín, personal de la Facultad de Medicina e Instituto de Investigaciones Biomédicas, por su colaboración en la realización y estandarización de las diferentes técnicas histológicas descritas en este estudio.

Al Dr. Miguel Tapia, responsable de la Unidad de Microscopia IIB-UNAM, por la ayuda en el manejo del microscopio de fluorescencia y la captura de imágenes.

A la M.V.Z. Georgina Díaz y al Dr. Daniel Garzón, personal del Bioterio IIB-UNAM, por su colaboración en el mantenimiento y manejo de las ratas Wistar utilizadas en este estudio.

A la M.V.Z. Clara Murcia Mejía y a la M. en C. Susana Rojas Mayas personal del Departamento de Reproducción de la FMVZ-UNAM, por la determinación de los niveles circulantes de hormonas esteroides.

Proyecto parcialmente financiado por CONACYT N° 78811, PAPIIT N° IN203912.

Y a mis compañeros del posgrado.

III. RESUMEN

La foliculogénesis es un proceso en donde el factor de crecimiento del endotelio vascular (VEGF) y miembros de la vía de señalización Notch están involucrados regulando la angiogénesis folicular. Si bien cada vía de señalización está presente en estructuras de folículos preantrales y antrales, la asociación de estas vías entorno a la etapa de transición de folículo preantral a un estadio antral no se ha descrito. Con base en ello y tratando de generar información, el presente estudio se encaminó a identificar al VEGF y Notch2 en estructuras foliculares del ovario de la rata infantil después de la inducción del desarrollo folicular con el estímulo gonadotrópico.

Para explorar esta posibilidad se analizó la morfología del ovario de la rata desde el día 10 hasta el día 25 día post-natal, después se analizó la transición de folículo preantral a un estadio antral mediante la inducción del desarrollo folicular con la gonadotropina coriónica equina. Finalmente y después de la inducción del desarrollo folicular se caracterizó el patrón histológico del ovario de la rata mediante histoquímica y fluorescencia para VEGF y Notch2.

El análisis histológico indicó que el ovario de la rata de 10 días postnatales cuenta con el mayor porcentaje de folículos preantrales y sobre esa base, la dosis de 10 UI de eCG generó un aumento en el peso y el tamaño del ovario, un incremento significativo en las concentraciones circulantes de estradiol, promovió el aumento en el número de folículos antrales, además se observó una disminución en el número de folículos preantrales, se estimuló la proliferación de las células de la granulosa de ambos grupos de folículos, y la localización del VEGF se incrementó en células de la granulosa ($p < 0.05$), en células de la teca y en el ovocito de folículos antrales, mientras que la presencia de Notch2 se limitó a las células granulosas del tipo mural, en células de la granulosa que formaron el *cumulus oophorus* y en el ovocito de ambos grupos de folículos. El análisis de correspondencia múltiple nos permitió sustentar que existe una asociación entre VEGF y Notch2, y que estos factores están involucrados en la transición de folículos preantral a antral en el ovario de la rata infantil.

Palabras clave: Transición folicular; Folículo preantral; Folículo antral; VEGF; Notch2

IV. ABSTRACT

Folliculogenesis is a process where VEGF and members of the Notch signaling pathway are involved in the regulation of follicular angiogenesis. Although each signaling pathway is present in structures of preantral and antral follicles, the association of these pathways to the stage of transition from preantral follicle to an antral stage has not been described. Based on this and trying to generate information during this phase of follicular transition, the present study aimed to identify the VEGFA and Notch2 in follicular structures of the ovary of the infantile rat after the induction of the follicular development with a gonadotropic stimulus.

To explore this possibility the morphology of the rat ovary was analyzed from day 10 to day 25 postnatal day, after which the transition from preantral follicle to an antral stage was analyzed by the induction of follicular development with equine chorionic gonadotropin. Finally and after the induction of follicular development the histological pattern of the ovary of the rat was characterized by histochemistry and fluorescence for VEGF and Notch2.

Histological analysis showed that the ovary of the 10-day postnatal rat had the highest percentage of preantral follicles and on that basis, the 10 IU dose of eCG generated an increase in weight and size of the ovary, a significant increase in The circulating concentrations of estradiol promoted an increase in the number of antral follicles, concomitantly a decrease in the number of preantral follicles was observed, the proliferation of the granulosa cells of both groups of follicles was stimulated, and the location of the VEGF was ($P < 0.05$) in granulosa cells, in teak cells and in the oocyte of antral follicles, whereas the presence of Notch2 was limited to the granulosa cells of the mural type, in granulosa cells that formed the cumulus Oophorus and in the oocyte of both groups of follicles. The multiple correspondence analysis allowed us to support that there is an association between VEGF and Notch2 and that these factors are involved in the transition from preantral to antral follicles in the ovary of the infant rat.

Keywords: Follicular transition; Preantral follicle; Antral follicle; VEGF; Notch2

V. ÍNDICE GENERAL

	PÁGINA
DEDICATORIAS.....	I
AGRADECIMIENTOS.....	II
RESUMEN.....	III
ABSTRACT.....	IV
ÍNDICE GENERAL.....	V
ÍNDICE DE FIGURAS.....	VI
ÍNDICE DE CUADROS.....	VII
ABREVIATURAS Y SIGLAS.....	VIII
1. INTRODUCCIÓN	1
2. ANTECEDENTES	
2.1 Foliculogénesis.....	6
2.2 Foliculogénesis en la rata.....	6
2.3 Ciclo estral.....	7
2.4 Clasificación folicular.....	7
2.4.1 Desarrollo folicular.....	8
2.4.2 Independencia, sensibilidad y dependencia gonadotropinas.....	9
2.4.2.1 Fase independiente a gonadotropinas.....	9
2.4.2.2 Fase sensible a gonadotropinas.....	10
2.4.2.3 Fase dependiente a gonadotropinas.....	10
2.5 Transición de folículo preantral a folículo antral.....	11
2.6 Gonadotropina coriónica equina o eCG.....	11
2.7 Angiogénesis.....	13
2.8 Factor de crecimiento del endotelio vascular (VEGF).....	14
2.8.1 VEGF en el ovario y su función.....	15
2.8.2 Relación entre Gonadotropinas y VEGF.....	17
2.9 Vía de señalización NOTCH.....	17
2.9.1 NOTCH en el ovario.....	18
2.9.2 Relación VEGF con NOTCH2.....	19

3. PLANTEAMIENTO DEL PROBLEMA.....	21
4. HIPÓTESIS.....	22
5. OBJETIVO GENERAL.....	22
5.1 OBJETIVOS PARTICULARES.....	22
6. INSTRUMENTACIÓN DE UN ABORDAJE EXPERIMENTAL <i>IN VIVO</i> QUE PERMITE EL ESTUDIO DE LA TRANSICIÓN FOLICULAR PREANTRAL-ANTRAL EN EL OVARIO DE LA RATA	
6.1 Introducción.....	23
6.2 Materiales y Métodos.....	24
6.2.1 Animales.....	24
6.2.2 Establecimiento de la edad.....	25
6.2.3. Establecimiento de la dosis de eCG.....	26
6.2.4 Dosis de 10 UI de eCG.....	26
6.2.5 Análisis estadístico.....	27
6.3 Resultados.....	28
6.3.1 Edad.....	28
6.3.2 Dosis de eCG.....	30
6.3.3 10UI de eCG.....	34
6.4 Discusión.....	37
6.4.1 Morfología del ovario.....	37
6.4.2 Dosis de eCG.....	38
6.4.3 El modelo.....	39
6.5 Conclusión.....	40
7. ESTÍMULO GONADOTRÓPICO ASOCIADO A PCNA, VEGF Y NOTCH2 EN EL OVARIO DE RATA INFANTIL	
7.1 Introducción.....	41
7.2 Material y métodos.....	42
7.2.1 Animales.....	42
7.2.2 Inmunotransferencia.....	44
7.2.3 Inmunotinción.....	45
7.2.3.1 Protocolo para diaminobencidina.....	45
7.2.3.2 Protocolo para Inmunofluorescencia.....	46
7.3 Análisis estadístico.....	48

7.4 Resultados	
7.4.1 Validación de anticuerpos.....	49
7.4.2 Inmunotinción con diaminobencidina.....	50
7.4.2.1 PCNA.....	50
7.4.2.2 VEGF.....	50
7.4.3 Inmunotinción con inmunofluorescencia.....	53
7.4.3.1 Colocalización de PCNA, VEGF y Notch2.....	53
7.4.3.2 PCNA.....	54
7.4.3.3 VEGF.....	54
7.4.3.4 NOTCH2.....	55
7.4.4 Análisis Multivariado.....	55
7.5 Discusión.....	63
7.6 Conclusión.....	66
8. DISCUSIÓN	67
9. CONCLUSIONES.....	70
10. REFERENCIAS.....	71

VI. ÍNDICE DE FIGURAS

Figura 1. Factores que participan en la regulación de la foliculogénesis.

Figura 2. Endocrinología de la rata.

Figura 6.1 Análisis histológicos del ovario de la rata prepúber.

Figura 6.2 Análisis de la población folicular en el ovario de la rata prepúber.

Figura 6.3 Análisis histológico del ovario de la rata de 10 días posnatales después del tratamiento con eCG.

Figura 6.4 Porcentaje de folículos primordiales, primarios, preantrales y antrales presentes en el ovario de ratas de 10 días post-natal después del tratamiento con eCG.

Figura 6.5 Efecto de eCG en el peso corporal y del peso del ovario en ratas de 10 posnatales.

Figura 6.6 Niveles circulantes de estradiol en la rata Wistar de 10 días post-natales.

Figura 6.7 Efecto del tratamiento con 10 UI de eCG durante la transición de folículo preantral a folículo antral.

Figura 7.1 Patrón electroforético e inmunotransferencia para las proteínas β actina, VEGF, PCNA y Notch2.

Figura 7.2 Localización celular de la proteína PCNA durante el desarrollo folicular inducido con eCG.

Figura 7.3 Localización celular de la proteína VEGF durante el desarrollo folicular inducido con eCG.

Figura 7.4 Colocalización de VEGF, DAPI y Notch2 en folículos preantrales y antrales del ovario de la rata infantil por medio de inmunofluorescencia.

Figura 7.5 Detección de PCNA en folículos del ovario de la rata infantil por medio de inmunofluorescencia.

Figura 7.6 Presencia de PCNA en folículos del ovario de la rata infantil por medio de i inmunofluorescencia.

Figura 7.7 Detección de VEGF en folículos del ovario de la rata infantil por medio de inmunofluorescencia.

Figura 7.8 Presencia de VEGF en folículos del ovario de la rata infantil por medio de inmunofluorescencia.

Figura 7.9 Presencia de Notch2 en folículos del ovario de la rata infantil por medio de inmunofluorescencia.

Figura 7.10 Presencia de Notch2, PCNA y DAPI en folículos del ovario de la rata infantil por medio de inmunofluorescencia.

Figura 7.11 Análisis de correspondencia múltiple.

VII. ÍNDICE DE CUADROS

Cuadro 6.1 Parámetros de evaluación morfológica del ovario de rata por edad

Cuadro 7.1 Procedimiento de obtención de muestras.

Cuadro 7.2 Combinación de los anticuerpos primarios y secundarios.

VIII. ABREVIATURAS Y SIGLAS

μg	Microgramo
μl	Microlitro
μM	Micromolar
mg	Miligramos
min	Minutos
ml	Militro
mM	Milimolar
DAB	Diaminobencidina
FSH	Hormona Folículo Estimulante
LH	Hormona Luteinizante
PMSG	Gonadotropina de Suero de Yegua Preñada
eCG	Gonadotropina Coriónica Equina
PA	Folículo Preantral
A	Folículo Antral
Oo	Ovocito
CG	Células de la granulosa
CT	Células de la teca
VEGF	Factor de Crecimiento del Endotelio Vascular
ANOVA	Análisis de varianza
IHQ	Inmunohistoquímica

1. INTRODUCCIÓN

El ovario del mamífero como glándula endócrina presenta cambios morfológicos que comienzan con el nacimiento y continúan de forma cíclica a partir de la pubertad (Griffin et al., 2006).

Durante el proceso de crecimiento y desarrollo folicular conocido como foliculogénesis se involucran a las distintas estructuras que conforman al ovario, así como a su dependencia, sensibilidad e independencia a la acción de las hormonas gonadotrópicas (McGee and Hsueh, 2000; Hunter, 2004). Con base en ello, la foliculogénesis se ha dividido en tres etapas:

La primera fase (SI) involucra el crecimiento y desarrollo de los folículos primordiales y primarios, etapa considerada como independiente al estímulo gonadotrópico, dado que el desarrollo folicular está bajo la acción directa de factores autócrinos, parácrinos y nutrientes provenientes de la vasculatura del estroma (McNatty et al, 2007).

La segunda fase (SII) comprende la transición del folículo preantral a un estadio de folículo antral, etapa considerada crítica ya que se rige el destino folicular, ya sea hacia la atresia o que continúe su desarrollo (Orizaka et al., 2009; Orizaka et. al., 2013); es clasificada también como una etapa independiente de gonadotropinas, sin embargo estudios en roedores muestran que la administración de gonadotropinas en edades tempranas favorece el desarrollo folicular (McGee et al., 1997), así mismo, ocurre un rápido crecimiento asociado con el incremento de FSH circulante (Meijs-Roelofs et al., 1990) y durante esta transición también se observan cambios morfológicos como el aumento de tamaño folicular, la adquisición del antro folicular, la proliferación de las células de la granulosa y la formación de una red capilar vascular individual (Wulff et al., 2001; Tempel-Brami et al., 2002). Por lo anterior se ha establecido la hipótesis que los folículos seleccionados en esta etapa de la foliculogénesis requieren de señales precisas por parte de las gonadotropinas que en conjunto con reguladores intraováricos modulan la supervivencia folicular y con ello se logre continuar con el crecimiento y desarrollo folicular (Barboni et al. 2000).

La tercera y última fase (SIII) incluye el reclutamiento, la selección y dominancia de los folículos preovulatorios hasta el proceso de ovulación, etapa finamente regulada por el patrón de secreción de las gonadotropinas (Craig et al., 2007).

En la figura 1 se resume el desarrollo folicular entorno a su independencia (SI), sensibilidad (SII) y su dependencia a gonadotropinas (SIII) mostrando los distintos factores autócrinos, parácrinos y endócrinos identificados en cada etapa.

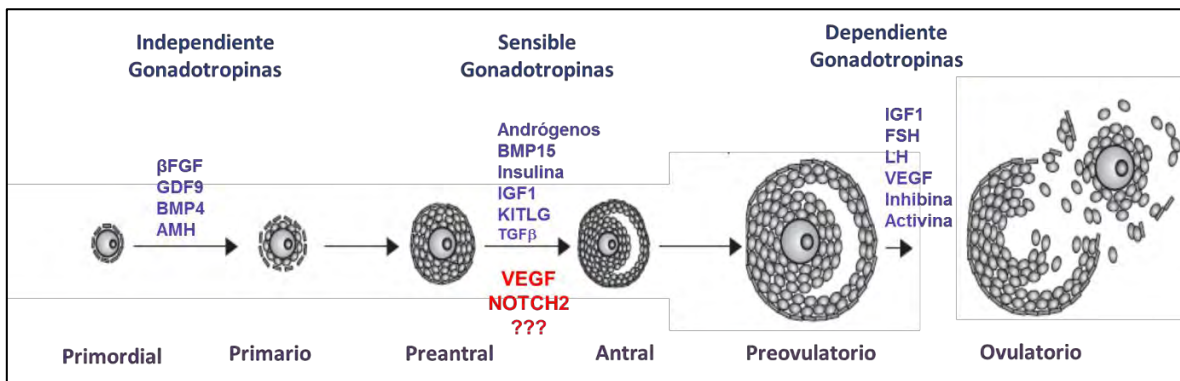


Figura 1. Factores involucrados en la regulación de la foliculogénesis (tomado de Orisaka et al., 2009; Prizant et al., 2014).

Otro de los factores involucrados durante el crecimiento y desarrollo folicular corresponde al rápido cambio que ocurre en el lecho vascular; la formación de una densa trama vascular, facilita que las células de la teca como las células de la granulosa del folículo produzcan una serie de hormonas al obtener oxígeno, nutrientes y precursores necesarios para su síntesis y liberación con lo que se asegura la continuidad de la función ovárica (Kazmareck et al., 2005).

Esta formación de nuevos vasos sanguíneos dentro del sistema vascular del ovario implica el desarrollo de una variedad de procesos celulares como la proliferación, migración y diferenciación de las células endoteliales. En muchos de estos casos ocurre una fina comunicación entre las células endoteliales vecinas con lo que se logra una red vascular funcional.

Entre los factores participantes en la regulación de la angiogénesis en el ovario se encuentra el factor de crecimiento del endotelio vascular o VEGF (por sus siglas en

inglés) y la vía de señalización Notch, la cual es regulada por VEGF a nivel de las células endoteliales (Siekman et al., 2008).

El VEGF es una glicoproteína homodimérica presente en células de la granulosa y también en células de la teca de folículos en desarrollo (Akiyama et al., 2014), su regulación depende de gonadotropinas (Danforth et al. 2003; Christenson y Stouffer, 1997) ya que el patrón de expresión de la proteína y sus receptores Flt-1 y KDR cambia a lo largo del ciclo estral cuando se presentan diferentes patrones de secreción de la LH y FSH (Celik-Ozenci et al., 2003). Así mismo, la expresión del VEGF en células de la granulosa de folículos preantrales y preovulatorios se incrementa después del pico de LH (Christenson y Stouffer, 1997).

Asociado con el incremento en patrón de expresión y secreción del VEGF a nivel folicular se encuentra el aumento en el lecho vascular (Martelli et al., 2009), un incremento en la permeabilidad de las células endoteliales (Danforth et al., 2003), una disminución en el proceso de apoptosis de las células de la granulosa y la teca y un incremento en la proliferación de las células de la granulosa (Shimitzu et al., 2007).

Por otro lado, estudios de funcionalidad para este factor han demostrado que la administración intrafolicular del VEGF en roedores y rumiantes está asociado con el incremento en el número de folículos primarios y secundarios (Danforth et al., 2003; Shimitzu et al., 2007) con un mayor porcentaje de sobrevivencia de folículos secundarios (Fortune et al., 2007; Bruno et al., 2009).

El otro componente recientemente involucrado en el proceso de angiogénesis corresponde a la familia de proteínas de superficie celular denominada Notch, que en conjunto con sus ligandos se encuentran regulando el desarrollo vascular, entre otras muchas acciones, dirigiendo el destino de las células endoteliales, su diferenciación y además conducir los brotes y la ramificación de vasos sanguíneos (Gridley, 2010).

Esta serie de proteínas se han identificado en las diferentes estructuras del ovario de mamíferos (Johnson et al., 2001; Jovanovic, et al., 2013). Por ejemplo, estudios de hibridación *in situ* muestran claramente que durante el desarrollo folicular, Notch2 y su ligando se expresa exclusivamente en el ovocito y en las células de la granulosa de folículos primordiales, primarios y preantrales (Trombly et al., 2009). En concordancia al hallazgo de expresión, Jovanovic (2013) inmunolocalizó a

Notch2 en cortes de ovario de rata únicamente en células de la granulosa de folículos preantrales y esporádicamente en células de la granulosa de folículos preovulatorios.

Aunque estudios de funcionalidad para los distintos miembros de la familia Notch durante el desarrollo folicular son escasos, folículos primarios de ratón tratados con un inhibidor específico de la vía de señalización Notch interrumpió el desarrollo folicular (Trombly et al, 2009), resultado que sugiere que Notch puede estar participando durante la transición folicular, sin embargo es necesario una serie de estudios para confirmar.

Si bien, no existe una clara evidencia de la interacción entre el VEGF y la vía Notch, se sabe en el modelo murino que el bloqueo de receptores específicos de Notch conduce a un desarrollo defectuoso en los vasos arteriales. Así mismo, el VEGF regula río abajo al gene hedgehog sónico (shh) y río arriba a la vía Notch para determinar el destino de células arteriales, y que el VEGF puede regular la expresión y síntesis de la familia Notch en células de la granulosa obtenidas de ovario con cáncer (Bray, 2009).

Por lo tanto, la segunda fase de la foliculogénesis es una etapa sensible a gonadotropinas, la cual bajo la administración exógena de estas hormonas la etapa se favorece, y que durante este proceso inducido con eCG se generan cambios en la trama vascular entorno a este grupo de folículos y que la angiogénesis depende de la acción del VEGF y miembros de la familia Notch, todo ello abre la posibilidad de que estas dos vías de señalización se encuentren participando en desarrollo folicular de la segunda fase de la foliculogénesis.

Luego entonces y tratando de generar información con relación a la transición de folículos preantrales a un estadio antral, el presente estudio se encamino a identificar la presencia de VEGF y Notch2 en folículos preantrales y antrales del ovario de la rata después de un estímulo gonadotrópico.

Para explorar esta posibilidad, el estudio se inició con el análisis histológico del ovario de la rata desde el día 10 hasta el día 25 día post-natal, para analizar la transición de folículo preantral-antral se indujo el desarrollo folicular con diferentes dosis de la gonadotropina coriónica equina. Posteriormente de la inducción del desarrollo folicular en la rata se analizó el patrón histológico del ovario mediante la inmunotinción para VEGF y Notch2.

El análisis histológico arrojó que el ovario de la rata de 10 día postnatales cuenta con el mayor porcentaje de folículos preantrales y sobre esa base, la dosis de 10 UI de eCG generó cambios morfológicos en el ovario, con un aumento en el peso y el tamaño, asociado a ello la concentración de estradiol circulante se incrementó ($p < 0.05$), se promovió la transición de folículos preantrales a antrales, se estimuló la proliferación de células de la granulosa, se incrementó la inmunolocalización de VEGF en células de la granulosa, células de la teca y ovocitos ($p < 0.05$), además se presentó un aumento de la inmunolocalización de Notch2 en las células granulosas murales y las granulosas del cumulus *oophorus*. El análisis de correspondencia múltiple nos permitió sustentar que existe una asociación entre el VEGF y Notch2 durante la transición de folículo preantral a antral en la rata infantil de 10 días de edad. Durante este estudio, se logró el desarrollo de un modelo *in vivo* en rata infantil que permitió identificar de forma específica la transición folicular en la etapa sensible a gonadotropinas, en donde el análisis multivariado indicó una interacción positiva entre el estímulo gonadotrópico y la proliferación celular por medio de PCNA, VEGF y Notch2.

Sin embargo es necesario la realización de estudios de funcionalidad entorno a esta fase de la foliculogénesis asociado cada uno de estos participantes, con el fin de establecer claramente la vía de señalización y su regulación. Con ello, se pretende comprender la participación activa de VEGF y Notch2 que nos permita desarrollar nuevas estrategias tanto reproductivas como contraceptivas, el perfeccionamiento de las condiciones de cultivo para la generación de ovocitos fertilizables, el tratamiento de la infertilidad asociada con el desarrollo anormal del folículo, el diseño de métodos no invasivos para controlar el tamaño del grupo de folicular, que podría ser útil en la determinación de la reserva folicular, para tratamientos para la insuficiencia ovárica.

2. ANTECEDENTES

2.1 Foliculogénesis

Los folículos son la unidad morfo-funcional del ovario, durante su proceso de formación, crecimiento y diferenciación conocida como foliculogénesis ocurren cambios que le permiten a los grupos de folículos continuar con su desarrollo para concluir en el proceso de ovulación o en la atresia (regresión o muerte del folículo). Este proceso es regulado finamente por complejas interacciones autócrinas, parácrinas y endócrinas, capaces de crear las condiciones necesarias para guiar al folículo a través del ciclo reproductivo. Debido a que existe un continuo crecimiento y regresión de los folículos, la relación volumen/contenido del ovario, se encuentra en constante cambio (Martelli, 2009; Irusta, 2009).

2.2 Foliculogénesis en la rata

A diferencia de la foliculogénesis en mamíferos superiores, en roedores el tiempo en el que se da el desarrollo folicular es relativamente rápido. En breve: 1) Las células germinales primordiales migran hacia la cresta gonadal durante el desarrollo embrionario tardío para convertirse oogonias. 2) Al nacer, el ovario de la rata consiste de cordones ovígeros y oogonias. 3) Los folículos primordiales comienzan su desarrollo a partir del día tres postnatal. 4) El primer grupo de folículos que llegará al estadio antral, lo hará a partir de la segunda semana de edad, comenzando con la presencia de folículos preantrales o secundarios desde el día 7 de edad y es a partir de este momento y hasta el día 18 que se presenta una disminución significativa de la apoptosis de las células de ovario cuando los folículos antrales tempranos son aparentes. 5) La pubertad o primer estro ocurre alrededor del día 34 y cada ciclo dura aproximadamente de 4 a 5 días y estos ciclos estrales son regulares y continuos entre los 10 y 12 meses de edad, cuando los ciclos se van prolongando y se vuelven irregulares. Entre los 12 y 15 meses, los animales entran en diestro persistente y en última instancia, el anestro (Mc Gee, 2000; Zhang et al., 2014; Picut et al., 2015). La figura 2, resume el estado de desarrollo de la rata desde el nacimiento hasta su estado adulto y los diferentes participantes hormonales.

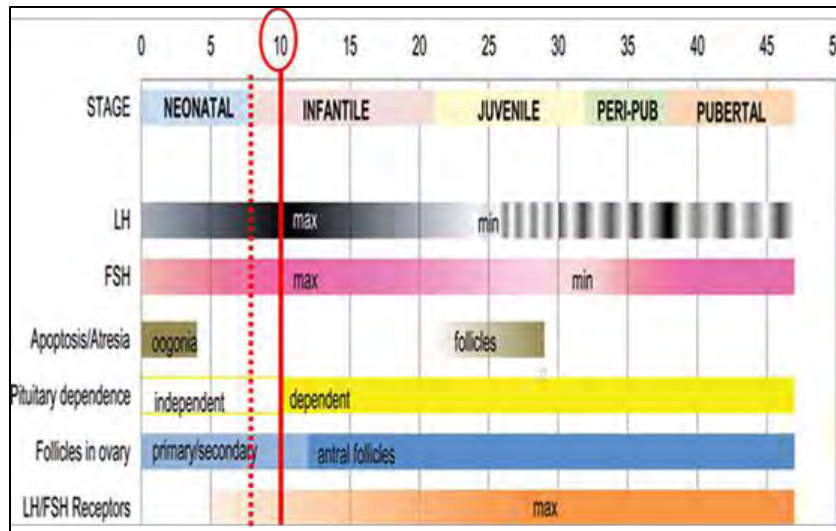


Figura 2. Endocrinología de la rata (Picut et al., 2015)

2.3 Ciclo estral

Para el estudio del ciclo estral en la rata se utiliza el frotis vaginal en las distintas etapas bajo los siguientes criterios: 1) Etapa de pro-estro se observe en el frotis vaginal más del 75% de células epiteliales nucleadas; 2) Etapa de estro se caracterizará por la presencia de células epiteliales cornificadas sin núcleo; 3) Etapa de diestro se asigna cuando se presentan en proporciones iguales de células cornificadas sin núcleo, células epiteliales nucleadas y leucocitos; 4) etapa de metaestro definido como la cantidad mínima de células, incluyendo leucocitos y ocasionalmente células epiteliales (Marcondes et al., 2002).

2.4 Clasificación folicular

El crecimiento folicular se divide de acuerdo a su etapa de desarrollo y su independencia o dependencia a gonadotropinas (McGee and Hsueh, 2000; Hunter, 2004). Su regulación en el ovario es un proceso complejo de interacciones celulares capaces de crear las condiciones necesarias para conducir el ciclo reproductivo (Martelli et al, 2009).

2.4.1 Desarrollo folicular: Después del nacimiento, la rata hembra cuenta con un ovario que está integrado principalmente por folículos primordiales, caracterizados por un ovocito detenido en la profase de su primer división meiótica (diploteno), rodeado únicamente por dos o tres células aplanadas derivadas del epitelio ovárico llamadas pre-granulosas. Es de esta población “estática” de folículos que se origina toda la población de folículos en crecimiento, por esta razón se considera a este grupo de folículos como la reserva de gametos que una hembra va a utilizar durante su vida reproductiva.

A partir de este grupo de folículos primordiales se inicia el desarrollo hacia la formación de folículos primarios, proceso que se inicia con la transformación de las células planas de la pre-granulosa en células de la granulosa de forma cuboide. Estas células de la granulosa diferenciadas forman una sola capa que rodea al ovocito, aunado a ello se forma una capa amorfa de glicoproteínas denominada zona pelúcida que rodea al ovocito, así mismo, se inicia la presencia de células de la teca rodeando a las células de la granulosa.

El aumento del diámetro del ovocito, así como incremento de más de cuatro capas de células de la granulosa que lo rodean, son dos características morfológicas de aquellos folículos que se denominan como secundarios o folículos preantrales; asociado a este crecimiento, el grupo de células de la teca que las rodean se diferencian en una capa externa y en una interna (Mc Gee, 2000).

Finalmente, en los folículos conocidos como terciarios o folículos antrales su ovocito se encuentra rodeado por células de la granulosa que forman el *cumulus oophorus* y múltiples capas de células de la granulosa que van a dar origen al grupo de células murales. Asociado a este cambio morfológico, la presencia de una cavidad antral que contiene un trasudado denominado líquido folicular. En este estadio antral, la presencia de células de la teca interna constituida por tejido conectivo y el grupo de células de la teca externa formada por una capa de colágena atravesada por capilares con miofibroblastos diferenciados de los fibroblastos del estroma. En este estadio el grupo de folículos se caracterizan por presentar un mayor número de receptores para FSH a nivel de las células de la granulosa, en tanto que las células de la teca las expresan para receptores de LH. Para su estudio, en rumiantes los folículos antrales se

clasifican en dominantes y subordinados. Los folículos dominantes, a diferencia de los subordinados, expresan en las células de la granulosa además de los receptores para FSH, receptores para LH (Irusta, 2009).

2.4.2 Independencia, sensibilidad y dependencia a gonadotropinas. Las fases que comprenden el crecimiento y desarrollo folicular están en función de la participación de las gonadotropinas, así se dividen en tres fases: 1) la fase independiente de gonadotropinas que comprende la activación de los folículos primordiales; 2) la fase sensible a gonadotropinas que integra la transición de los folículos preantrales a antrales, y 3) la fase dependiente de gonadotropinas en donde ocurre el desarrollo de folículos antrales a un estadio preovulatorio (Fortune, 2003).

Un aspecto interesante a considerar durante la foliculogénesis es que durante este proceso complejo, solo algunos de los folículos fisiológicamente crecientes alcanzan las etapas finales, y el resto de ellos sufren un proceso de regresión conocido como atresia, que produce la pérdida irreversible y progresiva de folículos (Gougeon, 2004).

2.4.2.1 Fase independiente a gonadotropinas: La fase independiente de gonadotropinas incluye el crecimiento y desarrollo del folículo primordial, primario y secundario (Orisaka et al, 2013; Mc Gee, 2000). En el ovario, los folículos primordiales y primarios reciben oxígeno y nutrientes por difusión pasiva desde los vasos sanguíneos del estroma, este grupo de folículos carecen de irrigación propia, mientras que la presencia de red capilar individual se inicia en los folículos secundarios en cuanto aparece la capa celular de la teca (Wulff et al., 2001). Si bien son conocidos de forma general los procesos que regulan este crecimiento y el desarrollo folicular, de forma particular se han descritos algunos de los mecanismos celulares y la participación de factores como la insulina, el IGF1, el ligando kit, la familia del factor transformante beta (TGF β) y las proteínas GDF9 y BMP4, durante la transición de la primera reserva pre-establecidas de folículos primordiales hacia folículos primarios y preantrales (McGee and Hsueh, 2000).

2.4.2.2 Fase sensible a gonadotropinas: La segunda fase considerada como una etapa sensible a gonadotropinas incluye el crecimiento y desarrollo del folículo preantral a un etapa de desarrollo conocida como antral temprano que comprende una capa de granulosa ya bien integrada, presencia de una capas de la teca, y comienza la aparición del antro folicular (Orizaka, 2009; Orisaka et al., 2013).

Aunque se conocen estos aspectos morfológicos durante el paso de folículo preantral a antral, también se considera a esta transición como una etapa independiente de gonadotropinas debido a que en ausencia de FSH ocurren cambios morfo-fisiológicos, como la adquisición del antro folicular, la proliferación de las células de la granulosa y la formación de una red capilar individual (Wulff et al., 2001; Tempel-Brami et al., 2002); sin embargo, estudios en roedores indican: 1) la presencia de receptores a gonadotropinas durante el desarrollo de folículos secundarios desde el día 7 de edad; 2) niveles elevados de FSH entre el día 11 y 19 cuando se observa un rápido crecimiento folicular; 3) el tratamiento con dihidotestosterona en la primera semana de vida que decrece los niveles de gonadotropinas y conduce a un retraso en la adquisición de receptores de FSH en estructuras ovárica; 4) el tratamiento de ratas infantiles con PMSG aumenta el peso del ovario; 5) el tratamiento de ratas neonatas con antagonistas a GnRH reduce el número de folículos en crecimiento alrededor de la pubertad, por lo tanto este grupo de resultados nos muestran evidencia que aunque se desarrolla esta etapa en ausencia de FSH, la presencia de esta gonadotropina favorece el desarrollo folicular, mismos cambios que están en concordancia con un incremento en la síntesis y expresión del factor de crecimiento del endotelio vascular o VEGF y recientemente se ha involucrada la participación de la vía de señalización Notch (Trombly et al., 2012; Zhang et al., 2012).

2.4.2.3 Fase dependiente a gonadotropinas: La fase dependiente de gonadotropinas, que incluye el reclutamiento, selección y la dominancia de los folículos preovulatorios hasta el proceso de ovulación (Orisaka et al, 2013). Muestra una participación orquestada del eje hipotálamo-hipófisis-gónada (Craig et al., 2007). En esta etapa se han identificado mecanismos celulares y moleculares que involucran

de forma activa a LH, FSH, factores de crecimiento (IGF, VEGF), y hormonas ováricas (inhibina, activina y folistatina) entre otras.

2.5 Transición de folículo preantral a folículo antral

La regulación de la foliculogénesis en el ovario de mamíferos es un proceso complejo. Aunque se ha discutido ampliamente la participación de diferentes factores autócrinos, parácrinos y endócrinos involucrados en torno a la fase dependiente e independiente de gonadotropinas, durante la fase sensible a gonadotropinas el o los mecanismos involucrados para su regulación siguen siendo un enigma (Orizaka et al., 2013; Mc Gee et al., 2013).

De forma particular, durante la transición de folículo preantral a antral ocurren diversos cambios morfo-fisiológicos, entre los que destacan el aumento de tamaño folicular, la adquisición del antro folicular, la proliferación de las células de la granulosa y la formación de una red capilar vascular individual (Wulff et al., 2001; Tempel-Brami et al., 2002). Este establecimiento del plexo capilar durante la transición de preantral a antral, coincide con un período de rápido crecimiento folicular, por lo que se ha propuesto como un factor que condiciona dicha transición en respuesta a las gonadotropinas (Redmer & Reynolds 1996, Barboni et al. 2000). Adicionalmente se considera a la transición de preantral a antral como la penúltima etapa del desarrollo en términos de independencia a gonadotropinas, y es una etapa fundamental para decidir el destino folicular hacia la atresia o el desarrollo folicular (Orisaka et al., 2009). Con base en ello, se maneja la hipótesis que los folículos seleccionados durante esta fase de la foliculogénesis necesitan recibir señales precisas por parte de las gonadotropinas y de reguladores intraováricos que modulan la supervivencia folicular para continuar su crecimiento y desarrollo en esta etapa. Por el contrario, el desarrollo de la atresia folicular es una consecuencia de un aporte inadecuado de varios de estos factores (Fortune et al., 2003).

2.6 Gonadotropina coriónica equina o eCG

La gonadotropina coriónica o eCG (por sus siglas en inglés equine chorionic gonadotropin) pertenece a la familia de las glicoproteínas que incluye a la hormona

folículo estimulante (FSH), hormona luteinizante (LH), y a la hormona estimulante de la tiroides (TSH). A diferencia de la LH, FSH y TSH que son hormonas sintetizadas y almacenadas dentro de la adenohipófisis, la gonadotropina coriónica humana (hCG) y la eCG son sintetizadas en las copas endometriales provenientes del cinturón coriónico, localizado en el útero de la hembra y yegua gestante (Allen and Wilsher, 2009).

La eCG es una glicoproteína heterodimérica, formada por dos cadenas polipeptídicas glicosiladas, unidas por enlaces no covalentes del tipo de puentes disulfuro; estas cadenas polipeptídicas se han designado como subunidades alfa (α) y beta (β), respectivamente (Bousfield et al., 2001).

Invariablemente, la subunidad alfa de la gonadotropinas poseen dos sitios de glicosilación, el primero se localiza en la posición 56 de la secuencia primaria de la cadena polipeptídica (Asn₅₆, que en humanos está en Asn₅₂) y el segundo sitio, se localiza en la posición 82 (Asn₈₂, Asn₇₈ en el humano). En ambos sitios de glicosilación, los oligosacáridos se incorporan a la proteína cuando se presenta la triada Asn-X-The, particularmente en el grupo amida de la cadena lateral del aminoácido asparagina (Asn), esta unión se conoce como N-glicosilación. Por otro lado, se ha descrito que estos oligosacáridos en esta cadena polipeptídica participan en la transducción de la señal, sitio localizado particularmente en el residuo Asn₅₂ o Asn₅₆ (Bousfield *et al*, 2001).

En el caso particular de la subunidad β de la gonadotropina coriónica equina y humana, este polipéptido está integrado de 149 residuos de aminoácidos, con 8 sitios de glicosilación, dos del tipo N-unidos, y 6 localizados en la parte final de la secuencia primaria de aminoácidos, del tipo O-unidos para la eCG y 4 para la hCG. El oligosacárido en este tipo de glicosilación se incorpora en el grupo hidroxilo del residuo de los aminoácidos serina o treonina (Legardinier, 2005).

El tipo de glicosilación O-unido en la subunidad β , le confieren un papel característico a esta proteína, el cual se refleja en un vida media en circulación de 8 días aproximadamente. Aunque los oligosacáridos de tipo N-unidos en esta subunidad disminuyen la afinidad por su receptor, son esenciales para la eficiente activación del receptor.

Esta glicohormona, presenta un peso molecular relativo de 72 kilodaltones, con una estructura primaria similar a la LH hipofisaria dentro de la misma especie, ambas hormonas tiene la capacidad de ser unidas al receptor hepta-catenario acoplado a proteína G, denominado eLH/CG-R. Esta hormona, presenta funciones semejantes a la hormona luteinizante (LH) dentro de la especie equina, sin embargo, en otras especies, presenta actividad biológica semejante a la FSH (Lecompte et al, 2010).

2.7 Angiogénesis

Para una función ovárica óptima se requiere del establecimiento y la remodelación continua de un sistema vascular, proceso que le suministra a los folículos en crecimiento y al cuerpo lúteo, el oxígeno, los nutrientes y las hormonas necesarias para asegurar en cada etapa la continuidad del desarrollo folicular; aunado a ello, esta red vascular debe permitir la salida de las hormonas esteroides producidas por las células foliculares y lúteas para alcanzar sus respectivos órganos blanco. Este mecanismo de angiogénesis promueve la formación de nuevos vasos sanguíneos a partir de la vasculatura pre-existente regulando la migración y proliferación de células endoteliales, así como la formación y organización de grupos celulares en estructuras tubulares que eventualmente se unirán para finalmente madurar en vasos sanguíneos estables (Tamani et al., 2004).

La angiogénesis involucra una serie pasos secuenciales primero, los componentes del entorno de la matriz extracelular endotelial son degradados localmente por proteasas producidas por la propia célula endotelial. Seguido por la migración quimio-táctica de células endoteliales hacia el lugar donde se desarrollará el nuevo vaso sanguíneo. Subsecuentemente en la sección media del vaso en formación, las células endoteliales proliferan y se ensamblan para formar el lumen del vaso sanguíneo. El nuevo vaso sufre anastomosis con el vaso adyacente para ser perfundido con circulación sanguínea (Risau, 1997, Abulafia, 2000). Hasta este punto, el capilar recientemente formado, es frágil y puede ser remodelado. La maduración del nuevo vaso sanguíneo hacia un vaso estable y funcional, requiere la acumulación de una lámina basal, y el recubrimiento por pericitos y células de músculo liso para fortalecerlo (Hellström et al., 2001).

Este mecanismo angiogénico en el ovario ocurre en condiciones fisiológicas, debido a que el crecimiento folicular y el desarrollo del cuerpo lúteo dependen de la proliferación de nuevos vasos capilares. Por ejemplo, en el ovario y durante la foliculogénesis, los folículos primordiales y primarios reciben oxígeno y nutrientes por difusión pasiva desde los vasos sanguíneos del estroma, mientras que la presencia de una red capilar individual se inicia con el desarrollo de los folículos secundarios en cuanto aparece la capa de células de la teca (Wulff et al., 2001; Martelli et al., 2009).

En el estado antral de los folículos, la capa vascular está integrada por dos redes concéntricas ubicada directamente por fuera de la membrana basal y entorno a la teca externa, sin embargo, estas redes capilares en un folículo íntegro no penetran hacia la capa de las células de la granulosa, por lo que esta capa celular permanece a vascular durante todo el desarrollo folicular (Tempel-Brami et al., 2002).

El establecimiento de este plexo capilar entorno a la capa de células de la teca interna, coincide con el período de rápido crecimiento y diferenciación de los folículos, por lo que se ha propuesto que este plexo es un factor que condiciona la selección del folículo dominante (Reynolds et al., 1998). Por ejemplo, se sabe que el grupo de folículos dominantes cuentan con una mejor irrigación sanguínea que los folículos subordinados (Acosta et al., 2003); aunado a ello, aquellos folículos que no adquieren un plexo vascular adecuado durante su desarrollo sufren atresia folicular (Kaczmarek et al., 2005). Es por ello que la adquisición de un adecuado aporte sanguíneo es posiblemente un paso limitante en el crecimiento, la selección y maduración del grupo de folículos que continuarán hasta la ovulación (Tamani et al., 2004).

2.8 Factor de crecimiento del endotelio vascular (VEGF)

En el ovario del mamífero se han identificado una serie de factores angiogénicos (Kaczmarek et al., 2005) entre los que se incluye al factor de crecimiento de fibroblastos de tipo ácido y básico (FGFa y FGFB, por sus siglas en inglés), angiopoyetinas (ANGPT), factores de crecimiento parecidos a insulina (IGFs), factores de crecimiento derivados de plaquetas (PDGF) y el factor de crecimiento endotelial vascular o VEGF (Zimmermann et al. 2003, Abramovich et al., 2006, Shimizu 2006).

El VEGF está formado por dos subunidades glicosiladas idénticas unidas por puentes disulfuro. Presenta un peso molecular de 45 kilodaltones y forma parte de una familia de proteínas que incluyen al factor de crecimiento placentario (PLGF), VEGF-A, VEGF-B, VEGF-C, VEGF-D y VEGF-F y dos proteínas semejantes al VEGF codificadas por dos cepas de parapoxvirus (Ferrara 2001; Ferrara et al., 2004).

Los distintos miembros de la familia del VEGF se unen a receptores del tipo tirosina quinasa a saber VEGF-1 ó Flt-1 (fms-like tyrosine kinase-1), VEGFR-2 ó KDR/Flk-1 (kinase insert domain-containing region) y VEGFR-3 ó Flt-4. Estos receptores comparten características como: la presencia de siete dominios semejantes a inmunoglobulinas en la porción extracelular, una sola región transmembranal y una secuencia tirosina cinasa interrumpida por una inserción de dominio cinasa en su porción intracelular. De forma particular, el receptor VEGFR-1 reconoce específicamente al VEGF-A, VEGF-B, PLGF-1 y PLGF-2 para reclutar y promover la migración de progenitores endoteliales y monocitos; el receptor VEGFR-2, que se expresa en la mayoría de las células endoteliales, se une a VEGF-A, VEGF-C, VEGF-D, y VEGF-E, para regular la proliferación, permeabilidad, supervivencia y migración de las células endoteliales. Finalmente el receptor VEGFR-3 se expresa en células del endotelio de tejido linfático del adulto, se une al VEGF-C y VEGF-D, con ello facilita la proliferación de los vasos linfáticos (Ferrara, 2001; Nishimura et al., 2002; Carmeliet et al., 2000).

Dentro de la familia de proteínas del VEGF, el VEGF-A es el factor predominante y más estudiado en múltiples especies y es a través del corte y empalme alternativo de su ARN mensajero que se da origen a un grupo de isoformas, proteínas designadas de acuerdo al número de residuos de aminoácidos: VEGF-110, VEGF-111, VEGF-121, VEGF-145, VEGF-148, VEGF-162, VEGF-165, VEGF-165b, VEGF-183, VEGF-189 y VEGF-206 (Kaczmarek et al., 2005).

2.8.1 VEGF en el ovario y su función

El VEGF y sus receptores Flt1 y KDR se han identificado en estructuras del ovario de mamíferos, por ejemplo, en bovinos (Yang & Fortune, 2007), en cerdos (Shimizu et al., 2003) la presencia del mRNA para el VEGFA se localiza en células de la granulosa y

células de la teca de folículos secundarios hasta folículos preovulatorios.

El VEGF en un inicio se le asoció como un factor de permeabilidad vascular (Ferrara et al., 1997), sin embargo, sus funciones están involucradas en muchas otras acciones por ejemplo: en la sobrevivencia celular, en acciones mitogénicas y de proliferación celular. El VEGF también regula, la migración y diferenciación de las células endoteliales, cuya actividad biológica depende del estado de desarrollo y la función fisiológica del órgano en el cual se expresa (Nishimura et al., 2002).

Con esta serie de actividades biológicas que desempeña el VEGF, su participación en el sistema reproductivo es regular la foliculogénesis. Al respecto, dentro del ovario y durante el desarrollo folicular se presenta una intensa actividad angiogénica regulada principalmente por el VEGF; este aumento en el patrón vascular entorno al folículo en crecimiento provee un medio selectivo que facilita el suministro creciente de gonadotropinas, factores de crecimiento, precursores de esteroides, así como otras sustancias (Kaczmarek et al., 2005), este aumento en el suministro de nutrientes garantiza la selección del folículo dominante y/o el continuo desarrollo de otros folículos (Zimmermann et al., 2001); en contraste, la degeneración de la red capilar, así como la reducción en la expresión del mRNA de VEGF en los folículos que no se logran desarrollar, se vuelven atrésicos (Rosales et al., 2010).

Por otro lado, hay evidencia de que el proceso angiogénico entorno a las células de la teca desempeña un papel fundamental en el desarrollo folicular (Tamanini & De Ambrogi, 2004). Además, las células de la granulosa son importantes para el proceso angiogénico, ya que estas células segregan varios factores angiogénicos que actúan sobre las células de la teca.

Actualmente se sabe que la producción de VEGF en las estructuras foliculares es regulada de forma diferencial de acuerdo al tamaño folicular. Ejemplo de ello se presenta en el folículo preovulatorio caracterizado por su alto grado de vascularización comparado con los folículos subordinados. Además se ha descrito que el patrón de expresión y la síntesis del mRNA del VEGF y sus receptores en el ovario cambia a lo largo de la foliculogénesis en diferentes especies (Berisha et al., 2000; Celik-Ozenci et al., 2003; Abramovich et al., 2009) .

2.8.2 Relación entre las gonadotropinas y el VEGF

La asociación de las gonadotropinas como reguladores de la expresión del VEGF se ha descrito en estudios *in vitro* e *in vivo*. Estudios *in vitro*, han encontrado que la síntesis y expresión del VEGF por las células de la granulosa se incrementa después del tratamiento con hCG, LH humana y LH bovina; *in vivo*, el incremento de VEGF en el líquido folicular de folículos dominantes se presentó después de un bolo de hCG (Hazzard, Molskness et al. 1999); a través de desarrollo del ciclo estral ovino, y mediante estudios inmunohistoquímicos e hibridación *in situ* en estructuras ováricas se ha observado un cambio en la inmunolocalización y un incremento en la expresión del VEGFR2 y del VEGF en concordancia con el tamaño folicular; adicionalmente este cambio fue mayor durante el pico preovulatorio y post-pico de LH comparado con la fase lútea y pre-pico de LH (Chowdhury, Scaramuzzi et al. 2010). En bovinos sincronizados e hiperestimulados con FSH y tratados con GnRH se observó que las células de la granulosa de folículos preovulatorios muestran una mayor expresión del gene para VEGF durante el pico preovulatorio de la LH (Berisha, Steffl et al. 2008). Por otro lado, primates no humanos que recibieron un antagonista a GnRH y que en ellos se analizó el patrón angiogénico dentro del ovario, se observó que el bloqueo del pico preovulatorio de la LH, generó un impacto negativo en la proliferación de células endoteliales, densidad vascular y en la expresión del VEGF en las células de la granulosa de los folículos preovulatorios (Taylor, Hillier et al. 2004).

El mecanismo por el cual las gonadotropinas induce la expresión y síntesis de VEGF es tema de estudio: Garrido (1993) demuestra que células de la granulosa bovina expuestas a LH inducen un incremento en la activación de la adenilato ciclasa asociado a la transcripción del VEGF.

2.9 Vía de señalización NOTCH2

Otra de las vías involucradas durante la angiogénesis ovárica en mamíferos es la vía de señalización Notch (Jovanovic et al., 2013). Vía altamente conservada entre especies que está integrada por cuatro tipos de receptores (Notch 1-4) y dos tipos de ligandos (Jagged1, Jagged2; y Delta-[DII] 1, DII 3, DII 4), ambos, ligando Notch y sus receptores son proteínas transmembranales, heterodiméricas que consisten de un

dominio extracelular y un dominio intracelular no ligado covalentemente (Zhang et al., 2014).

El camino de señalización de esta vía se inicia cuando el dominio extracelular del receptor Notch y su ligando presente en la superficie de células adjuntas se unen, luego de la unión, los receptores Notch se vuelven susceptibles al rompimiento proteolítico mediado por un complejo de secretasas, que libera el dominio intracelular de Notch (NICD). Una vez liberado NICD entra en el núcleo y forma un complejo con la proteína de unión de señal de recombinación-Jk, que contiene un dominio vinculante con el ADN. Este complejo regula a su vez a la familia de factores de transcripción del tipo Hey, que son genes objetivo de Notch. Estos genes objetivo funcionan como factores de transcripción que regulan la expresión de otros genes en diferentes células (Vorontchikhina et al., 2005).

Una vez que se activa la señalización de Notch desempeña un papel importante en la regulación del desarrollo de diferentes órganos de vertebrados, como en el desarrollo del sistema nervioso central; en el desarrollo cardiovascular; en el páncreas, en el intestino y en el desarrollo óseo, todos ellos a través de regular la proliferación, la diferenciación y la apoptosis de células endoteliales (Trombly et al., 2009).

2.9.1 NOTCH en el ovario

A nivel del ovario, los diferentes componentes que integran a la familia NOTCH se han localizado en estructuras no vasculares y vasculares. Claro ejemplo son los estudios de hibridación *in situ* en ovario de ratón, en donde se identificó una alta expresión del mRNA para Notch2, Notch3 y Jagged2 en la células de la granulosa de folículos en desarrollo, mientras que en estructuras vasculares como lo es la capa de células del endotelio, localizadas dentro de la capa de células de la teca que rodean al folículos se identificaron exclusivamente Notch1 y Notch4 (Johnson et al., 2001).

Este patrón de distribución diferencial de los miembros de la familia Notch concuerda con la identificación de Notch1 y el ligando Jagged1 en células del endotelio del músculo liso mientras que en capilares y en pequeños vasos de folículos preovulatorios de hembras sexualmente maduras se presentó una alta expresión del

ligando Dll4 no así en vasos sanguíneos de ovarios de recién nacidos (Vorontchikhina et al., 2005).

En concordancia con estos estudios, evidencias inmunohistoquímicas en el ovario de ratón recién nacido, así como en tejido de ovario obtenido de rata de 14 días posnatal se confirmó una distribución diferencial de la familia Notch, en donde los ovocitos de folículos primordiales y primarios se detectó exclusivamente Notch2 y Jagged1; mientras que Notch2 estuvo ausente en estructuras de folículos antrales mientras que en células de la granulosa de folículos primarios y de folículos antrales la presencia de Notch2 fue evidente (Trombly et al., 2009).

Finalmente, estudios de funcionalidad de esta vía de señalización (Trombly et al., 2009) han demostrado que la inhibición específica del receptor Notch con secretasas en folículos primarios en cultivo provoca una completa digénesis de los folículos, sugiriendo que la vía de señalización Notch es importante para el desarrollo folicular desde el ensamblaje de folículos primordiales hasta el desarrollo de folículos primarios; adicionalmente, ovarios de animales hipofisectomizados tratados previamente con gonadotropinas y con un inhibidor de la vía Notch (compuesto E) interrumpió el crecimiento de los folículos dependientes de gonadotropinas (Jovanovic et al., 2013). Por lo tanto, los estudios de expresión, inmunolocalización y funcionalidad de esta vía de señalización nos indica su participación de Notch en el desarrollo folicular y que puede estar involucrado en la comunicación de células del endotelio, sugiriendo como un candidato para regular la actividad intraovárica a través de vías vasculares y no vasculares dentro del ovario.

2.9.2 Relación VEGF con Notch

La señalización de Notch interactúa con VEGF durante la formación de un nuevo vaso sanguíneo, durante la migración de las células endoteliales de punta y la proliferación de las células endoteliales de tallo que formaran el nuevo vaso sanguíneo, el proceso se resume, VEGF induce la expresión del ligando Dll4 de NOTCH, lo cual activa la vía Notch a través del ligando Jagged 1 de NOTCH el cual reduce la expresión del receptor 2 de VEGF (VEGFR2) suprimiendo las células endoteliales de punta, lo cual promueve la proliferación de las células endoteliales de tallo (Roca et al,

2007; Thurston et al, 2008; Jovanovic et al, 2012). Las vías Notch y VEGF desempeñan funciones complementarias durante la angiogénesis tumoral, y el bloqueo simultáneo de ambas vías disminuye la vasculatura y la viabilidad del tumor primario, mucho más que al sólo bloquear estas vías por separado (Hernández, et al; 2013).

Por otra parte en las regiones angiogénicas en la vasculatura de la retina, muestran intensa expresión de VEGFR2 en las regiones donde las células endoteliales expresan fuertemente el ligando Dll4 de NOTCH (Suchting et al. 2007; Sieckmann 2008).

Se ha demostrado la relación VEGF y NOTCH en funciones ováricas, por ejemplo en el ovario de los mamíferos se requiere de la comunicación bidireccional entre ovocito-células de la granulosa y células de la granulosa-granulosa para la maduración meiótica, la competencia ovocitaria y el desarrollo folicular, respectivamente. Al analizar las vías implicadas en este tipo de regulación molecular se incluyen una unión estrecha entre las vías de señalización IGF 1, VEGF, FGF, Notch. (Bonnet et al., 2013) documentaron el perfil de expresión de varios genes, incluyendo VEGF y NOTCH los cuales mostraron una expresión diferencial entre los ovocitos y las células de la granulosa. También se ha demostrado una función activa de Jagged1 y Notch2 en la resolución de sincitios de células germinales y la coordinación de crecimiento de las células somáticas y germinales dentro de los folículos del ovario de ratón (Vanorny et al, 2014).

3. PLANTEAMIENTO DEL PROBLEMA

La participación activa de una gran cantidad de interacciones bioquímicas entorno al desarrollo de la foliculogénesis, muestra claramente que durante su fase dependiente e independiente a gonadotropinas, la foliculogénesis es finamente regulada por factores autócrinos, parácrinos y endócrinos.

Sí bien esta información es escasa en la segunda etapa de la foliculogénesis, etapa en donde ocurre la transición de folículo preantral a folículo antral en ausencia de gonadotropinas, la administración exógena de estas hormonas favorece el crecimiento y desarrollo folicular, aunado a ello, se ha observado cambios en el patrón angiogénico intraovárico en donde el aumento en la trama vascular garantiza la continuidad del crecimiento y desarrollo durante esta transición, proceso que se ve favorecido en presencia de VEGF y miembros de la familia Notch.

Al respecto se reconoce al VEGF y a sus receptores como los principales reguladores de la angiogénesis, modificando la proliferación, sobrevivencia y migración de las células endoteliales derivadas de las arterias, venas y vasos linfáticos, lo que resulta en la formación de nuevos vasos sanguíneos; asociado a esta vía, recientemente se ha documenta la participación de distintos miembros de la familia Notch y que mediante el contacto célula-célula y una señalización local también desempeñan papeles de regulación en el crecimiento y desarrollo folicular modificando el proceso de angiogénesis, lo que abre la posibilidad de que estas dos vías de señalización se encuentren involucradas durante el desarrollo folicular en esta segunda fase.

Por lo tanto y tratando de generar nueva información sobre la transición de folículo preantral a un estado antral en el ovario del mamífero, el presente estudio se encaminó a identificar la presencia de VEGF y Notch2 en estructuras foliculares del ovario de la rata después del estímulo gonadotrópico y su posible relación.

4. HIPÓTESIS

La inducción del desarrollo folicular con gonadotropinas favorece la expresión de VEGF y Notch2 durante la transición de folículos preantral a antral en el ovario de la rata infantil.

5. OBJETIVO GENERAL

Evaluar el efecto del estímulo gonadotrópico sobre la presencia de VEGF y Notch2 durante la transición de folículos preantral a antral en la rata infantil.

5.1 OBJETIVOS PARTICULARES

- a) Desarrollar un modelo *in vivo* que permita el estudio de la transición de folículo preantral a antral en el ovario de rata infantil.
- b) Evaluar el desarrollo folicular después del estímulo gonadotrópico.
- c) Evaluar el efecto del estímulo gonadotrópico asociados a la presencia de VEGF y Notch2 durante la transición preantral-antral.

6. ABORDAJE EXPERIMENTAL *IN VIVO* QUE PERMITA EL ESTUDIO DE LA TRANSICIÓN FOLICULAR PREANTRAL-ANTRAL EN EL OVARIO DE LA RATA

6.1 INTRODUCCIÓN

Diversas estrategias experimentales *in vivo* e *in vitro* se han desarrollado entorno al estudio de la foliculogénesis en mamíferos. Estudios *in vitro* en roedores han demostrado que las células de la granulosa de folículos en desarrollo contienen receptores a FSH desde edades tempranas hasta etapas maduras del animal. Esta serie de estudios han permitido demostrar la participación de las gonadotropinas en la esteroidogénesis folicular, particularmente en folículos preantrales y antrales. (Danforth et al., 2003; Wang et al., 2007)

Estudios *in vivo*, en roedores prepúberes bajo el efecto de antagonista a GnRH o bien después de la extracción de la hipófisis ha generado evidencias de una participación activa de las gonadotropinas durante el desarrollo folicular (McGee et al., 1997). En concordancia con ello, el modelo *in vivo* de la rata prepúber intacta bajo el efecto de la gonadotropina coriónica equina o eCG, ha demostrado la participación de las hormonas esteroides, de factores de crecimiento como el factor de crecimiento del endotelio vascular o VEGF (por su siglas en inglés) y algunas citosinas, con resultados que indican un papel regulador de estos factores durante la transición de folicular de la primera y última fase de la foliculogénesis Sin embargo, para el estudio segunda fase de la foliculogénesis, fase que incluye la transición del folículo preantral a un estado antral, el empleo de este modelo muestra una serie de dificultades que pueden interferir en la interpretación y desarrollo del estudio, por ejemplo, el ovario de animales prepúberes (21 a 25 días) presenta un patrón folicular con una alta asincronía, asociado a ello, los niveles de gonadotropinas endógenas se encuentran elevados. (Danforth et al., 2003; Wang et al., 2007; Abramovich et al., 2009; Zang et al., 2015;).

Con base a esta información y este grupo de modelos, en la actualidad no se cuenta con una estrategia experimental *in vivo* que permita estudiar de forma específica la transición de folículo preantral a un estadio antral durante la

foliculogénesis. Por lo tanto, en este capítulo de la tesis se presenta los resultados del desarrollo de la estrategia experimental *in vivo* que permitió evaluar la transición del folículo preantral a un estadio antral. Para ello, se caracterizó el desarrollo ovárico postnatal, bajo la presunción de que los ovarios infantiles cuentan con un número mayor de folículos preantrales, cuya maduración puede ser sincronizada farmacológicamente con un estímulo gonadotrópico y con ello aumentar el número de folículos por animal en la etapa de transición de folículo preantral a antral.

6.2 MATERIALES Y MÉTODOS

6.2.1 Animales

Para el desarrollo del estudio histológico del ovario de la rata prepúber, el Bioterio del Instituto de Investigaciones Biomédicas (IIB) de la Universidad Nacional Autónoma de México proporcionó cuatro ratas gestantes de la cepa Wistar. Cada rata gestante se confinó en una caja individual con piso y pared continua sólida y con tapa removible de reja (conforme a la Norma Oficial Mexicana, NOM-062-ZOO-1999) y bajo esta condición se trasladó al bioterio de transición del Instituto, en donde permaneció en un ambiente con una temperatura contralada de $23 \pm 1^{\circ}\text{C}$, con una humedad relativa del 75%, con ciclos de luz-oscuridad de 12h/12h, agua y alimento comercial (LabDiet, autoclaveable, 5010-5P14, Brentwood Mo, USA) *ad libitum* hasta el momento del parto y fin del estudio.

Veinticuatro horas después del parto, la camada se ajustó a 10 crías, seleccionándose preferentemente a las hembras; el grupo de animales permaneció con su madre lactante hasta su utilización.

El manejo de los animales y los procedimientos experimentales fueron aprobados tanto por el Comité de Ética para la Experimentación con Animales del IIB-UNAM, así como por el Comité Institucional para el Cuidado y Uso de los Animales de Experimentación (CCIUAL) del Instituto de Investigaciones Biomédicas (UNAM). (ID221).

6.2.2 Establecimiento de la edad

Para el estudio histológico se utilizaron ovarios de cinco ratas de diferentes edades, a saber: 10, 13, 15, 17, 21 y 25 días post-nacimiento. Las crías lactantes de este estudio permanecieron con su madre hasta el momento del sacrificio. Los animales de 21 días se sacrificaron en el momento del destete y el resto de los animales permanecieron confinados en una jaula hasta el día 25, momento en que fueron sacrificados.

Con el fin de tener grupos de condición corporal homogénea se registró el peso vivo de cada rata; al término, el grupo de animales seleccionado por edad se colocó en una cámara cerrada conectada a un taque de CO₂ en donde se les ocasiono la perdida rápida de la conciencia hasta que cesó su respiración o latidos cardiacos.

Una vez que se concluyó el sacrificio, a cada animal se le extrajo los ovarios que se disecaron y limpiaron del tejido graso que los rodea y se registró el peso. Concluido este procedimiento, cada ovario se colocó en una solución de paraformaldehído al 4% amortiguada en fosfato salino 0.1M, pH 7.2 a 4°C durante 48 horas y después se depositó en una solución de sacarosa al 10% por un periodo de 24 horas; concluido este tiempo, cada tejido se trasladó a una solución al 20% por un periodo similar y finalmente los ovarios se conservaron en sacarosa al 30%.

Previo a la inclusión en parafina, cada ovario se lavó tres veces con amortiguador de fosfatos salino (PBS). De cada bloque de parafina que contenía el tejido se realizó una serie de cortes con un grosor de 5 micras con el microtomo (SLEE; modelo MEV) y cada corte se colocó en portaobjetos gelatinizados.

Para el estudio histológico se utilizó la serie que comprendió la parte central del tejido, la que se tiño con la técnica de Hematoxilina-Eosina (H&E). De esta seriación se capturaron imágenes reconstruidas a 20X con un microscopio confocal de disco giratorio (Olympus BX51 WI) de la Unidad de Microscopía del Instituto de Investigaciones Biomédicas de la UNAM. El análisis histológico del tejido se realizó a partir de 3 cortes de ovario reconstruido de cinco animales por edad, y las imágenes se analizaron con el programa Image J. Para el análisis morfológico del ovario se consideró el diámetro del ovario, el diámetro del folículo y de cada ovocito. Con el fin

de no realizar dobles conteos foliculares, solo se tomaron en cuenta aquellos folículos que presentaron ovocito (Lee et al., 2001).

6.2.3 Establecimiento de la dosis de eCG

Una vez que se analizó el patrón histológico del ovario en las diferentes edades, se procedió a inducir el desarrollo folicular con eCG (eCG, Foligón, INTERVET, México); para ello, las diferentes dosis ensayadas se administraron únicamente en ratas de 10 días posnatales, debido a que el ovario de la rata con esta edad presentó una población mayoritariamente conformada de folículos preantrales. El estudio de la dosis se realizó en dos ensayos independientes bajo las mismas condiciones; el primero ensayo incluyó las dosis de 25 y 50 UI de eCG, el segundo analizó dosis menores que correspondieron a 0.1, 1.0 y 10UI de eCG.

Estudio 1. Para este ensayo se utilizaron 15 ratas de la cepa Wistar, de 10 días de edad, con peso entre 17 y 20 g. El grupo de animales se distribuyó al azar en tres grupos, el grupo 1, recibió 0 UI; el grupo 2, recibió 25 UI y el grupo 3, recibió 50 UI de eCG. La dosis total en cada grupo se dividió en dos aplicaciones con diferencia de 24 horas. Todos los grupos recibieron la dosis en un volumen de 0.5 ml de solución salina por vía subcutánea y 48 h después del primer estímulo, los animales se sacrificaron bajo las condiciones indicadas en el estudio histológico.

Estudio 2. Se utilizaron 20 ratas de la cepa Wistar, de 10 días de edad, con peso entre 17-20 g. Los animales se distribuyeron al azar en cuatro grupos, a saber, el grupo 1, recibió 0UI, el grupo 2, recibió 0.1 UI, el grupo 3, recibió 1.0 UI y el grupo 4, recibió 10 UI de eCG. En este estudio todos los grupos, recibieron una sola dosis en un volumen de 0.5 ml de solución salina por vía subcutánea y 48 h después los animales se sacrificaron.

Una vez que se concluyó cada estudio, los ovarios se procesaron siguiendo el protocolo descrito en el estudio histológico.

6.2.4 Dosis de 10 UI de eCG

Los resultados después de la administración de la eCG nos indicaron que la dosis de 10 UI de eCG como la dosis óptima para el desarrollo folicular en la rata infantil y para

corroborar este hallazgo se procedió a confirmar el efecto en tres estudios independientes.

Para cada ensayo se utilizaron 8 ratas de la cepa Wistar, de 10 días de edad, con peso entre 17-20 g y se desarrolló bajo las mismas condiciones. Los animales se distribuyeron al azar en dos grupos, el grupo control que no recibió eCG y el grupo eCG que recibió 10 UI de la hormona. En cada estudio, los animales recibieron una sola dosis en un volumen de 0.5 ml de solución salina por vía subcutánea y 48 h después se sacrificaron. Una vez que se concluyó cada estudio, los ovarios de cada animal se procesaron siguiendo el protocolo descrito en el estudio histológico.

6. 2.5 Análisis estadístico

Los datos se analizaron mediante estadística descriptiva y se consideró como diferencias significativas un valor de $p < 0.05$. Previo al análisis, los datos se sometieron a la prueba de Shapiro-Wilk para distribución normal. El diámetro del ovario, diámetro folicular y el diámetro del ovocito por edad se comparó con una prueba de ANOVA de una vía seguida de la prueba de comparación múltiple de Tuckey. En el mismo análisis se comprobó el supuesto de que los grupos presentaron homogeneidad de varianzas mediante la prueba de Brown-Forsythe. Finalmente, el porcentaje de folículos por categoría y edad se comparó mediante una prueba X^2 . El análisis estadístico se realizó con el programa estadístico Prism 7.0 (GraphPad, Inc. CA, USA).

Para comparar los cambios en la distribución del diámetro de los folículos de acuerdo a la edad postnatal, la distribución de frecuencias relativa de los folículos que se midieron en los cortes de ovario de cada grupo de edad se ajustó con una distribución gaussiana para las edades de 0, 13 y 17 días. Mientras que para los datos de las ratas de 21 días post-natales se utilizó un ajuste de la suma de dos Gaussianas, la cual se caracteriza por presentar dos picos de frecuencias, uno de mayor magnitud que el otro.

6.3 RESULTADOS

6.3.1 Edad

Los parámetros de registro entorno a la morfología del ovario por edad se resumen en cuadro 1. El peso del ovario se incrementó significativamente con la edad, mientras que el diámetro del ovario mostró un patrón bimodal, un grupo que incluyó los días 10 al 15 posnatal que resultó inferior al grupo de 17 a 25 días de edad. Por su parte el diámetro folicular mostró una fase de transición entre el día 15 y 15 de edad. Finalmente el diámetro del ovocito presentó un patrón de crecimiento similar al peso del ovario.

Edad (días)	Ovario (mg)	∅ Ovario (mm)	∅ Foliculo antral (µm)	∅ Ovocito (µm)
10	0.75 ± 0.04 ^a	1.2 ± 0.3 ^a	133.7 ± 4.1 ^a	31.9 ± 1.2 ^a
13	1.38 ± 0.04 ^b	1.6 ± 0.1 ^a	160.4 ± 3.5 ^{a,b}	42.6 ± 1.1 ^b
15	2.33 ± 0.17 ^c	1.6 ± 0.1 ^a	191.1 ± 6.8 ^b	55.4 ± 2.3 ^c
17	3.29 ± 0.26 ^d	2.0 ± 0.1 ^b	192.3 ± 6.0 ^b	63.7 ± 2.0 ^d
21	6.3 ± 0.18 ^e	2.3 ± 0.2 ^b	255.3 ± 10.5 ^c	64.5 ± 1.2 ^d
25	9.7 ± 0.80 ^f	2.5 ± 0.2 ^b	237.7 ± 7.8 ^c	68.9 ± 1.7 ^d

Los datos muestran el promedio ± error estandar de la media de tres observaciones por edad. Las letras indican diferencias entre edades

El corte histológico representativo del ovario por edad se presenta en la figura 6.1. En cada corte se incluyó el grupo de folículos predominantes. A los 10 días posnatales se observaron una serie de folículos conformados por 3 o 4 capas de células de la granulosa que rodean a su ovocito, sin la presencia de un antro folicular, folículos que se clasificaron como preantrales; entre los días 13 y 15 posnatales (dato no presente), el grupo de folículos predominantes, mostraron un mayor número de capas de células de la granulosa rodeando a su folículo, adicionalmente se presentó una capa de células de la teca y se observó un antro folicular (folículos antrales); para los días 17, 21 y 25 posnatal (dato no presente), los folículos predominantes correspondieron al tipo preovulatorio, caracterizados por múltiples capas de células de la granulosa que rodean a su folículo, así mismo, se observaron un mayor número de capas de la teca rodeando a las células de la granulosa y se presentó un grupo de células de la granulosa entorno al folículo dando origen al *cumulus oophorus* y se presentó un antro folicular perfectamente delimitado.

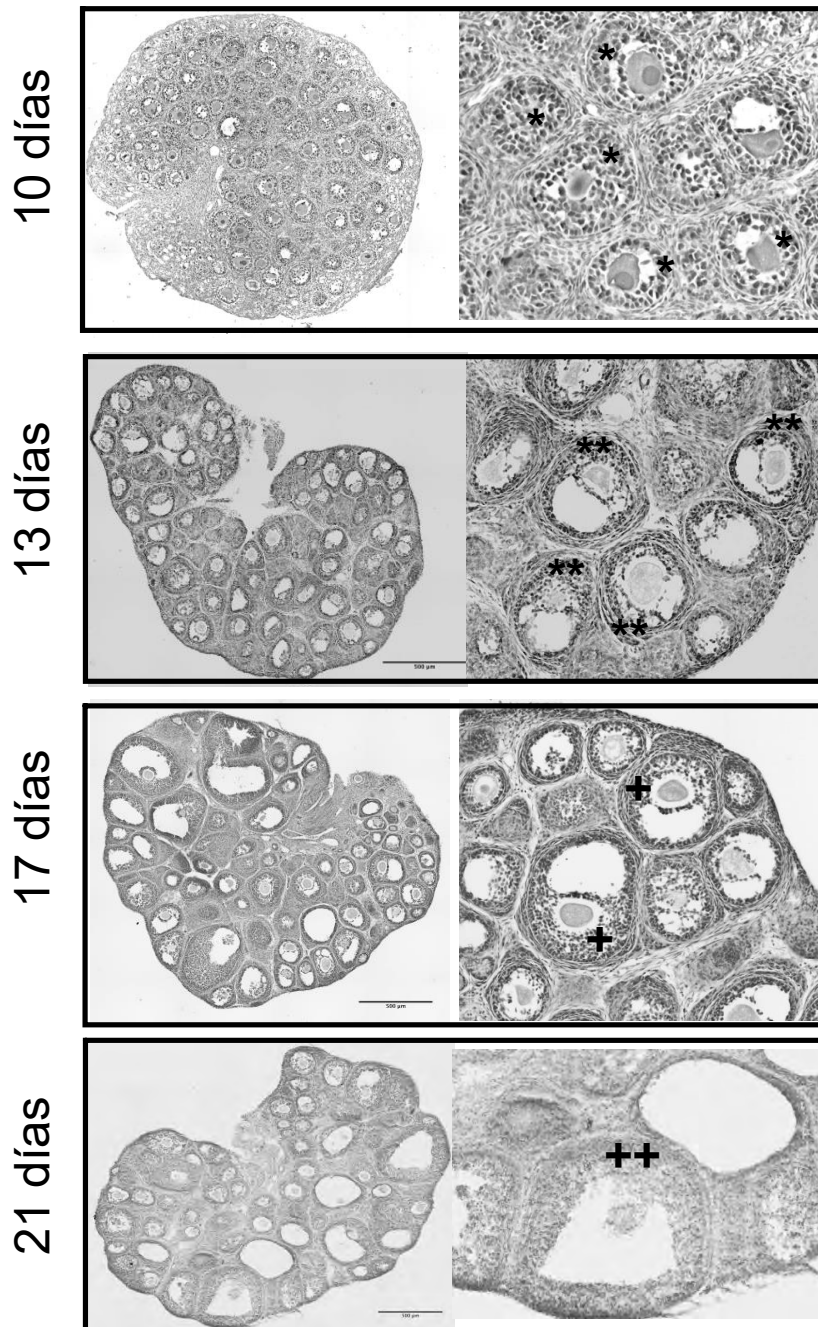


Fig. 6.1. *Análisis histológicos de folículos en desarrollo de ovarios de rata prepúber.* Grupo de folículos predominantes por edad. Cada tejido ovárico se tiñó con hematoxilina & eosina. La ampliación de cada imagen correspondió a 20X y se tomó con un microscopio de campo claro. La barra en cada recuadro representa una longitud de 500 μm . *Folículos preantrales; ** Folículos antrales; + folículos antrales grandes; ++ Folículo preovulatorio. Los datos representan tres cortes por ovario de cinco ratas por edad.

El patrón histológico del ovario de la rata por edad y el análisis de la población folicular predominante se resume en la figura 6.2. En **A**, se ejemplifica el corte histológico de ovario teñido con H&E por edad. En **B**, se presenta el patrón promedio de folículos predominantes por edad, mientras que el patrón de frecuencias de la distribución de la población folicular se resume en **C**. El análisis por categoría folicular con respecto a la edad se presenta en **D**, en donde es evidente que el ovario de 10 días posnatales se caracterizó por su alto porcentaje (81%) de folículos preantrales (<150 μm), en contraste, al comparar con edades mayores este porcentaje disminuyó ($p < 0.05$), así mismo se evidenció la presencia de folículos de mayor tamaño cuya población folicular resultó más heterogéneo con el incremento de la edad, en donde se presentaron folículos con diámetros que oscilaron entre los 300 a 450 μm , particularmente entre las edades de 17 a 25 DPN.

6.3.2 Dosis de eCG

Con base al análisis histológico del ovario en la rata prepúber se procedió al estudio del desarrollo folicular aplicando diferentes dosis de eCG sobre ratas infantiles de 10 días posnatales.

Aunque la administración de 25 UI y 50 UI eCG generó un incremento en el peso del ovario (9.3 ± 0.9 mg y 8.04 ± 0.5 mg) con relación al grupo control (6.7 ± 0.8 mg), la diferencia no fue significativa. El análisis histológico del ovario de cada rata mostró folículos preantrales y antrales con un apreciable desprendimiento en sus capas de células de la granulosa entorno al ovocito, así como una desorganización dentro del estroma folicular (Fig. 6.3). Debido al patrón morfológico del ovario después del tratamiento resultó difícil realizar un análisis de la población folicular.

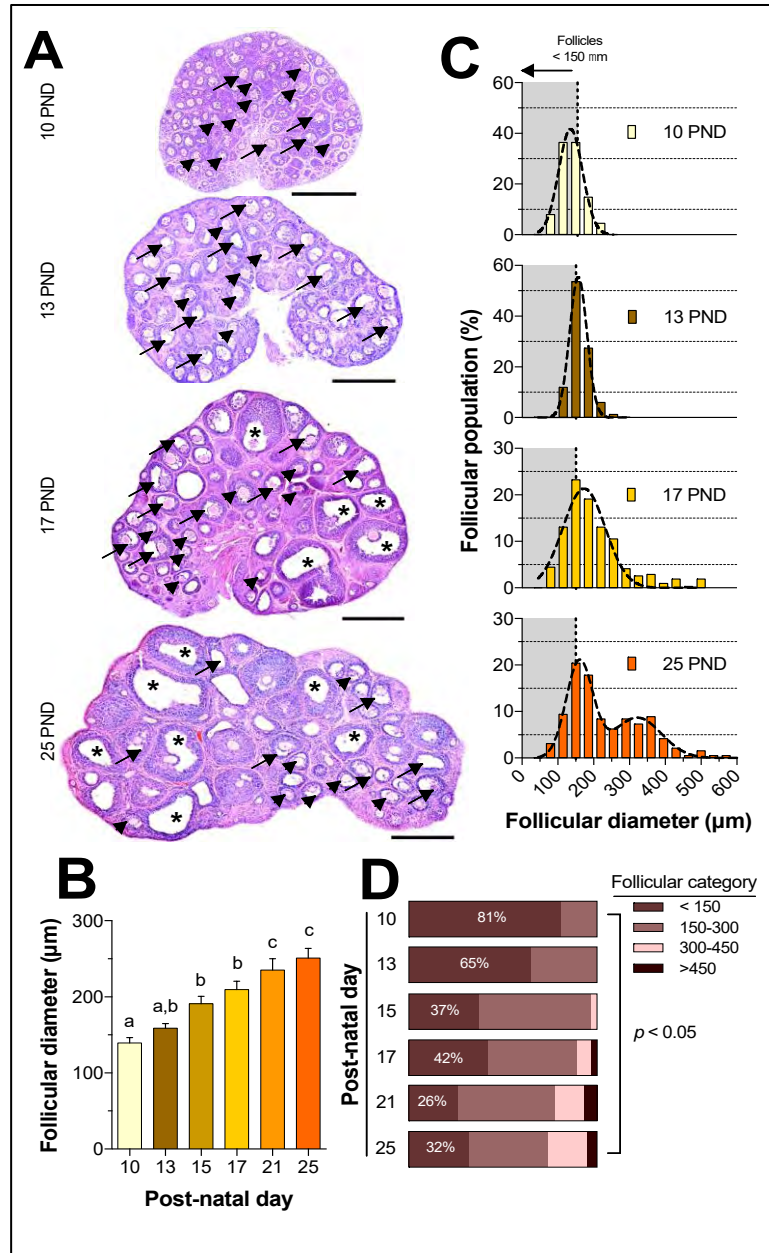


Fig. 6.2. Análisis de la población folicular en el ovario de la rata prepúber. A) Corte histológico del ovario de acuerdo a su edad, teñidos con H&E; B) promedio del diámetro folicular predominante por edad; C) patrón de distribución de la población folicular con relación al diámetro; D) Porcentaje de folículos de acuerdo al tamaño y edad post-natal. La flecha completa señala a los folículos antrales (AF) y la cabeza de flecha muestra los folículos preantrales (PAF). La barra equivale a 1000 μm . Los datos representan tres cortes por ovario de cinco ratas por edad.

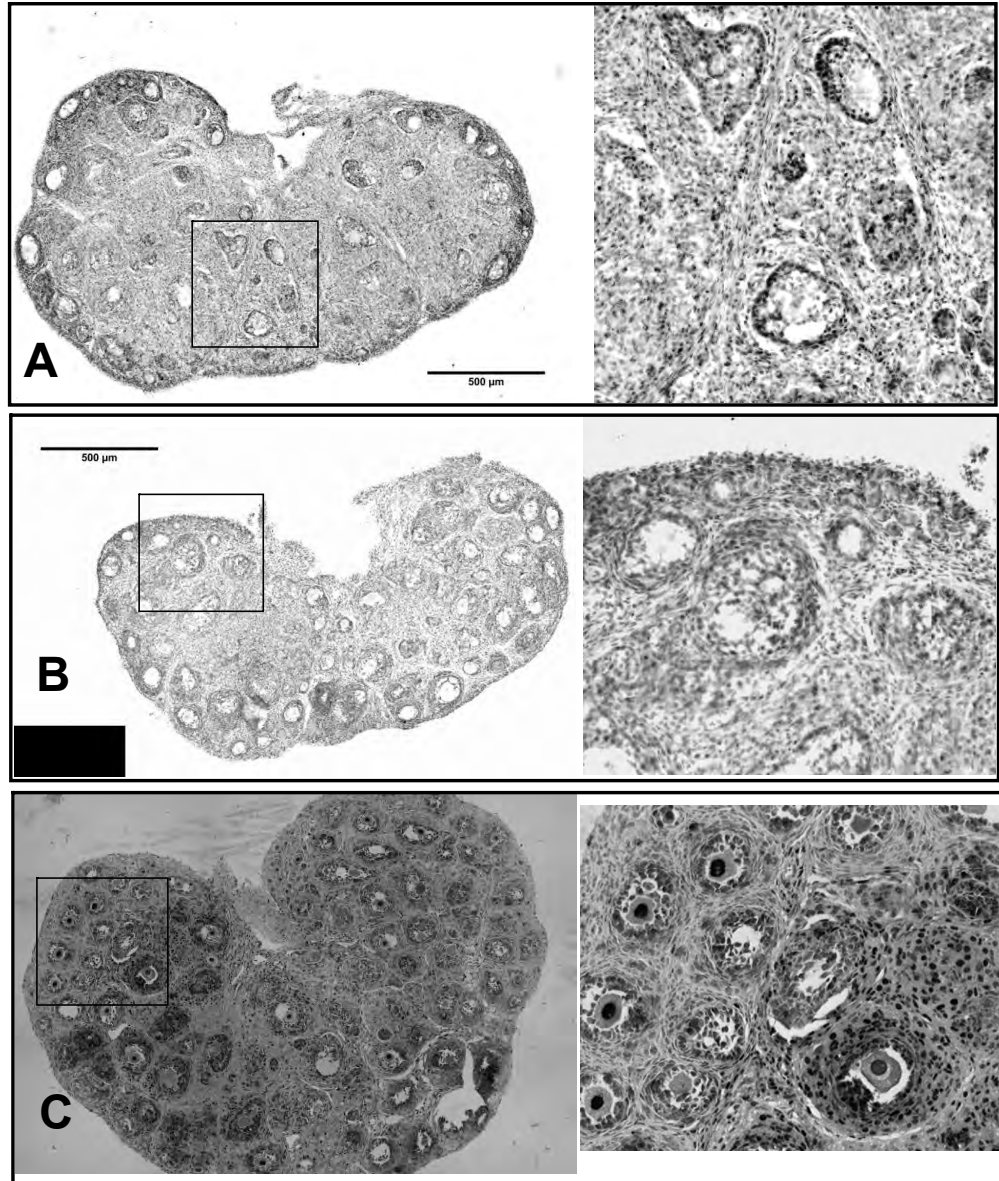


Fig. 6.3. *Análisis histológicos de folículos en desarrollo de ovarios de rata de 10 días posnatales después del tratamiento con eCG.* A) corte histológico de ovario después de 25UI de eCG; B) corte de ovario después de 50UI de eCG; C) corte histológicos del ovario del grupo control. Los cortes representan la observación de tres imágenes por animal de cinco ratas por grupo. El recuadro contiguo representa el patrón de estructuras predominantes por folículo. Cada tejido ovárico se tiñó con hematoxilina & eosina. La amplificación de cada imagen correspondió a 20X y se tomó con un microscopio de campo claro. La barra en cada recuadro representa una longitud de 500 µm. Los datos representan tres cortes por ovario de cinco ratas por edad.

A diferencia del patrón de respuesta con dosis altas, los ovarios de la rata de 10 días post-natal que recibió 1.0 UI (1.78 ± 0.085 mg) y/o 10 UI (2.0 ± 0.14 mg) de eCG presentaron un incremento ($p < 0.05$) en el peso cuando se comparó con el grupo control (1.21 ± 0.047 mg). El análisis de la población folicular denoto una disminución en el porcentaje de folículos primordiales con la dosis de eCG; en contraste el porcentaje de folículos primarios se mantuvo constante y el porcentaje de folículos preantrales y antrales se incrementó con 1.0 y 10 UI de eCG. La figura 6.4, resume el porcentaje poblacional a las diferentes dosis.

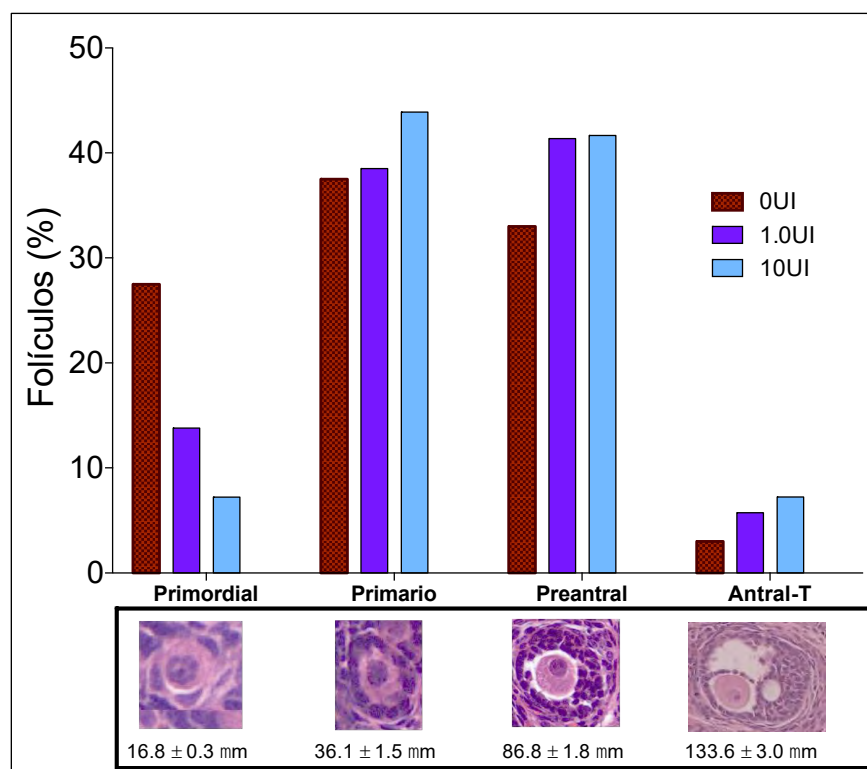


Fig. 6.4. Porcentaje de folículos primordiales, primarios, preantrales y antrales presentes en el ovario de ratas de 10 días post-natal después del tratamiento con eCG. El porcentaje se determinó del registro de tres cortes de ovario de 5 hembras por grupo.

6.3.3 10UI de eCG

El grupo de ratas infantiles de 10 días posnatales que recibió 10 UI de eCG no presentó cambios en el peso corporal con respecto al grupo control (Fig. 6.5 recuadro A). En contraste, el peso del ovario de este grupo se duplicó significativamente después del tratamiento (Fig. 6.5 recuadro B).

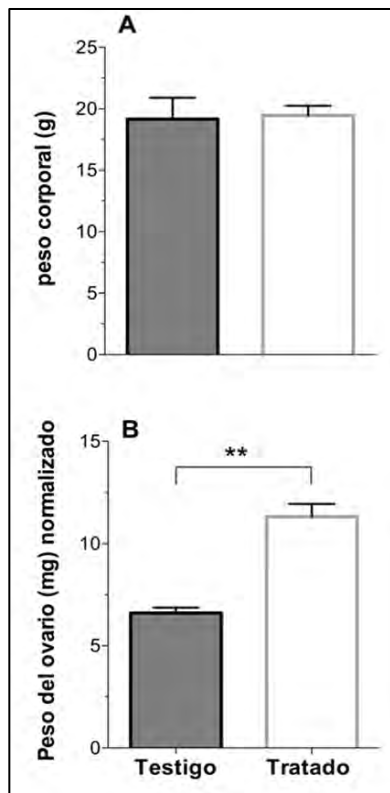


Fig. 6.5. Efecto de eCG en el peso corporal y del peso del ovario en ratas de 10 posnatales. A) Peso corporal del grupo control (testigo) y del grupo que recibió eCG (tratado). B) Peso del ovario por cada 100g de peso corporal del grupo testigo y tratado. Las ratas fueron tratadas en el día 8 de edad con solución salina (testigo) y/o 10 UI de eCG (tratado), 48 hrs después se sacrificaron. Las barras representan el promedio \pm ES del peso del ovario y de cada animal de cinco animales por grupo.

Por otro parte, los niveles circulantes de estradiol en el grupo que recibió eCG (Fig. 6.6 recuadro A) se incrementó significativamente (86.2 ± 3.5 pg/ml) cuando se comparó con los niveles secretados por grupo que recibió únicamente solución salina (50.8 ± 12.6 pg/ml). Este patrón de respuesta resultó consistente en cada ensayo independiente (Fig. 6.6 cuadro B).

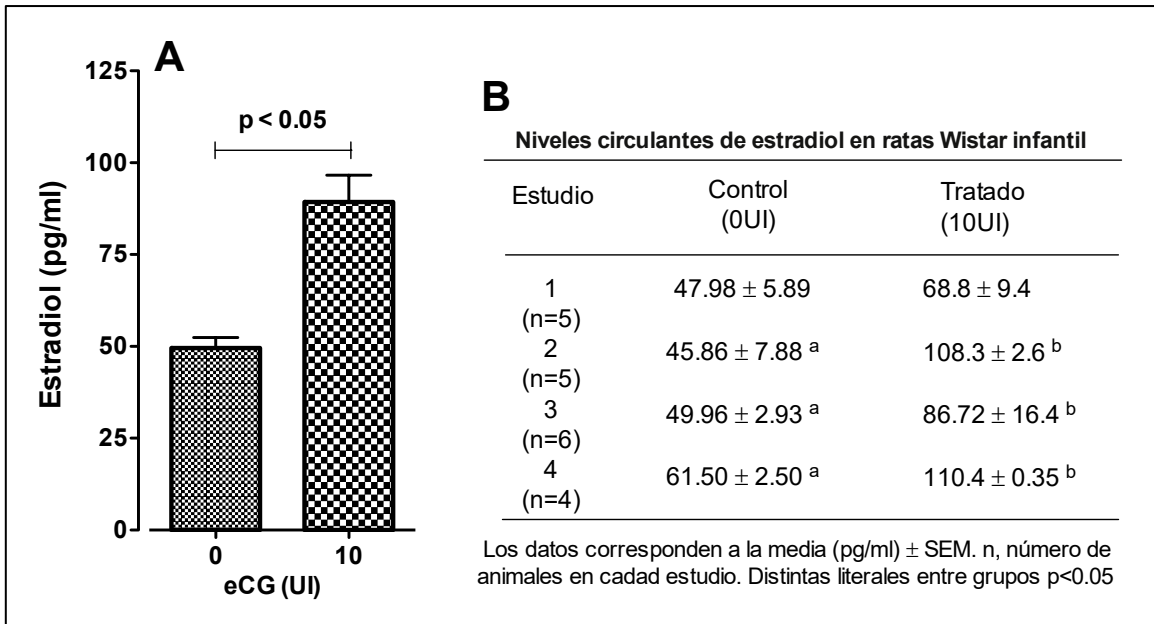


Fig. 6.6. Niveles circulantes de estradiol en la rata Wistar de 10 días post-natales. Ambos grupos de animales recibieron en el día 8 post-natal 100 μ l de solución salina (testigo) y/o 10UI de eCG (Tratado), 48 horas después se sacrificaron. Las barras muestran el promedio \pm SEM de 20 animales por grupo. El cuadro B, muestra el promedio \pm SEM por ensayo.

El análisis histológico de los ovarios del grupo control y del grupo que recibió eCG se presenta en la figura 6.7, panel A. El patrón de distribución de la población folicular en ambos grupos mostro un comportamiento normal (panel B), con una población de folículos preantrales del 62% correspondió a folículos con un diámetro cercano a las 125 μ m (grupo control, 0UI). En contraste, en el grupo que recibió 10 UI de eCG mostró una la población folicular cercana al 48% con un diámetro de 150 μ m. Durante el análisis histológico, el grupo control se caracterizó por presentar un 80.2% de folículos preantrales (FPA), mientras que el porcentaje de folículos antrales (FA) disminuyó y correspondió al 19.8% (Panel C), mientras el patrón de distribución folicular en el grupo de animales que recibió 10 UI de eCG mostró una distribución de folículos antrales del 43.5% y de folículos preantrales del 56.5% (Panel C). En el recuadro D se resumen las concentraciones circulantes de estradiol en ambos grupos.

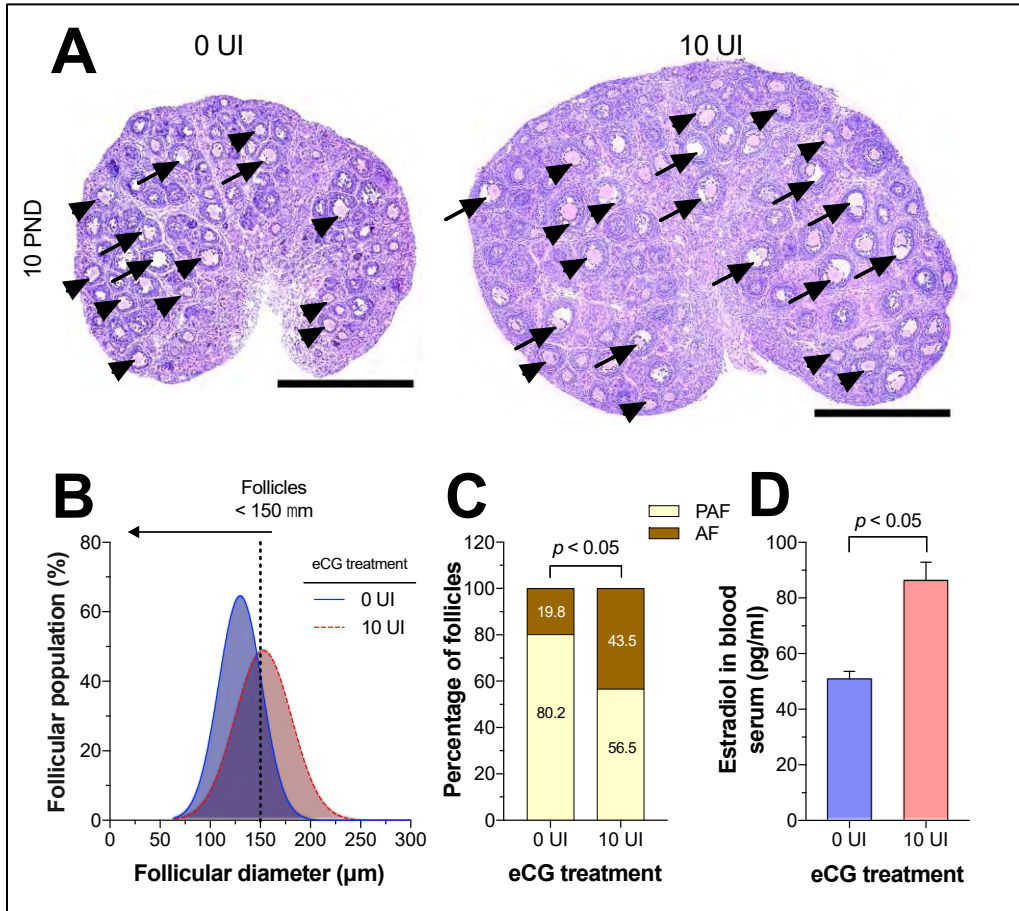


Fig. 6.7. Efecto del tratamiento con 10 UI de eCG durante la transición de foliculo preantral a foliculo antral. A) Corte histológico del ovario de rata infantil (10DPN) teñido con H&E; B) Patrón de distribución de la población de folicular con o sin tratamiento; C) Porcentaje de foliculos preantrales y antrales de cada tratamiento; D) Concentración de estradiol (pg/ml) en el suero de ambos grupos. La curva de distribución de frecuencias del panel B se ajustó a una curva gaussiana. Los datos del panel C y D se compararon mediante una *t* de Student a una cola para dos medias independientes. PND= Días Postnatales. La Flecha completa señala foliculos antrales y la cabeza de flecha señala foliculos preantrales. La barra en cada corte histológico equivale a 1000 μ m. Los datos representan el promedio de tres cortes histológicos por ovario de cinco ratas por tratamiento.

6.4 DISCUSIÓN

El presente capítulo de la tesis muestra el desarrollo del modelo biológico *in vivo* para el análisis de la transición de folículos preantrales a un estadio antral en el ovario de la rata. Los resultados mostraron que la rata infantil de 10 días posnatales después del tratamiento con 10UI de eCG disminuyó su porcentaje de folículos preantrales concomitantemente un aumento de folículos antrales, asociado a un incremento de niveles circulantes de estradiol. Esta serie de resultados apoyan a la rata infantil como un modelo *in vivo* para el estudio de la segunda etapa de la foliculogénesis.

6.4.1 Morfología del ovario

El estudio morfológico confirmó que el ovario de la rata infantil (10-17 días posnatal) cuenta predominantemente con un patrón de folículos primordiales, primarios y secundarios, sin embargo, al acercarse la etapa a la pubertad (21 y 25 posnatales) la presencia de folículos preovulatorios se acentuó. Estas observaciones se apoyan con los resultados descritos por Picut (2015) en donde el ovario de la rata cambia su estado morfológico conforme se incrementó la edad.

El análisis histológico del ovario en animales infantil (10 días posnatal) mostró un patrón con un alto porcentaje de folículos conformados por 2-4 capas de células de la granulosa, así como un pequeño número de folículos que presentaron pequeñas bolsas de líquido empezando a formarse, patrón morfológicos característico de folículos preantrales como se ha descrito para esta especie (Picut et al 2015; Hirshfield and Midgley, 1978).

Con base a los resultados morfológicos descritos en este estudio y si se considera que los niveles circulantes de gonadotropinas endógenas durante las primeras semanas de vida, la rata presenta un patrón de secreción bimodal, con niveles altos durante los días 3-4 de vida, después caen a nivel basal y se elevan nuevamente alrededor del día 10-11, niveles que se mantienen comparables al pico preovulatorio hasta el día 19-20 de vida (Dahl et al., 1988) y aunado al indició de la presencia de receptores a gonadotropinas en estructuras de folículos preantrales en etapas tempranas del desarrollo del animal, podemos considerar que en conjunto estos tres factores nos permiten inferir que a la edad de 8 DPN es el momento

adecuado para administrar a la eCG y analizar su efecto sobre el patrón de transición folicular de preantral 48 horas después.

6.4.2 Dosis de eCG

El patrón morfológico del ovario de animales de 10 DPN después de la administración de 25 y 50UI de eCG mostró un patrón distorsionado a nivel del estroma del ovario, con un desprendimiento y desorganización de las capas de la células de la granulosa en gran parte de los folículos preantrales, características morfológicas de folículos en estado atrésico.

Aunque se considera que el ovario de la rata infantil es sensible a gonadotropinas, la administración de 25 o 50 UI se han administrado en ratas de 21 a 23 días de edad con resultados que generan un incremento del tamaño del ovario y desarrollo folicular (Perera-Marín et al., 2004), en el presente estudio las correspondiente dosis resultaron desfavorables en animales infantiles, posiblemente por un efecto inhibitor de la hormona exógena.

A diferencia del patrón histológicos descrito con dosis altas, la dosis de 1.0 UI de eCG no mostró un efecto en el patrón histológico con respecto al grupo control, aunado a ello en el peso del ovario, el porcentaje de folículos antrales no se modificaron, resultado que muestra la baja sensibilidad del ovario a dosis pequeñas de eCG.

En contraste, la administración de 10UI de eCG generó un incremento en el peso y tamaño del ovario, así como en el desarrollo folicular, que se reflejó en un aumento del porcentaje de folículos antrales concomitantemente una disminución en el porcentaje de folículo preantrales. Estudios previos en ratas juveniles de 19 días (McGee et al., 1997) se demostró que la administración de 1.0 UI de eCG/g de peso induce un incremento en el peso del ovario, datos que apoyan que 10UI de eCG por animal es capaz de inducir en ratas de 8 día posnatales el desarrollo folicular como se presentó en el incremento del peso del ovario. Además McGee (1997) demostró que el tratamiento con eCG a ratas infantiles de 5 días posnatales (que contiene una proporción fija de FSH y LH bioactiva), también se traduce en un aumento en el peso de ovario. Por lo tanto nuestra información indica que 10UI corresponde a la dosis

adecuada para analizar la transición folicular de folículo preantral a un estado antral en el ovario de la rata infantil de 10 días postnatales.

Aunque en este estudio no se utilizaron ratas hipofisectomizadas o tratadas con antagonista a GnRH, con el fin de inhibir el patrón de secreción de las gonadotropinas endógenas que puedan enmascarar el efecto de la eCG exógena durante el estudio del desarrollo folicular, nosotros consideráramos que el modelo de la rata infantil de 10 días posnatales que recibió el estímulo de eCG cuenta con los requisitos para el estudio de la transición folicular de preantral a antral, dado que en el momento que el animal no presenta ningún pico previo de gonadotropinas, por lo que el efecto que se observó entorno al incremento del tamaño y el peso del ovario, así como el cambio en el patrón folicular se pueden atribuir al efecto generado por la eCG exógena.

6.4.3 El modelo

El modelo más utilizado para el estudio de la foliculogénesis corresponde al efecto que ejerce la gonadotropina coriónica equina o eCG sobre ratas prepúberes intactas. Con este modelo se ha logrado conocer los cambios morfológicos que ocurren en el ovario durante la primera y última etapa de la foliculogénesis, asociado a sus mecanismos de regulación y su actores involucrados (Danforth et al., 2003; Abramovich et al., 2009).

El estudio de la transición de folículo preantral a un estadio antral (segunda etapa de la foliculogénesis) ha sido poco documentada y aunque se cuenta con este modelo éste presenta dos limitaciones: 1) la edad de estudio (21 a 25 días posnatales), el ovario está integrado con una población folicular altamente asincrónica, lo que resulta difícil para este análisis; 2) los animales a esta edad muestran niveles hormonales de FSH y LH elevados, y posiblemente enmascaren la respuesta inducida por la eCG. Es por estas razones que el presente estudio se encaminó a conocer primeramente la morfología del ovario de la rata desde la lactancia a la pubertad y el efecto de diferentes dosis de eCG sobre el desarrollo folicular.

La utilización de la eCG como inductor del desarrollo folicular ha sido ampliamente documentado (Abramovich et al., 2009). Esta hormona tiene un doble efecto biológico, actúa como LH y FSH. Esta gonadotropina cuenta con una mayor

actividad biológica dirigida a generar efectos similares a la FSH y tiene una prolongada vida media en circulación atribuida a su alto contenido de oligosacáridos (Braw and Tsafiriri, 1980), por estas características intrínsecas de la hormona, el presente estudio utilizó a la eCG como un inductor del desarrollo folicular en la rata.

6.5 CONCLUSIÓN

El incremento significativo entorno al diámetro del ovario, la disminución en el porcentaje de folículos preantrales concomitantemente un aumento en el porcentaje de folículos antrales y el aumento en las concentraciones circulantes de estradiol, abre el panorama para ser utilizada a la rata infantil como modelo biológico *in vivo*, que permita de forma específica el estudio de la transición de preantral a antral y con ello tener un modelo que permita identificar el o los mecanismos y sus actores involucrados durante la transición de folículos preantrales a un estadio antral.

7. ESTÍMULO GONADOTRÓPICO ASOCIADO A PCNA, VEGF Y NOTCH2 EN EL OVARIO DE RATA INFANTIL

7.1 INTRODUCCIÓN

En los mamíferos, el desarrollo folicular ovárico es un proceso continuo durante la vida reproductiva. La identificación de los factores autócrinos, parácrinos y endócrinos que regulan el crecimiento y desarrollo folicular ha permitido el estudio en la vida reproductiva del mamífero (Orizaka et al., 2013).

Uno de los factores involucrados corresponde al factor de crecimiento del endotelio vascular o VEGF (por su sigla en inglés) que favorece el desarrollo vascular entorno a folículos en crecimiento lo que garantiza la tasa de reclutamiento de folículos y/o la inhibición de la atresia folicular (Danforth et al., 2003).

Aunado a su participación en el proceso angiogénico, el VEGF favorece de forma local la permeabilidad celular, la tasa de proliferación y la disminución de la apoptosis en las células de la granulosa y en células de la teca (Barboni et al., 2000) y con ello favorece el desarrollo folicular (Greenaway et al., 2004).

Su regulación por parte de las gonadotropinas (Schimitzu et al., 2013; Zimmerman et al., 2003) hace al VEGF un factor activo a lo largo de la foliculogénesis cuando el patrón de secreción de las gonadotropinas es modificado. Alternativamente, el efecto directo del VEGF en células de la granulosa desempeña efectos mitógenos que podría estimular directamente el crecimiento folicular; su acción *in situ* en el ovario (Danforth et al., 2003), su bloqueo durante la foliculogénesis inducida por gonadotropinas (Abramovich et al., 2006), y la inhibición de la acción de su receptor (Wulff, 2001), confirman su participación activa en el desarrollo folicular.

Aunque la identificación de los factores que regulan el crecimiento y desarrollo se ha centrado principalmente en factores endocrinos y factores intraováricos. La comunicación entre el ovocito-granulosa y las células granulosa-granulosa que implican el contacto célula-célula y una señalización local, también desempeñan papeles importantes en el crecimiento y desarrollo folicular (Zhang et al., 2011).

Al respecto, estudios previos han demostrado que los miembros de la vía de señalización Notch se expresan de forma diferencial en los ovarios de mamíferos,

incluyendo Notch2, (Johnson et al., 2001), lo que sugiere que esta vía de señalización podría desempeñar un papel en la foliculogénesis. Sin embargo, la mayoría de los estudios sobre la señalización de Notch se han descrito durante el desarrollo de folículos ováricos de ovarios de animales adultos. Recientemente Trombly et al. (2009) encontraron que el bloqueo de la señalización Notch en los ovarios de ratón neonatal cultivados resultó en el defecto del montaje folicular primario, lo que indica que la señalización Notch es esencial para la formación del folículo primordial.

Dado el hecho de que los componentes de la vía de señalización Notch también están presentes en los folículos primarios y secundarios, es posible postular que esta vía también puede desempeñar papeles en el desarrollo folicular en etapas posteriores.

Por lo tanto, con este cuerpo de evidencias, en el presente capítulo de esta tesis se enfocó a identificar la presencia del VEGF y Notch2 en el ovario de la rata infantil después del desarrollo folicular inducido con eCG, bajo la hipótesis que el efecto gonadotrópico induce una mayor presencia de VEGF y Notch en las diferentes estructuras foliculares.

7.2 MATERIALES Y MÉTODOS

7.2.1 Animales

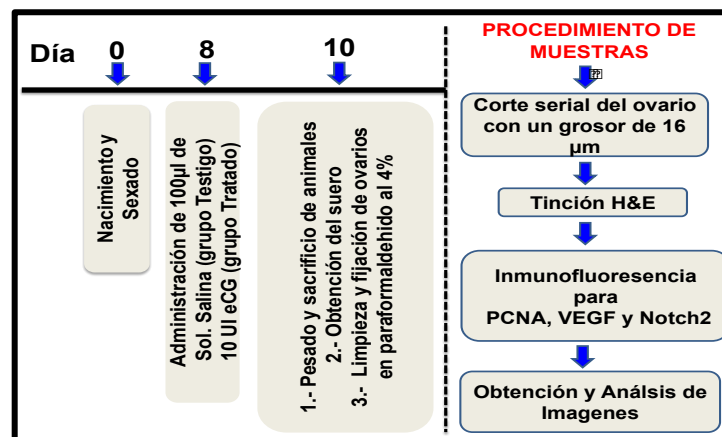
Para el desarrollo del efecto gonadotrópico sobre la inducción del desarrollo folicular en la rata infantil asociado a PCNA, VEGF y Notch2, el Bioterio del Instituto de Investigaciones Biomédicas (IIB) de la Universidad Nacional Autónoma de México proporcionó de tres a cuatro ratas gestantes de la cepa Wistar por estudio. Cada rata gestante se confinó en una caja individual con piso y pared continua sólida y con tapa removible de reja (todo conforme a la Norma Oficial Mexicana, NOM-062-ZOO-1999) y bajo esta condición se trasladó al Bioterio de transición del Instituto, en donde permaneció en un ambiente con una temperatura contralada de $23 \pm 1^{\circ}\text{C}$, con una humedad relativa del 75%, con ciclos de luz-oscuridad de 12h/12h, agua y alimento comercial (LabDiet, autoclaveable, 5010-5P14, Brentwood Mo, USA) *ad libitum* hasta el momento del parto y al final del estudio. Veinticuatro horas después del parto, la

camada se ajustó a 10 crías, seleccionándose preferentemente a las hembras y los animales permanecieron con su madre lactante hasta su utilización.

El manejo de los animales y los procedimientos experimentales fueron aprobados tanto por el Comité de Ética para la Experimentación con Animales del IIB-UNAM, así como por el Comité Institucional para el Cuidado y Uso de los Animales de Experimentación (CCICUAL) del Instituto de Investigaciones Biomédicas (ID221).

Para este estudio se realizaron cuatro experimentos independientes, las crías (n=8) en cada experimento se distribuyeron en dos grupos: el grupo control (n=4) que recibió solución salina y el grupo tratado (n=4) con 10UI de eCG (Foligón, INTERVET, México). Ambos grupos recibieron por vía subcutánea (s.c.) 100µl de cada solución y 48 hrs después del estímulo, los animales se sacrificaron. Previo al sacrificio se registró el peso corporal de cada animal y para la determinación de estradiol se extrajo aproximadamente entre 1 o 2 ml de sangre periférica bajo anestesia con CO₂.

Una vez concluido este proceso y después del sacrificio, a cada animal se le extrajeron los ovarios, a los que se les eliminó el tejido graso circundante, se pesaron e inmediatamente se depositaron de forma individual en una solución de buffer de fosfatos (PBS) pH 7.4 con 4% de paraformaldehído por 24 hrs a 4º C. Finalmente, los ovarios se sumergieron de manera consecutiva en una solución de PBS con sacarosa al 10, 20 y 30% por 24 h cada una. El esquema siguiente resume dicho procedimiento.



7.2.2 Inmunotransferencia

Previo a la identificación de las proteínas PCNA, VEGF y Notch2 en el tejido ovárico de la rata infantil, cada anticuerpo se validó mediante inmunotransferencia. Para ello, se homogeneizaron 12 ovarios de crías de 10 días de edad sin tratamiento y 12 ovarios de crías que recibieron 10 UI de eCG; Ambos grupos de ovarios se homogenizaron independientemente con un sonicador de punta con 100 µl de buffer RIPA [50 mM Tris-HCl, 150 mM NaCl, 1% SDS, 5 mM EGTA, 0.5 mM MgCl₂, 0.5 mM MnCl₂ y 0.2 mM PMSF (phenylmethyl-sulfonylfluoride)] que contenía una mezcla de inhibidores de proteasas (Complete mini, Roche 04 693 124 001). Una vez que se obtuvo cada homogenado se centrifugó a 10,000 rpm por 10 min a 4° C y al sobrenadante recuperado se le cuantificó la concentración de proteína con el estuche comercial BCA Protein Assay Kit II, (Pierce, 21225) tomando como referencia a la albúmina bovina (BSA). Una vez concluido este paso se realizó el análisis electroforético.

Para el análisis electroforético se utilizaron geles de poliacrilamida al 10%. En cada corrida electroforética se colocaron 10 µg de proteína de cada extracto por carril. Para ello, cada extracto de ovario se resuspendió en el amortiguador de corrida y la muestra se calentó a 100° C durante 5 min; al terminó, el extracto se separó en la SDS-PAGE; una vez concluida la corrida electroforética, las proteínas presentes en el gel se transfirieron a una membrana de nitrocelulosa (Bio-Rad, Trans-Blot Transfer Medium, Hercules, CA, USA) y la membrana se incubó con los anticuerpos primarios específicos, a saber: anti-VEGF (1:10,000; ab46154 de Abcam) y anti-Notch2 (1:10,000 de Abcam) y el anti-PCNA monoclonal de ratón (1:10,000; PC10 de Santa Cruz, Biotechnology) por 24h. Al término, la membrana se lavó 3 veces con amortiguador de fosfatos salino que contenía 0.05% de Tween 20, por 5 min en agitación constante y a temperatura ambiente, al concluir este paso se incubó la membrana con un anticuerpo secundario biotinilado contra conejo (AP182B, Millipore) y/o ratón (AP194B, Millipore) a una concentración 1:10,000; el complejo antígeno-anticuerpo se visualizó usando un estuche de dimamino-bencidina y níquel, siguiendo las especificaciones del fabricante (Peroxidase-sustrate KIT, DAB-SK-4100, Vector). Se utilizaron como controles positivos: extracto de cuerpo lúteo para VEGF, extracto de páncreas para Notch-2 y extracto de hígado de rata adulta para PCNA; en todos los casos se utilizó β-actina

como proteína constitutiva. Los controles negativos corresponden al extracto de ovario sin anticuerpo primario.

7.2.3 Inmunotinción

Para el desarrollo de la inmunolocalización de las proteínas PCNA, VEGF y Notch2 en el tejido ovárico de la rata infantil después de la inducción del desarrollo folicular con eCG se desarrollaron dos protocolos sobre cortes histológicos con un grosor de 16 μ m.

El primer protocolo se desarrolló en cortes de ovarios de rata no perfundida y se utilizaron anticuerpos secundarios biotinilados, anticuerpos que contienen como cromógeno a la Diaminobencidina (DAB).

El segundo protocolo se desarrolló en cortes de ovario proveniente de animales perfundidos con paraformaldehído al 4% amortiguado con fosfato salino al 0.1M, pH 7.2. Los anticuerpos secundarios utilizados están acoplados a isotiocianato de fluoresceína (FITC) e isotiocianato de rodamina (TRITC).

7.2.3.1 Protocolo con DAB

Como primer paso, cada laminilla se hidrato con amortiguador de fosfatos (PB) al 0.1M; posteriormente y con el fin de inhibir la peroxidasa endógena del tejido, cada laminilla recibió una solución de peróxido de hidrógeno al 1% durante 10 min; al término, las laminillas se permeabilizaron durante 5 min a temperatura ambiente con PB que contenía 0.3% de Triton X-100, 5% de albumina sérica bovina (BSA) y 3% de suero de caballo inactivado; posteriormente y con el fin de exponer los sitios antigénicos del tejido, cada laminilla se sumergió en una solución de citratos 0.01M, pH 6.0 (Immuno/DNA Retriever, Bio-SB, BSB-0020) a 60°C durante 30 min. Concluidos esta serie de pasos, las laminillas se incubaron por 18h a 4°C con los siguientes anticuerpos: anti-VEGF (rabbit policlonal; 1:250 dilución; ab 46154, Abcam), anti PCNA (mouse monoclonal; 1:100 dilución, Dako, Debmark); anti-Notch2 (rabbit policlonal; 1:250 dilución; ab 46154, Abcam). En todos los casos, los anticuerpos primarios se diluyeron en PBS + 0.1% BSA.

La unión antígeno-anticuerpo se identificó con presencia de un anticuerpo secundario biotinilado (anti-rabbit IgG, Millipore AP182B) y el complejo Avidina-biotina peroxidasa (PK6100, Vector), por último el revelado del complejo se realizó con dimamino-bencidina con o sin níquel siguiendo las especificaciones del fabricante de estuche (Peroxidase-sustrate KIT, DAB-SK-4100, Vector). Al término, los diferentes cortes se contratiñeron con verde de metilo y/o eosina. Como control negativo se utilizaron secciones de tejido que se incubaron sin anticuerpo primario o secundario.

Para evaluar la morfología del ovario con diaminobencidina se capturaron imágenes 20X con el microscopio confocal de disco giratorio Olympus BX51 WI, y el análisis de imágenes se realizó con el programa Image J.

7.2.3.2 Protocolo para fluorescencia

Para el desarrollo de este protocolo y con el fin de minimizar la autofluorescencia del tejido se recurrió a obtener ovarios de rata perfundida.

Perfusión: Cada animal recibió una inyección intra-peritoneal de pentobarbital sódico, una vez anestesiado el animal se colocó un catéter en el ventrículo izquierdo, e inmediatamente después se administraron 150 ml de PB seguido de 250 ml de una solución de PFA al 4%. Concluido este proceso, los ovarios de cada animal se retiraron, se limpiaron del tejido graso circundante y se depositaron en una solución de sacarosa al 10 % y 24 hrs después se colocaron en solución de sacarosa al 30% en donde permanecieron hasta su análisis histológico.

Cortes histológicos: para obtener cortes de ovario, primeramente el tejido que permaneció en sacarosa al 30% se incluyó en una solución crioprotectora (Tissue Tek-II O.C.T 4583, Sakura Finetek USA) e inmediatamente la muestra se congeló con 4-metilbutano pre-enfriado con hielo seco. Una vez congelado el tejido se realizaron cortes seriales con un grosor de 16 μm a -20°C con el criostato (marca y modelo) y los cortes obtenidos se depositaron sobre un portaobjeto pre-tratado con gelatina.

Inmunofluorescencia: El análisis por inmunofluorescencia de cada laminilla que contenía cortes histológicos centrales de cada ovario se inició permeabilizó el tejido con amortiguador PBS-Tritón; se continuó con el bloqueo peroxidasa endógena colocando peróxido de hidrógeno al 3% durante 10 min y los sitios antigénicos de

cada tejido se expusieron aplicando el amortiguador de citratos al 0.01M, pH 6.0 (Immuno/DNA Retriever, Bio-SB, BSB-0020) durante 30 min a 60°C.

Al terminó, cada corte contenido en la laminilla se bloqueó durante 60 min a temperatura ambiente con una solución que contenía albúmina y suero de caballo inactivado al 5%. Finalmente y con el fin de minimizar la auto-fluorescencia, cada laminilla recibió una solución que contenía 50 mM de acetato de amonio y 1mM sulfato de cobre por 15 minutos a temperatura ambiente (Schnell, 1999).

Una vez concluidos esta serie de pasos, las laminillas se dividieron en dos grupos, un grupo de laminillas que se incubó simultáneamente por 42 horas a 4°C con el anticuerpo primario policlonal para VEGF (anti-VEGF, ab46154, Abcam, dilución 1:200) y con el anticuerpo monoclonal dirigido contra a PCNA (anti-PCNA, PC10 de Santa Cruz Biotechnology, dilución 1:50). El segundo grupo de laminillas se incubó por el mismo tiempo y temperatura colocando simultáneamente al anticuerpo primario policlonal para el receptor Notch2 (antiNotch2, ab52302, Abcam, dilución 1:200) y al anticuerpo monoclonal dirigido contra a PCNA (anti-PCNA, PC10 de Santa Cruz Biotechnology, dilución 1:50). Posteriormente, cada laminilla se lavó dos veces con amortiguador de fosfatos (PB) y se incubó con el anticuerpo secundario a temperatura ambiente por 90 min, finalmente se lavó dos veces con PB y se tiñeron los núcleos con DAPI (1 µg/ml) durante 1 min y al final se cubrieron con medio de montaje para fluorescencia (S3023, Dako).

En todos los casos se utilizó como control negativo la preparación en ausencia de anticuerpo primario. El control positivo correspondió a cortes de ovario de rata adulta. La tabla 2 resume el esquema de combinación de los anticuerpos primarios y secundarios

Tabla 2. Combinación de los anticuerpos primarios y secundarios.

Anticuerpo Primario	Anticuerpo Secundario	Anticuerpo Primario	Anticuerpo Secundario
Anti-PCNA de ratón	Dk x Ms Alexa 488 dilución 1:500	Anti-VEGF de conejo	Dk x Rb Alexa 594 dilución 1:500
Anti-PCNA de ratón	Dk x Ms Alexa 488 dilución 1:500 ¹	Anti-Notch de conejo	Dk x Rb Alexa 594 dilución 1:500 ²
DAPI			

¹ A21202, A21207² Invitrogen

Digitalización de imágenes: Para evaluar la morfología del ovario inmunoteñido con fluoróforos se adquirieron imágenes con el microscopio confocal de disco giratorio Olympus BX51 WI con un aumento de 40X, utilizando los filtros para isotiocianato de fluoresceína e isotiocianato de rodamina y el análisis de imágenes se realizó con el programa Image J.

7.3 ANÁLISIS ESTADÍSTICO

Para evaluar la asociación de las distintas características que definen a los folículos en respuesta al tratamiento con 10 UI de eCG, se utilizó un análisis de correspondencia múltiple. Para este análisis se incluyó la asociación entre los grupos tratados (0 y 10 UI de eCG), la categoría de tamaño del folículo (< 80 μm , 80-160 μm y > 160 μm), el tipo de folículo (preantral o antral), el nivel de producción de estradiol de acuerdo a los valores en percentiles del grupo control (0 UI, < 33.3%, 33.3-66.6% y > 66.6%), la expresión (positiva o negativa) de VEGF, NOTCH y PCNA en las células de la granulosa o en el ovocito. El análisis de correspondencia múltiple se realizó con el paquete estadístico SAS University (SAS Institute, Cary, NC, USA).

7.4 RESULTADOS

7.4.1 Validación de anticuerpos

El estudio por medio de la inmunotransferencia para la caracterización de los anticuerpos para la identificación de las proteínas β actina, VEGF, PCNA y Notch 2 presentes en el extracto de ovario de la rata infantil se ejemplifican en la figura 7.1. Cada banda inmunoteñida que se presentó en el extracto del ovario control y tratado así como en el cuerpo lúteo (control positivo) correspondió al peso molecular relativo (Kda) de cada proteína como es señalado en el protocolo del fabricante.

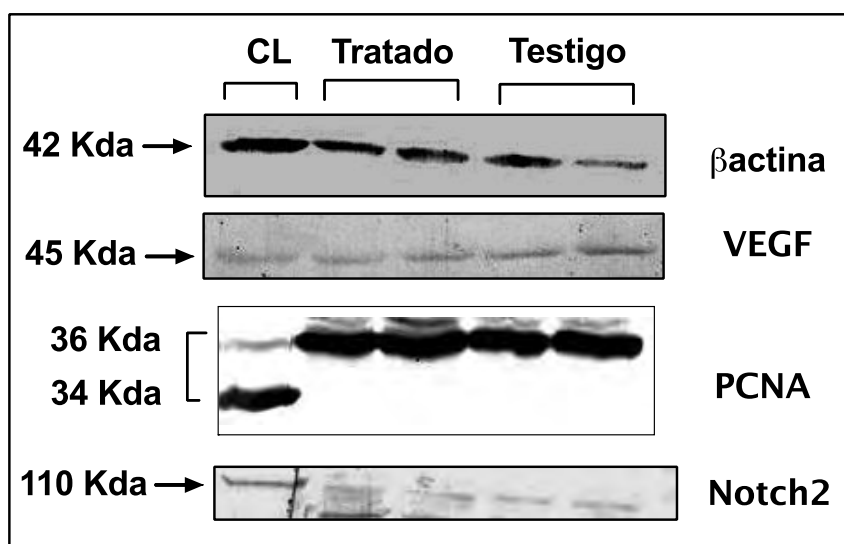


Fig. 7.1.- Después de la homogenización del tejido ovárico, las proteínas fueron extraídas y sujetas a una electroforesis en geles de poliacrilamida al 10% y transferidas a una membrana de nitrocelulosa. La proteína PCNA, Notch2, VEGF y β -actina se visualizaron con su correspondiente anticuerpo (ver materiales y métodos). El panel muestra el inmunoblot representativo para la proteína actina, VEGF, PCNA y Notch 2 presente en el extracto de ovario de rata que recibió 10UI de eCG (grupo tratado), el extracto de ovario del grupo testigo (solución salina) y el cuerpo lúteo (CL) como control positivo. KDa, peso molecular relativo. El revelado de la proteína se describe en material y métodos.

7.4.2 Inmunotinción con DAB

7.4.2.1 PCNA

La presencia de la proteína PCNA en rebanas de tejido ovárico de rata infantil se ejemplifica en la figura 7.2. En el recuadro A, se presenta la distribución de la proteína en el corte de ovario que no recibió eCG. El recuadro B, ejemplifica el patrón de PCNA en el corte de ovario después del tratamiento con eCG. Como se aprecia, la proteína se presentó principalmente en células de la granulosa de folículos preantrales y antrales de ambos grupos, así mismo, la proteína se inmunolocalizó en algunos ovocitos de folículos primordiales. Su mayor presencia fue en el ovocito de folículos pre-antrales y antrales. Esta proteína fue escasa en células de la teca de cada folículo. En apariencia la presencia de PCNA fue mayor después de la inducción del desarrollo folicular.

7.4.2.2 VEGF

El patrón de inmunotinción para la proteína VEGF se ejemplifica en la figura 7.3. En el recuadro A se presenta el corte de ovario antes del tratamiento, en él se observa al VEGF en el ovocito de folículos preantrales y antrales, escasamente se observa en células de la granulosa, pero es evidente en células de la teca y el estroma del ovario (cuadro de amplificación). En el recuadro B se muestra el corte de ovario después del tratamiento con eCG. VEGF está presente en células de la granulosa como en células de la teca de folículos preantrales y antrales, de manera idéntica el ovocito mostró un patrón positivo de inmunotinción para esta proteína (cuadro de amplificación). El recuadro C muestra el control negativo del sistema de inmunotinción.

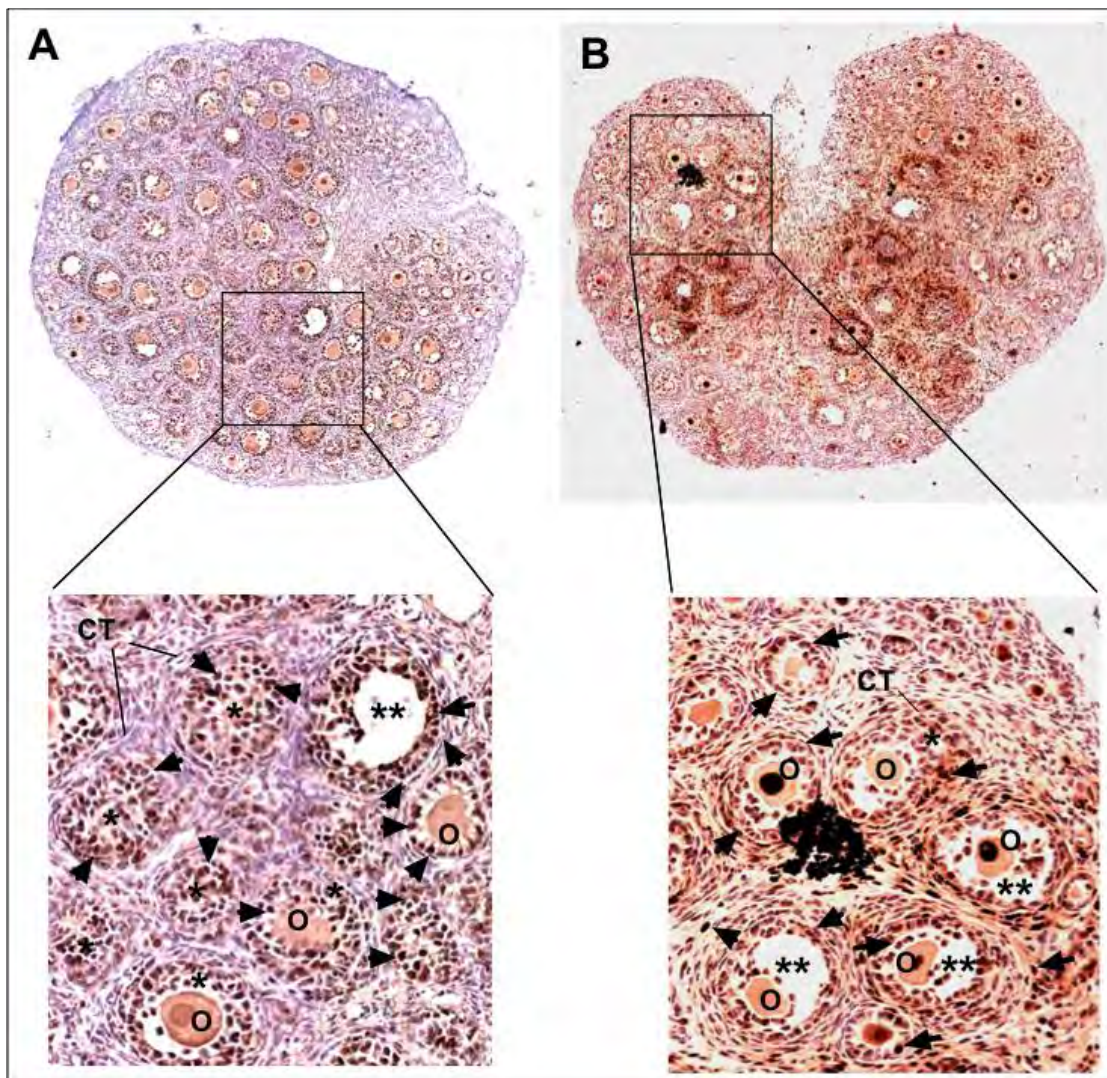


Fig. 7.2. Localización celular de la proteína PCNA durante el desarrollo folicular inducido con eCG. La sección del ovario representa la seriación central de tres cortes de ovario de cinco animales por grupo. Cada sección del ovario se inmunotiñó para PCNA. El panel A) ejemplifica el corte de ovario sin tratamiento y el recuadro inferior corresponde a una amplificación del tipo de folículo predominante; el panel B) corresponde al corte de ovario de animales que recibieron 10 UI de eCG, el recuadro ejemplifica los tipos de folículos predominantes en el ovario. La señal inmunohistoquímica positiva a PCNA corresponde a café oscuro y en azul su contratinción. La cabeza de flecha muestra células de la granulosa inmunopositivas a PCNA. *folículos pre-antrales; ** folículos antrales; CT, células de la teca; o, ovocito. Los datos representan tres cortes por ovario de cinco ratas.

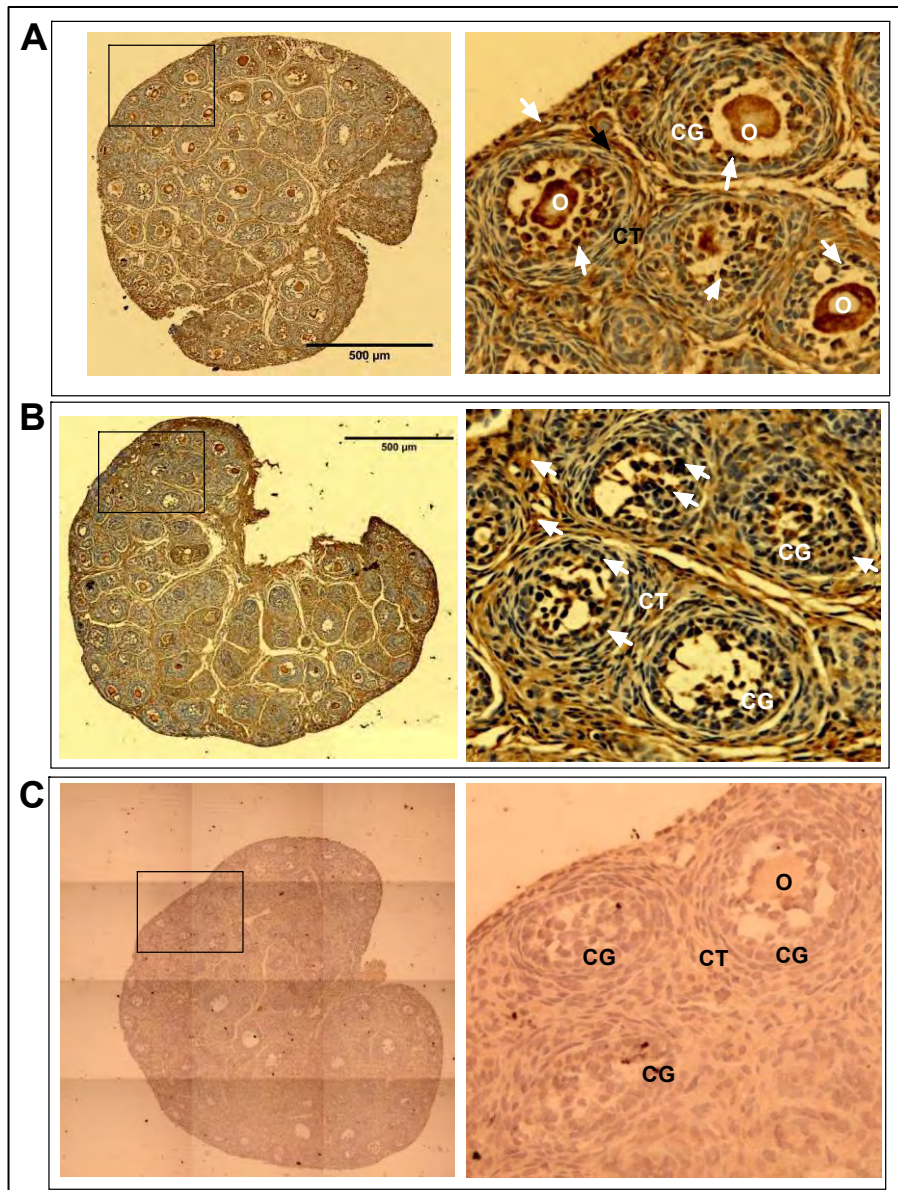


Fig. 7.3. Localización celular de la proteína VEGF durante el desarrollo folicular inducido con eCG. La sección del ovario representa la seriación central. Cada sección del ovario se inmunotizó para VEGF. El panel A) ejemplifica el corte de ovario sin tratamiento y el recuadro corresponde a una amplificación del tipo de folículo predominante; el panel B) corresponde al corte de ovario de animales que recibieron 10 UI de eCG, el recuadro ejemplifica los tipos de folículos predominantes en el ovario; el panel C, corresponde al grupo control. La señal inmunohistoquímica a VEGF corresponde a café oscuro y en azul su contraindicación. La cabeza de flecha muestra células de la granulosa inmunopositivas a VEGF. CG células de la granulosa; CT células de la teca; O, ovocito. Los datos representan tres cortes por ovario de cinco ratas.

7.4.3 Inmunotinción con inmunofluorescencia

7.4.3.1 Colocalización de VEGF, Notch2, PCNA

La colocación de las proteínas VEGF, PCNA, DAPI y Notch2, PCNA, DAPI en el grupo de folículos preantrales y antrales objetivo de este estudio se realizó previamente en corte de ovario de ratas de 10 días que recibieron 10 UI de eCG o en ausencia de eCG. La figura 7.4 muestra un patrón representativo del ovario inmunoteñido para estas proteínas y su localización en el grupo de folículos.

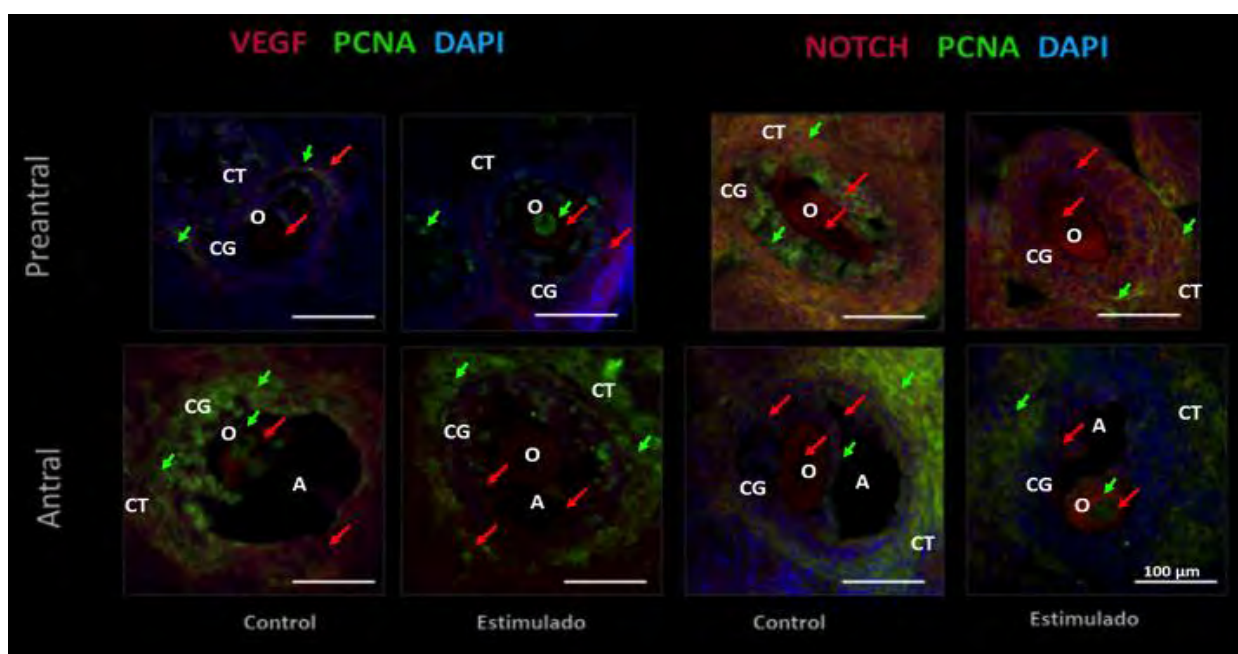


Fig. 7.4. Colocalización de VEGF, PCNA, DAPI y Notch, PCNA y DAPI en folículos preantrales y antrales del ovario de la rata infantil por medio de inmunofluorescencia. En el recuadro superior de la figura se presenta la inmunolocalización de VEGF, PCNA, NOTCH y DAPI en un folículo preantral de ambos grupos. En la parte inferior se ejemplifica al folículo antral antes y después del tratamiento con eCG. El grupo control o testigo (0UI); grupo estimulado (10UI). VEGF (rojo); PCNA (verde); Notch (rojo) y DAPI (color azul). Las flechas en color rojo señalan a VEGF presente en células de la teca (CT) y la granulosa (CG). Las flechas en color verde señalan a PCNA en el ovocito y CG. A, antro folicular. La barra en cada imagen indica una longitud de 100 µm. Imagen original de amplificación 20X. Los datos representan tres cortes por ovario de cinco ratas.

7.4.3.2 PCNA

La presencia de la proteína de proliferación nuclear (PCNA) en rebanas de tejido ovárico de rata infantil por medio de inmunofluorescencia se ejemplifica en la figura 7.5. En el panel superior se muestra la distribución de la proteína PCNA en conjunto con la tinción nuclear con DAPI en cada corte de ovario completo y que representó a cada grupo. En el panel intermedio se muestra únicamente la distribución de la marca inmunofluorescente para PCNA (color verde) y en el panel final para DAPI (color azul). Los resultados mostraron una fuerte inmunofluorescencia nuclear de PCNA en el ovocito de folículos preantrales y antrales, así como en el grupo de células de la granulosa en el tejido ovárico de ratas que recibieron eCG (Fig. 7.6, panel A, 10UI), en contraste, el patrón de inmunotinción para PCNA en el grupo que no recibió eCG fue menos presente y se localizó en la región del citosol de las células de la granulosa (Fig. 7.6, panel A, 0UI). El conteo de folículos inmunopositivos a PCNA en tres cortes por ovario de cuatro animales por grupo mostró una diferencia significativa entre folículos preantrales y antrales antes y después de la inducción de desarrollo folicular con eCG (Fig. 7.6, panel B).

7.4.3.3 VEGF

La presencia de la proteína del factor de crecimiento del endotelio vascular o VEGF en rebanas de tejido ovárico de rata infantil por medio de inmunofluorescencia se ejemplifica en la figura 7.7. En el panel superior se muestra la distribución de la proteína VEGF en conjunto con la tinción nuclear con DAPI en un corte de ovario completo que representó a cada grupo. En el panel intermedio se muestra únicamente la distribución de la marca inmunofluorescente para VEGF (color rojo) y en el panel final para DAPI (color azul). Los resultados mostraron una fuerte inmunofluorescencia para VEGF en el ovocito de folículos preantrales y antrales, así como en las células de la teca del tejido ovárico de ratas que recibieron eCG (Fig. 7.8 panel A, 10UI), en contraste, el patrón de inmunotinción para VEGF en el grupo que no recibió eCG fue menos evidente y se localizó en solo regiones específicas de algunos folículos antrales (Fig. 7.8 panel A, 0UI). El conteo de folículos inmunopositivos a VEGF en tres cortes por ovario de cuatro animales por grupo mostró una diferencia

significativa entre folículos preantrales y antrales antes y después de la inducción de desarrollo folicular con eCG (Fig. 7.8, panel B).

7.4.3.4 NOTCH2

La presencia de la proteína Notch2 en rebanas de tejido ovárico de rata infantil por medio de inmunofluorescencia se ejemplifica en la figura 7.9. En el panel superior se muestra la distribución de la proteína Notch2 en conjunto con la tinción nuclear DAPI en un corte de ovario completo que representó al grupo testigo. En el panel inferior se muestra la distribución de la marca inmunofluorescente para NOTCH2 (color rojo) y en el panel final para DAPI (color azul) del grupo que recibió 10UI de eCG. Los resultados en el grupo testigo mostraron una fuerte inmunofluorescencia para NOTCH2 en las células de la pre-granulosa de folículos primordiales, escasamente se presentó NOTCH2 en células de la granulosa de folículos preantrales y antrales y se observó una amplia distribución de la proteína en la parte del estroma del ovario.

En contraste, la inmunotinción de NOTCH2 en el grupo tratado, fue muy específica, en el ovocito de folículos antrales, en células de la granulosa que están en el cumulus oophorus y en células de la teca. Escasa marca se presentó en el grupo de folículos preantrales. El conteo de folículos inmunopositivos a NOTCH2 en tres cortes por ovario de cuatro animales por grupo no mostró una diferencia significativa entre folículos preantrales y antrales antes y después de la inducción de desarrollo folicular con eCG (Fig. 7.10).

7.4.4 ANÁLISIS MULTIVARIADO

El patrón de asociación entre los grupos de tratamiento y las características de los folículos, la concentración de estradiol y la expresión de VEGF, NOTCH y PCNA en células de la granulosa y en el ovocito de los folículos preantrales y antrales de las ratas evaluadas se resumen en la figura 7.11. La fuerza de asociación entre las variables se interpretó en relación a la distancia que separan a dos puntos adyacentes; entre menor es la distancia, mayor la asociación entre variables.

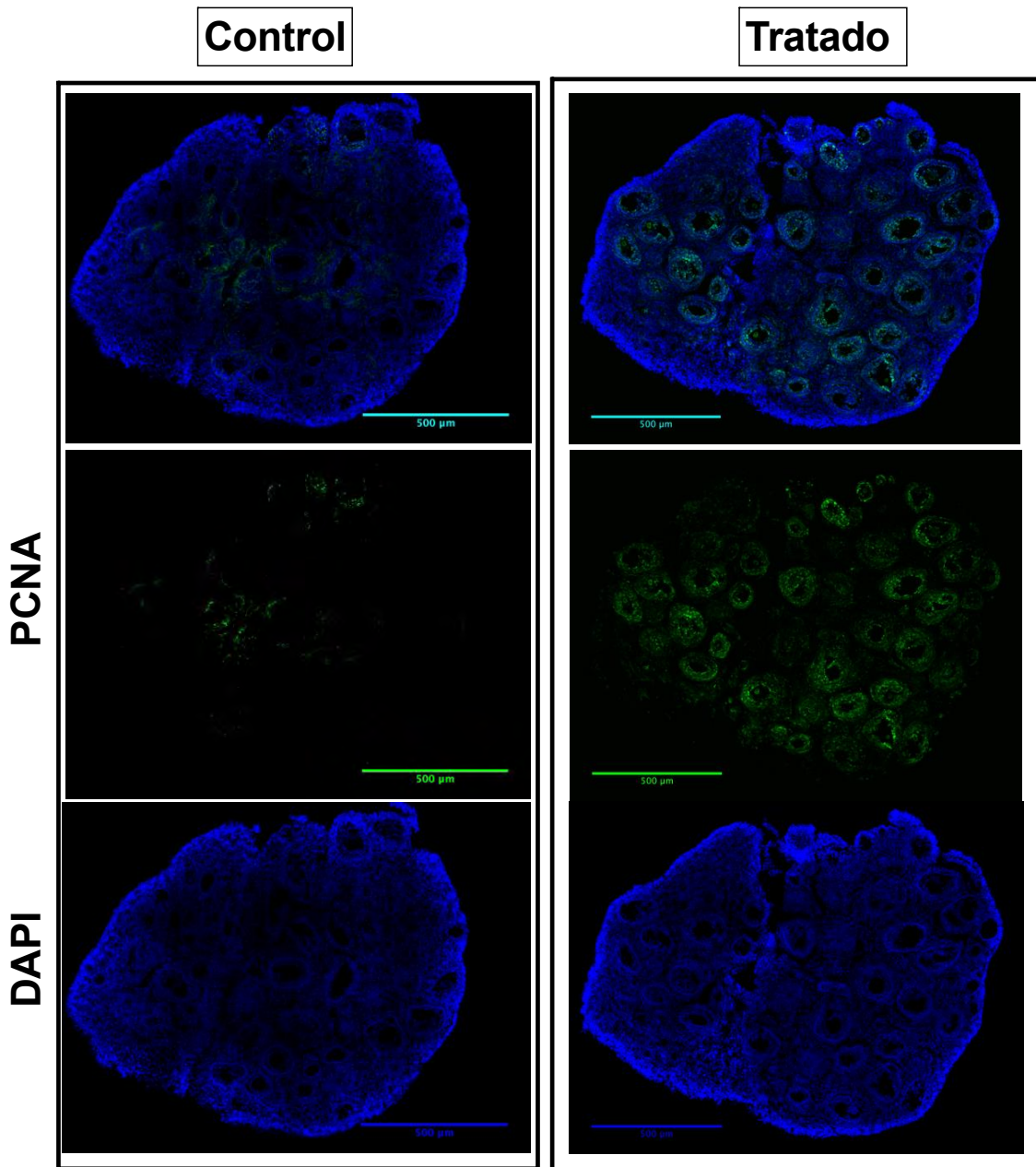


Fig. 7.5. *Detección de PCNA en folículos del ovario de la rata infantil por medio de inmunofluorescencia.* El recuadro superior se presenta la distribución de la población folicular inmunopositiva a PCNA (color verde) y DAPI (color azul). En el panel intermedio solo se presenta la marca de PCNA (verde) por ovario y el panel inferior la presencia de DAPI (azul). La línea denota una longitud de 500 µm. Imagen original de amplificación 20X. Los datos representan tres cortes por ovario de cinco ratas.

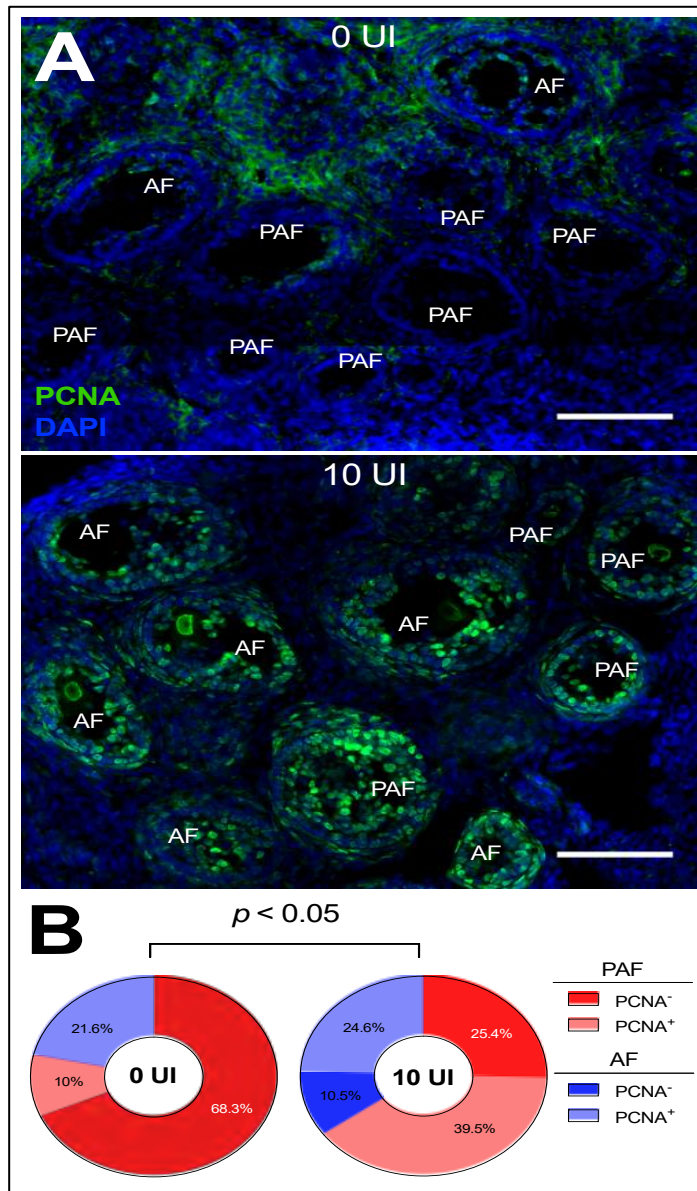


Fig. 7.6. Presencia de PCNA en folículos del ovario de la rata infantil por medio de inmunofluorescencia. En el recuadro A se presenta la población folicular inmunopositiva a PCNA (color verde) que representó al grupo testigo (0UI) y al grupo tratado (10UI). DAPI (color azul). En el panel B se resume el porcentaje de folículos preantrales (PAF) y antrales (AF) que resultaron inmunopositivos a PCNA. $P < 0.05$, representó diferencia entre grupos. La barra en cada imagen indica una longitud de 200 μm . Imagen original de amplificación 20X. Los datos representan tres cortes por ovario de cinco ratas.

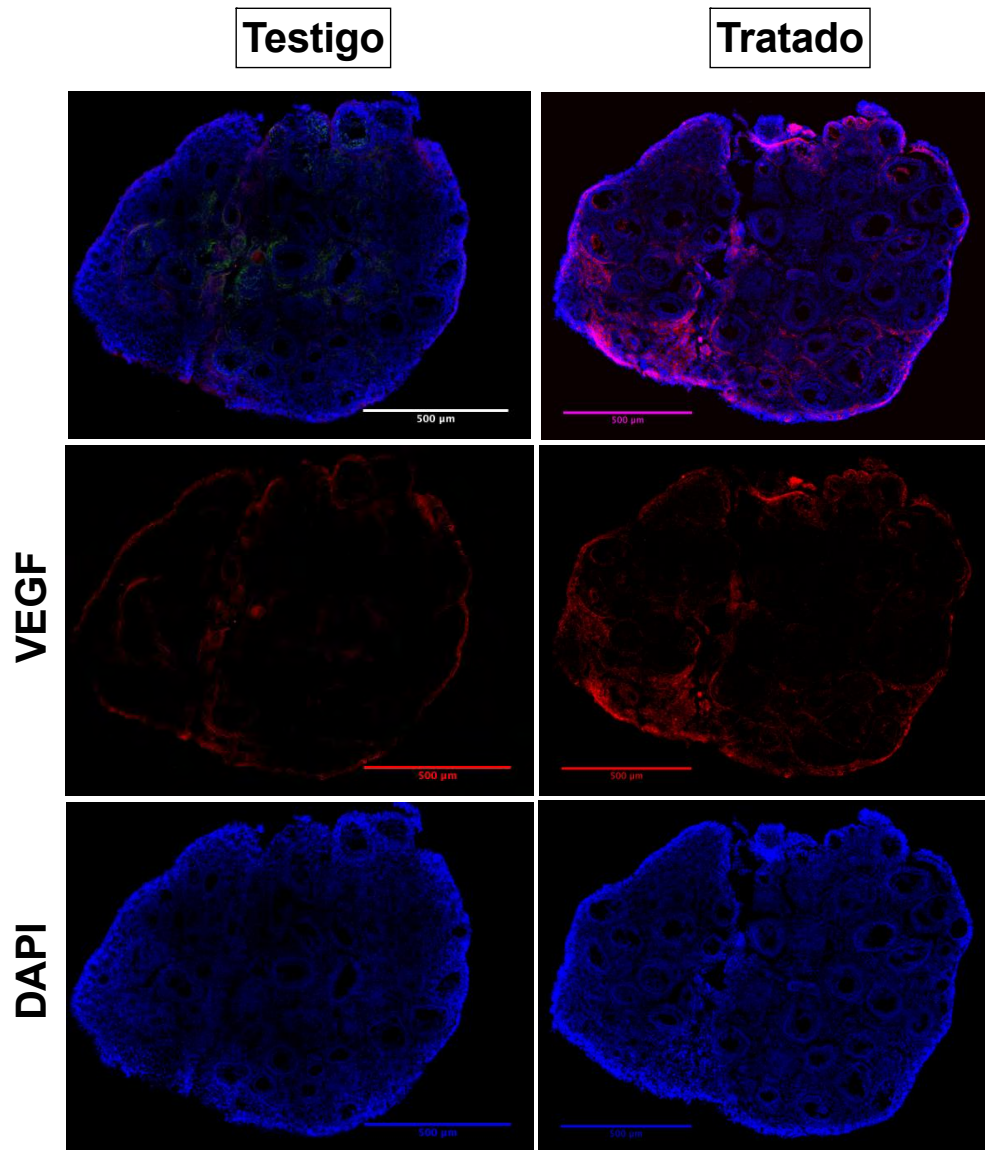


Fig. 7.7 *Detección de VEGF en folículos del ovario de la rata infantil por medio de inmunofluorescencia.* El recuadro superior se presenta la distribución de la población folicular inmunopositiva a VEGF (color rojo) y DAPI (color azul). En el panel intermedio solo se presenta la marca de VEGF (rojo) por ovario y el panel inferior la presencia de DAPI (azul). La línea denota una longitud de 500 µm. Imagen original de amplificación 20X. Los datos representan tres cortes por ovario de cinco ratas.

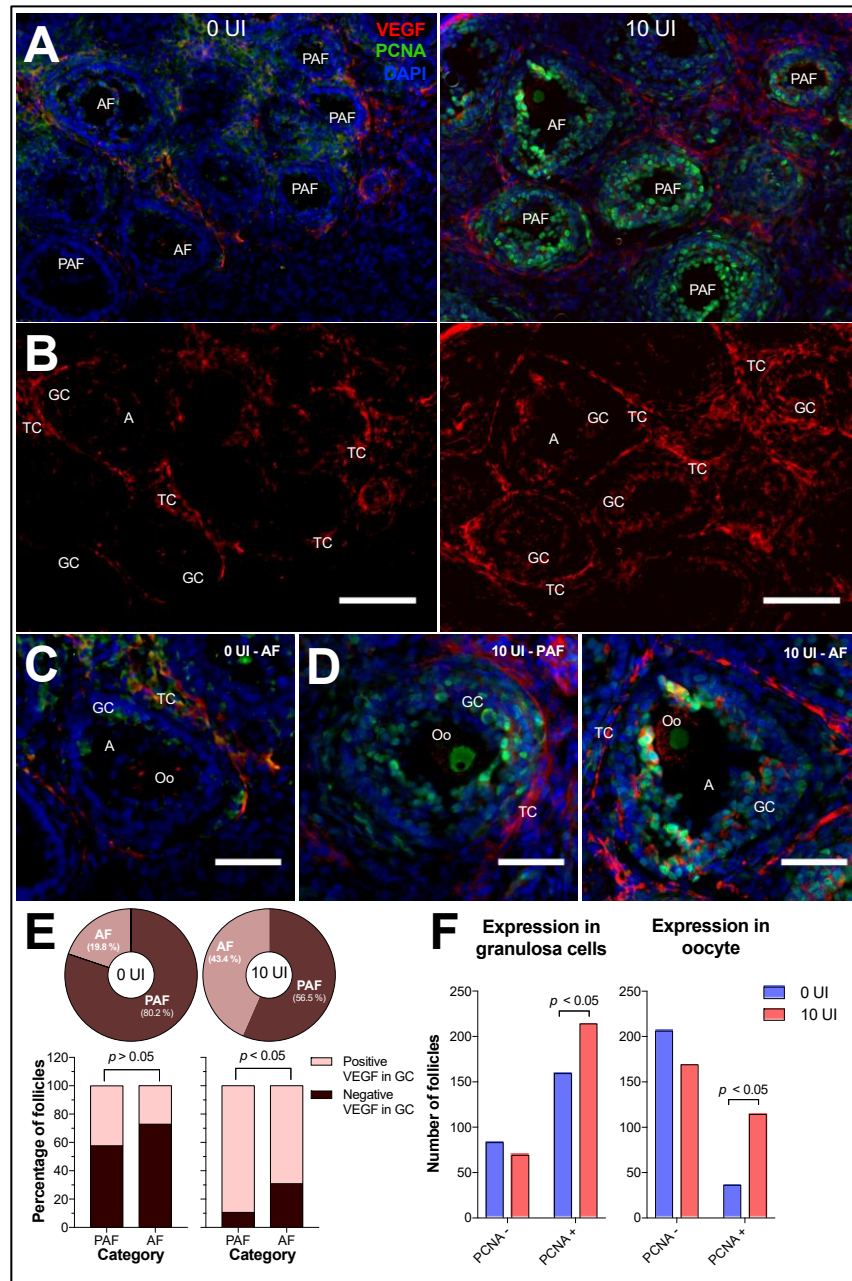


Fig. 7.8. Presencia de VEGF en folículos del ovario de la rata infantil por medio de inmunofluorescencia. En el recuadro A se ejemplifica la ampliación representativa de la población folicular del grupo testigo (0UI) y del grupo tratado (10UI) inmunopositivos a VEGF (color rojo) y DAPI (color azul). En el panel B se muestra únicamente la distribución del inmunomarcaje para VEGF de ambos grupos en folículos preantrales (PAF) y antrales (AF). La imagen del recuadro C y D muestra la colocalización de PCNA y VEGF en folículos preantrales y antrales de cada grupo. El recuadro E, muestra el porcentaje de folículos PAF y AF inmunopositivos a VEGF en las células de la granulosa. La grafica de recuadro F, muestra el número de folículos que expresaron a la proteína PCNA con cada tratamiento. $P < 0.05$ diferencia significativa en tres corte por ovario de cuatro animales por grupo. La barra en cada imagen indica 200 μm . Imagen original de ampliación 20X.

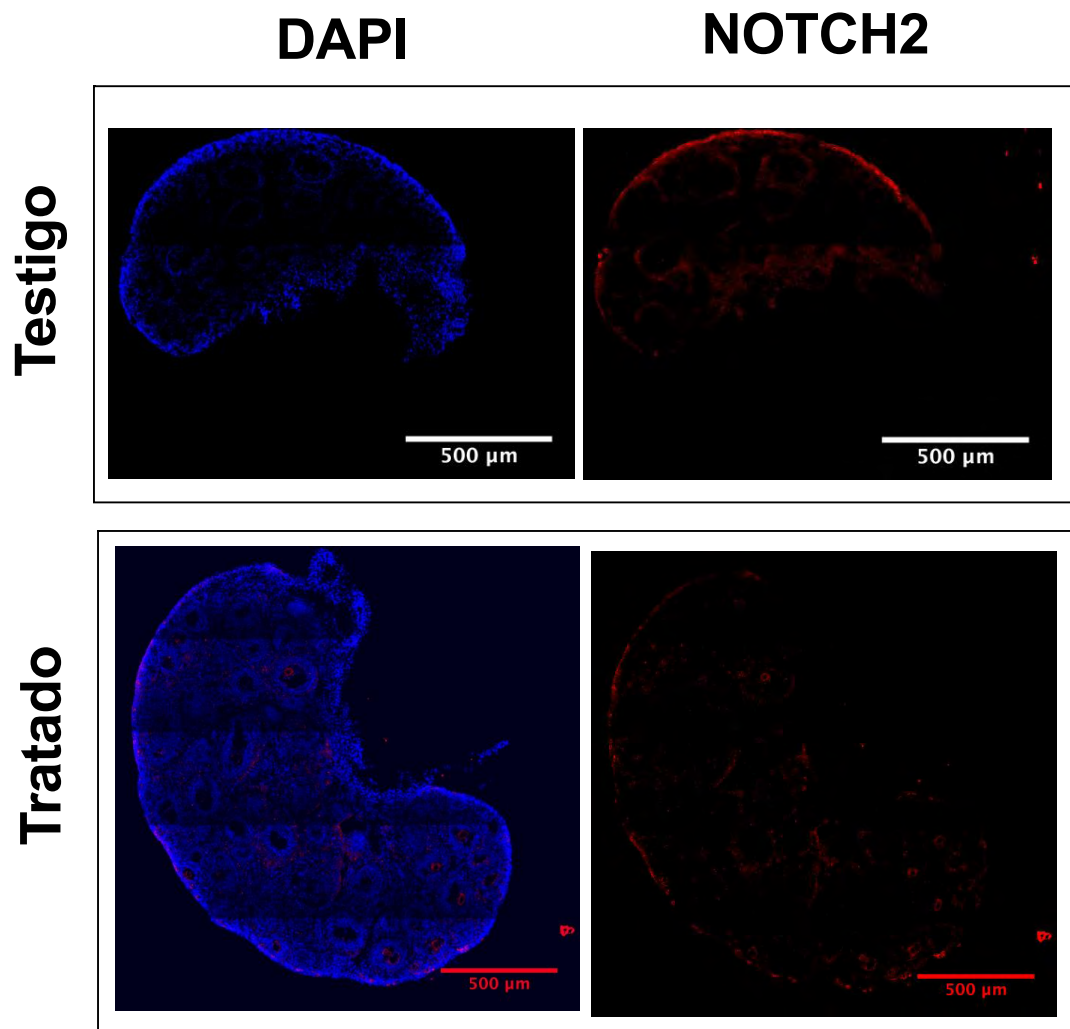


Fig. 7.9. Presencia de *Notch2* en folículos del ovario de la rata infantil por medio de inmunofluorescencia. En el recuadro superior se presenta un corte de ovario del grupo testigo (0UI). En la parte inferior del grupo tratado con 10UI de eCG. La marca roja denota inmunopositividad a *Notch2*. En azul es tinción con DAPI. La barra indica 500 μm . Imagen original de amplificación 20X. Los datos representan tres cortes por ovario de cinco ratas.

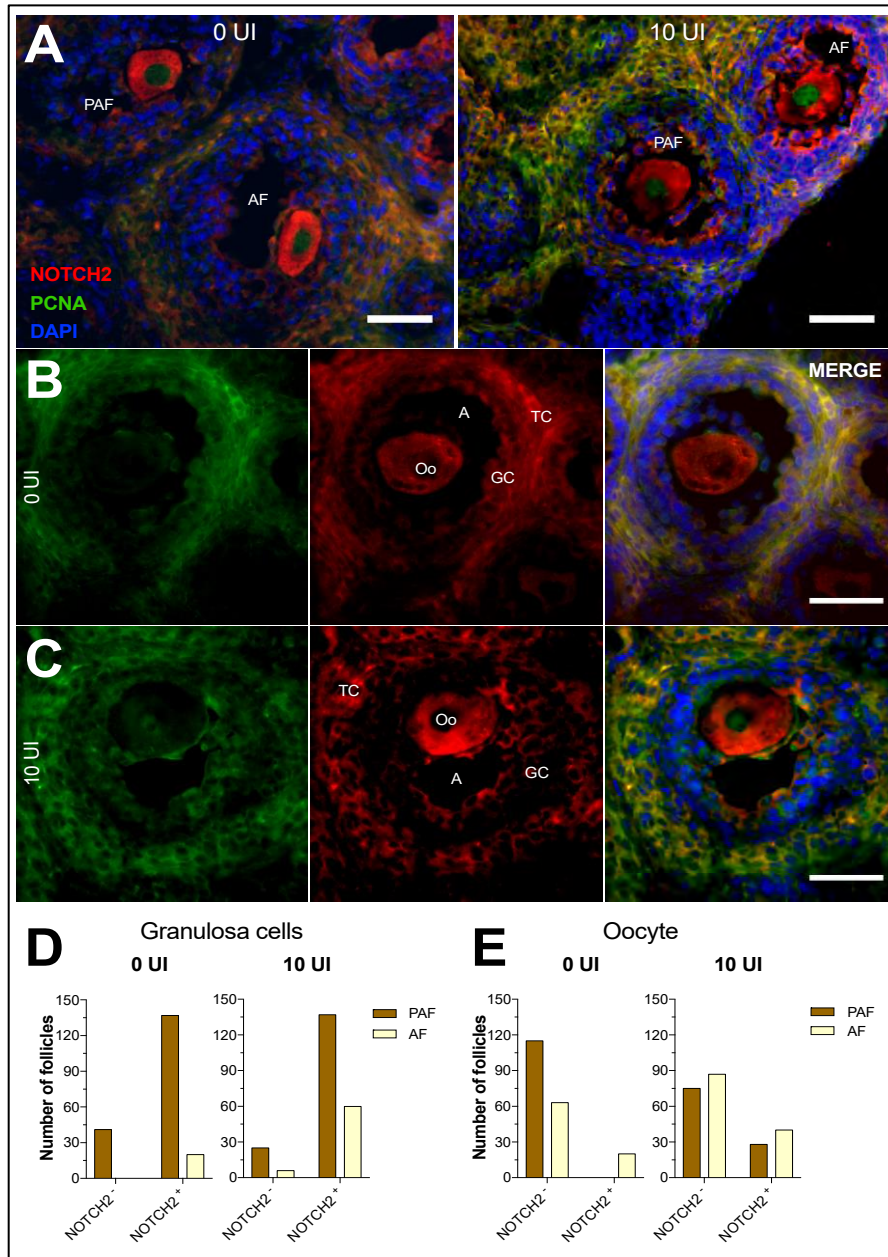


Fig. 7.10. Presencia de Notch2, PCNA y DAPI en folículos del ovario de la rata infantil por medio de inmunofluorescencia. En el recuadro A se muestra el patrón de distribución de la inmunofluorescencia para PCNA, Notch2 y DAPI en folículos preantrales (PAF) y antrales (FA) del grupo testigo (0 UI) y del grupo tratado (10UI). El recuadro B y C se presenta una ampliación de los folículos antrales del grupo testigo y tratado, respectivamente. En cada recuadro se separaron la marca de PCNA (VERDE) y Notoch2 (ROJO). En el recuadro D y E se resume el número de folículos preantrales y antrales inmunopositivos en sus células de la granulosa y en el ovocito. A, antro folicular; TC, células de la teca; GC, células de la granulosa Oo, ovocito. La barra indica una longitud de 200 μ m. Imagen original de ampliación 20X.



Fig. 7.11 *Análisis de correspondencia múltiple*. Muestra el patrón de asociación entre los grupos de tratamiento, las características de los folículos, la concentración de estradiol y la expresión de VEGF, NOTCH y PCNA en células de la granulosa y en el ovocito de los folículos preantrales y antrales de las ratas evaluadas. La categoría de concentración de estradiol en suero se obtuvo a partir de los percentiles 33 y 66% del grupo control (0 UI de eCG). Se dibujaron elipses arbitrarias para asistir la interpretación de los grupos formados por la asociación entre categorías de las variables. La fuerza de asociación entre las variables puede ser fácilmente interpretada en relación a la distancia que separan a dos puntos adyacentes; entre menor es la distancia, mayor la asociación entre variables.

7.5 DISCUSIÓN

Un creciente grupo de resultados entorno al estudio de la foliculogénesis, muestran claramente la participación de factores autócrinos y parácrinos intrafolliculares en la etapa independiente a gonadotropinas, en tanto que durante la fase dependiente están involucrados múltiples factores endocrinos (Orizaka et al., 2013). A diferencia de estas etapas, durante la fase sensible a gonadotropinas, la regulación del crecimiento del folículo preantral en los mamíferos es poco conocida (McGee et al., 2013). Al parecer la disponibilidad de un suministro vascular en esta etapa de desarrollo puede proporcionar señales endocrinas y parácrinas que pueden ser importante durante los primeros estados de crecimiento del folículo (Danforth et al., 2003). Por lo tanto, los resultados de este estudio muestra el efecto de la eCG sobre el desarrollo folicular en el ovario de la rata infantil, asociado a VEGF, PCNA y Notch2 como factores autócrinos o parácrinos involucrados en la foliculogénesis.

Así mismo, durante el desarrollo folicular inducido en el ovario de la rata infantil con eCG se observó una mayor inmuno-presencia del factor de crecimiento del endotelio vascular o VEGF en células de la granulosa (CG), de la teca y en el ovocito de folículos preantrales y antrales. Esta presencia de VEGF en CG y de la teca coincidió con estudios que demostraron que este factor de crecimiento es sintetizado y expresado en este grupo de células (Barboni et al., 2000). Este incremento de VEGF en folículos preantrales y antrales durante el desarrollo folicular inducido, se puede atribuir a un posible papel regulador de las gonadotropinas sobre la síntesis del VEGF intrafollicular. A este respecto evidencias *in vitro* e *in vivo* muestran que la expresión, síntesis y secreción del VEGF en folículos en desarrollo depende en parte de las gonadotropinas; esta síntesis y secreción del VEGF cambia a lo largo de la foliculogénesis, cuando el patrón de secreción de las gonadotropinas es modificado (Schimitzu et al., 2013; Zimmerman et al., 2003).

La presencia de VEGF en las células de la granulosa y de la teca de folículos en transición conlleva a pensar que el incremento de este factor después del tratamiento con eCG favoreció el desarrollo de folículos preantrales a través de mejorar la angiogénesis o la permeabilidad vascular entorno a este grupo de folículos en desarrollo (Greenaway et al., 2004), cambios que en conjunto puedan generar un

impacto en el suplemento vascular del folículo, lo que provee los elementos necesarios como factores autócrinos o parácrinos como los factores de crecimiento, esteroides, gonadotropinas, oxígenos y nutrientes para continuar con el desarrollo. Este incremento de sustancias foliculotrópicas podría resultar en un aumento en la tasa de reclutamiento de folículos antrales o inhibir la atresia folicular. Alternativamente, otras evidencias sugieren que el VEGF puede tener efectos mitógenos directos sobre las células de la granulosa in vitro y podría estimular directamente el crecimiento del folículo en el ovario de rata, o bien activar la sobrevivencia y proliferación de la células de la granulosa, así como un aumento en la permeabilidad vascular (Greenaway et al., 2004). Aunque en este estudio no se analizó el desarrollo vascular entorno al desarrollo folicular, es necesario desarrollo estudios detallados que examinen la evolución temporal de la angiogénesis ovárica, la permeabilidad vascular y crecimiento de los folículos en curso, con lo que se podría ayudar a establecer la relación entre el crecimiento del folículo y la angiogénesis siguiente después de la administración o inhibición del VEGF.

Por otro lado, el efecto directo del VEGF en el ovario (Danforth et al., 2003), su bloqueo durante la foliculogénesis inducida por gonadotropinas (Abramovich et al., 2006), y la inhibición de la acción de su receptor (Wulff, 2001), confirman su participación en el desarrollo de folículos preantrales en el ovario de la rata. Por lo tanto, con este cuerpo de evidencias y la mayor presencia de VEGF en las estructuras foliculares del ovario de la rata infantil después del efecto gonadotrópico, nos hace pensar que la inducción del desarrollo folicular a través de la transición folicular de preantral a un estadio antral depende del VEGF cuya regulación está a cargo de la eCG sobre la síntesis y secreción de este factor de crecimiento. VEGF intrafolicular que puede desencadenar una serie de cambios involucrados en la foliculogénesis.

Aunque no se conoce de forma precisa los mecanismos por los cuales se regula al VEGF en este grupo de folículos uno de los candidatos son las gonadotropinas (Robinson et al., 2009). Al respecto, se sabe que el estradiol es un inductor del crecimiento y desarrollo folicular en la rata (Danforth et al., 2003) y la observación de un incremento significativo en los niveles circulantes de estradiol en la rata infantil después del tratamiento hormonal, niveles que coincidieron con el patrón observado

en ratas prepúberes, nos hace pensar que los estrógenos pueden interferir modulando al elemento de respuesta para el receptor a estradiol presente en el tejido blanco como se ha descrito para el gene para VEGF (Khurana et al., 2004).

En concordancia con el VEGF, el antígeno nuclear de células en proliferación o PCNA, se incrementó significativamente después del tratamiento de la rata infantil con eCG. Esta proteína como indicador de la proliferación celular (Tománek and Chronowska, 2006) que sirve como cofactor de la delta DNA polimerasa en la fase S del ciclo celular y es envuelta en la reparación de DNA durante su síntesis (Bravo et al., 1987), tiene un patrón temporal de expresión, particularmente durante el crecimiento y desarrollo del folículos ováricos, caracterizados por un marcado proceso de proliferación y diferenciación de las células de la granulosa en respuesta a un estímulo gonadotrópico, coincidió al observado en CG y de la teca en esta especie antes de la pubertad. Aunque este patrón resultó similar a las estructuras ováricas de cerdas adultas (Tománek and Chronowska, 2006), en la rata lactante se observó un alto porcentaje de ovocitos inmunopositivos con PCNA en folículos primordiales, posiblemente se atribuye a la especie.

Esta presencia de PCNA en CG de la granulosa y de la teca en folículos preantrales y antrales después de la eCG, posiblemente esté relacionado con el incremento en la tasa de crecimiento, así como a un aumento en la tasa metabólica en aquellos folículos que respondieron a estímulo gonadotrópico, como se ha reportada en la rata y otros mamíferos. En contraste, la presencia de PCNA en el ovocito de este grupo de folículos no se puede relacionar con un mecanismo de proliferación celular ya que el ovocito se encuentra arrestado meioticamente y no existe replicación del DNA, sin embargo, la presencia de PCNA puede estar relacionada como proteína auxiliar de la DNA polimerasa que es envuelta en la reparación del DNA o bien que la DNA polimerasa puede ser activa en ovocitos a reparar el material genético durante el proceso de transcripción (Tománek and Chronowska, 2006).

A diferencia del patrón de VEGF y PCNA, el receptor de membrana Notch2 involucrado en la foliculogénesis (Johnson et al., 2001) y angiogénesis (Vorontchikhina et al., 2005) en la rata; en folículos de ratas infantiles no se modificó. Su presencia en cortes de ovario de rata adulta mediante hibridación in situ (Johnson

et al., 2001) e inmunohistoquímica (Jovanovic et al., 2013) durante el desarrollo folicular y la localización específica de Notch2 en células de la granulosa, células de la teca y el ovocito de folículos preantrales y antrales coincidió con reportes previos, no se observó un cambio en la inmunolocalización con el tratamiento, sin embargo un dato interesante fue la aparición de Notch2 en células de granulosa que rodea al ovocito así como al grupo de células de la granulosa cercanas al antro y células de la granulosa murales en folículos de ratas que recibieron eCG. A este respecto se ha señalado que la aparición del antro folicular conlleva una diferencia morfológica y funcional de ambos tipos de células de la granulosa y cuya diferencia se puede atribuir a la comunicación ovocito-CG en el momento de la transición folicular. La presencia de Notch2 en el ovocito de folículos preantrales y antrales puede ser un indicativo de calidad folicular dado que folículos con baja respuesta a LH no contienen Notch2 (Tanriverdi et al., 2013).

7.6 CONCLUSIÓN

Se cuenta con un modelo biológico in vivo que permite el estudio y análisis de la transición de folículo preantral a antral durante la fase sensible a gonadotropinas, cuyo análisis multivariado reveló que existe una asociación entre el efecto gonadotrópico, la inmunolocalización de VEGF, Notch2 y PCNA y el incremento de los niveles circulantes de estradiol.

8. DISCUSIÓN

Los resultados entorno al desarrollo folicular indican en su fase dependiente e independiente de gonadotropinas una participación activa de factores autócrinos, parácrinos y endocrinos (Orizaka et al., 2013). Asociado a estos factores, la disponibilidad de un suministro vascular en cada etapa garantiza la continuidad de la foliculogénesis (Danforth et al., 2003). Aunque se cuenta con esta información, el desarrollo folicular en su fase sensible a gonadotropinas, etapa que abarca la transición del folículo preantral a un estadio antral, el o los factores que la regulan no son del todo conocidos (McGee et al., 2013).

Dentro de los factores propuestos se encuentran el VEGF y miembros de la vía de señalización Notch regulando la angiogénesis folicular (Dimitris et al., 2013). Si bien estas vías de señalización se han localizado en estructuras de folículos preantrales y antrales, su asociación durante el desarrollo de folículo preantral a un estadio antral no se ha descrito. Con base en ello y tratando de generar nueva información entorno a la fase sensible de la foliculogénesis, el presente trabajo de tesis demostró con sus resultados y por medio del análisis multivariado una asociación significativa entre VEGF, Notch2 y el patrón circulante de estradiol durante la foliculogénesis inducida en la rata infantil.

Aunque está bien documentada a la rata prepúber (21 a 25 días de edad) pre-sensibilizada con eCG como el modelo útil para el estudio de la foliculogénesis (Danforth et al., 2003; Abramovich et al., 2009), este modelo cuenta con varias desventajas, por ejemplo, 1) el ovario en este periodo cuenta con una población folicular heterogénea (Picut et al., 2013), lo que resulta difícil para un análisis específico de transición folicular y 2) los niveles de FSH y LH endógenos a esta edad se encuentran elevados, posiblemente enmascaren la respuesta inducida por la eCG. Por lo tanto, y como se discutió en el capítulo 6 de este trabajo de tesis, fue necesario el desarrollo del modelo del ovario de la rata infantil. El análisis histológico del ovario después de la administración de eCG, resultó en la inducción del desarrollo folicular

con una disminución de folículos preantrales concomitantemente un aumento de folículos antrales, resultado que se interpretó como un cambio en la transición folicular. Con base en ello el modelo desarrollado permitió el estudio específico de la segunda fase de la foliculogénesis.

El mayor patrón de inmunolocalización de VEGF se evidenció en folículos antrales y preantrales de animales que recibieron eCG, nos indicó un posible papel regulador de las gonadotropinas sobre la síntesis del VEGF intrafolicular (Schimitzu et al., 2013; Zimmerman et al., 2003). Así mismo, con el incremento de VEGF en este grupo de células de folículos en transición se presentó una mayor presencia de PCNA como un indicio de un incremento en la tasa de crecimiento celular, así como a un aumento en la tasa metabólica en aquellos folículos que respondieron a estímulo gonadotrópico (Greenaway et al., 2004). Aunque en este estudio no se realizó un estudio sobre la angiogénesis folicular la presencia de una mayor tasa de secreción del VEGF esté involucrado sobre el suplemento vascular del folículo, lo que favoreció el inicio de la transición folicular.

A diferencia del patrón de VEGF y PCNA, el receptor de membrana Notch2 involucrado en la foliculogénesis (Johnson et al., 2001) y angiogénesis (Vorontchikhina et al., 2005) folicular en la rata no se modificó en estructuras del ovario de la rata infantil después del estímulo gonadotrópico. Sin embargo, su presencia coincidió a lo descrito en cortes de ovario de rata adulta mediante hibridación *in situ* (Johnson et al., 2001) e inmunohistoquímica (Jovanovic 2013).

Finalmente, la presencia de PCNA en el ovocito de este grupo de folículos no se puede relacionar con un mecanismo de proliferación celular ya que el ovocito se encuentra arrestado meioticamente y no existe replicación del DNA, sin embargo, la presencia de PCNA puede estar relacionada como proteína auxiliar de la DNA polimerasa que es envuelta en la reparación del DNA o bien que la DNA polimerasa puede ser activa en ovocitos a reparar el material genético durante el proceso de transcripción (Tománek and Chronowska, 2006). Aunado a ello, la aparición de

Notch2 en células de granulosa que rodea al ovocito así como al grupo de células de la granulosa cercanas al antro y células de la granulosa murales en folículos de ratas que recibieron eCG, hace pensar en una comunicación ovocito-CG y CG-CG en el momento de la transición folicular que favorezca la aparición del antro y/o la presencia de Notch2 en el ovocito de folículos preantrales y antrales puede ser un indicativo de calidad folicular dado que folículos con baja respuesta a LH no contienen Notch2 (Tanriverdi et al., 2013).

Aunque se cuenta con esta serie de resultados que confirman la asociación entre ambas vías de señalización es necesario el desarrollo de estudios que nos permitan establecer la funcionalidad de cada una de las vías en esta etapa de estudio con relación al desarrollo vascular, para examinar la evolución temporal de la angiogénesis ovárica, la permeabilidad vascular y crecimiento de los folículos en curso, con lo que se podría ayudar a establecer la relación entre el crecimiento del folículo, la angiogénesis y su regulación con VEGF y vía Notch.

Por lo tanto, con este cuerpo de evidencias que indican una mayor presencia de VEGF en las estructuras foliculares del ovario de la rata infantil después del efecto gonadotrópico, nos hace pensar en una inducción del desarrollo folicular dependiente de gonadotropinas, regulando la síntesis y secreción de VEGF y que el VEGF intrafolicular que puede desencadenar una serie de cambios involucrados en la foliculogénesis.

9. CONCLUSIÓN

El presente estudio demostró la asociación entre la inmunolocalización de VEGF, Notch2, la proliferación y la presencia de cavidad antral, lo que nos sugiere que VEGF y Notch2, desempeñan un papel funcional durante el proceso de transición de preantral antral en el ovario de la rata infantil. Sugerimos que a pesar de las diferencias entre la fisiología del ovario de una rata infantil y una adulta, esta misma acción se podría llevar a cabo en ratas adultas, e inclusive en otras especies de mamíferos. Se requieren otros estudios sobre la comunicación entre los ovocitos y las demás células foliculares, a fin de comprender mejor los mecanismos de interacción y su participación en la transición preantral-antral.

10. REFERENCIAS

Abramovich, D., Parborell, F., Tesone, M., 2006. Effect of a vascular endothelial growth factor (VEGF) inhibitory treatment on the folliculogenesis and ovarian apoptosis in gonadotropin-treated prepubertal rats. *Biol Reprod.* 75(3):434-41.

Abulafia, O., Sherer D.M., 2000. Angiogenesis of the ovary. *Am J Obstet. Gynecol.* 1 (1):240-246.

Acosta, T.J., Hayashi, K.G., Ohtani, M., Miyamoto, A., 2003. Local changes in blood flow within the preovulatory follicle wall and early corpus luteum in cows. *Reproduction*; 125:759-767.

Akiyama, I., Yoshino, O., Osuga, Y., Shi, J., Harada, M., Koga, K., Hirota, Y., Hirata, T., Fujii, T., Saito, S., Kozuma, S., 2014. Bone morphogenetic protein 7 increased vascular endothelial growth factor (VEGF)-a expression in human granulosa cells and VEGF receptor expression in endothelial cells. *Reprod. Sci.* 21(4):477-82.

Allen, W.R., Wilsher, S., 2009. A review of implantation and early placentation in the mare. *Placenta* 30(12):1005-15.

Barboni, B., Turriani, M., Galeati, G., Spinaci, M., Bacci, M.L., Forni, M., Mattioli, M., 2000. Vascular endothelial growth factor production in growing pig antral follicles. *Biol Reprod.* 63(3):858-64.

Berisha, B., Schams, D., Kosmann, M., Amselgruber, W., Einspanier, R., 2000. Expression and tissue concentration of vascular endothelial growth factor, its receptors, and localization in the bovine corpus luteum during estrous cycle and pregnancy. *Biol Reprod*; 63:1106-1114.

Berisha, B., Steffl, M., Welter, H., Kliem, H., Meyer, H.H., Schams, D., Amselgruber, W., 2008. Effect of the luteinising hormone surge on regulation of vascular endothelial growth factor and extracellular matrix-degrading proteinases and their inhibitors in bovine follicles. *Reprod Fertil Dev.* 20(2):258-68.

Bonnet, A., Cabau, C., Bouchez, O., Sarry, J., Marsaud, N., Foissac, S., Woloszyn, F., Mulsant, P., Mandon-Pepin, B., 2013. An overview of gene expression dynamics during early ovarian folliculogenesis: specificity of follicular compartments and bi-directional dialog. *BMC Genomics.*

Bousfield, G.R., Butnev, V.Y., Butnev, V.Y., 2001. Identification of twelve O-glycosylation sites in equine chorionic gonadotropin beta and equine luteinizing hormone ss by solid-phase Edman degradation. *Biol Reprod.* 64(1):136-47.

Bravo, R., Frank, R., Blundell P.A., Macdonald-Bravo H., 1987. Cyclin/PCNA is the auxiliary protein of DNA polymerase-delta. *Nature* 326, 515-517.

Braw, R.H., Tsafiri, A., 1980. Effect of PMSG on follicular atresia in the immature rat ovary. *J Reprod Fertil.* Jul; 59(2):267-72.

Bray, S.J., 2016. Notch signalling in context. *Nat Rev Mol Cell Biol.* 17(11):722-735.

Bruno, J.B., Lima-Verde, I.B., Celestino, J.J., Lima, L.F., Matos, M.H., Faustino, L.R., Donato, M.A., Peixoto, C.A., Campello, C.C., Silva, J.R., Figueiredo, J.R., 2016. Expression of angiotensin II receptors in the caprine ovary and improvement of follicular viability *in vitro*. *Zygote.* 24(4):568-77.

Carmeliet, P., 2000. VEGF gene therapy: stimulating angiogenesis or angioma-genesis? *Nat Med.* 6(10):1102-3.

Celik-Ozenci C., Akkoyunlu, G., Kayisli, U.A., Arici, A., Demir, R., 2003. Localization of vascular endothelial growth factor in the zona pellucida of developing ovarian follicles in the rat: a possible role in destiny of follicles. *Histochem Cell Biol.* 120(5):383-90.

Christenson, L.K., Stouffer, R.L., 1997. Follicle-stimulating hormone and luteinizing hormone/chorionic gonadotropin stimulation of vascular endothelial growth factor production by macaque granulosa cells from pre- and periovulatory follicles. *J Clin Endocrinol Metab.* 82(7):2135-42.

Chowdhury, M.W., Scaramuzzi, R.J., Wheeler-Jones, C.P., Khalid, M., 2010. The expression of angiogenic growth factors and their receptors in ovarian follicles throughout the estrous cycle in the ewe. *Theriogenology.* 73(7):856-72.

Craig, J., Orisaka, M., Wang, H., Orisaka, S., Thompson, W., Zhu, C., Kotsuji, F., Tsang, B.K., 2007. Gonadotropin and intra-ovarian signals regulating follicle development and atresia: the delicate balance between life and death. *Front Biosci.* 12:3628-39.

Dahl, K.D., Jia, X.C., Hsueh, J.W., 1988. Bioactive follicle-stimulating hormone levels in serum and urine of male and female rats from birth to prepubertal period. *Biol Reprod.* 39(1):32-8.

Danforth, D.R., Arbogast, L.K., Ghosh, S., Dickerman, A., Rofagha, R., Friedman, C., 2003. Vascular endothelial growth factor stimulates preantral follicle growth in the rat ovary. *Biol Reprod.* 68(5):1736-41.

Dimitris, A., Funahashi, Y., Kadenhe-Chiweshe, A., Shawber, C.J., Kitajewski, J.K., Kandel, J., Yamashiro, D. J., 2013. Notch and VEGF pathways play distinct but complementary roles in tumor angiogenesis. *Vascular Cell* 5:17.

Douglas, W.L., Jeffrey, M.I., 2001. Estrogen and Angiogenesis: A Review. *Arteriosclerosis Thrombosis and Vascular Biology* 21(1):6-12.

Feranil, J., Isobe, N., Nakao, T., 2005. Apoptosis in the antral follicles of swamp buffalo and cattle ovary: TUNEL and caspase-3 histochemistry. *Reprod Domest Anim* 40:111-116.

Ferrara, N., Henzel, W.J., 1989. Pituitary follicular cells secrete a novel heparin-binding growth factor specific for vascular endothelial cells. *Biochem Biophys Res Commun.*161:851-858.

Ferrara, N., Davis-Smyth, T., 1997. The biology of vascular endothelial growth factor. *Endocr Rev*; 18:4-25.

Ferrara, N., 2001. Role of vascular endothelial growth factor in regulation of physiological angiogenesis. *Am J Physiol Cell Physiol*; 280:1358-1366.

Ferrara, N., 2004. Vascular Endothelial Growth Factor: Basic Science and Clinical Progress. *Endocrine Reviews*; 25:581-611.

Fortune, J.E., 2003. The early stages of follicular development: activation of primordial follicles and growth of preantral follicles. *Anim Reprod Sci.* Oct 15; 78(3-4):135-63.

Fraser, H.M., Wilson, H., Wulff, C., Rudge, J.S., Wiegand, S.J., 2006. Administration of vascular endothelial growth factor Trap during the 'post-angiogenic' period of the luteal phase causes rapid functional luteolysis and selective endothelial cell death in the marmoset. *Reproduction* 132:589-600.

Fraser, H.M., Lunn, S.F., 2001. Regulation and manipulation of angiogenesis in the primate corpus luteum. *Reproduction*; 121:355-362.

Fraser, H.M., Wulff, C., 2003. Angiogenesis in the corpus luteum. *Reprod Biol Endocrinol*; 10:1:88.

Galas, J., Słomczyńska, M., Knapczyk-Stwora, K., Durlej, M., Starowicz, A., Tabarowski, Z., Rutka, K., Szołtys, M., 2012. Steroid levels and the spatiotemporal expression of steroidogenic enzymes and androgen receptor in developing ovaries of immature rats. *Acta Histochemica* 114(3):207-216.

Garrido, C., Saule, S., Gospodarowicz, D., 1993. Transcriptional regulation of vascular endothelial growth factor gene expression in ovarian bovine granulosa cells. *Growth Factors.* 8(2):109-17.

Gougeon, A., 2004. Dynamics for human growth: Morphologic, Dynamic and Functional Aspects. *The Ovary.* Elsevier. 2003. Chap 2 pp 25-30.

Gridley, T., 2010. Notch signaling in the vasculature. *Curr Top Dev Biol.* 92:277-309.

Griffin, J., Emery, B. R., Huang, I., Peterson, C.M., and Douglas T., 2006. Comparative analysis of follicle morphology and oocyte diameter in four mammalian species (mouse, hamster, pig, and human). *J Exp Clin Assist Reprod.*; 3: 2.

Greenaway, J., Connor, K., Pedersen, H., Coomber, B., Lamarre, J., Petrik, J., 2004. Vascular endothelial growth factor and its receptor, Flk-1/KDR, are cytoprotective in the extravascular compartment of the ovarian follicle. *Endocrinology*;145:2896-2905.

Hazzard, T.M., Molskness, T.A., Chaffin, C.L., Stouffer, R.L., 1999. Vascular endothelial growth factor (VEGF) and angiopoietin regulation by gonadotrophin and steroids in macaque granulosa cells during the peri-ovulatory interval. *Mol Hum Reprod*.5(12):1115-21.

Hellström, M., Gerhardt, H., Kalén, M., Li, X., Eriksson, U., Wolburg, H., Betsholtz, C., 2001. Lack of pericytes leads to endothelial hyperplasia and abnormal vascular morphogenesis. *J Cell Biol*; 153:543-553.

Hernández, S.F., 2012. Regulación de la luteólisis funcional y estructural. Rol de la esfingosina 1-fosfato (S1P) y del sistema Notch. Facultad de Ciencias Exactas y Naturales. Universidad de Buenos Aires. TESIS.

Hernández, S.L., Banerjee, D., Garcia, A., Kangsamaksin, T., Cheng, W.Y., Anastassiou, D., Funahashi, Y., Kadenhe-Chiweshe, A., Shawber, C.J., Kitajewski, J.K., Kandel, J.J., Yamashiro, D.J., 2013. Notch and VEGF pathways play distinct but complementary roles in tumor angiogenesis. *Vasc Cell*. 2013 Sep 25; 5(1):17.

Hirshfield, A.N., Midgley, A.R. Jr., 1978. Morphometric analysis of follicular development in the rat. *Biol Reprod*. Oct; 19(3):597-605.

Hunter, M.G., Robinson, R.S., Mann, G.E., Webb, R., 2004. Endocrine and paracrine control of follicular development and ovulation rate in farm species. *Anim Reprod Sci*. Jul; 82-83:461-77.

Irusta, G., 2008. Mecanismos involucrados en la atresia del folículo ovárico: relación entre esteroidogénesis, angiogénesis y apoptosis. Facultad de Ciencias Exactas y Naturales. Universidad de Buenos Aires. TESIS.

Johnson, J., Espinoza, T., McGaughey, R. W. Rawls, A., 2001. Notch pathway genes are expressed in mammalian ovarian follicles. *Mech Dev* 109: 355-361.

Johnson, M.L., Redmer, D.A., Reynolds, L.P., 2001. Gap junctional intercellular communication of bovine granulosa and thecal cells from antral follicles: Effects of luteinizing hormone and follicle-stimulating hormone *Endocr*. 18: 261

Jovanovic, V.P., Sauer, C.M., Shawber, C.J., Gomez, R., Wang, X., Sauer, M.V., Kitajewski, J., Zimmermann, R.C., 2013. Intraovarian regulation of gonadotropin-dependent folliculogenesis depends on notch receptor signaling pathways not involving Delta-like ligand 4 (Dll4). *Reprod. Biol. Endocrinol* 11: 1-43.

Khurana, R., Shafi, S., Martin, J., Zachary, I., 2004. Vascular endothelial growth factor gene transfer inhibits neointimal macrophage accumulation in hypercholesterolemic rabbits. *Arterioscler Thromb Vasc Biol.* 24(6):1074-80.

Kaczmarek, M.M., Schams, D., Ziecik, A.J., 2005. Role of vascular endothelial growth factor in ovarian physiology—an overview. *Reprod Biol*; 5:111–136.

Kaczmarek, M.M., Kiewisz, J., Schams, D., Ziecik, A.J., 2009. Expression of VEGF–receptor system in conceptus during peri–implantation period and endometrial and luteal expression of soluble VEGFR–1 in the pig. *Theriogenology* 71:1298–306.

Kumar, T.R., Wang, Y., Lu, N., Matzuk, M.M., 1997. Follicle stimulating hormone is required for ovarian follicle maturation but not male fertility. *Nat Genet.* 15(2):201-4.

Lecompte, F., Harbeby, E., Cahoreau, C., Klett, D., Combarous, Y., 2010. Use of the immature rat uterotrophic assay for specific measurements of chorionic gonadotropins and follicle-stimulating hormones in vivo bioactivities. *Theriogenology* 74(5):756-64.

Legardinier, S., Cahoreau, C., Klett, D., Combarous, Y., 2005. Involvement of equine chorionic gonadotropin (eCG) carbohydrate side chains in its bioactivity; lessons from recombinant hormone expressed in insect cells. *Reprod Nutr* 45(3):255-9.

Li, Z., Liu, S., Cai, Y., 2014. Differential Notch activity is required for homeostasis of malpighian tubules in adult *Drosophila*. *J Genet Genomics.* Dec 20; 41(12):649-52.

Li, D., Masiero, M., Banham, A.H., Harris, A.L., 2014. The Notch Ligand Jagged1 as a Target for Anti-Tumor Therapy. *Front Oncol.* 4: 254.

Marcondes, F. K., Bianchi, F. J., Tanno, A. P., 2002. Determination of the estrous cycle phases or rats: some helpful considerations. *Braz. J. Biol.* vol.62 no.4a São Carlos Nov.

Martelli, A., Bernabò, N., Berardinelli, P., Russo, V., Rinaldi, C., Di Giacinto, O., Mauro, A., Barboni, B., 2009. Vascular supply as a discriminating factor for pig preantral follicle selection. *Reproduction*; 137(1):45-58.

Martelli, A., Berardinelli, P., Russo, V., Mauro, A., Bernabò, N., Gioia, L., Mattioli, M., Barboni, B., 2006. Spatio-temporal analysis of vascular endothelial growth factor expression and blood vessel remodeling in pig ovarian follicles during the periovulatory period. *J Mol Endocrinol*; 36:107–119.

McGee, E.A., Perlas, E., LaPolt, P.S., Tsafiriri, A., Hsueh, A. J., 1997. Follicle-stimulating hormone enhances the development of preantral follicles in juvenile rats. *Biol Reprod.* 57(5):990-8.

McGee, E.A., Hsueh, A.J., 2000. Initial and cyclic recruitment of ovarian follicles. *Endocr Rev.* Apr; 21(2):200-14.

McNatty, K.P., Reader, K., Smith, P., Heath, D.A., Juengel, J.L., 2007. Control of ovarian follicular development to the gonadotrophin-dependent phase: a 2006 perspective. *Soc Reprod Fertil Suppl.*64:55-68.

Meijs-Roelofs, H.M., Kramer, P., Van Cappellen, W.A., Van Leeuwen, E.C., 1990. Effects of a luteinizing hormone-releasing hormone antagonist in late-juvenile female rats: blockade of follicle growth and delay of first ovulation following suppression of gonadotropin concentrations. *Biol Reprod.* 43(4):607-13.

Monget, P., Bobe, J., Gougeon, A., Fabre, S., Monniaux, D., Dalbies-Tran, R., 2012. The ovarian reserve in mammals: a functional and evolutionary perspective. *Molecular and Cellular Endocrinology* 356 2–12.

Moor, R.M., Seamark, R.F., 1986. Cell signaling, permeability, and microvasculatory changes during antral follicle development in mammals. *J Dairy Sci.* 69(3):927-43.

Nishimura, S., Maeno, N., Matsuo, K., Nakajima, T., Kitajima, I., Saito, H., Maruyama, I., 2002. Human lactiferous mammary gland cells produce vascular endothelial growth factor (VEGF) and express the VEGF receptors, Flt-1 AND KDR/Flk-1. *Cytokine.* 18(4):191-8.

NOM-062-ZOO-1999. Norma Oficial Mexicana, Especificaciones técnicas para la producción, cuidado y uso de los animales de laboratorio. Secretaría de Agricultura, Ganadería, Desarrollo Rural, Pesca y Alimentación. Estados Unidos Mexicanos.

Oktay, K., Schenken, R.S., Nelson, J.F., 1995. Proliferating cell nuclear antigen marks the initiation of follicular growth in the rat. *Biol Reprod.* 53(2):295-301.

Orisaka, M., Tajima, K., Tsang, B.K., Kotsuji, F., 2009. Oocyte-granulosa-theca cell interactions during preantral follicular development. *J Ovarian Res.* 2(1):9.

Orisaka, M., Hattori, K., Fukuda, S., Mizutani, T., Miyamoto, K., Sato, T., Tsang, B.K., Kotsuji, F., Yoshida, Y., 2013. Dysregulation of ovarian follicular development in female rat: LH decreases FSH sensitivity during preantral-early antral transition. *Endocrinology.* 154(8):2870-80.

Perera, Marín, Gerardo; Falcón, Alcántara, Andrés; Murcia, Mejía, Clara; Hernández, Cerón, Joel; González, Padilla, Everardo., 2004. Purificación de cinco isoformas de la hormona

luteinizante bovina (bLH). Caracterización fisicoquímica, biológica e inmunológica. *Veterinaria México*, 129-145.

Picut, C.A., Dixon, D., Simons, M.L., Stump, D.G., Parker, G.A., Remick, A.K., 2015. Postnatal ovary development in the rat: morphologic study and correlation of morphology to neuroendocrine parameters. *Toxicol Pathol.* 43(3):343-53.

Prizant, H., Gleicher, N., Sen, A., 2014. Androgen actions in the ovary: balance is key. *J Endocrinol.* 222(3):R141-51.

Redmer, D.A., Doraiswamy, V., Bortnem, B.J., Fisher, K., Jablonka-Shariff, A., Grazul-Bilska, A.T., Reynolds, L.P., 2001. Evidence for a role of capillary pericytes in vascular growth of the developing ovine corpus luteum. *Biol Reprod*; 65:879-889.

Redmer, D.A., Dai, Y., Li, J., Charnock-Jones, D.S., Smith, S.K., Reynolds, L.P., Moor, R.M., 1996. Characterization and expression of vascular endothelial growth factor (VEGF) in the ovine corpus luteum. *J Reprod Fertil*; 108:157-165.

Reynolds, L.P., Redmer, D.A., 1998. Expression of the angiogenic factors, basic fibroblast growth factor and vascular endothelial growth factor, in the ovary. *J Anim Sci*; 76:1671-1681.

Richards, J. S., 2001. Perspective: The ovarian follicle—a perspective in 2001. *Endocrinology* 142, 2184-2193.

Risau, W., 1997. Mechanisms of angiogenesis. *Nature* 386(6626):671-4.

Robinson, R.S., Woad, K.J., Hammond, A.J., Laird, M., Hunter, M.G., Mann, G.E., 2009. Angiogenesis and vascular function in the ovary. *Reproduction* 138(6):869-81.

Roca, C., Adams, R.H., 2007. Regulation of vascular morphogenesis by Notch signaling. *Genes Dev.* 21(20):2511-24.

Rosales, A.M., Guzmán, A., 2008. Apoptosis in follicular atresia and luteal regression. Review. *Téc Pecu Méx*; 46:159-182.

Rosales-Torres, A.M., Alonso, I., Vergara, M., Romano, M.C., Castillo-Juárez, H., Ávalos, A., Rosado, A., Gutiérrez, C.G., 2010. Vascular endothelial growth factor isoforms 120, 164 and 205 are reduced with atresia in ovarian follicles of sheep. *Anim Reprod Sci*; 122:111-117.

Schnell, S.A., Staines, W.A., Wessendorf, M.W., 1999. Reduction of lipofuscin-like autofluorescence in fluorescently labeled tissue. *J Histochem Cytochem.* 47(6):719-30.

Sharma, R.K., Balaiya, S., Chalam, K.V., 2010. Bevacizumab suppression of establishment of micrometastases in experimental ocular melanoma. *Invest Ophthalmol Vis Sci.* 51(12):6906.

Shimizu, T., Miyamoto, A., 2007. Progesterone induces the expression of vascular endothelial growth factor (VEGF) 120 and Flk-1, its receptor, in bovine granulosa cells. *Anim Reprod Sci* 102:228–237.

Shimizu, T., Jayawardana, B.C., Tetsuka, M., Miyamoto, A., 2007. Differential effect of follicle-stimulating hormone and estradiol on expressions of vascular endothelial growth factor (VEGF) 120, VEGF164 and their receptors in bovine granulosa cells. *J Reprod Dev* 53:105–112.

Shimizu, T., Iijima, K., Ogawa, Y., Miyazaki, H., Sasada, H., Sato, E., 2008. Gene injections of vascular endothelial growth factor and growth differentiation factor-9 stimulate ovarian follicular development in immature female rats. *Fertil Steril* 89(Suppl 5):1563–1570.

Shimizu, T., Iijima, K., Miyabayashi, K., Ogawa, Y., Miyazaki, H., Sasada, H., Sato, E., 2007. Effect of direct ovarian injection of vascular endothelial growth factor gene fragments on follicular development in immature female rats. *Reproduction*; 134:677–682.

Shimizu, T., Iijima, K., Miyabayashi, K., Ogawa, Y., Miyazaki, H., Sasada, H., Sato, E., 2003. Induction of follicular development by direct single injection of vascular endothelial growth factor gene fragments into the ovary of miniature gilts. *Biol Reprod* 69:1388–1393.

Shimizu, T., Sato, E., 2005. Manipulation of ovarian follicle development by injecting vascular endothelial growth factor (VEGF) gene. *Reprod Biol.* 5(3):257-68.

Shimizu, T., Kawahara, M., Abe, Y., Yokoo, M., Sasada, H., Sato, E., 2003. Follicular microvasculature and angiogenic factors in the ovaries of domestic animals. *J Reprod Dev.* 49(3):181-92.

Siekman, A.F., Covassin, L., Lawson, N.D., 2008. Modulation of VEGF signalling output by the Notch pathway. *Bioessays.* 30(4):303-13.

Suchting, S., Freitas, C., le Noble, F., Benedito, R., Bréant, C., Duarte, A., Eichmann, A., 2007. The Notch ligand Delta-like 4 negatively regulates endothelial tip cell formation and vessel branching. *Proc Natl Acad Sci USA* 104(9):3225-30.

Tamanini, C., De Ambrogi, M., 2004. Angiogenesis in developing follicle and corpus luteum. *Reprod Domest Anim*; 39:206–216.

Tanriverdi, G., Denir, S., Ayla, S., Bilir, A., Oktar, H., Cepni, I., Irez, T., 2013. Notch signaling pathway in cumulus cells can be a novel marker to identify poor and normal responder IVF patients. *J Assist Reprod Genet.* 30(10):1319-26.

Taylor, P.D., Hillier, S.G., Fraser, H.M., 2004. Effects of GnRH antagonist treatment on follicular development and angiogenesis in the primate ovary. *J Endocrinol.* 183(1):1-17.

Tempel-Brami, Michal Neeman., 2002. Non-Invasive Analysis of Rat Ovarian Angiogenesis by MRI. *Mol Cell Endocrinol* 187 (1-2), 19-22.

Thurston, G., Kitajewski, J., 2008. VEGF and Delta-Notch: interacting signalling pathways in tumour angiogenesis. *Br J Cancer*; 99(8):1204-9.

Tománek, M., Chronowska, E., 2006. Immunohistochemical localization of proliferating cell nuclear antigen (PCNA) in the pig ovary. *Folia Histochem Cytobiol.*; 44(4):269-74.

Tománek, M., Chronowska, E., Kott, T., Czerneková, V., 2008. Telomerase activity in pig granulosa cells proliferating and differentiating in vitro. *Anim Reprod Sci.* 104(2-4):284-98.

Trombly, D.J., Woodruff, T.K., Mayo, K.E., 2009. Suppression of Notch signaling in the neonatal mouse ovary decreases primordial follicle formation. *Endocrinology.* 150(2):1014-24.

Vanorny, D.A., Prasasya, R.D., Chalpe, A.J., Kilen, S.M., Mayo, K.E., 2014. Notch signaling regulates ovarian follicle formation and coordinates follicular growth. *Mol Endocrinol.* Apr; 28(4):499-511.

Villavicencio, M. M. J., 1991. Un estudio de los mecanismos que regulan el crecimiento y la diferencia folicular en la rata prepuber: el papel de la hormona estimulante del foliculo y sus isohormonas. TESIS

Vorontchikhina, M.A., Zimmermann, R.C., Shawber, C.J., Tang, H., Kitajewski, J., 2005. Unique patterns of Notch1, Notch4 and Jagged1 expression in ovarian vessels during folliculogenesis and corpus luteum formation. *Gene Expr Patterns.*

Wulff, C., Wiegand, J., Saunders, T. K., Scobie, A., Fraser., 2001. Angiogenesis During Follicular Development in the Primate and its Inhibition by Treatment with Truncated Flt-1-Fc (Vascular Endothelial Growth Factor TrapA40). *Endocrinology* 142 3244–3254.

Wulff, C., Wilson, H., Wiegand, S.J., Rudge, J.S. & Fraser, H.M., 2002. Prevention of thecal angiogenesis, antral follicular growth, and ovulation in the primate by treatment with vascular endothelial growth factor trap R1R2. *Endocrinology* 143 2797–2807.

Xu, J., Gridley, T., 2013. Notch2 is required in somatic cells for breakdown of ovarian germ-cell nests and formation of primordial follicles. *BMC Biol.* 11:13.

Yang, M.Y., Fortune, J.E., 2007. Vascular endothelial growth factor stimulates the primary to secondary follicle transition in bovine follicles in vitro. *Mol Reprod Dev.* 74(9):1095-104.

Zhang, P., Yan, X., Chen, Y., Yang, Z., Han, H., 2014. Notch signaling in blood vessels: from morphogenesis to homeostasis. *Sci China Life Sci.* 57(8):774-80.

Zhang, C.P., Yang, J.L., Zhang, J., Li, L., Huang, L., Ji, S.Y., Hu, Z.Y., Gao, F., Liu, Y.X., 2011. Notch signaling is involved in ovarian follicle development by regulating granulosa cell proliferation. *Endocrinology.* 2011 Jun; 152(6):2437-47.

Zimmermann, R.C., Xiao, E., Bohlen, P., Ferin, M., 2002. Administration of antivasular endothelial growth factor receptor 2 antibody in the early follicular phase delays follicular selection and development in the rhesus monkey. *Endocrinology* 143:2496–2502.