



085797

Casa abierta al tiempo

**UNIVERSIDAD AUTONOMA METROPOLITANA - IZTAPALAPA**

División de Ciencias Biológicas y de la Salud

**ACTIVIDAD PROTEOLITICA Y ANTIPROTEOLITICA DURANTE  
LA MADURACION FOLICULAR EN LA CABRA**

T E S I S

PARA OBTENER EL GRADO DE:  
MAESTRO EN CIENCIAS EN BIOLOGIA DE LA REPRODUCCION ANIMAL

P R E S E N T A

ANA MARIA ROSALES TORRES



UNIVERSIDAD AUTONOMA METROPOLITANA  
SERVICIOS DOCUMENTALES  
IZTAPALAPA

1 9 8 8

AGRADECIMIENTOS

Al Dr. Adolfo Rosado, quien tan acertadamente supo dirigirme  
y crear el clima académico - científico necesario para escribir  
un trabajo de ésta índole.

085797

Al grupo Bioquímico del laboratorio de Biología Molecular del Instituto Mexicano del Seguro Social y de manera muy especial a los doctores Omar Hernández y Efraín Mercado, quienes atinadamente me asesoraron para el desarrollo de esta tesis.

Al Dr. Fausto Sánchez, jefe del Departamento de Producción  
Agrícola y Animal de UAM -X por todas las facilidades  
brindadas.

A mis padres y hermanos por su apoyo y cariño incondicionales.

A mis amigos, quienes con su afecto han contribuido a generar en mí la fuerza interior que ha permitido mantenerme entusiasta en el arduo camino de la ciencia.

A Leticia Alfaro, por su amistad y compañía que me han sido fundamentales y por su valiosa ayuda en cada etapa de este trabajo.



A Julián, porque juntos hemos disfrutado la pasión por el conocimiento, tanto en el terreno de las ideas como en el transcurso vital, descubriendo que esta aventura del saber no dá, en ningún momento, una noción de certidumbre, sino eventualmente una prolongada y placentera sensación de movimiento continuo.

## I N D I C E

RESUMEN . . . . .	1
INTRODUCCION . . . . .	3
OBJETIVOS . . . . .	63
MATERIAL Y METODOS. . . . .	64
RESULTADOS. . . . .	76
DISCUSION . . . . .	93
CONCLUSIONES. . . . .	.108
BIBLIOGRAFIA. . . . .	.110

## RESUMEN

Se diseccionaron y clasificaron folículos antrales de cabra, inicialmente por tamaño en tres grupos : menores de 3, entre 3 y 6 y mayores de 6 mm. Los folículos menores de 3mm. de diámetro fueron estudiados sin ningún otro tipo de clasificación. Todos los demás folículos se clasificaron en 4 grupos de acuerdo al grado de atresia que evidenciaron al microscopio estereoscópico. Las observaciones histológicas mostraron que en el grupo 1 se incluyeron a los folículos no atrésicos, en el grupo 2 a folículos en estadios tempranos de atresia y los grupos 3a y 3b se formaron por los folículos con atrésia secundaria y terciaria respectivamente. Las actividades de tripsina y antitripsina fueron medidas en líquido folicular, en homogeneizados de células de la granulosa y en sacos foliculares vacíos, usando para ambas actividades un procedimiento fluorométrico. La actividad antitriptica, se caracterizó parcialmente desde el punto de vista físico-químico, se calculó por cromatografía en gel su peso molecular, el cual fué aproximadamente de 64,000 daltones y para el caso de la actividad triptica de 24,000 daltones aproximadamente.

Se observó que la actividad antitriptica en el líquido folicular está directamente relacionada con el proceso de atresia e inversamente con el diámetro folicular; la actividad fué muy baja en los folículos grandes no atrésicos y consistentemente alta en los folículos pequeños de menos de 3 mm y en los folículos atrésicos. No se encontraron diferencias

entre los folículos de los grupos 3a y 3b en los diferentes tamaños. Después de la eliminación por filtración en gel de la actividad antitriptica, la actividad de tripsina de las células libres en el líquido folicular sólo estuvo presente en los folículos no atrésicos mayores de 6 mm.

Se encontró una alta actividad de tripsina en las células del saco de los folículos con atresia temprana. Esta actividad fué significativamente menor en los folículos del grupo 3a y estuvo casi ausente en los folículos con atresia terciaria (grupo 3b). Por el contrario, la actividad de tripsina de las células de la granulosa recuperadas por centrifugación del líquido folicular, fué dos veces más alta en el grupo 3a que en los grupo 1 y 2 y casi cinco veces más alta que la del grupo 3b.

Otro importante hallazgo en este trabajo fué el haber encontrado que la concentración de hemoglobina es un importante parámetro para medir la atresia folicular de la cabra.

## INTRODUCCION

El desarrollo del ovario en los vertebrados puede ser didacticamente dividido en 4 etapas principales, siendo las tres primeras comunes con el desarrollo del testículo (Baker, 1972; Tsafiriri, 1978).

La primera fase comprende la migración de las células germinales primordiales desde su lugar de origen hasta depositarse en un engrosamiento celómico, ventral al mesonefros, que constituirá posteriormente la gónada.

La segunda fase, que se inicia con la llegada de las células germinales a la cresta genital, consiste fundamentalmente en la proliferación, por división mitótica, tanto de las células germinales como del epitelio no-germinal lo cual conduce a la formación de la gónada primitiva, que es idéntica en ambos sexos (Etapa de gónada indiferenciada).

Durante la tercera fase, el tejido gonadal se diferencia para formar dos partes fundamentales, una parte periférica o corteza y una parte central o médula (la cual se halla ausente en algunos vertebrados), separadas por una formación fibrosa, la túnica albugínea primitiva. Las células germinales se disponen en cuerdas, llamadas cuerdas de Pfluger.

La cuarta es la fase de diferenciación sexual. Durante esta fase las células germinales son llevadas a la médula y la corteza se atrofia en el macho, mientras que en la hembra las células germinales permanecen en la corteza y es la médula la

que sufre el proceso de atrofia. Las células provenientes de la hipertrófia de la corteza del ovario primitivo se alinean alrededor de las células germinales constituyendo el origen de las células de la granulosa y dando origen a los folículos primordiales. En este temprano estadio, mientras las células germinales del macho permanecen quiescentes, las células germinales de la hembra pueden ya iniciar el proceso de división y diferenciación celular, el cual, en el caso de las células germinales, recibe el nombre de meiosis y termina, en la hembra, con la formación de una sola gameta femenina haploide, es decir conteniendo la mitad del material genético.

La división mitótica de las células germinales primordiales u ovogonias da origen a la formación de los ovocitos primarios, los cuales inician el proceso de la meiosis durante el cual su material genético debe ser reducido a la mitad, formando primero un ovocito secundario, haploide y un primer glóbulo polar y, subsecuentemente por división mitótica, terminar con la formación del gameto haploide femenino u ovocito propiamente dicho y un segundo glóbulo polar (White, 1973; Baker, 1972 ).

Incorrectamente se ha aplicado el término ovogénesis al proceso de crecimiento del ovocito y la formación de su envoltura folicular, asociada en algunas especies a la vitelogénesis, procesos que se sabe acontecen después de que se ha realizado la primera parte de la meiosis y el ovocito ha sido detenido en dictioteno (Henderson y Henderson, 1960; White, 1973). Correctamente debe aplicarse el término ovogénesis precisamente a esta fase inicial del proceso, desde la formación del ovocito primario, hasta la presentación del "dictioteno" o

fase de arresto meiótico (Zybina, 1969). Las etapas posteriores deben mejor considerarse como maduración meiótica del ovocito (Masui y Clarke, 1979). En este trabajo así serán considerados.

Durante la ovogénesis, los ovocitos inician el proceso de reducción cromosómica o meiosis hasta alcanzar un punto específico del proceso meiótico, habitualmente la fase terminal del diploteno, y en este punto, antes de completar la reducción del material genético, reaparecen la membrana nuclear y el nucleólo y el proceso se detiene (arresto meiótico). Esta fase de la ovogénesis se ha llamado "dictioteno" o fase de reposo meiótico (Zybina, 1969). Aunque el proceso reduccional se ha detenido, el crecimiento del ovocito continúa, tanto a nivel citoplásmico, como nuclear, adquiriendo la célula un tamaño enorme y estando finalmente dotada de un núcleo grande y vesiculoso que ha sido llamado "vesícula germinal" (Germinal Vesicle; VG) (Baker, 1972; Moore et al, 1974; Heller et al, 1981).

Durante la fase de crecimiento el ovocito aumenta de diámetro desde 20 hasta 80 micras. Este gran aumento de volumen se acompaña de la síntesis y acumulación de organelos y macromoléculas (Schultz et al, 1979; Sternlich y Schultz, 1981). Presumiblemente, estos constituyentes son utilizados durante los estadios iniciales de la embriogénesis, como sucede seguramente en las especies inferiores (Davidson, 1976). Además durante esta fase de crecimiento el ovocito experimenta una diferenciación morfológica y bioquímica a la que se asocia la adquisición de la capacidad para terminar la meiosis (Weakley, 1968; Szollosi,

1972; Wassarman y Josefowicz, 1978; Schultz et al, 1979). En efecto, ovocitos que no han alcanzado un diámetro de unas 60 micras, no son capaces de terminar espontáneamente la meiosis cuando son colocados in vitro, bajo condiciones adecuadas (Heller et al, 1981). Bajo estas condiciones, la frecuencia con la cual los ovocitos reanudan la meiosis aumenta con su tamaño. Sólo aquellos ovocitos que han completado adecuadamente su crecimiento son capaces de reanudar la meiosis y sólo éstos, al ser fertilizados, originan un embrión normal, capaz de terminar adecuadamente su desarrollo (Thibault, 1972).

La maduración meiótica se realiza espontáneamente cuando los ovocitos obtenidos de animales adultos se liberan de sus envolturas foliculares y se colocan en un medio de cultivo adecuado (Pincus y Enzmann, 1935; Biggers, 1972; Schuetz, 1974). Este proceso se realiza in vitro en aproximadamente 15 horas. Se caracteriza por la disolución de la membrana nuclear y dispersión del contenido del núcleo, proceso que se conoce como "ruptura de la vesícula germinal" o más escuetamente GVBD. La cromatina difusa del dictioteno se condensa en cromosomas bivalentes, los cuales se aparean, se separan y completan la primera división mitótica, concluyendo con la emisión del primer glóbulo polar.

Los ovocitos obtenidos de ratonas de menos de 15 días de edad son incapaces de reanudar su maduración meiótica cuando se aíslan y se cultivan in vitro, permaneciendo en dictioteno. Los ovocitos obtenidos de ratonas mayores de 15 días de edad son ya capaces de experimentar la maduración meiótica con una



frecuencia que aumenta con la edad de la ratona (Sorensen y Wassarman, 1976).

La secuencia temporal de la maduración meiótica in vitro puede describirse como sigue: Rompimiento o degradación de la vesícula germinal (Germinal Vesicle Break Down; GBVD) 1-5 horas, la metafase I se alcanza alrededor de 5-10 horas y la metafase II en 10-16 horas. Bajo las mejores condiciones experimentales, aproximadamente el 80% de los ovocitos colocados en cultivo experimentan la GVBD en unas 3 horas, y de éstos el 70 % son capaces subsecuentemente de emitir el primer glóbulo polar (Tsafriri et al, 1982).

El tiempo que los ovocitos permanecen detenidos en dictioténo, así como la naturaleza del estímulo que reinicia la meiosis, son específicos de la especie (Masui y Clarke, 1979). Por ejemplo en la estrella de mar y en la rana la reanudación de la meiosis obedece al estímulo proporcionado por la interacción entre el plasmalema del ovocito y dos compuestos pequeños, y por lo tanto libremente difusibles, la 1-metil adenina en la estrella de mar (Kanatami et al, 1969; Shirai y Kanatami, 1972) y la progesterona en la rana (Thibier-Fouchet et al, 1976). Tomando como ejemplo el ratón (Pedersen, 1970), la ovogénesis principia con la formación de las células germinales primordiales alrededor del día octavo de la vida embrionaria. Tan pronto como la migración de las células germinales termina, alrededor del día 12 de la gestación, algunas ovogonias inician ya la profase de la meiosis. Para el día 16 de la embriogénesis casi todos los ovocitos se encuentran en paquiteno y para el día

18 algunos pueden observarse ya en diploteno (Fig. 1). En el momento del nacimiento un número considerable de ovocitos están ya en la fase de reposo o dictioteno y para el día 5 de la vida extrauterina el ovario del ratón está poblado con miles de ovocitos pequeños (20  $\mu$ m) en arresto meiótico. En esta fase meiótica permanecerán hasta que, un poco antes de cada ovulación, algunos de ellos sean selectivamente estimulados para terminar la meiosis, es decir, desde varias semanas hasta más de un año (Pedersen, 1970; Schultz y Wassarman, 1977). Durante la fase de crecimiento, el ovocito se encuentra rodeado de una o más capas de células foliculares, el conjunto de estas células se ha llamado la capa granulosa. Se ha propuesto, desde hace mucho tiempo, que estas células regulan el crecimiento del ovocito mediante el aporte adecuado de nutrientes (Zamboni, 1970). Es decir se ha dado a estas células foliculares el mismo papel que se sabe desempeñan, en los animales inferiores, las llamadas células nutrientes (Anderson, 1974; Telfer, 1975). En efecto, estudios realizados con microscopio electrónico mediante el procedimiento de crío fractura (freeze fracture) han mostrado que existen numerosas uniones comunicantes (gap junctions) entre el ovocito y las células foliculares que lo rodean (Anderson y Lambertini, 1976). Estas uniones comunicantes pueden observarse durante todo el proceso de crecimiento del ovocito, antes y después de la formación de la zona pelúcida, y lentamente disminuyen hasta llegar a desaparecer cuando el proceso de ovulación se aproxima (Bleil y Wassarman, 1980). Se acepta de modo general que las uniones comunicantes proveen canales intercelulares a través de los cuales pueden pasar

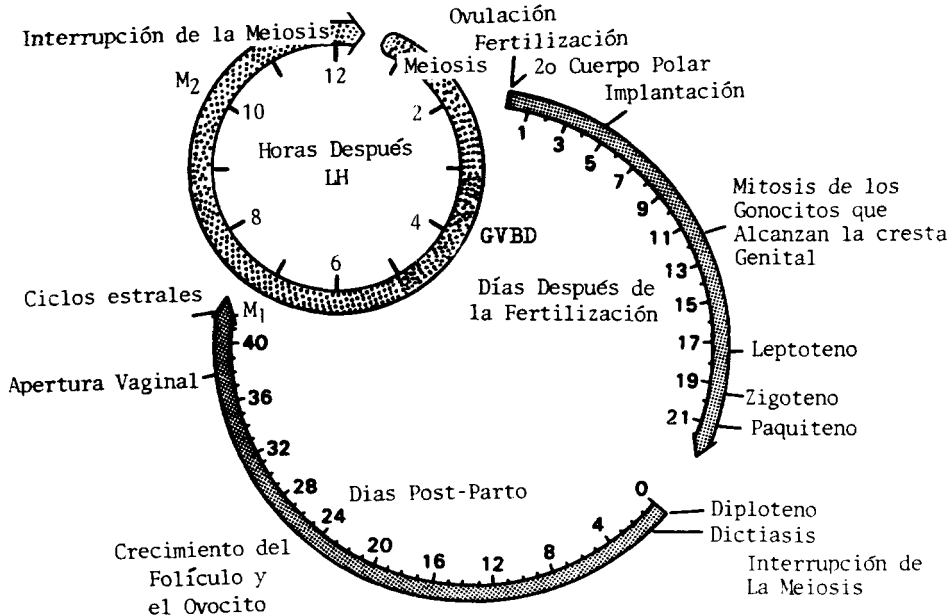


Figura 1.- Presentación esquemática del ciclo de la ovogénesis en diferentes edades de la ratona y de los numerosos puntos en los cuales dicho proceso puede ser controlado. El proceso meiótico se inicia durante la vida fetal y se detiene en la fase llamada de diploteno, un poco después del nacimiento. Normalmente la meiosis se reinicia en la edad adulta como respuesta a la producción del pico de gonadotropinas. La reiniciación preovulatoria de la meiosis se inicia con el rompimiento de la vesícula germinal (GVBD) e incluye la expulsión del primer glóbulo polar y el progreso hasta la metafase de la segunda división meiótica. Puesto que la ruptura de la vesícula germinal es un acontecimiento fácilmente observable se ha tomado como el índice que demarca la reanudación de la meiosis y el principio de la maduración folicular.

pequeñas moléculas de una célula a otra (Lowenstein, 1979). Esto resulta en el fenómeno conocido como acoplamiento metabólico o cooperación fisiológica entre las células comunicadas (Pitts, 1977). A través de este proceso el ovocito puede recibir, de las células foliculares que lo rodean, nutrientes y sustancias reguladoras del crecimiento. Sin embargo debe decirse que hasta ahora sólo se ha podido demostrar que estas uniones son funcionales cuando el ovocito ha alcanzado la fase de dictioteno y no antes (Gilula et al, 1978), lo cual pone en duda su papel regulador durante toda la fase inicial de crecimiento del ovocito.

Una vez formado el antro folicular, algunas capas celulares derivadas de la granulosa permanecen rodeando al ovocito, dando origen al llamado cumulus oophorus. Se ha demostrado que durante el arresto meiótico, las células del cumulus se hallan en comunicación funcional con el ovocito. Esto se ha demostrado porque la inyección iontoforética de fluoresceína a las células del cumulus es rápidamente seguida por la aparición de esta sustancia en el citoplasma del ovocito, es decir el cumulus y el ovocito se encuentran metabólicamente acoplados (Cross y Brinster, 1974; Moor et al, 1980; Heller y Schultz, 1980). Los resultados de varias observaciones experimentales han demostrado que algunos metabolitos producidos en las células del cumulus pasan libremente al ovocito en dictioteno por las uniones comunicantes (Wassarman y Letourneau, 1976). Como veremos después este proceso se ha involucrado en los mecanismos que regulan la reanudación de la meiosis (Heller et al, 1981).

La iniciación de la etapa final de crecimiento y maduración

depende, aparentemente, de factores intraováricos (Peters et al, 1975; Foxcroft et al, 1985). Así, el número de ovocitos que inician cíclicamente la fase final de maduración y crecimiento parece ser una función de la poza de ovocitos que permanecen en reposo. El ovocito y las células foliculares que lo rodean crecen coordinadamente, progresando a través de una serie de estadios morfológicamente identificables (Pedersen, 1970). Durante las fases iniciales de la maduración el ovocito crece hasta alcanzar unas 80 micras de dm, antes de que se inicie la formación del antro folicular; consecuentemente, la mayoría del crecimiento y maduración foliculares ocurren una vez que el ovocito ha detenido su crecimiento. Después de esto, el crecimiento es continuo, terminando en la ovulación de un ovocito maduro, o en la degeneración (atresia) del ovocito y de su folículo (Foxcroft, 1985).

En la ratona sexualmente madura, los ovocitos maduros contenidos en los folículos de Graaf reinician la meiosis y completan la primera división meiótica justamente antes de la ovulación (Mauleon y Marianna, 1977). La reiniciación de la meiosis puede ser mediada por ciertos estímulos hormonales in vivo (Baker y Neal, 1972; Tsafiriri et al, 1972; ), o simplemente extrayendo al ovocito de sus envolturas foliculares y colocándolo en un medio de cultivo adecuado (Pincus y Enzmann, 1935; Biggers, 1972; Schuetz, 1974).

Según se aproxima el tiempo de la ovulación se observa una disminución coordinada del acoplamiento metabólico y del número y la profundidad de las uniones comunicantes que existen

entre el cumulus y el ovocito. Después de la ovulación, las células del cumulus continúan rodeando al ovocito, pero las uniones comunicantes se han retraído del interior del ovocito y el acoplamiento metabólico ha dejado de ser funcional (Gilula et al, 1978).

En condiciones normales los ovocitos maduros son ovulados y continúan su división meiótica hasta la metafase II en el oviducto, o en cultivo. En esta fase de la meiosis permanecen hasta el momento de la fertilización, o bien hasta que sean partenogénicamente activados. El proceso de maduración que termina en la metafase II, ha sido llamado maduración meiótica, para distinguirlo del proceso de ovogénesis propiamente dicha (Donahue, 1972; Sorensen y Wassarman, 1976). La maduración meiótica se caracteriza por la ruptura y desaparición de la membrana nuclear (ruptura de la vesícula germinal, GVBD), la condensación de la cromatina en cromosomas, la emisión del primer glóbulo polar y la nueva interrupción de la meiosis en la metafase II (Donahue, 1972).

La microscopía electrónica se ha utilizado muy extensamente para estudiar los cambios morfológicos que acompañan al crecimiento del ovocito durante la ovogénesis. Entre los cambios ultraestructurales observados pueden señalarse (I) la reorganización del retículo endoplásmico y del aparato de Golgi; (II) los cambios de conformación de las mitocondrias; (III) constitución de un complejo sistema laminar dentro del citoplasma del ovocito, así como del complejo sistema formado por los gránulos corticales; (IV) formación de

microvellosidades en la superficie del ovocito, concomitantemente con la formación de la zona pelúcida y de la constitución del sistema de acoplamiento metabólico con las células del cumulus. Todo ésto será estudiado con mayor detenimiento en la parte siguiente.

### Cinética del crecimiento Folicular

La cinética del crecimiento folicular ha sido estudiada desde hace años por varios investigadores: en el ratón (Jones and Krohn, 1959; Borum, 1961; Pedersen, 1970); en la rata (Beaumont and Mandl, 1962); en el hamster (Challoner, 1974); en el cobayo (Ioannou, 1964); en el conejo (Teplitz y Ohno, 1963; Peters et al, 1965); en la oveja (Mauleon, 1973); en el puerco (Black y Erickson, 1968); en la vaca (Erickson, 1966); en el mono rhesus (Baker, 1966); en la mujer (Baker, 1963).

Los diferentes estadios del crecimiento folicular se han clasificado de acuerdo a su tamaño, el número de células foliculares que rodean al ovocito y la formación del antro, producido por la secreción del líquido folicular. De acuerdo a los criterios establecidos en los trabajos mencionados en el párrafo anterior, se ha dividido el crecimiento folicular en 8 etapas (ver Fig. 2); desde el folículo de tipo 1, desprovisto de células foliculares, que sólo es visible en el ovario durante la vida prenatal y una o dos semanas después del nacimiento, hasta el folículo preovulatorio, completamente desarrollado, tipo 8, el cual se caracteriza porque el cumulus está unido a la capa granulosa únicamente por un pedículo.

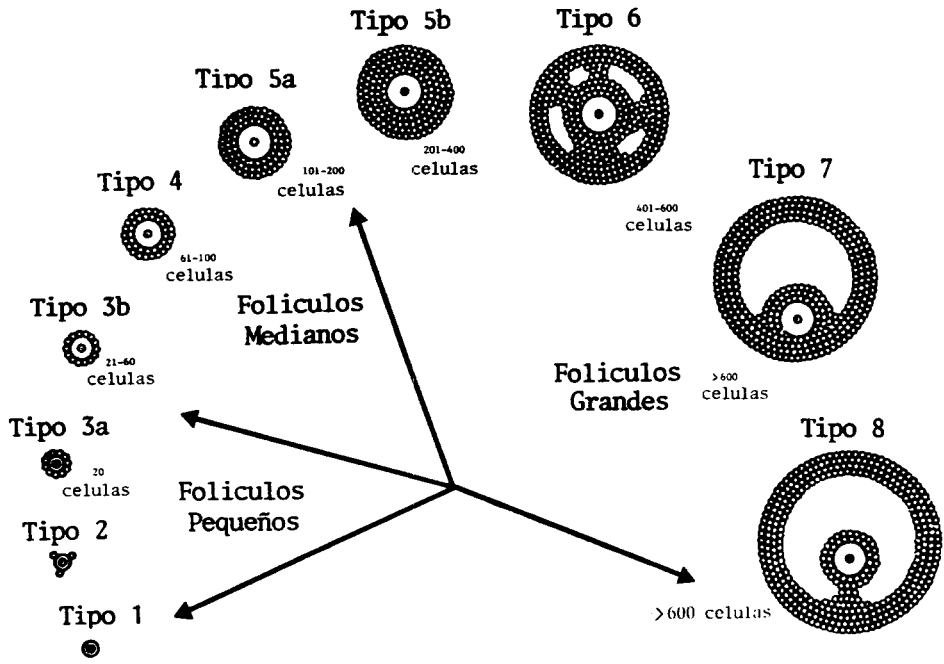


Figura 2.- Cinética del crecimiento folicular ( ver texto. )



El grupo de folículos pequeños es heterogéneo, consiste de folículos de tipo 2 y tipo 3a. Los folículos de tipo 2 no están en crecimiento, constituyen, como en el animal inmaduro, una poza, de la cual, más pronto o más tarde, se inicia el desarrollo de nuevos conjuntos de folículos. En contraste la mayoría, si no todos, los folículos del tipo 3a han iniciado su crecimiento y ya no lo suspenderán hasta terminar por ser ovulados o involucionar por el proceso conocido como atresia folicular.

Los folículos de tamaño intermedio, tipos 3b a 5a, constituyen un grupo bastante uniforme en relación a su patrón de crecimiento: todos ellos crecen y ninguno, o sólo una escasa cantidad, degeneran e inician el proceso de atresia. La determinación de su velocidad de crecimiento, estudiada por autoradiografía y expresada como el tiempo necesario para duplicar el número de células de la granulosa, indica que crecen más rápidamente los folículos de tipo 5a, seguidos por los de tipo 3b y finalmente los de tipo 4. Además, es importante mencionar, que la velocidad de crecimiento folicular se modifica, en el animal maduro, de acuerdo a la etapa del ciclo estral; es más rápido durante el estro y más lento durante el metaestro.

El patrón de crecimiento de los folículos grandes, tipos 5b a 7, es diferente por tres circunstancias importantes: es considerablemente más rápido que el de los folículos de tamaño intermedio, es invariable en relación con el ciclo estral y, fundamentalmente, la degeneración y la atresia son un hecho común, finalmente los folículos de tipo 6, que no han sido

afectados por el fenómeno de atresia, se transforman en folículos de tipo 7.

Los folículos tempranos del tipo 7 continúan creciendo a la misma velocidad que los folículos del tipo 6 y parecen ser igualmente sensibles, todavía, a la atresia. Pero pronto el crecimiento de las células foliculares más periféricas se detiene, el folículo deja de crecer y se forma el pedículo ovárico.

Los folículos de tamaño medio se encuentran en un equilibrio de flujo: el número de folículos que entran y abandonan este tamaño por hora, es el mismo, y los folículos que entran al tipo 3a continúan su crecimiento hasta formar folículos grandes. Los cálculos hechos por Pedersen en el ratón (1970), indicaron la presencia de 139 folículos de tipo 3b, 106 de tipo 4 y 45 de tipo 5. Debido al equilibrio de flujos es posible sostener que esta misma relación existe entre las velocidades de crecimiento de los tres tipos de folículos, lo cual fué demostrado al encontrarse que el tiempo medio de tránsito de cada uno de ellos fué, respectivamente 178, 129 y 62 horas. El número de folículos de tipos 5b y 6 muestra una variación considerable en relación al ciclo estral. Su número es mínimo durante el proestro. A partir de este momento la cantidad de folículos de tipo 5b aumenta y el mayor número se encuentra durante el estro, mientras que la mayoría de los folículos de tipo 6 se encuentran durante el metaestro; esto se debe a que durante el estro el crecimiento de los folículos de tipo 5a se acelera, originando numerosos folículos de tipo 5b, mientras que el tránsito de los

foliculos de tipo 5b a 6 se mantiene constante. El número de foliculos de tipo 7 es casi el mismo durante todo el ciclo, pero su tamaño cambia: durante el estro solamente pueden encontrarse foliculos de tipo 7 tempranos, es decir pequeños, mientras que durante el proestro tardío solamente se encuentran foliculos de tipo 7 grandes. Estos foliculos serán ovulados la noche siguiente o sufrirán el proceso de atresia, puesto que foliculos de tipo 7 grandes no se encuentran en el día 1 del ciclo, como ya mencionamos. Se ha calculado que un foliculo crece, durante un ciclo de 4 días, desde el tipo 5b hasta el tipo 7 preovulatorio. Esto significa que los foliculos de tipo 7 que se ven en el primer día del ciclo, casi seguramente sufrirán el proceso de atresia durante los primeros días del ciclo, y que serán los foliculos de tipo 7 temprano que se observan en los días 2 ó 3 del ciclo, los que formarán el grupo que seguramente será ovulado.

Las cuentas diferenciales realizadas, indican que un número considerable de foliculos de tipo 5b y 6 sufren el proceso de degeneración y atresia, particularmente en la segunda parte del ciclo estral. También podría concluirse de los estudios de Petersen y otros autores, que la atresia de los foliculos pequeños o intermedios es rara, o inexistente. Se ha calculado que, en la rata, unos 600 foliculos inician su crecimiento entre los 3 y los 4 meses de edad. Casi todos estos foliculos alcanzan a crecer hasta el tipo 5b, pero sólo unos 50 foliculos terminan su crecimiento y son ovulados durante este mes, es decir que entre las edades de 3 y 4 meses, más de 500 foliculos degeneran.

Según Pedersen (1970), el desarrollo folicular, desde el momento que se inicia hasta alcanzar el tipo 5b dura 14 días y hasta su ovulación 19 días. Estos resultados varían según diferentes autores. Los cambios morfológicos que acompañan a este proceso de maduración y crecimiento foliculares se han estudiado con cuidado utilizando tanto la microscopía de luz como la electrónica.

Folículos en crecimiento.- El crecimiento progresivo de los folículos que aparecen después de la pubertad se caracteriza por: a).- crecimiento y diferenciación del óvulo, formación de la zona pelúcida b).- proliferación de las células foliculares, formación del cumulus oophorus y del antro folicular c).- desarrollo de una cápsula de tejido conectivo del estroma adyacente. El óvulo inmaduro aumenta de tamaño y alrededor del mismo se forma una membrana con gran capacidad de refracción que es la zona pelúcida.

Las células foliculares aplanadas se transforman en primer lugar en cúbicas y después en cilíndricas. Se dividen activamente para producir una capa estratificada alrededor del óvulo. La proliferación es más rápida de un lado del óvulo y por ello el folículo adquiere forma oval y el óvulo tiene posición excéntrica. En la masa folicular aparecen pequeños espacios irregulares llenos de un líquido claro (líquido folicular). El aumento de este líquido causa aumento del tamaño folicular. Los espacios llenos de líquido se unen para formar una cavidad

común, el antro, en la capa folicular. El óvulo rodeado por un grupo de células foliculares, es comprimido a un lado y forma una prominencia precisa en la cavidad antral. Esta prominencia excéntrica se conoce como cumulus oophorus. Las células foliculares del cumulus que están en relación directa con el óvulo adquieren una posición radial y forman la corona radiada, separada del óvulo únicamente por la zona pelúcida. El epitelio estratificado, compuesto de células foliculares, forman una capa regular continua, la granulosa, alrededor de la cavidad del antro.

Conforme aumenta el tamaño del folículo, el estroma adyacente se organiza en una cápsula, la teca folicular, separada de la granulosa por una membrana basal (la membrana transparente). La teca folicular se diferencia en dos capas, una vascular o teca interna y una capa fibrosa o teca externa. La teca interna incluye tejido conectivo laxo que contiene numerosos capilares. La teca externa compuesta de fibras colágenas íntimamente unidas y fibras fusiformes, se unen en la periferia con el estroma ovárico que lo rodea ( Leeson y Leeson, 1984).

Folículo maduro o de De Graaf .- Un folículo maduro o de De Graaf ocupa todo el ancho de la corteza, penetra en la médula y sobresale de la superficie del ovario. En este punto el estigma, la túnica albugínea y la teca folicular se adelgazan (Leeson y Leeson, 1984).

Células de la granulosa.- Las células de la granulosa de los mamíferos son generalmente poligonales o cuboidales. Durante cada fase del crecimiento folicular las células de la granulosa se caracterizan por una población densa de ribosomas y polisomas, numerosas cisternas del retículo endoplásmico rugoso y un complejo de Golgi muy bien desarrollado. Durante el estado inicial del crecimiento folicular, el complejo de Golgi está generalmente orientado hacia el ovocito, sin embargo durante la fase de rápida acumulación de líquido el complejo de Golgi se orienta hacia el antro. Cuando la capa granulosa se adelgaza por la acumulación del líquido en los folículos de Graaf no hay una polarización especial del complejo de Golgi. El citoplasma típico de las células de la granulosa durante etapas posteriores al crecimiento folicular muestra la presencia de cisternas en el retículo endoplásmico rugoso, conteniendo material electrodenso, además posee agrupamiento de vacuolas de Golgi localizadas en la región cortical de la célula o en contacto con la membrana plasmática.

La mayoría de las células de la granulosa tienen una apariencia irregular poliédrica y una superficie relativamente rugosa. Las células de este tipo generalmente predominan cerca de la lámina basal, la cual limita al folículo. Después de la ruptura del folículo, estas células tienden a separarse en pequeños grupos, los cuales guardan su estructura individual. Otras células de la granulosa, especialmente en áreas como la superficie de la cavidad folicular, están alargadas o aplanadas.

En los folículos de De Graaf numerosas células de la granulosa están cubiertas por una capa delgada de material con textura retículo-granular; este material es más abundante en la superficie de las células del antro formando una lámina regular, la cual rodea la cavidad, que se le ha llamado membrana limitante interna. Esta membrana está compuesta probablemente de líquido folicular precipitado y condensado así como de restos de células degeneradas. Algunas células de la granulosa tienen una apariencia irregular parecida a la de una estrella. Estas células al igual que las poliedrales contienen numerosas microvellosidades y largas proyecciones citoplasmáticas. El citoplasma de estas células posee numerosos microfilamentos delgados que están compuestos de proteínas contráctiles actina y miosina.

Entre las células de la granulosa existen diversos tipos de contactos intercelulares dentro de los que se incluyen: desmosomas cortos, adherencias zonales y uniones fuertes (Motta, et al, 1971; Espey y Stutts, 1972). Algunos estudios demuestran que las células de la granulosa poseen uniones huecas distribuidas al azar, las cuales se incrementan en tamaño y número con el continuo crecimiento del folículo, especialmente cuando éste depende de la estimulación gonadotrófica. Las uniones huecas parecen tener además importancia en la coordinación de las actividades celulares durante el crecimiento y desarrollo foliculares. Tal actividad coordinadora de las células de la granulosa (síntesis de macromoléculas, proliferación, etc) puede ser una respuesta a la estimulación hormonal, mediada por las uniones huecas (Heller, et al, 1981).

Maduración del ovocito.- Durante el crecimiento primario, los ovocitos tienen un enorme núcleo alargado llamado vesícula germinal (GV). Este núcleo contiene cromosomas en escobillón, los cuales están activamente comprometidos en la síntesis de RNA. Hacia el final del período de crecimiento los cromosomas en escobillón se descondensan, cuando los ovocitos entran al estado estacionario.

Tradicionalmente, el proceso de maduración del ovocito se refiere a los cambios ocurridos en la morfología de los cromosomas durante la progresión de la meiosis. Antes de comenzar la maduración, el ovocito contiene una vesícula germinal (GV) con pocos nucleólos grandes o algunos pequeños. Los cromosomas de la GV están extendidos y muy dispersos. En el inicio de la maduración se rompe la GV y los cromosomas comienzan su condensación. Con el progreso de la maduración los cromosomas se condensan más y comienzan a alinearse en el huso en pares (Metafase I). La separación de los pares homólogos de cromosomas es seguida por la formación del primer cuerpo polar. Los cromosomas que permanecen en el ovocito se mantienen alineados- Metafase II. Cuando comienza la segunda división meiótica, se separan los cromosomas hijos y se produce la división entre el ovocito y el segundo cuerpo polar. Los cromosomas que permanecen en el ovocito después de la separación, se descondensan y forman un pronúcleo (Masui y Clarke,1979). La progresión de la maduración del ovocito es acompañada por cambios fundamentales en el citoplasma y las estructuras nucleares.



La configuración cromosómica de los ovocitos en diploteno varían de especie a especie. En los mamíferos los cromosomas permanecen difusos cuando el ovocito está en fase estacionaria. La transición entre el estado de diploteno y la primera división meiótica es iniciada por la condensación de los cromosomas en la GV. En los mamíferos este proceso de condensación comienza cerca de la membrana interna de la envoltura nuclear, lugar en donde primero se adhieren los cromosomas (Motlik, et al, 1978). El comportamiento del nucleólo durante la fase temprana de la ruptura de la vesícula germinal (GVBD) se ha descrito en el ratón, la transformación principal es el aumento de tamaño y la acumulación de material electrodensó, antes de su desintegración (Zamboni, 1972).

En el proceso de GVBD, ocurren varias interacciones entre la GV y el citoplasma. En el ratón (Zamboni, 1972) se ha observado que se incrementa el número de mitocondrias, particularmente en el área cercana a la discontinuidad o ruptura de la membrana nuclear.

También se han estudiado los cambios de la estructura periférica de los ovocitos durante la maduración, observándose que se incrementan las microvellosidades de la superficie del ovocito (Zamboni, 1972).

Zona pelúcida.- Durante la maduración del ovocito un material amorfo, rico en mucopolisacáridos se deposita entre la superficie del ovocito y las células de la granulosa que lo

rodean. En los folículos de Graaf este material forma una cubierta continua, la zona pelúcida, la cual parece ser sintetizada en el retículo endoplásmico rugoso y modificada por el aparato de Golgi de las células de la granulosa.

Esta delgada zona está interpuesta entre las células de la granulosa y el ovocito; el contacto entre estos dos elementos foliculares es mantenido a través de las proyecciones citoplasmáticas que se originan en las células de la granulosa y que penetran la zona pelúcida. Algunas de estas proyecciones están íntimamente en contacto con la superficie del ovocito; esta comunicación entre el ovocito y las células de la granulosa puede servir para la transferencia de "nutrientes" y posiblemente también están involucradas en el desarrollo y maduración del ovocito.

La zona pelúcida tiene una superficie irregular y granular, la cual en parte es el resultado de la presencia de envolturas canaliculares las cuales penetran e interconectan el interior de la zona. Los canales y envolturas son ocupados por las ramificaciones de las proyecciones del cumulus y las células coroneales. La zona pelúcida está compuesta por dos capas distintas, una interna de material denso amorfo y otra externa que es una fina capa granular. Los numerosos gránulos presentes en la superficie de la zona pelúcida parecen ser originados en las células de la granulosa que rodean al ovocito (Motta y van Blerkom, 1974).

Bajo condiciones normales la reanudación de la meiosis en los folículos preovulatorios depende de la secreción endógena de gonadotropinas o bajo condiciones experimentales de la administración exógena de las mismas gonadotropinas a hembras adecuadamente preparadas (Tsafriri, 1978). La interferencia con la secreción de gonadotropinas puede inhibir, no sólo los cambios ovulatorios, sino todo el proceso de maduración meiótica. En efecto, la hipofisectomía realizada en ratonas de 15 días de vida: reduce notablemente el desarrollo de la competencia meiótica, inhibe por completo el desarrollo de folículos antrales entre los días 21 y 31 post-parto, aumenta la incidencia de atresia la cual afecta prácticamente a todos los folículos antrales, induce la presentación de atresia aún en los folículos preantrales, en los cuales este fenómeno es raro bajo condiciones normales (Tsafriri et al, 1976 Dekel et al, 1979).

La administración de estradiol o de PMSG a las ratas hipofisectomizadas aumenta el desarrollo folicular y restituye la capacidad de alcanzar la competencia meiótica. Estos efectos se observan únicamente cuando el tratamiento hormonal se inicia después del día 20 post-parto. Bajo estas condiciones la PMSG es capaz de revertir por completo el efecto de la hipofisectomía, mientras que el estradiol es parcialmente efectivo.

Si la administración de PMSG o estradiol se realiza en animales menores de 21 días de nacidos, tanto la PMSG como el estradiol no son efectivos para restituir el crecimiento folicular y la maduración meiótica del ovocito (Fig. 3 ). Estos resultados indican que la posibilidad de estimular la

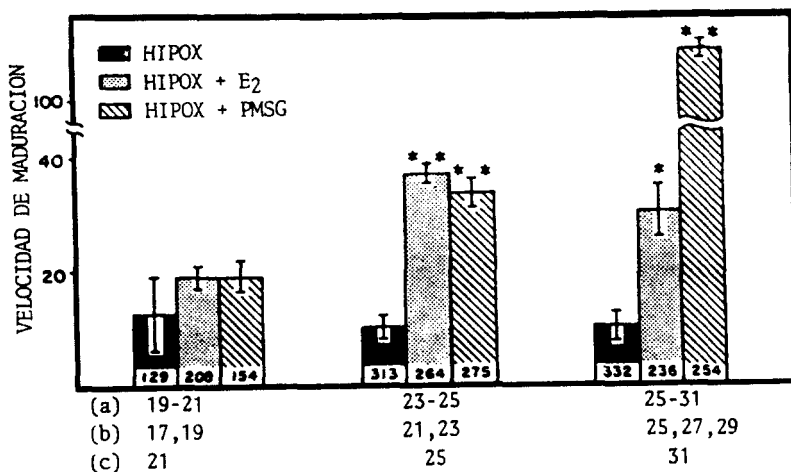


Figura 3.- Efecto de la edad sobre la capacidad del estímulo hormonal para inducir la aparición de la competencia para llevar a cabo el proceso de maduración meiótica del ovocito de la rata. Las ratas fueron hipofisectomizadas en el día 15 post-parto. ( a ) indica los días de edad post-parto en los animales a los cuales se les implantó subcutáneamente una cápsula de estradiol; ( b ) edad en días post-parto a la que se inició la aplicación de PMSG por vía subcutánea; ( c ) días de edad post-parto a la cual se realizó el sacrificio de los animales y la explantación de los ovocitos. Los ovocitos fueron cultivados durante 6 horas. El número de ovocitos examinados se indica en el cuerpo de cada una de las columnas. \*  $p > 0.01$ ; \*\*  $p > 0.001$  cuando se compara con la maduración alcanzada en las ratas hipofisectomizadas sin tratamiento hormonal.

maduración folicular con gonadotropinas depende estrictamente de la realización de un programa intrínseco de maduración ovárica.

El tiempo en el que es efectiva la sustitución hormonal, corresponde con el tiempo en el cual se adquiere normalmente la capacidad de llevar al cabo la maduración meiótica (Bar-Ami y Tsafriri, 1981). Aunque la incapacidad de las hormonas para inducir la recuperación de la maduración meiótica antes de los 21 días de vida, debe depender del desarrollo de un proceso bioquímico específico del ovario, hasta ahora ha sido imposible encontrar algún cambio metabólico que se pueda relacionar directamente con la adquisición de la capacidad de llevar al cabo con éxito la maduración meiótica. Una molécula capaz de desempeñar este papel ha sido, sin embargo, caracterizada en los anfibios, el llamado factor de promoción de la maduración o MPF (Sadler y Maller, 1983).

En la Fig. 4 tomada de Bar-Ami y Tsafriri (1986), pueden observarse claramente los efectos que acabamos de señalar. Estos resultados apoyan fuertemente la idea (Bar-Ami y Tsafriri, 1981; Bar-Ami et al, 1983) de que la FSH y los estrógenos ováricos participan de manera muy importante en el desarrollo de la maduración meiótica en los mamíferos. Sin embargo existen algunas evidencias que van en contra de esta hipótesis: (1) 55% de los ovocitos que crecen en cultivo folicular y que alcanzan 70 micras de diámetro son capaces de proseguir su maduración meiótica cuando son explantados de ratones de 8 días de edad (Eppig, 1977); (2) utilizando ratonas genéticamente deficientes en la producción de LHRH para obtener ovocitos de 70 micras de diámetro, se ha observado que estos ovocitos tienen la misma capacidad para alcanzar la

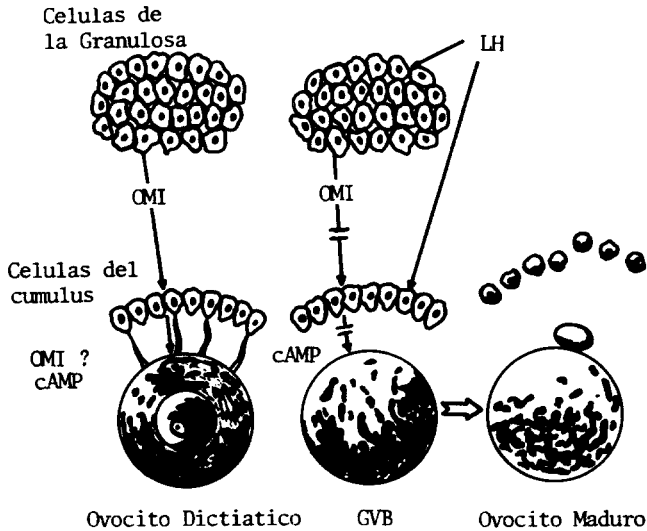


Figura 4.- Representación esquemática del mecanismo de control de la maduración meiótica en los ovocitos de los mamíferos según Tsafiri y Bar-Ami (1981). La reiniciación de la meiosis es prevenida en los folículos antrales por el OMI producido en las células de la granulosa. La acción inhibitoria de OMI es ejercida, aparentemente, por la mediación de las células del cumulus las cuales producen cierto tipo de señal inhibitoria que es conducida al ovocito a través de las uniones comunicantes. No se sabe con exactitud si es el OMI mismo, el AMPc, o un segundo factor el utilizado por las células del cumulus como factor inhibitorio. La LH induce la reanudación de la meiosis posiblemente por estimulación de las células murales de la granulosa. El mecanismo mismo de la LH no se conoce con certeza, pero podría actuar: suspendiendo la síntesis de OMI o de los factores inhibidores secundarios; induciendo la involución del mecanismo de acoplamiento metabólico y evitando el transporte de los factores de inhibición a través de las uniones comunicantes. Alternativamente la LH podría actuar induciendo la generación de una señal positiva mediante la producción de un factor estimulante de la meiosis todavía no identificado.

maduración meiótica que aquellos obtenidos de ratonas normales (Cattanach et al, 1977, Beamer y Eppig, 1984). Sin embargo debe tenerse en cuenta que en ambos tipos de animales el número de ovocitos que alcanzan el tamaño de 70 micras, necesario para realizar estos experimentos, es extremadamente pequeño en relación al número que alcanza este tamaño en la ratona normal (Eppig, 1977), lo cual debe tenerse en cuenta cuando se analizan este tipo de experimentos.

Pincus y Enzmann (1935) demostraron que los ovocitos del conejo separados de su ambiente folicular son capaces de llevar a cabo la maduración folicular cuando se colocan in vitro en un medio adecuado, aún desprovisto totalmente de hormonas. Esta observación ha sido confirmada repetidamente y extendida a otras especies de mamíferos (Biggers, 1972). La maduración espontánea de los ovocitos aislados indujo a Pincus y Enzmann a sugerir que las células foliculares "producen un compuesto o compuestos, capaces de inhibir directamente la maduración nuclear del ovocito". Chang (1955) fué el primero en demostrar la presencia, en el líquido folicular, de un factor inhibidor de la maduración espontánea de los ovocitos de conejo.

El cultivo de ovocitos de puerco dentro de hemisecciones de la pared folicular inhibe su maduración espontánea, mientras que ovocitos cultivados exclusivamente con células de las tecas, reanudan la meiosis. La presencia de células de la granulosa también inhibe la maduración de los ovocitos, encontrándose que este efecto es dependiente estrictamente del número de células de la granulosa añadidas al sistema, lo cual ha llevado a la

proposición de que estas células producen un factor inhibidor de la maduración del ovocito (Oocyte Maturation Inhibitor; OMI) (Tsafriri y Channing, 1975).

También se ha encontrado que las células de la granulosa obtenidas de folículos pequeños son más activas que las células obtenidas de folículos intermedios o grandes y que el efecto inhibidor de las células de la granulosa puede ser revertido por la adición al medio de cultivo de LH (5 ug/ml) (Tsafriri et al, 1979; Gwatkin y Anderson, 1976) .

Posteriores estudios sobre la existencia de este inhibidor de la maduración del ovocito han proporcionado los siguientes resultados: a) es posible obtener OMI a partir de extractos acelulares obtenidos de homogeneizados de células de la granulosa; de los medios de cultivo en los cuales se han mantenido estas mismas células, y que por lo tanto se considera "condicionado" o; del líquido folicular de varios animales (conejo, borrego, vaca , hamster y mujer) (Tsafriri y Channing, 1975; Gwatkin y Andersen, 1976; Jagiello et al, 1977; Hillensjo et al, 1979); b) la actividad de OMI presente en el líquido folicular declina durante la maduración folicular, según puede demostrarse por la utilización de líquido obtenido de folículos pequeños, medianos y grandes (Stone et al, 1979, 1978; Tsafriri et al, 1977); c) el OMI no es específico de especie y el líquido folicular obtenido de una especie es capaz de producir inhibición de la maduración folicular de otras (Tsafriri et al, 1977; Gwatkin y Andersen, 1976); d) la acción del OMI parece ser reversible y su presencia continua es requerida para mantener la



inhibición de la maduración (Stone et al, 1978; Hillensjo et al, 1979); e) debido a su baja actividad y a su ausencia en los folículos grandes en ocasiones es difícil demostrar su presencia lo cual ha llevado a algunos autores a negar su existencia (Sato e Ishibashi, 1977; Leibfried y First, 1980), sin embargo la actividad de OMI puede siempre encontrarse si se estudia la fracción de bajo peso molecular del líquido folicular; f) el pico preovulatorio de gonadotrofinas induce un aumento rápido en la esteroidogénesis folicular, sin embargo la adición de esteroides al medio de cultivo no es capaz de revertir la inhibición de la maduración folicular inducida por OMI. De la misma manera, el bloqueo de la acción del OMI inducido por la adición de LH no es inhibido por la adición de inhibidores de la esteroidogénesis (aminoglucetimida, cianoquetona) a cultivos tratados con LH (Tsafriri et al, 1982); g) El OMI es capaz de inhibir la reanudación de la meiosis solamente si el ovocito se encuentra rodeado del cumulus. Si el ovocito es desnudo de estas células, la meiosis se reanuda aun en presencia de concentraciones elevadas de OMI (Hillensjo et al, 1979 ). Es pues aparente que la señal inhibitoria del OMI debe transmitirse directamente de las células del cumulus al ovocito (Tsafriri et al, 1982). Recientemente el OMI ha sido parcialmente caracterizado (Centola et al, 1974) y se ha establecido (Tsafriri et al, 1976; Tsafriri y Channing, 1976) un sistema de bioensayo para su demostración: una unidad de OMI es la cantidad necesaria para bloquear la ruptura de la vesícula germinal en el 50% de los ovocitos. Estos hallazgos parecen demostrar que el OMI es un péptido de

peso molecular menor de 2000 que es secretado al líquido folicular por las células de la granulosa.

#### Papel de la Comunicación Cumulus - Ovocito

Se ha observado (Gilula et al, 1978; Moor et al, 1980), que el acoplamiento metabólico entre las células del cumulus y el ovocito presenta su máxima actividad antes de la secreción del pico de gonadotrofinas. Esto llevó a la hipótesis de que la reanudación de la meiosis se produce como resultado de la ruptura del acoplamiento funcional entre estas células, posiblemente provocado por la hormona ovulatoria (Lindner et al, 1974; Gilula et al, 1978; Moor et al, 1980). Se propuso así que el efecto de la LH sobre la maduración meiótica es secundaria a su actividad de secuestro funcional del ovocito. No obstante, el estudio de la secuencia temporal de los cambios inducidos por la acción de la LH sobre la maduración meiótica no parece apoyar esta hipótesis. En efecto, según ha sido demostrado por Moor et al (1980), la ruptura de la vesícula germinal precede a la retracción de las uniones comunicantes entre el ovocito y las células del cumulus y por lo tanto a la disminución del fenómeno de acoplamiento metabólico. Estos hallazgos han sido comprobados por la observación de que la FSH es capaz de suprimir el acoplamiento metabólico sin inducir la reanudación de la meiosis (Moor et al, 1981).

Papel del AMP - cíclico

La perturbación fisiológica de los folículos puede ser producida por la actividad estimuladora de las gonadotropinas sobre otras actividades además de la esteroidogénesis. Por ejemplo, se sabe que la LH estimula la producción de prostaglandinas en el folículo (Chasalow y Pharris, 1972; Bauminger et al, 1975), y la aplicación de PGE2 al medio de cultivo induce la maduración del ovocito (Tsafriri et al, 1972). Sin embargo la indometacina, que inhibe la producción de PGE2, falla en suprimir la maduración inducida por LH (Tsafriri et al, 1972), aunque debe recordarse que la LH estimula la síntesis de PGs en el ovario preovulatorio (Bauninger et al, 1975). Es claro entonces que la acción de la LH en la inducción de la maduración en ovocitos dentro de los folículos, no es mediada por prostaglandinas. Sin embargo, también queda claro que ambas tienen una acción estimuladora que produce cambios fisiológicos en los folículos.

Es conocido que tanto la LH como las PGs estimulan la adenilciclase e incrementan los niveles de Adenosin Monofosfato cíclico (AMPC) en el folículo (Lamprecht et al, 1973). Tanto el AMPC como sus derivados a concentraciones de  $10^{-3}M$  tienen un efecto inhibitorio en la maduración del ovocito de rata (Hillensjo et al, 1978). Nekola y Smith (1975) en ratones, mostraron que la adición de dibutiril AMPC al medio de cultivo de folículos, inhibe el efecto inductivo de la LH sobre la maduración del ovocito. El efecto inhibitorio del dbAMPC también se ha observado en ovocitos libres, obtenidos de ratonas maduras

(Cho et al, 1974) y de ratas (Magnusson y Hillensjo, 1977). Por lo tanto es muy probable que la inhibición de la maduración de los ovocitos intrafolliculares causada por el dbcMP, se deba a la acción directa de este compuesto sobre los ovocitos.

Una hipótesis atractiva es la que postula que las uniones huecas (Gap junctions) transmiten AMPc de las células foliculares al ovocito, inhibiendo su maduración (Dekel y Beers, 1978). Además se ha postulado que el reinicio de la meiosis causado por la secreción de gonadotrofinas se dá cuando se interrumpe la transferencia directa de AMPc al ovocito (Dekel y Beers, 1978). En contraste con esta hipótesis se encuentra la demostración de que la reducción del acoplamiento intercelular producido por LH, no parece ser el disparador para el reinicio de la meiosis ya que la iniciación de la maduración precede a la terminación de la comunicación inducida por LH (Moor et al, 1981; Eppig, 1982). La elevación de la concentración de AMPc en las células del cumulus, no resulta en un pico detectable de AMPc en el ovocito (Schultz et al, 1983). Estos datos indican que el AMPc de las células del cumulus puede no ser transferido al ovocito, sin embargo, existe una correlación entre la elevación de los niveles de AMPc de las células del cumulus y el retraso en la maduración. Un modelo propuesto recientemente para explicar la inhibición de la meiosis en el ratón, sugiere que un inhibidor putativo originado en las células del cumulus, es activado por el incremento de los niveles del AMPc y subsecuentemente transmitido al ovocito a través de la uniones huecas y de esta manera actuar suprimiendo la GVBD (Eppig, 1983; Freter y Schultz, 1984).

El AMPc puede jugar un papel significativo en el arresto intrafolicular de la meiosis del ovocito en conejos y otros mamíferos (Cho et al, 1974; Magnusson y Hillensjo, 1977). Sin embargo datos "in vitro", obtenidos utilizando ovarios de coneja perfundidos, no coincidieron con lo anterior (Dekel y Beers, 1978). Estos resultados suscitan la posibilidad de que se requiera una elevación transitoria de los niveles de AMPc para que este agente actúe como un inhibidor importante de la maduración espontánea del ovocito encerrado en el cumulus y sin embargo la elevación continua del AMPc en los folículos preovulatorios puede inducir el reinicio de la meiosis en ovocitos-cumulus dentro de sus folículos. Los resultados de Yoshimura y Wallach (1987), están de acuerdo con esta situación, ya que estos investigadores encuentran que la exposición continua a AMPc ejerce un efecto inhibitorio sobre la maduración del ovocito tanto con cumulus como con folículo; en contraste, la exposición transitoria de los folículos preovulatorios a AMPc acelera el reinicio de la meiosis en el complejo ovocito-folículo. La capacidad del AMPc para acelerar el reinicio de la meiosis no se observa cuando los ovocitos con cumulus o dentro de sus folículos son expuestos de manera constante a concentraciones elevadas de AMPc.

Alternativamente, el aumento de los niveles intrafoliculares de AMPc puede ser un requisito esencial para el reinicio de la meiosis previo a la ovulación. ( Deckel y Beers, 1978; 1980 ). Esta última posibilidad ha sido utilizada por Richards y Midgley ( 1976 ) para postular un mecanismo de acción

del estradiol sobre la maduración folicular ( Fig. 5 ), en la cual el estradiol combinado con su receptor penetra al núcleo y actúa estimulando la síntesis de RNA mensajero encargado de sintetizar la adenilato ciclasa. De esta manera el aumento de receptores en las células de la granulosa por efecto de la estimulación con FSH puede ser mediada por el acoplamiento de la adenilato ciclasa a los sitios receptores para FSH. La fijación de la FSH induce un aumento en la síntesis de AMPC, el cual, a su vez inducirá la traducción del RNA mensajero para los receptores a LH y la posibilidad de un estímulo eficaz por esta hormona.

#### Otros Agentes

La demostración de la existencia de un compuesto inhibidor de la maduración del ovocito tal como el OMI, ha servido de base para la búsqueda de otros compuestos que funcionen como factores inhibidores de la maduración. En 1976 Gwatkin y Anderson describieron la presencia de un péptido de unos 10 000 Daltons, que funciona interfiriendo la acción activadora de la LH sobre la maduración del ovocito. En 1984 se señaló la presencia de un nuevo péptido, más grande que el OMI, pero más pequeño que el factor encontrado por Gwatkin y Anderson y con mayor capacidad para inhibir la maduración del ovocito (Sato y Koide, 1984). Este nuevo compuesto fué llamado factor preventivo de la maduración del ovocito (OMPF). El funcionamiento de este factor parece estar relacionado con la presencia de ciertos glicosamin - glicanos (GAGs), particularmente heparina y heparan sulfato, en el folículo (Sato y Koide, 1984).

MODIFICACION DEL SISTEMA DE RESPUESTA A LA FSH

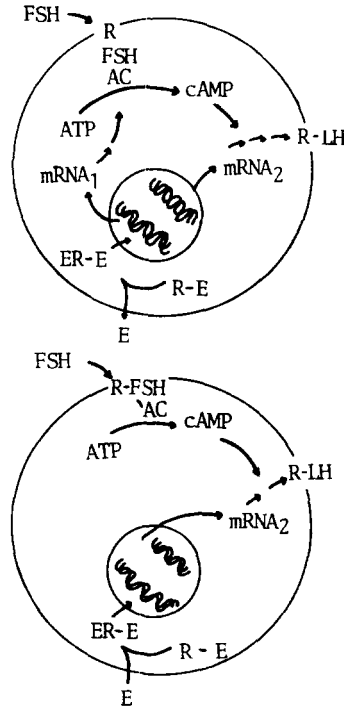


Figura 5.- Dos posibles mecanismos de acción del estradiol sobre las células de la granulosa. (A) El primer mecanismo indica la manera como el estradiol actúa modificando la respuesta celular a la FSH. El estradiol, por intermedio del complejo Estradiol-Receptor (ER-E), regula la síntesis del RNA mensajero (mRNA-1) para la síntesis de la adenilato ciclasa (AC). De esta manera el aumento de la respuesta de las células de la granulosa al estímulo con FSH puede ser mediado por el acoplamiento del receptor de la gonadotropina (R-FSH) al sistema adenilato ciclasa- AMPc. El aumento en la concentración de este segundo mensajero estimulará la síntesis del RNA mensajero (mRNA-2) que lleva la información para la síntesis del receptor membranar para la LH (R-LH). (B) El segundo esquema indica un procedimiento alternativo en el cual el complejo receptor-estradiol ( ER-E ) regula directamente la síntesis del RNA mensajero (mRNA-2) encargado de la síntesis de los receptores membranales para LH (R-LH). En este caso la susceptibilidad a la actividad estimuladora de la FSH se realizará mediante la síntesis de AMPc, el cual aumenta la eficiencia de la transacción del mRNA-2 y por lo tanto la síntesis de los receptores para la LH.

En efecto, mientras que ninguno de los glicosaminoglicanos utilizados aisladamente a concentraciones tan altas como 500 ug/ml no parecen tener efecto sobre el proceso de maduración folicular, la heparina y el heparan sulfato, a concentraciones muy pequeñas, son capaces de bloquear completamente, el funcionamiento inhibitor del OMPF (Sato et al, 1986). Esto sugiere que la consistente presencia de estos GAGs en el ambiente folicular pudiera ser necesaria para modificar la actividad de los factores inhibidores de la maduración.(Tabla I)

A este respecto debe recordarse que los GAGs pueden modificar la acción de las gonadotrofinas interfiriendo con su fijación a las células de la granulosa (Nimrod y Linder, 1980) y se ha descrito que bloquean la activación de la adenilato ciclasa inducida por la LH (Salomon et al, 1978). Los folículos maduros de apariencia normal contienen concentraciones muy bajas de condroitin sulfato (CS), mientras que en los folículos atrésicos la concentración de algunos GAGs es muy alta, lo cual provoca una disminución de la capacidad de fijación de la FSH y la de LH (Peluso y Steger, 1978). Es pues posible sugerir que según el folículo crece y madura la concentración de GAGs disminuye, propiciando la interacción de las gonadotrofinas con las células foliculares. En el caso de que se produzca la atresia la concentración de GAGs se mantiene alta, o aun aumenta, disminuyendo la estimulación gonadotrópica.

En 1985 Downs et al (1985), y Eppig et al (1985) sugirieron que las purinas son capaces de ejercer un control efectivo sobre



TABLA 1

Efecto de los glicosaminglicanos sobre la actividad del factor preventivo de la maduración del ovocito (OMPF) en el ratón.

Glicosaminglicano OMPF		GVBD (%)	inhibición (%)
Control	-	79.5 ± 8.3	0
Control	+	11.7 ± 6.5	85
Condrotin sulfato	-	77.5 ± 15.1	2
Condrotin sulfato	+	14.3 ± 9.3	82
Heparan sulfato	-	75.0 ± 8.5	6
Heparan sulfato	+	62.5 ± 12.5	21
Heparina	-	73.6 ± 6.4	7
Heparina	+	55.4 ± 12.1	30

La concentración de los glicosaminglicanos en el medio de cultivo fué de 500 µg/ml. 10 a 15 ovocitos se suspendieron en cada caso en el medio de cultivo con las adiciones señaladas y después de 3 horas de incubación a 37 °C. se determinó la presencia de GVBD.

( Modificado de Downs y Eppig, 1987 )

la reanudación de la meiosis. En particular estos grupos de investigadores señalaron la presencia de altas concentraciones de hipoxantina en el líquido folicular y su capacidad para mantener al ovocito en arresto meiótico, posiblemente actuando de manera concertada con el AMP-cíclico.

La aplicación intraperitoneal de inhibidores de la síntesis de novo de purinas, tales como la azaserina, así como de inhibidores de la inosina monofosfato deshidrogenasa (IMP-deshidrogenasa), como es el caso del ácido micofenólico y la bredinina, indujeron la ruptura de la vesícula germinal en ratonas impúberes estimuladas con PMSG (Downs y Eppig, 1987). Por el contrario los inhibidores de la adenilosuccinato sintetasa (hadacidina y di-alanosina), no tuvieron ningún efecto (Tabla II). Estos resultados sugieren que la conversión de IMP a derivados de la guanina o de la xantina, debería estar involucrada en la acción inhibitoria de la hipoxantina sobre la maduración in vitro del ovocito.

Downs et al (1985) encontraron que la guanosina es el compuesto más activo como inhibidor de la maduración folicular y sugieren que los derivados de la guanina, producidos dentro del folículo por la IMP-deshidrogenasa, desempeñan un papel fundamental en el mantenimiento del arresto meiótico. Sin embargo no se ha determinado con precisión la forma en que la hipoxantina participa en este proceso.

085797

TABLA II.

Efecto de ácido micofenólico (MA), brendinina (BR), azaserina (AZA), hadacidina (HAD) y di-alanosina (ALA) sobre la maduración del ovocito in vivo.

Tratamiento	Ovocitos examinados	GVBD	( % )
Control	1095	10	( 1 )
1.5 umolas MA	439	114	( 26 )
3.0 umolas MA	423	329	( 78 )
1.5 umolas BR	447	201	( 45 )
3.0 umolas BR	398	382	( 96 )
6.0 umolas BR	456	444	( 97 )
12.0 umolas AZA	167	167	( 40 )
12.0 umolas HAD	450	1	( 0 )
12.0 umolas ALA	531	2	( 0 )

Se utilizaron ratones a los que se les inyectaron 5 UI de PMSG y a las 24 horas la dosis indicada de los diferentes agentes por vía intra-peritoneal. Los controles recibieron solamente el solvente aplicado de la misma manera. Los animales se sacrificaron 22 horas después del tratamiento, se les extrajeron y se observaron los ovocitos rodeados de cumulus para determinar la presencia de GVBD.

( Modificado de Sato et al, 1986 )

### Metabolismo Energético

La maduración espontánea de ovocitos aislados de rata se acompaña de un aumento gradual en el consumo de oxígeno. Este incremento no ocurre sino hasta cuando el ovocito sufre la GVBD (Magnusson et al, 1977; Magnusson y Hillensjo, 1977). Hillensjo et al (1975) y Dekel et al (1976), observaron que la velocidad de consumo de oxígeno en complejos ovocito-folículo disminuyó durante la maduración del ovocito después de la estimulación con LH. Una gran proporción de la actividad respiratoria en los complejos es debida a la respiración de las células que rodean al ovocito (Hillensjo et al, 1975; Magnusson et al, 1977; Billig et al, 1983), esto es importante para darse cuenta que, mientras el consumo de oxígeno en el ovocito se incrementa, este aumento queda enmascarado por la gran disminución del consumo en las células que lo rodean. Sin embargo un estudio más reciente demostró que la elevación en el consumo de oxígeno por el ovocito no es un prerequisite para su maduración nuclear (Magnusson, 1980). Experimentos realizados utilizando folículos de mamíferos, han demostrado un incremento en la producción de ácido láctico y del consumo de glucosa por los folículos después de ser estimulados con LH (Nelsson, 1974; Hillensjo, 1976; Tsafiriri et al, 1976). Sin embargo, Zeilmarker y Verhamme (1977) midieron directamente los cambios en la concentración de lactato dentro del folículo mismo y no encontraron cambios significativos durante el proceso de maduración. En otros trabajos se ha demostrado que el aumento en la producción de

ácido láctico por los folículos estimulados con LH, no es necesaria para que ocurra la maduración del ovocito ya que la supresión con yodoacetato del consumo de glucosa y la producción de ácido láctico no inhibió la maduración del ovocito (Tsafriri et al, 1976). Esto parece indicar que el efecto estimulador de la LH no está relacionado con el aumento en la actividad glicolítica del folículo.

El folículo, durante la maduración del ovocito tiene la capacidad de utilizar, con distintos grados de eficiencia, una extensa variedad de metabolitos de glucosa tales como el piruvato, lactato, oxalacetato, succinato y fumarato, así como la misma glucosa. Biggers et al (1967) observaron en el ratón que los ovocitos libres pueden utilizar sólo piruvato y oxalacetato como sustratos. El lactato y otros derivados de la glucosa se pueden utilizar sólo cuando los ovocitos se incuban con sus células foliculares las cuales sí son capaces de metabolizar al lactato (Brinster, 1971; Rushmer y Brinster, 1973). Esta característica metabólica parece ser un fenómeno universal pues se encuentra tanto en mamíferos como en vertebrados inferiores y en invertebrados (Eppig y Steckman, 1974, 1976), y es probablemente debida a un bloqueo bien demostrado de la fosfofructocinasa (Barbehenn et al, 1974, 1978). De hecho Zeilmaker y Verhammer (1974), sugirieron que, puesto que la disponibilidad del oxígeno está limitada en el folículo, el lactato, más que el piruvato, puede ser la mayor fuente de energía aprovechable por el ovocito dentro del folículo. También se ha sugerido que, la incapacidad de los

ovocitos libres para consumir lactato, puede deberse a la falta de nicotín adenín dinucleótido (NAD) endógeno, necesario para convertir el lactato a piruvato vía la activación de la deshidrogenasa láctica (LDH). Esta sugerencia se basa en la observación de que la adición de NAD produce la maduración de ovocitos libres en un medio conteniendo lactato como única fuente de energía (Sorensen, 1972; Zeilmaker et al, 1972; Billig y Magnusson, 1985).

No hay duda de que la maduración del ovocito es un proceso que requiere consumo de energía, sin embargo no existe un completo acuerdo con respecto a los mecanismos que participan en la regulación del metabolismo energético del ovocito durante su maduración. La mayoría de los investigadores están de acuerdo en que la GVBD no se da, en condiciones de inhibición del metabolismo aeróbico (Zeilmaker y Verhammer, 1974; Gwatkin y Haidri, 1974), sea por la falta de oxígeno, o bien por la presencia de inhibidores respiratorios como KCN (Brachet et al, 1975).

Schulz y Lambert (1973), observaron que la maduración de los ovocitos de estrella de mar involucra una disminución en los niveles de AMP y ATP y un incremento del ADP, por lo cual sugieren que el aumento de oxígeno que se observa después de la GVBD, tanto en esta especie como en otras, puede ser interpretado como un indicador del aumento en la fosforilación oxidativa para reestablecer el nivel de ATP que se consumió durante la GVBD.

Uno de los procesos que requiere energía durante la maduración del ovocito, es la síntesis de proteínas. Esto se basa fundamentalmente en dos hechos; primero, existe una reducción substancial de los niveles de síntesis de proteínas durante la maduración del ovocito, bajo condiciones anaeróbicas (Smith y Ecker, 1970) y segundo, el pico de consumo de oxígeno observado en los ovocitos, coincide con el tiempo de mayor incorporación de aminoácidos en las proteínas del ovocito (Brachet et al, 1975).

### Síntesis de Proteínas

Aparentemente el hecho de que exista un aumento en la actividad de síntesis de proteínas en el ovocito durante la maduración, es un fenómeno general para todos los animales. En ovocitos de mamífero la síntesis de proteínas ha sido estudiada en especies como el ratón (Galbus y Stein, 1976; Schultz y Wassarman, 1977; Schultz et al, 1978), cerdos (Mc Gaughey y Van Blerkom, 1977), oveja ( Warmes et al, 1977). A excepción de la oveja, en el resto de las especies, se han observado cambios significativos en el patrón de síntesis de proteínas del ovocito solamente después de la GVBD. En el estudio de las ovejas, se encontró que estos cambios también ocurrieron antes de la GVBD. Esto parece sugerir que la síntesis protéica es un requisito para la progresión de la maduración. Sin embargo Smith y Ecker (1970 ) y Ecker y Smith (1971), mostraron que mantener a los ovocitos bajo condiciones anaeróbicas, no detuvo su maduración a pesar de que hubo una disminución substancial en el

nivel de síntesis de proteínas. Baltus et al (1973), también obtuvieron evidencias en este sentido, utilizando inhibidores específicos a concentraciones capaces de disminuir la síntesis protéica al 50%.

En mamíferos, el tratamiento con inhibidores de la síntesis protéica, como puromicina o cicloheximida, detiene a los ovocitos en la metafase I o en estado de cromosoma bivalente circular, pero no afecta ni la condensación de los cromosomas ni la GVBD (Wassarman y Letourneau, 1976; Schultz y Wassarman, 1977). Sin embargo aparentemente en estos experimentos no fue totalmente inhibida la síntesis protéica, por lo que es posible que la poca proteína sintetizada en presencia del inhibidor sea suficiente para permitir los primeros eventos de la maduración. Schultz y Wassarman (1977) han sugerido que la inhibición de la síntesis de proteínas durante las primeras 5 horas de la maduración en ovocitos de ratón (estado de cromosoma circular bivalente) no afecta la maduración, pero la inhibición durante las siguientes 5 horas (estado de metafase I), impide cualquier adelanto o progreso de la misma. Por lo tanto aparentemente existen ciertas proteínas que son sintetizadas durante fases específicas de la maduración y que son indispensables en los pasos subsecuentes del proceso.

Recientemente se ha estudiado la incorporación de sustratos marcados a macromoléculas en los complejos ovocito-cumulus durante la expansión provocada por la FSH (Ball et al, 1985). El estudio electroforético de las proteínas sintetizadas bajo estas condiciones parece indicar la aparición de algunas



especies proteicas características del complejo estimulado, que no son apreciables en el sistema antes de su estimulación por la gonadotropina. Estas nuevas proteínas podrían ser semejantes a las inducidas en las células de la granulosa cuando son estimuladas con gonadotropina coriónica humana (Landefeld et al, 1979).

De particular interés parecen ser los estudios de Crosby et al (1981). Estos autores estudiaron el papel que las relaciones intercelulares desempeña dentro del folículo para regular o mantener la maduración del ovocito, particularmente desde el punto de vista de la síntesis de proteínas. La velocidad de captación de aminoácidos a través de la membrana del ovocito aumenta de manera importante durante la maduración (Moor y Smith, 1979), y puede inducirse por la supresión de las células foliculares, aunque las células del cumulus se mantengan intactas. Esto implica que las células foliculares regulan o inhiben el transporte de sustratos a través de las conexiones del complejo cumulus-ovocito en el folículo completo y que esta acción inhibitoria puede ser suprimida por las gonadotropinas. Sin embargo debe tenerse en cuenta que el cumulus mismo posee un efecto regulador sobre esta función del ovocito, ya que los ovocitos aislados no tienen un mecanismo estable de transporte de aminoácidos.

Más difíciles de entender son los resultados de estos investigadores en relación al patrón de proteínas sintetizadas bajo estas diferentes condiciones. En efecto, sus resultados indican que no sólo las células del cumulus participan en la

determinación del patrón de proteínas sintetizado por el ovocito, sino que las restantes células del folículo participan también: en primer lugar algunos ovocitos envueltos en su cumulo son capaces de sintetizar proteínas sin estímulo hormonal, lo cual indica que las células del cumulus solas no son siempre capaces de inhibir por completo la síntesis de proteínas del ovocito; en segundo lugar, los cambios inducidos en este parámetro por el tratamiento con LH de complejos cumulus-ovocito, son similares pero no idénticos a los encontrados en los folículos enteros estimulados bajo las mismas circunstancias (Crosby et al, 1981).

La estimulación por FSH de la expansión del complejo cumulus-ovocito provoca una disminución notable en la incorporación de timidina-H3 al DNA que se acompaña de un aumento en la incorporación de leucina a proteínas, principalmente durante las 24 horas posteriores a la estimulación. Por el contrario la incorporación de uridina al RNA no se modifica (Ball et al, 1985).

### Síntesis de RNA

La síntesis de RNA es muy activa en el ovocito en crecimiento y disminuye drásticamente una vez que el ovocito adquiere su mayor tamaño y se inicia la formación del antro (Moore et al, 1974). En este mismo momento el nucleólo del ovocito, originalmente de estructura finamente granular y vacuolado, se hace compacto y agranular (Crozet et al, 1981; Motlik et al, 1984). Estas modificaciones morfológicas y funcionales parecen necesarias para la adquisición de la competencia meiótica del ovocito, pero no ocurren en todas las especies al mismo tiempo. En el ratón ocurre cuando el ovocito se hace plurilaminar (Chouinard, 1971); en el cerdo ocurre en los folículos antrales (Crozet et al, 1981); en el humano se realiza solo en los folículos antrales grandes (Tesarik et al, 1983); en las vacas se ha observado en folículos antrales de tamaño medio, entre 0.5-3 mm de diámetro. Estos ovocitos mostraron una intensa síntesis de hnRNA y rRNA, la cual cesó prácticamente acompañándose de cambios en la estructura nucleolar.

El RNA sintetizado por el ovocito en crecimiento es muy estable. Por ejemplo, cerca del 80% del material radioactivo insoluble en ácido sintetizado después de la inyección intrabursal de un ribonucleótido marcado, se retuvo hasta el momento de la ovulación ocurrida unos 10-20 días después

(Bachvarova y DeLeon, 1980; Brower et al, 1981). Usando estas mismas técnicas se ha encontrado que aproximadamente el 10% del RNA sintetizado y presente en el ovocito ovulado es poli(A)-RNA (Bachvarova y DeLeon, 1980). En otros estudios se ha encontrado que en ovocitos cuyo crecimiento es estimulado in vitro, el RNA sintetizado fue de todas las especies, ribosomal, de transferencia y poli(A)-RNA (Brower et al, 1981) ; así mismo se encontró que el recambio de las especies sintetizadas es practicamente nulo durante los 10 días del estudio, lo cual se consideró verdaderamente notable en el caso del poli(A)- RNA.

Estudios encaminados a demostrar la síntesis relativa de diferentes especies de RNA han encontrado que la síntesis y estabilidad relativa de los RNA 28S:18S:5S:4S se mantuvo esencialmente constante durante el crecimiento del ovocito (Brower et al, 1981; Boreen et al, 1983).

En trabajos realizados con anfibios, se ha observado que la maduración inducida por gonadotrofinas en ovocitos dentro de sus folículos, es inhibida por el inhibidor de la síntesis de RNA, actinomicina D (Dettlaf, 1966, Brachet, 1967). La actinomicina D no evitó la maduración de ovocitos encerrados en sus folículos inducida por LH (Tsafriri, et al, 1972). Estos resultados sugieren que el efecto de las gonadotrofinas en la inducción de la maduración del ovocito, puede involucrar la síntesis de RNA, pero sólo bajo ciertas condiciones fisiológicas, ya que la mayoría de los inhibidores de la síntesis de RNA carecen de efecto sobre la maduración cuando los

ovocitos están dentro del folículo. En ovocitos libres en metafase I ó en estado de cromosoma bivalente circular el inhibidor mencionado si fué capaz de evitar la maduración (Blom y Mukherjee, 1972; Galbus y Stein, 1976), o ésta se acompaña de aberraciones cromosómicas severas (Alexandre y Gerin, 1977).

#### Síntesis de DNA

Aparentemente no se requiere de síntesis de DNA durante el proceso de maduración (Masui y Clarke, 1979). Existen evidencias en anfibios de la presencia de síntesis de DNA, aparentemente a nivel de citoplasma y muy probablemente de origen mitocondrial (Hanocq, et al, 1974).

### Ovulación

Después de que el ovocito ha reanudado la meiosis y se ha llevado a cabo normalmente la maduración folicular, la liberación de un ovocito fertilizable se realiza mediante la ruptura del folículo y el vaciamiento de su contenido, incluyendo el ovocito, en el ambiente extraovárico. Este proceso se conoce como ovulación. La ovulación involucra algunos procesos locales que son cruciales para que el evento se realice normalmente. En el mamífero, los folículos maduros se acercan a la superficie del ovario hasta que forman sobre ella una protrusión cubierta por una delgada membrana de aspecto translúcido, llamada estigma.

El proceso de ovulación ha sido el objeto de numerosos experimentos. La evidencia acumulada indica que un pre-requisito esencial para que se realice la ruptura folicular es la descomposición de la capa de tejido conectivo, fundamentalmente colágena, que cubre al folículo (Espey, 1978). Entre los motivos que se han mencionado como causantes de este proceso dinámico se encuentran : (1) Aumento en la presión intrafolicular (Espey y Lipner, 1963; Meyer et al, 1971); 2) Acción directa del aumento en la secreción de esteroides (Rondell, 1974); (3) Acción de algunas enzimas proteolíticas sobre la pared del ovario (Espey, 1974; Morales et al, 1983); (4) Presencia de una reacción inflamatoria. Kitai et al (1985); (5) Contractilidad ovárica (Okamura et al, 1972); (6) Esteroidogénesis (Thebault, 1977).

### Atresia Folicular

Se estima que al nacimiento, el número de ovocitos en ambos ovarios varía de 60,000 a 100,000 de acuerdo a la especie y la raza. Sin embargo, no todos estos ovocitos son capaces de alcanzar el estado maduro. Por cada ovocito que madura y es ovulado, varios empiezan su desarrollo pero nunca alcanzan la maduración, por tal motivo cualquier ovario normal contiene numerosos ovocitos en degeneración dentro de folículos que no pudieron alcanzar su desarrollo total (Hafez, 1974). A este proceso de degeneración que sufren la mayoría de los folículos ováricos se le conoce como atresia (Ingram, 1962).

La atresia, bajo condiciones naturales, es un proceso paulatino e irreversible. Las alteraciones morfológicas que va sufriendo el folículo dependerán del grado de atresia que vaya alcanzando. Existe una propuesta para clasificar a los folículos por su estado de atresia, implementada por Hay, et al (1976) y complementada por Moor, et al (1978). Estos autores proponen la clasificación en cuatro grupos: El grupo número 1 en el cual se incluyen los folículos que tienen una apariencia translúcida, una buena vascularización y una capa granulosa regular. Este grupo en realidad se refiere a los folículos normales no atrésicos.

En el grupo 2 se incluye a los folículos que presentan una apariencia grisácea o que de alguna manera han perdido su apariencia translúcida, pero que todavía presentan circulación sanguínea y escasos desprendimientos de la capa granulosa. Este grupo fué considerado "intermedio" y difícil de clasificar.

Finalmente un tercer grupo en el cual se incluyen los folículos claramente atrésicos, cuya apariencia opaca obedece a que la mayor parte de los vasos sanguíneos se encuentran vacíos, así como a la presencia de grandes desprendimientos de la granulosa y de una gran cantidad de glóbulos blanquecinos, "cuerpos atrésicos", presentes dentro de la cavidad folicular. Este último grupo ha sido posteriormente dividido en dos subgrupos, el de los folículos moderadamente atrésicos o grupo 3a y el grupo 3b que incluye los folículos severamente atrésicos.

Existe otra forma más minuciosa para clasificar a los folículos atrésicos y fué propuesta por Carson et al (1979) y es como sigue:

Atresia I: Se refiere a los folículos no atrésicos y son aquellos que presentan una capa granulosa íntegra y uniforme además de que sus tecas son perfectamente evidentes y en contacto muy cercano con la granulosa.

Atresia II: En esta clase se encuentran algunas áreas discontinuas en la granulosa así como picnosis en estas células.

Atresia III: Las perforaciones de la capa granulosa están asociadas con áreas de picnosis extensivas de los núcleos de las células de esta capa.

Atresia IV : En este momento existe ya una perforación extensiva de la capa de la granulosa, además de una separación parcial de la teca interna. Los núcleos picnóticos son evidentes en ambas capas. El ovocito empieza a separarse de la pared folicular.

Atresia V: Los fragmentos residuales de la granulosa están



totalmente separados de la teca. los capilares tecaes y el ovocito han desaparecido.

En este mismo trabajo, los autores encuentran que la atresia es dependiente del diámetro folicular; el 79% de los folículos con diámetro menor a 1 mm eran no atrésicos (atresia I, II), mientras que el 93% de los folículos mayores de 6mm fueron atrésicos (atresias III, IV, V). Así mismo confirman el hecho de que las células de la granulosa pierden la capacidad de unir gonadotrofinas conforme avanza la atresia.

Hasta el momento no se conocen con precisión las causas que desencadenan o determinan la atresia folicular. Existen diversas teorías que han tratado de explicar las causas de la atresia. John y Khron (1959) postularon que la atresia es inducida por una sustancia intraovárica capaz de promoverla. También se sustenta que este proceso degenerativo es el resultado de las limitaciones en aporte de nutrientes y sustratos por una reducción de la suplementación sanguínea (Greenwald, 1974; Hay et al , 1976). Otra explicación que se ha dado es la existencia de un desarrollo aberrante de receptores de la teca y de la granulosa (Richards et al, 1978 ). Además, han sido involucrados numerosos y contradictorios factores hormonales. Se dice que la atresia se incrementa por altos niveles de gonadotrofinas (Sturgis, 1971; Harman et al, 1975), pero también por su disminución (Keever y Greenwald, 1967; Greenwald, 1974); ha sido reportado que los estrógenos incrementan la atresia (ter Haar et al, 1976; Peddie, 1977) y también que tienen un efecto

antiatrésico (Harman et al, 1975); los andrógenos también han sido reportados como causa del incremento de la atresia (Louvet et al, 1975).

En algunos experimentos se ha podido demostrar que los folículos atrésicos son capaces de regenerarse bajo condiciones in vitro aun cuando su líquido folicular (Moor et al, 1978) o el medio de cultivo (Hay et al, 1979) contengan altos niveles de andrógenos, bajos niveles de estrógenos y la ausencia total de gonadotrofinas.

Generalmente los estudios sobre atresia folicular sólo describen los estadios avanzados de ésta debido a la dificultad que presenta la indentificación de las etapas tempranas. En un estudio reciente en el cual se comparan observaciones al microscopio de luz y al microscopio electrónico, se encontró que el único signo de la atresia temprana fué la presencia de núcleos picnóticos. Los folículos con atresia avanzada observados al microscopio de luz, mostraron severas alteraciones, principalmente en cuanto a la pérdida de células de la granulosa, así como marcadas irregularidades en la zona pelúcida. Las observaciones de estos folículos al microscopio electrónico revelaron alteraciones citoplásmicas que variaron de acuerdo al grado de atresia yendo desde la vacuolización y el aumento del tamaño de las mitocondrias, hasta daños importantes en otros organelos. En el estadio avanzado de la atresia los ovocitos presentan una importante vacuolización y disminución de las microvellosidades, los organelos se observan severamente distorsionados y la zona pelúcida además de presentar una

importante condensación se encuentra retraída hacia la placa de células de la granulosa (Gondos, 1982).

Se han desarrollado una serie de modelos con el propósito de estudiar a la atresia desde el momento en que se dan los primeros indicios y no sólo en retrospectiva como lo permiten las condiciones naturales de un animal. Los modelos que han sido usados son: el bloqueo de la ovulación en el proestro con barbitúricos como el pentobarbital sódico (Braw y Tsafriri, 1980); la inyección de PMSG en ratas inmaduras (Peluso et al, 1977); la hipofisectomía durante el proestro en hamsteres (Greenwald, 1978). Bill y Greenwald (1981), desarrollaron un modelo con el cual se producen grandes poblaciones sincronizadas de folículos atrésicos en hamsteres, el tratamiento consiste en hipofisectomizar a las hembras el día de la ovulación (día 1) e inmediatamente después inyectar subcutáneamente PMSG. El día 4 se aplica intraperitonealmente suero anti-PMSG (privación aguda de gonadotropinas). Este tratamiento produce una supresión más brusca del efecto de la PMSG de lo que ocurre normalmente por su degradación biológica normal, lo cual acelera de una manera muy importante el proceso de atresia.

Actualmente este es uno de los métodos más usados en el estudio de la atresia. De hecho todos los modelos citados concuerdan en los cuadros básicos de descripción de este proceso y sólo difieren en el tiempo en el que comienzan los primeros signos, dependiendo de lo drástico o de lo rápido que se vean afectados los niveles de gonadotropina.

Utilizando el modelo de privación aguda de gonadotrofinas, Bill y Greenwald (1981) encuentran que el examen morfológico de los folículos antrales después de la aplicación de anti-suero PMSG en hamsteres hipofisectomizados, reveló que los primeros cambios hacia la atresia se detectan a las 4 horas de la aplicación del anti-suero. A este tiempo, se observaron una gran cantidad de células de la granulosa con núcleos picnóticos principalmente en las células que rodeaban al ovocito. A las 8 horas se observó la desintegración del cumulus oophorus aunque sin desintegración del ovocito. A las 24 horas el cumulus se observa totalmente desintegrado y el ovocito flota libremente en la cavidad antral.

Uno de los aspectos menos estudiados en el proceso de maduración folicular concierne a los cambios bioquímicos que participan en el proceso, siendo claro que hasta ahora todos los estudios hechos se refieren, sobre todo, a los cambios endócrinos que acompañan el proceso de atresia, sin que de ellos pueda derivarse un conocimiento preciso de los cambios que precipitan la presentación del fenómeno. Estudios bioquímicos realizados en hamsteres mediante la utilización del método de Bill y Greenwald para producir atresia, han demostrado que la cantidad de DNA folicular se mantuvo constante durante las primeras 24 hr, pero después disminuyó, alcanzando un nadir a las 48 hr. La concentración de DNA por folículo a las 48 hr correspondió a una disminución notable en el número de células hasta  $1.0 \times 10^5$ . Durante este tiempo la observación histológica demuestra la destrucción y eliminación de un gran número de

células de la granulosa (Hubbard y Greenwald, 1981). Entre las 48 y las 72 hr se observó un ligero, pero significativo, aumento en la concentración de DNA por folículo, el cual puede corresponder a la infiltración leucocitaria que se produce durante la atresia o bien a la hiperplasia de la teca.

También se ha encontrado una disminución en la concentración folicular de nucleótidos cíclicos, tanto AMPc como GMPc, aparentemente en correlación con el progreso de la atresia. Por autoradiografía se ha demostrado una disminución en la población de receptores para FSH y hCG en las células de la granulosa de los folículos atrésicos (Uielenbroek et al, 1980). Puesto que ambas gonadotrofinas estimulan la adenilato ciclasa en el hamster, una reducción en el número de sus receptores debe causar una disminución en la actividad de esta enzima y por lo tanto una disminución en la concentración folicular de AMPc (Hubbard y greenwald, 1981). La disminución observada en el GMPc no podría explicarse de la misma manera. También debe considerarse que el progreso de la atresia va acompañada por la muerte y disminución de las células de la granulosa, lo cual ciertamente contribuye a explicar el descenso en los nucleótidos cíclicos, tal vez no como un fenómeno primario, sino secundario a otras alteraciones foliculares.

Desde el punto de vista hormonal el primer efecto de la privación aguda de PMSG es la disminución en la habilidad para la producción de estrógenos (1 hora después del tratamiento) y posteriormente la de los andrógenos ( 2 horas después del tratamiento). En cuanto a la progesterona, ésta no parece ser

alterada de manera importante por el proceso de la atresia. Este estudio parece proveer una evidencia importante aunque indirecta acerca del orden en el que se presentan los signos de la atresia, siendo los morfológicos posteriores a los esteroideogénicos.

En un estudio más minucioso sobre las alteraciones esteroidales producidas como consecuencia de la atresia, utilizando el mismo modelo de la privación de gonadotropinas, Hubbard y Greenwald (1983), corroboraron que los folículos disminuyen rápidamente su habilidad para sintetizar estrógenos y testosterona, mientras que la producción de 17-OH-P, P4 y AMPC declinan más lentamente conforme avanza la atresia.

Una consideración importante para entender la disminución de los esteroides aromáticos en los folículos atrésicos es el hecho de haberse comprobado en distintas circunstancias tanto experimentales, usando el modelo de producción de atresia por privación de gonadotropinas (Shaha y Greenwald, 1982), como naturales (Carson et al, 1979), que durante este proceso degenerativo hay una declinación gradual de los receptores a LH, así como la destrucción de las células de la granulosa, quedando intactas las células de la teca hasta estadios avanzados. Se ha sugerido además, que la destrucción de la granulosa, causa la liberación de factores inmunológicos e inflamatorios, tales como el complemento, con lo cual ocurre una mayor destrucción celular (Farookhi, 1981).

En un trabajo realizado con células de la teca y de la granulosa, se vió que éstas contienen las enzimas capaces de

convertir progesterona a estradiol hasta 24 horas después de producida la atresia, por lo que aparentemente el problema de la disminución de los esteroides aromáticos se debe a un inadecuado aporte de androstenediona por parte de las células de la teca, de tal manera que uno de los puntos clave de los eventos esteroidogénicos durante la atresia puede ser la disminución de la actividad de la enzima C-17-20 liasa de la teca, con lo cual se impide el aporte del sustrato, androstenediona, a las células de la granulosa ( Silavin y Greenwald, 1984).

A pesar de que los datos más recientes parecen indicar que los cambios en la esteroidogénesis durante la atresia no se deben a alteraciones en la actividad de aromatización, existen algunos grupos de investigación que siguen sosteniendo esta hipótesis y postulan que la reducción en la actividad de aromatización de los folículos atrésicos se debe a una disminución en la actividad existente inmediatamente antes de que se inicie el proceso de atresia y no a la falla en la adquisición inicial de esta actividad (Moor, 1977; Moor et al, 1978; Mc Natty, 1981). Estos autores además proponen que la disminución en la aromatización, es uno de los primeros signos de atresia. Al respecto Tsonis et al (1984) discrepan de la opinión de los autores anteriores en cuanto a que la pérdida de la actividad de aromatasa sea uno de los signos tempranos de atresia, ya que ellos demuestran que en las etapas tempranas de la degeneración atrésica dicha actividad está presente en niveles normales.

Existen algunos informes que permiten sostener que la

atresia sea un proceso regulado intraováricamente. El trabajo realizado por Hay et al (1979) parece apoyar esta hipótesis. Ellos demuestran que los folículos atrésicos son capaces de recuperarse tanto de los daños histológicos como de los bioquímicos y hormonales producidos durante este proceso mediante el aislamiento del folículo de su medio ambiente natural y su mantenimiento en un medio de cultivo con nutrientes y sin ninguna otra suplementación.

Los datos indican que la recuperación es total al grado de ser imperceptible la diferencia con los folículos no atrésicos. En este mismo trabajo, se apoya también la hipótesis de la carencia de receptores a FSH en los folículos atrésicos, dado que la adición de esta hormona al medio de cultivo no produjo la recuperación de la capacidad de aromatización de los folículos en este estado.



## OBJETIVOS

### Objetivo Particular.

- Estudiar desde el punto de vista bioquímico la maduración y la atresia folicular en la cabra.

### Objetivos Particulares.

- Demostrar que los criterios que utilizaron Moor et al (1978) y Hay et al (1976) para el diagnóstico macroscópico e histológico de la atresia folicular en la oveja, pueden ser aplicados en el diagnóstico de los folículos de la cabra.
- Encontrar un parámetro bioquímico que permita establecer el estado de maduración de los folículos caprinos.
- Determinar la presencia de actividad proteolítica y antiproteolítica (tripsina y antitripsina) del líquido folicular, células de la granulosa y saco folicular y en su caso caracterizar fisicoquímicamente estas actividades.
- Conocer la influencia que tienen la atresia y el tamaño folicular sobre la actividad proteolítica ó antiproteolítica, así como determinar la localización de estas actividades en el folículo.

### MATERIAL Y METODOS :

Se obtuvieron ovarios de cabras criollas adultas no gestantes sacrificadas en el rastro de Milpa Alta D.F., procedentes de explotaciones extensivas con empadre continuo y condiciones de manejo muy similares. La zona caprina de procedencia se encuentra ubicada en el Municipio de San Luis Acatlán, Guerrero a  $16^{\circ} 45'$  LS y  $98^{\circ} 45'$  LO. El clima de este sitio es tropical subhúmedo con lluvias en verano (Aw 1), su altitud es de 375 m. sobre el nivel del mar, la temperatura media anual es de  $26^{\circ}\text{C}$ . y su precipitación media de 976 mm.

De acuerdo a estudios realizados previamente con animales de esta zona ( Avendaño et al 1984 ), la época en la que los animales presentan su mejor momento reproductivo, en términos de incidencia de estros y tasa ovulatoria, es la que comprende los meses de Septiembre a Diciembre, por tal motivo, en el presente estudio se obtuvieron las muestras semanalmente durante los cuatro meses mencionados. Las muestras se obtuvieron aproximadamente 15 minutos después de la evisceración de los animales, los ovarios se transportaron en solución de NaCl 0.154 M a  $-4^{\circ}\text{C}$ ., conteniendo 50 U de Kanamicina / ml., y en un lapso no mayor 60 min. se tenían en el laboratorio; los ovarios se enjuagaron con solución salina fría en dos ocasiones, antes de hacer su disección, la cual se realizó desprendiendo la mayor proporción del tejido estromal hasta hacer posible la identificación fácil de la capa de células de la granulosa. La

parte gruesa de la disección se realizó macroscópicamente, pero para desprender las capas más cercanas al folículo fué necesario hacerlo bajo un microscopio estereoscópico equipado con fuente de iluminación eléctrica, magnificación 120 x (AMERICAN OPTICAL INSTRUMENT COMPANY). Durante todo el proceso de disección los folículos se mantuvieron en cajas de petri con la solución mencionada y en un baño de hielo para mantener la temperatura de la solución a 4. °C. la cual se verificó en repetidas ocasiones para cada experimento. Los folículos aislados se agruparon de acuerdo a su diámetro y a su estado de atresia. El diámetro folicular fué determinado utilizando una regla con escala graduada a intervalos de 1 mm. Los folículos medidos se clasificaron en tres grupos; menores de 3, de 3 a 6, y mayores de 6 mm. El estado morfológico de atresia se diagnosticó utilizando un microscopio estereoscópico ( magnificación 120 X), a través del cual se juzgaron principalmente tres elementos; la continuidad de la capa granulosa, el grado de vascularización tecal y la presencia del complejo cumulus-ovocito. Los folículos se clasificaron en cuatro grupos, siguiendo principalmente el criterio de Moor et al (1978), quedando de la siguiente manera: los folículos con apariencia brillante y translúcida, extensiva vascularización y una capa granulosa regular, fueron clasificados como no atrésicos ( Grupo 1 ); los folículos con apariencia opaca o grisácea, una pobre vascularización, vasos sanguíneos vacíos y desprendimientos de la placa granulosa, fueron considerados atrésicos (Grupo 3 ). Este grupo fué subdividido en dos, los moderadamente atrésicos (Grupo 3a) y los

severamente atrésicos (Grupo 3b). Esta subdivisión se hizo principalmente por el grado de daño a nivel de la capa granulosa desprendimiento del complejo cumulus ovocito y lesión de las tecas. Los folículos que presentaron algunos rasgos de atresia, como poca translucidez y aspecto grisáceo, pero sin desprendimientos claros de la granulosa, se clasificaron como indeterminados (Grupo 2).

Con el propósito de tener una confiabilidad adecuada en la clasificación bajo el microscopio estereoscópico (clasificación macroscópica), primero se realizó un ensayo con 120 folículos, los cuales después de ser clasificados macroscópicamente con el criterio mencionado, se enviaron al laboratorio histológico para su reclasificación y finalmente se compararon los resultados.

A los folículos clasificados, se les extrajo el líquido folicular por punción con una aguja calibre 22. El líquido se coleccionó en forma individual en pequeños tubos de polietileno para centrifuga (Beckman), mantenidos en hielo. Con el propósito de evaluar el grado de infiltración sanguínea en los líquidos foliculares obtenidos, se determinó en todas las muestras la concentración de hemoglobina por el método de la Benzidina (Crosby and Furth, 1956).

Los folículos con valores de hemoglobina mayores a 25 ug/ml. no se consideraron en los siguientes experimentos. Los valores de hemoglobina se utilizaron además para conocer su correlación con el grado de atresia. Por otro lado se hizo un experimento piloto, en el que se constato que con el método de

extracción de líquido que se usó, se estaban obteniendo más del 85% de las células de la granulosa. Así mismo los folículos procedentes de ovarios con cuerpos lúteos muy desarrollados o con anomalías gruesas como quistes, fibrosis, etc., no fueron considerados en este estudio, las patologías macroscópicas que se descartaron fueron básicamente las mencionadas por Rosales et al (1987).

El líquido folicular fué centrifugado a 3500 g. durante 10 min. para separar las células foliculares. El sobrenadante fué centrifugado a 12,000 g. por 20 min. Los precipitados del primer sobrenadante se resuspendieron en solución amortiguadora fría de Tris-NaCl (Tri-hidroxi-metil-amino-metano), pH 7.4 (50 mM.) y nuevamente se centrifugaron a 3500 g. durante 10 min., después se homogeneizaron en un homogeneizador (Coaxial Potter Elvehjem), con émbolo de teflón en 500 ul de Tris-HCl pH 7.4 (50 mM). Los sacos foliculares vacíos también se lavaron por centrifugación y se homogeneizaron en un 500 ul de la solución anterior. Durante la homogeneización de las estructuras, los tubos que las contenían se mantuvieron en hielo.

Las determinaciones que se hicieron fueron:

### Proteínas

Para la cuantificación de proteínas, se utilizó el método de Lowry y col. (1951), modificado por la incorporación del tartrato de sodio y potasio a la solución alcalina, con lo cual se le da mayor estabilidad a los reactivos. La determinación de proteínas se basa en el complejo colorido formado por el cobre del reactivo de la solución 2, con los enlaces peptídicos de las

proteínas. La intensidad del color es proporcional al número de enlaces peptídicos presentes. Las determinaciones se realizaron en líquido folicular y homogeneizados de paquete y saco.

Reactivos:

- Solución al 2% de Carbonato de Sodio y 0.02% de Tartrato de Sodio y Potasio en Sosa 0.1 N (Solución 1)
- Solución al 0.5 % de Sulfato de Cobre pentahidratado en agua (Solución 2).
- Solución Cupro-alkalino: Se mezclan 50 ml. de la solución 1 y 1 ml. de la solución 2 (Solución 3).
- Reactivo de Folin Ciocaltau (Harleco) diluido 1:2 en agua (Solución 4).

Método:

Se utilizaron alícuotas de 50 µl, tanto para el líquido folicular como para los homogeneizados de paquete y saco folicular.

Para hacer la determinación de proteínas en el líquido folicular por este método fué necesario diluirlo 20 veces dada su alta concentración. La muestra se aforó a 0.4 ml. con agua destilada y posteriormente se agregaron 2 ml. de la solución 3, a los 10 min. se agregó 0.1 ml. de solución 4. Después de 20 min. de reposo a temperatura ambiente, los tubos se leyeron en un espectrofotómetro Coleman Jr. a 550 nm.

En la curva estandar se utilizó Albúmina Sérica Bovina liofilizada. Se sabe que el color obtenido de la reacción en este método, sigue la ley de Lambert-Beer, únicamente cuando la concentración proteínica está en el rango de 0 a 100 µg y después de esta concentración pierde la linealidad y formando otra línea recta de 100 a 500 µg, por este comportamiento y dado que los rangos de concentración manejados en la curva estandar fueron de 15 a 90 µg/sistema, cuando las muestras problema mostraron una lectura mayor a la del último punto de la curva estándar fué necesario repetir la determinación con una alicuota menor, igualmente . cuando la lectura fué menor a la del primer punto del estandar, se repitió el experimento con una alicuota de mayor volumen

### Hemoglobina

La Hemoglobina se determinó en el líquido folicular por el método de la Benzidina (Crosby and Furth, 1956), que normalmente es usado para determinar Hemoglobina en plasma y que fué muy efectiva para la medición en líquido folicular disminuyendo al 10 % el volumen total de la mezcla de reacción.

### Reactivos:

- Solución de Benzidina al 1 % en Acido Acético al 90 %.
- Agua oxigenada al 1 %
- Acido Acético al 2 %
- Estandar de Hemoglobina. Normalmente las ampollitas comerciales contienen 800 µg/ml de Hemoglobina, para usarla

en la curva estandar se hizo una dilución 1:40 , por lo que la concentración final fué de 20 µg/ml.

Método:

Se tomaron alícuotas de 20 µl de líquido folicular y se aforaron a 50 µl con agua destilada, posteriormente se les agregó 100 µl de Benzidina al 1 % en Acido Acético al 90 % más 100 µl de H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> al 1 % .

Después de mezclar el contenido de los tubos se dejaron reposar durante 20 min. a temperatura ambiente, al término de este tiempo se les agregó 1 µl de Acido Acético al 10 % y después de 10 min. a temperatura ambiente las reacciones se leyeron en un espectrofotómetro Coleman Jr. a 515 nm. Para la curva estandar se tomaron alícuotas de van de 5 hasta 50 µl, las cuales equivalen a concentraciones de 100 a 1000 ng/sistema.

En todas las determinaciones mencionadas hasta aquí, los experimentos se realizaron por duplicado, con el propósito de tener resultados más confiables, así mismo para todos los casos, se incluyó un blanco de reactivos cuyo valor se restó a todos los tubos problema. En cuanto al cálculo de las concentraciones de las muestras, éste se hizo por la extrapolación del valor de la absorbancia obtenida sobre las curvas estandares respectivas.



Determinación del Peso Molecular de las Actividades Antitriptica y Triptica del Líquido Folicular por Filtración en Gel

Las macromoléculas tales como las proteínas, entre otras, se pueden separar o fraccionar por cromatografía de filtración en gel en base a las diferencias de tamaño y forma moleculares. A este tipo de cromatografía también se le llama cromatografía de exclusión molecular o cromatografía de tamiz molecular.

Existen varios tipos de sustancias que se utilizan para esta técnica, entre las que se encuentra el Sephadex; el cual está compuesto de moléculas de dextrana entrecruzadas con hepíclorhidrina formando perlas porosas con un tamaño bastante uniforme. Cuando el Sephadex se coloca en agua, se hincha formando un gel, en este momento las perlas presentan poros, los cuales son bastante uniformes y cuyo tamaño está determinado por el grado de entrecruzamiento, esta característica es lo que establece el grado de fraccionamiento.

Conforme una mezcla de varias macromoléculas pasa al través de una columna de gel, las moléculas con dimensiones más grandes que los poros más grandes de las perlas, se excluyen del gel y se eluyen primero; mientras que las moléculas pequeñas penetran en los poros. El grado al cual una molécula entra a los poros de un gel depende de su tamaño y forma; por consiguiente, las moléculas se eluyen de la columna conforme decrece su tamaño o peso molecular. El volumen de elución es logarítmicamente proporcional al tamaño o peso molecular.

Para determinar el peso molecular de las actividades antitriptica y triptica por esta técnica, una alícuota de 150  $\mu$ l. obtenida del líquido de los folículos en el estadio adecuado según la clasificación ya descrita, se colocó sobre la parte superior de una columna de Sephadex G 150-40 (Sigma Chemical Products) de 0.9 cm. de diámetro por 30.0 cm. de altura, (columna de plástico K 15/30 Pharmacia Fine Chemicals), la cual se dejó equilibrar toda la noche con el amortiguador de elución (Tris-HCL 0.05 M pH 7.4). La muestra se eluyó con el mismo amortiguador a 4° C. y a una velocidad de flujo de 6 ml./hr. Se colectaron 15 fracciones de 1 ml. cada una, usando un colector de fracciones LKB Ultrorrac tipo 7000 equipado con monitor para ultravioleta Uvicord II acondicionado para absorción a 280 nm. y un graficador LKB tipo 6520 A.

A las fracciones así obtenidas se les midió la actividad Antitriptica y a las fracciones con valores negativos (cero) se les midió la actividad triptica.

Las fracciones que presentaron actividad triptica fueron aquellas que eluyeron después de los 9 ml. y que por consiguiente su PM está muy al extremo de los valores inferiores de la curva de calibración para Sephadex G 150, por esta razón para corroborar el PM obtenido, las alícuotas con actividad triptica se juntaron y se filtraron al través de una columna de Sephadex G 50 en las condiciones arriba mencionadas.

Para calcular el PM en ambos casos se utilizó el valor del coeficiente de distribución aparente ( $K_{av}$ ) de las actividades

correspondientes entre los poros del gel y el solvente de elución, el cual se obtuvo utilizando la siguiente fórmula:

$$K_{av} = \frac{V_e - V_o}{V_t - V_o} \quad \text{en donde :}$$

$V_o$  : volumen vacío, el volumen de elución de las moléculas, que se distribuyen únicamente en la fase móvil debido a que son más grandes que los poros más grandes del gel. Este volumen se obtuvo de la señal que envió el Uvicord II al graficador al pasar una solución de una sustancia patrón (Dextrán azul 2000 Pharmacia Fine Chemicals) y cuyo PM es mayor al límite de exclusión del gel que se está usando.

$V_t$  : volumen total de la columna de gel y el cual se obtiene por cálculo matemático, usando la fórmula del volumen de un cilindro  $V_t = \pi r^2 h$ .

$V_e$  : volumen de elución de la columna, el volumen de solvente requerido para eluir una molécula dada. Se obtiene también de la señal que manda el Uvicord II al graficador cuando se está eluyendo la muestra problema.

Puesto que  $V_t - V_o$  incluye el volumen de la matriz del gel, el cual es inaccesible a todas las moléculas de la muestra,  $K_{av}$  no es un coeficiente de distribución verdadero. Sin embargo, para un gel dado hay una relación constante  $K_{av}/K_d$  que es independiente de la naturaleza del soluto o de su concentración, por lo tanto  $K_{av}$  define el comportamiento del soluto al igual que  $K_d$  independientemente de las dimensiones y de las condiciones de empaquetamiento de la columna. Prácticamente es

más fácil determinar el peso molecular de una sustancia, construyendo una curva de calibración de  $K_{av}$  contra peso molecular, utilizando un juego de proteínas con diferentes pesos moleculares, los cuales deben estar dentro de los límites de exclusión del gel y efectuar la determinación gráficamente. Normalmente en la filtración de gel con Sephadex los solutos tienen isotermas de partición lineales y dan picos simétricos en una gráfica de  $K_{av}$  contra el volumen de elución.

Para tener idea del tamaño de las moléculas con actividad antitriptica el líquido se dializó en frío contra 450 ml. de NaCl 0.09 % durante 24 hrs; a las 12 hrs. se hizo un cambio de la solución de NaCl. Al terminar el tiempo estipulado se recuperó el líquido folicular del saco de diálisis y se midió la actividad antitriptica por el método que más adelante se describe. Otra prueba que se aplicó fué la de resistencia a la temperatura, para lo cual se colocó el líquido folicular en pequeños tubos, dentro de una platina caliente ( Module Heater, Scientific Products H-2021-1 115 volts) a la temperatura de 45, 60, 75 y 90 °C., durante 5 min. c/u. La actividad antitriptica se midió después de la exposición a cada una de las temperaturas.

#### Actividad Antitriptica

Esta medición se hizo en el líquido folicular, siguiendo un método fluorométrico descrito previamente por Mercado y Rosado (1975). El parámetro que se usó, fué la disminución ocasionada por adición de líquido folicular en la fluorescencia producida

por la actividad hidrolítica de la tripsina pancreática bovina (SIGMA # TBO03), 50 µg. disueltos en 200 µl. de solución salina 0.9 %, sobre una solución 0.045 nM. de un sustrato fluorosintético, el Benzoyl-D-L-arginina- β -naftilamina (BANA). Las determinaciones se hicieron a  $22 \pm 0.1$  °C. en tres ml. de bufer Tris-HCl (Tri-hidroxi-metil-amino-metano 0.05 M, pH 7.4, ajustado con HCl). La fluorescencia fué determinada en un espectrofluorómetro Perkin Elmer MPF-3L, equipado con termostato y un sistema de doble rejilla. La emisión de la fluorescencia fué determinada a 410 nm., con una longitud de onda de excitación de 345 nm. con una apertura de excitación y de emisión de 6 nm., el valor de la sensibilidad del amplificador fué de 30 (10mV).

Antes de cada medición el fluorómetro se calibró con una solución acuosa 23.3 mM. de β -Naftil-amina (Sigma Chemical Co.) amortiguada con Bufer Tris-HCl 0.05 M pH 7.4. Con esta misma solución, se hizo la curva de calibración para calcular las n molas de β -Naftil-amina liberadas que corresponden para cada muestra, de acuerdo a la fluorescencia emitida en cada reacción.

#### Actividad Triptica

La actividad triptica de los sacos y células homogeneizadas, se midió con el mismo método fluorométrico descrito para la actividad antitriptica. Para la determinación en el líquido folicular, fué necesario primero separar la actividad antitriptica, por el método de cromatografía de filtración en gel que se describió anteriormente.

## RESULTADOS

### Clasificación de los Folículos

Nuestros resultados señalan que los criterios propuestos por Moor y col (1976) para juzgar la atresia folicular de la oveja, pueden ser extendidos al diagnóstico de la atresia folicular en la cabra, de tal manera que los folículos de cabra que mostraron un aspecto brillante, translúcido y sin desprendimiento alguno de la granulosa, además de la presencia clara del complejo cumulus -ovocito, fueron clasificados como no atrésicos, grupo 1.

Los folículos con evidencias de alteraciones en la posición del complejo cumulus-ovocito, apariencia opaca y poca vascularización, con desprendimientos evidentes de la capa granulosa, lo que da un aspecto natoso al interior del folículo, fueron clasificados como atrésicos, grupo 3.

En el subgrupo 3a se incluyeron los folículos que presentaron menos del 50% de desprendimiento de la granulosa, evidencia de perforaciones de la misma, aspecto opaco y poco vascularizado, y desprendimiento del complejo cumulus -ovocito. En el grupo 3b, se incluyeron los folículos que mostraron más del 50% de desprendimiento de la granulosa con abundantes perforaciones, aspecto muy opaco, vascularización prácticamente nula y ausencia del complejo ovocito-cumulus. En este grupo se incluyen también los folículos con claro daño a las tecas.

Los folículos que no presentan evidencia clara de atresia, pero que tampoco pueden ser fácilmente clasificados como no atrésicos por su aspecto poco brillante y algunas alteraciones sospechosas de desprendimiento de la granulosa, fueron incluidos en un grupo especial considerado como indefinido o grupo 2.

Los resultados del diagnóstico histopatológico del grado de atresia realizado simultáneamente en un grupo numeroso de folículos control, para comparar la acuciosidad del diagnóstico de atresia por observación macroscópica simple, diagnóstico que se realizó siguiendo criterios previamente establecidos en la literatura mundial (Hay et al, 1976; Moor et al, 1979), se mencionan a continuación: La granulosa de los folículos no atrésicos tiene por lo menos 7 capas de células de apariencia normal con sólo un número escaso de células picnóticas o fragmentadas. La mayoría de las células foliculares se observaron normales, con numerosas mitosis. Los núcleos, nucleólos, citoplasma y bordes celulares se observaron bien preservados. Los ovocitos no estaban afectados. La lámina basal está siempre presente y su grosor es uniforme. La teca es normalmente de menor espesor que la granulosa y sus células están orientadas paralelamente a la membrana basal conteniendo habitualmente algunas células de carácter fibroblástico o glandular.

En la atresia primaria el grosor de la granulosa ha disminuido y contiene en general entre 3 y 6 capas de células, muchas de estas células aparecen desorganizadas o picnóticas: la

capa basal de las células de la granulosa se encuentra normalmente ausente y la lámina basal se encuentra adelgazada y anormal.

En resumen, los folículos en atresia primaria se distinguieron fundamentalmente por la presencia de piconosis en un número variable de las células de la granulosa. Este fenómeno se encontró en diferentes lugares de folículos con apariencia y forma normales.

Los folículos con atresia avanzada se encontraron severamente afectados en la observación histológica. En general los folículos habían perdido varias capas de células de la granulosa y por lo tanto se observaron contraídos e irregulares. Las capas restantes contenían numerosas células picnóticas, pocas o ninguna mitosis y bordes celulares irregulares y distorsionados. La zona pelúcida invariablemente se encontró afectada, irregular y condensada en partes, habiéndose retraído de manera más o menos notable de la capa interna de las células del cumulus. La lámina basal que separa las células de la granulosa de las células de la teca se encuentra engrosada, pero permanece más o menos intacta aún en los folículos con atresia terciaria, aún cuando en éstos es posible observar ocasionalmente algunas regiones en las que la lámina basal ha desaparecido y las células de la teca y de la granulosa se encuentran en contacto directo.

El líquido folicular, que tiene una apariencia floculenta en los folículos normales no atrésicos, se encontró francamente



coagulado en los folículos atrésicos durante la observación histológica.

En la atresia secundaria la granulosa se ha reducido a una o dos capas, presentando áreas de desprendimiento total, la teca se encuentra también adelgazada y desorganizada, sin embargo es frecuentemente más gruesa que la granulosa. Las células de la teca se redondean, siendo posible encontrar en ella células escamosas.

En la atresia terciaria, la granulosa es escasa y ausente en numerosos lugares. Algunas células de la granulosa se observan hipertrofiadas y con citoplasma basofílico. La teca se encuentra muy delgada y muy desorganizada. En numerosos folículos con atresia terciaria es posible encontrar fibras de colágeno en ambos lados de la lámina basal y en ocasiones aún dentro de esta misma lámina. En la teca interna de los folículos en atresia terciaria se encuentra una pérdida de células de la teca como resultado de la apoptosis y se observa la presencia de numerosos cuerpos de inclusión producidos por la fagocitosis. La cavidad antral de los folículos atrésicos contiene frecuentemente pequeños grupos o nidos, de células de la granulosa exfoliadas.

En la figura 6 se presentan los resultados obtenidos por el estudio comparativo. El grupo 1 claramente puede considerarse como formado casi totalmente por folículos normales, sin evidencia microscópica de atresia. Sólo 6% de los folículos clasificados en este grupo demostraron presentar un estadio

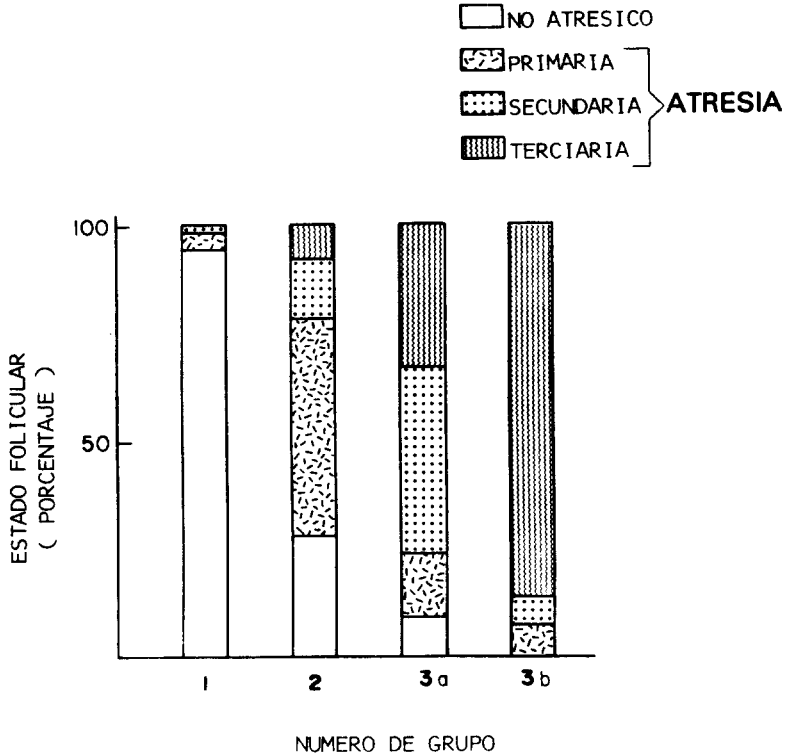


Figura 6.- Comprende la relación entre la clasificación gruesa o macroscópica y la histológica de los folículos atrésicos y no atrésicos de la cabra. Los folículos fueron divididos en cuatro grupos en base a su apariencia gruesa observada a través de un microscopio estereoscópico siguiendo el procedimiento usado por Moor et al (1978) en la oveja. Las barras indican la composición de cada grupo cuando se corroboraron con el estudio histológico de acuerdo con los criterios de Hay et al (1976). Los estados de atresia fueron divididos de acuerdo a los autores mencionados en: primaria, secundaria y terciaria. El número de casos estudiados fué de 120.

inicial de atresia por la observación histológica. Por el contrario el grupo 3, tanto 3a como 3b, está constituido casi totalmente por folículos con evidentes datos histológicos de atresia avanzada, 43% de folículos en atresia secundaria y 33% en atresia terciaria en el grupo 3a y 86% de folículos en atresia terciaria, con sólo 14% de folículos en otros estadios de atresia en el grupo 3b. El grupo intermedio, grupo 2, es mucho más difícil de definir y seguramente los datos encontrados no podrán ser relacionados fácilmente con ningún grado de atresia, como podemos ver está constituido por 28% de folículos no atrésicos, 51% de folículos en atresia primaria, y 13% y 8% respectivamente en atresia secundaria y terciaria. Sin embargo si se considera que más del 50% de los folículos clasificados en este grupo presentan histológicamente datos de atresia inicial o primaria, no se cometerá un error muy grande si se toman los datos encontrados como manifestantes del principio del proceso de atresia folicular.

En cuanto al tamaño folicular es importante mencionar que la clasificación de los folículos menores de 3 mm ofreció mayores dificultades y requirió un tiempo muy grande para llegar a una clasificación que el estudio histológico demostró posteriormente poseer un 50% de posibilidades de error. Este error consistió fundamentalmente en considerar atrésicos folículos que el estudio histológico demostró ser normales. Estos resultados nos hicieron tomar la decisión de no intentar una clasificación de este tipo de folículos y se agruparon sólo por su tamaño.

### Concentración de Hemoglobina

En la figura 7 se presentan los datos de la concentración de hemoglobina en el líquido folicular de acuerdo al grupo de atresia. Es importante mencionar que la concentración de hemoglobina/ml. del líquido folicular fué considerado para eliminar aquellas muestras que por su alta concentración de esta proteína ( 25 ug/ml ) pudiesen confundir los resultados de algunas de las determinaciones planteadas. Por otro lado, la concentración de esta proteína en el líquido folicular efectivamente resultó ser un adecuado indicador del grado de atresia en los folículos mayores de 6 mm. Como se puede ver en la figura 7A, la concentración de hemoglobina aumentó conforme avanzó la atresia, se pudo observar una diferencia estadísticamente significativa entre los dos primeros grupos de la clasificación y los dos restantes, que se refieren a los folículos claramente atrésicos. No obstante en los folículos de 3 a 6 mm., la concentración de hemoglobina no parece ser importante para diagnosticar el grado de atresia, dado que no se observa ninguna tendencia de la concentración de esta proteína por estadio de atresia, sin embargo la diferencia si resulta importante estadísticamente cuando se comparan las concentraciones en los mismos estadios de atresia pero a diferente tamaño folicular.

### Actividad Antitriptica.

En cuanto a la presencia del inhibidor de tripsina o actividad antitriptica del líquido folicular demostrada en este

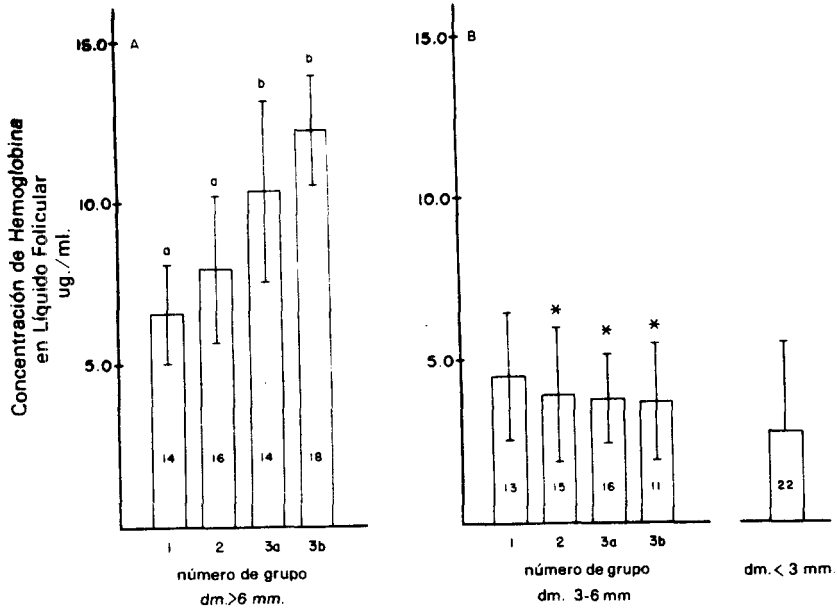


Figura 7.- Concentración de hemoglobina en el líquido folicular caprino. Cada barra representa la media  $\pm$  la desviación estándar del número de casos indicados dentro de las barras. Los resultados son expresados como folículos > 6mm. (A) y < 6mm.(B). Las letras diferentes indican diferencia estadísticamente significativa entre las barras ( $p < 0.05$ ), usando una prueba simultánea de ANOVA y suma de cuadrados de GABRIEL ( Figura 7 A ). Las diferencias entre los folículos de distintos tamaños se calcularon usando la prueba de "t" de Student. Los asteriscos indican que las barras del panel B son diferentes estadísticamente ( $p < 0.05$ ) de las correspondientes en el panel A .

trabajo, se observó que existe una importante correlación entre el incremento de esta actividad y el progreso de la atresia en los folículos mayores de 6 mm. Cabe mencionar que en estos folículos mayores de 6 mm. existen diferencias significativas en cuanto al porcentaje de inhibición de dicha actividad trípica entre los tres primeros grupos de atresia, siendo el mayor valor de la inhibición el del grupo 3a ( ver figura 8A ). Aunque no existe diferencia significativa entre los valores de la inhibición del grupo 3a con los del 3b, sí se puede observar una clara tendencia a la disminución de la actividad antitripica en este último estadio de atresia. Tampoco se encontraron diferencias significativas entre los valores de la actividad antitripica de los grupos mencionados ( 3a y 3b ) cuando éstos fueron analizados por tamaño folicular ( datos no mostrados en la gráfica ).

En figura 8B se pueden observar las diferencias de la actividad inhibitoria debidas al tamaño folicular para un mismo grado de atresia ( Grupo 1 ). Los resultados muestran que hay una correlación negativa entre el tamaño folicular y la presencia del inhibidor de tripsina, de tal manera que la mayor inhibición de la actividad trípica la presenta el líquido de los folículos menores de 3 mm., y conforme aumenta el tamaño esta actividad disminuye.

En la siguiente figura ( 9 ) se puede ver con mayor claridad el efecto del tamaño folicular sobre la inhibición de la actividad trípica, ya que en todos los grupos de atresia el porcentaje de inhibición fué mayor en los folículos medianos ( 3

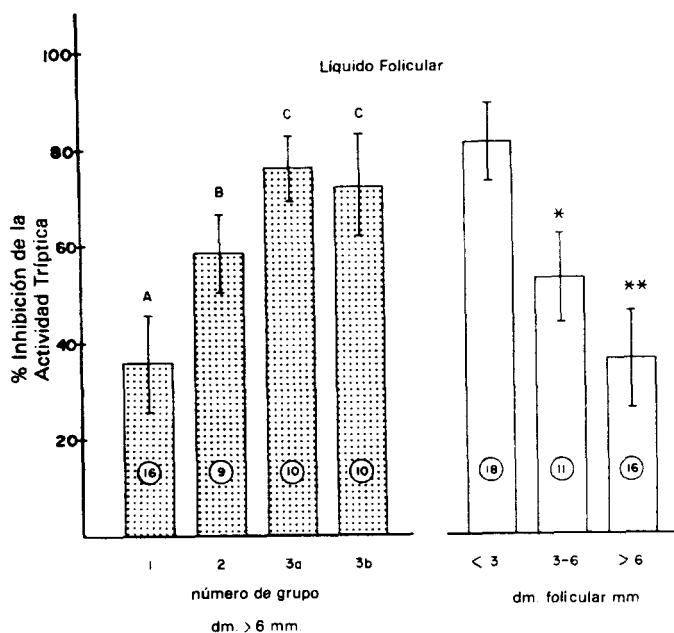


Figura 8.- Efecto de la atresia ( 8A ) y el tamaño folicular (8B) en la actividad antitriptica del líquido follicular caprino. La actividad antitriptica se midió por la adición de una cantidad conocida de tripsina bovina pura a una mezcla del sustrato fluorogénico ( BANA ) y 10 ul. del líquido follicular específico. Las barras indican la media de los valores porcentuales de la inhibición de tripsina y la desviación estandar. El número de casos está indicado dentro de las barras. Las letras diferentes indican diferencias estadísticamente significativas entre las barras. Para el caso de la atresia folicular (8A), se usó un procedimiento simultáneo ANOVA- suma de cuadrados de GABRIEL. Las diferencias en el tamaño folicular (8B) expresadas con asteriscos fueron calculadas con la prueba de "t" de Student.

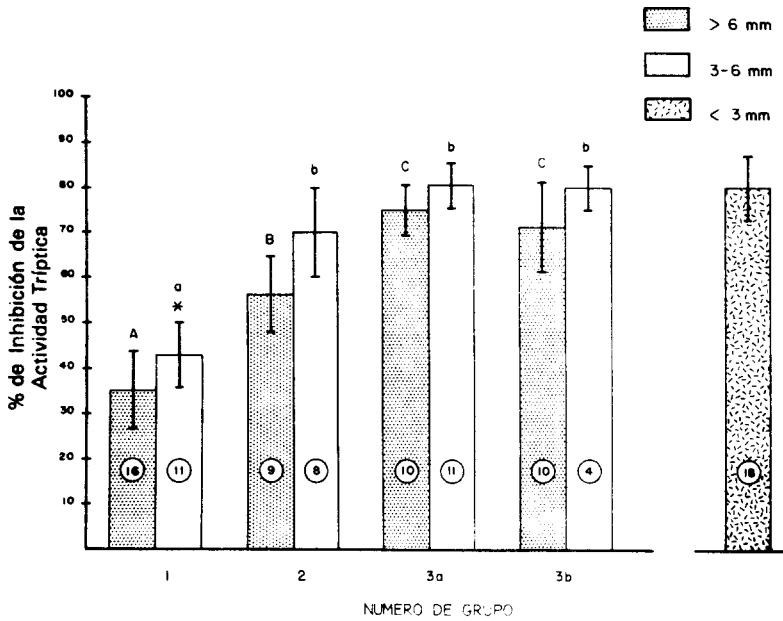


Figura 9.- Efecto del tamaño folicular sobre la inhibición de la actividad triptica. Para todos los estados de atresia el líquido folicular en los folículos entre 3 y 6 mm. tuvo el mayor efecto inhibitorio sobre la tripsina .



a 6 mm.) comparativamente con los grandes. Para el caso de los folículos de 3 mm. el valor de la inhibición fué tan alto como el de los folículos de 3 a 6 mm. en los dos últimos estadios de atresia.

#### Caracterización del Inhibidor de Tripsina.

Las pruebas fisicoquímicas que se le hicieron al inhibidor demostraron que se trata de una molécula termosensible dado que perdió el 98% de su actividad cuando fué expuesto durante 5 min. a 95 °C., también demostró no ser dializable y actuar óptimamente a pH 7.4, mostrando pequeños decrementos en su actividad a pHs mayores o menores.

Los datos arrojados por la columna de cromatografía de filtración en gel que se presentan en la figura 10 muestran el volumen en el cual se encontró la actividad triptica y antitriptica así como el del marcador del volumen vacío, que en este caso fué dextrán azul. Así mismo se puede observar que la localización del marcador se hizo por la lectura de las fracciones en el espectrofotómetro a 630 nm., mientras que la actividad antitriptica se midió en porcentaje de inhibición de la actividad triptica y ésta última en porcentaje de actividad sobre el sustrato sensible ( BANA ). En ambos casos se usó el método fluorométrico ya descrito. En la fracción 6 que equivale a 6 ml. de volumen se tuvo el Vo. y a los 8 y 15 ml. la actividad antitriptica y triptica respectivamente, correspondiendo a pesos moleculares aproximados de 64,000 y 24,000 daltones.

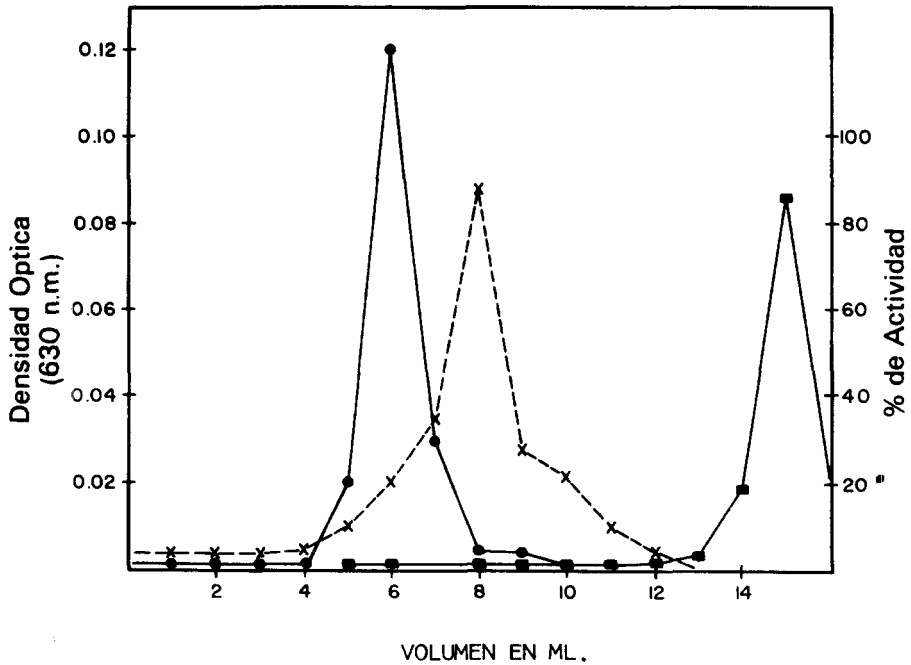


Figura 10.- Separación de las actividades de tripsina y antitripsina presentes en el líquido folicular de la cabra por cromatografía de filtración en gel, usando "Sephadex" G 150-40 en una columna 0.9 X 30 cm. y Tris-HCL 0.05 M., pH 7.4 como eluyente. El volumen vacío (●-●-●-) se dió a los 6 ml. y el peso molecular calculado para la actividad antitriptica (-X-X-X) y triptica (-■-■-)fué de 64,000 y 24,000 daltones respectivamente. La actividad de tripsina además fué caracterizada en "Sephadex" G 50 para corroborar el peso molecular calculado ( datos no mostrados en la gráfica )

### Cinética del Inhibidor de Tripsina.

En la figura 11 , se presentan los valores obtenidos en la cinética enzimática que se realizó a la actividad antitriptica del líquido folicular. Primero se obtuvo el valor en  $\Delta$  de fluorescencia de la tripsina (20 ug/ml) sobre concentraciones fijas del sustrato: 1.87, 3.75, 7.50 y 15.0 por  $10^{-5}$  M de BANA ; después se midió el efecto inhibitor del líquido folicular (L.F.) a cuatro diferentes volúmenes: 5, 10, 15 y 20 ul. sobre la tripsina. El efecto del líquido folicular se midió por la disminución en la fluorescencia/min.

Al graficar los datos con las inversas de la velocidad y la concentración del sustrato, se construyó la gráfica tipo Lineweaver - Burke, que se muestra en la misma figura 11, esta gráfica permitió conocer que el líquido folicular posee una inhibición de tipo incompetitiva sobre la actividad triptica.

### Actividad de Tripsina.

En la figura 12 , se presenta el efecto del estado de atresia sobre la actividad de tripsina ( medida por el cambio de fluorescencia/min/mg. de proteína) encontrada en las células de la granulosa ( figura 12A ) y del saco folicular ( 12 B ). La actividad de tripsina que se encontró en el saco folicular fue muy alta en los folículos del grupo 1 y disminuyó paulatinamente conforme avanzó la atresia, siendo sumamente baja para el caso de la atresia 3b, no se encontraron diferencias significativas entre el grupo 1 y 2 pero sí entre cada uno de ellos con los grupos 3a y 3b, mientras que en estas células del saco o pared

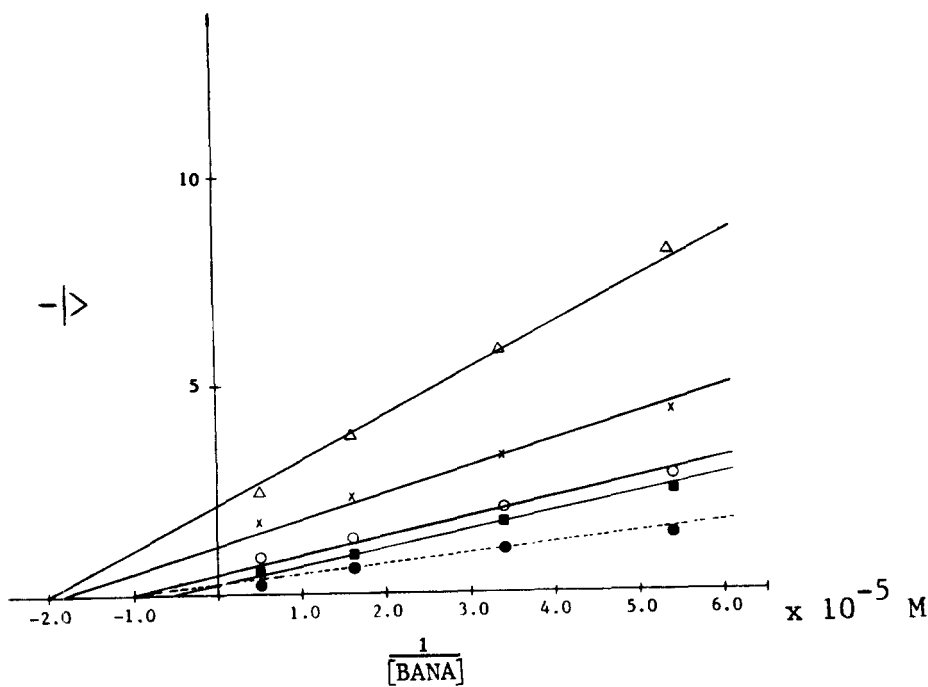


Figura 11.- Análisis cinético de la reacción de tripsina con líquido folicular de cabra. Gráfica tipo Lineweaver-Burk de la concentración del sustrato Benzoi-DL-arginina-  $\beta$  - naftilamina (BANA) contra la actividad triptica en ausencia (●) y en presencia de 5 (■), 10 (○), 15 (x) y 20 (Δ)  $\mu$ l de líquido folicular.

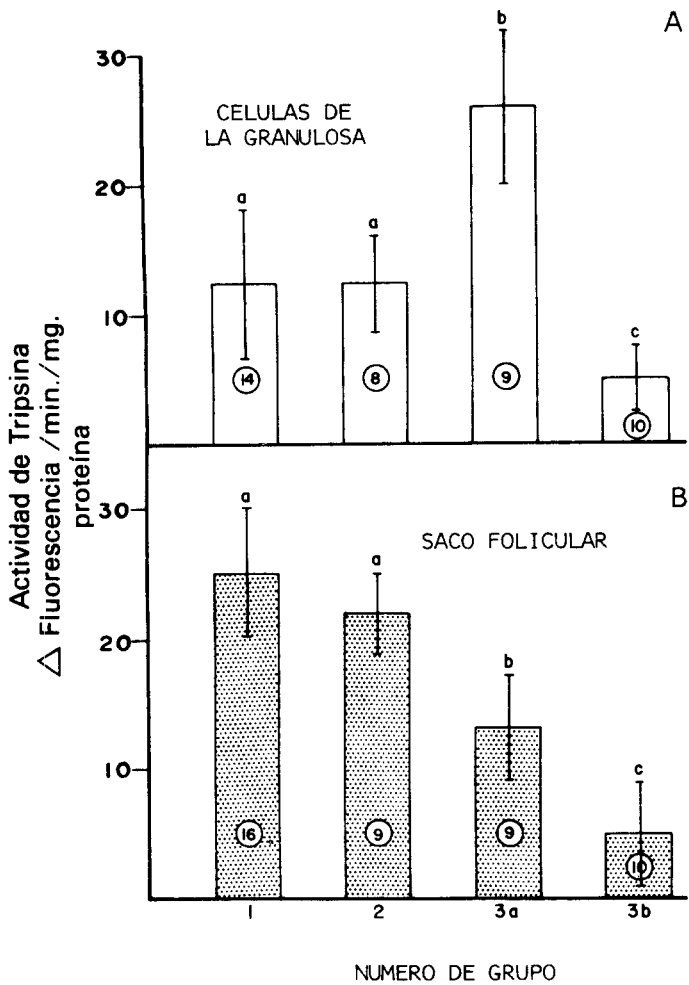


Figura 12.- Efecto del estadio de atresia sobre la actividad de tripsina en los homogeneizados de saco folicular (12B) y células de las granulosa (12A), obtenidos de folículos de cabra. Las barras indican la media  $\pm$  la desviación estandar de la actividad observada en el número de ensayos independientes indicados dentro de las barras. Las letras diferentes expresan diferencia estadísticamente significativa ( $p < 0.05$ ) entre las barras calculada por un método simultáneo de ANOVA y suma de cuadrados de GABRIEL.

folicular el descenso más importante en la actividad triptica se presenta en la atresia 3a, las células de la granulosa muestran justamente en este grupo de atresia la mayor actividad de tripsina ( El grupo 3a presenta 2 veces más actividad que las células de la granulosa de la atresia 1 y 2 ) cabe señalar que en los primeros estadios de atresia la actividad de tripsina de las células del saco folicular es casi el doble de la actividad que presentan las células de la granulosa, mientras que en el estadio más avanzado de atresia ( grupo 3b ), la actividad es prácticamente la misma para ambos grupos celulares. El peso molecular de esta actividad se puede observar en la figura 10.

DISCUSION.

La inhibición de la actividad proteolítica, tanto plasmática como tisular, parece ser un proceso de gran importancia en el mantenimiento de la homeostásis. La alfa(1) - antitripsina es una glicoproteína sintetizada por el tejido hepático que probablemente funciona como el principal inhibidor de las proteasas plasmáticas, incluyendo a la tripsina (Wu y Lakowski, 1960), la quimiotripsina (Wu y Lakowski, 1960), la elastasa (Turino et al, 1969), la collagenasa (Eisen et al, 1970) y la renina (Scharpe et al, 1976). Aunque la actividad de alfa(1)-antitripsina está fundamentalmente relacionada con la presencia en el suero sanguíneo de este inhibidor, la acción antitriptica más importante, sea proporcionada por este inhibidor o por otros, relacionados con él, se realiza fundamentalmente a nivel tisular. La importancia de este proceso de inhibición de la proteólisis tisular puede quedar demostrado porque su deficiencia se acompaña de esclero enfisema pulmonar (Lieberman, 1959), enfermedades hepáticas (Koj et al, 1978), carcinogénesis (Verloes et al, 1978), etc.

De manera particular se ha relacionado la actividad anti-proteasa con dos fenómenos fundamentales:

- 10.- La remodelación tisular , como en el caso de la reabsorción que acompaña la involución post-parto del útero o la regeneración hepática después de la hepatectomía parcial en la rata y

20.- La regulación del crecimiento y la diferenciación, por ejemplo, el nivel aumentado de actividad proteolítica encontrado en las células neoplásicas, y que aparentemente propicia la aparición de metástasis, puede ser debido a la deficiencia en los niveles de inhibidores de la actividad proteolítica.

La actividad proteolítica liberada del acrosoma del espermatozoide durante la reacción acrosomal, parece ser indispensable para permitir que la fertilización del óvulo se realice normalmente. Esta actividad proteolítica obedece a un proceso de regulación finamente controlado, lo cual subraya su importancia y enfoca nuestra atención hacia la participación de este tipo de actividades proteolíticas en el proceso reproductivo en general. Desde el punto de vista que a nosotros nos interesa, la demostración de la participación de fenómenos proteolíticos en el proceso de la ovulación (Espey, 1974; Morales et al, 1983), corrobora que la función inhibitoria de la actividad proteolítica tisular desempeña un papel fundamental en los procesos en los cuales están involucrados la digestión tisular, la remodelación o el crecimiento, y al mismo tiempo marca, también en la hembra, la participación de procesos proteolíticos en la regulación del proceso reproductivo.

El crecimiento y la maduración foliculares parecen ser continuos, una vez iniciado el proceso sólo termina con la ovulación o la atresia (Hafez, 1974). La maduración folicular normal depende del desarrollo secuencial de la susceptibilidad del folículo al estímulo estrogénico, inicialmente, y después a



la FSH y a la LH. Sin embargo, a pesar de la importancia que para la sobrevivencia de la especie tiene la maduración folicular normal, la atresia parece ser el destino final de la mayoría de los folículos que inician su crecimiento. Una de las áreas más importantes en el estudio de la función ovárica, hasta ahora casi completamente desconocida, es la relacionada con la elucidación de los factores involucrados en el fenómeno de atresia folicular.

Varios grupos de autores han tratado de relacionar las modificaciones microscópicas relacionadas con el inicio y la progresión del fenómeno de atresia con cambios en la morfología macroscópica del folículo, estos estudios se han realizado particularmente en los ovinos (Hay et al, 1976; Turnbull et al, 1977; Moor et al, 1978; O'Shea et al, 1978).

En este estudio, la confirmación histológica de la observación macroscópica de cambios morfológicos en los folículos de la cabra, apoya nuevamente la hipótesis de que la atresia folicular puede ser establecida por la observación macroscópica de los folículos. Los experimentos piloto llevados a cabo durante el presente estudio, comparando las evidencias histológicas de atresia con los datos encontrados por la simple observación bajo el microscopio de disección demostraron que las discontinuidades de la membrana granulosa estuvieron invariablemente relacionadas con un aumento en la picnosis de los núcleos de las células de la granulosa, indicando que estos cambios, observables macroscópicamente, no son una consecuencia de daños provocados artificialmente durante la disección de los folículos o por la manipulación posterior de los mismos.

En la Fig.6 puede observarse la correlación encontrada entre el agrupamiento en cuatro grupos de los folículos disecados del ovario de la cabra dependiendo de su aspecto macroscópico, con el diagnóstico histopatológico del grado de atresia, diagnóstico que se realizó siguiendo criterios previamente establecidos en la literatura mundial (Hay et al, 1976; Moor et al, 1979). El grupo 1 claramente puede considerarse como formado casi totalmente por folículos normales, sin evidencia microscópica de atresia, mientras que el grupo 3, tanto 3a como 3b, esta constituido casi totalmente por folículos con evidentes datos histológicos de atresia avanzada, secundaria (grupo 3a) o terciaria (grupo 3b). El grupo intermedio, grupo 2, es mucho más difícil de definir y seguramente los datos encontrados no podrán ser relacionados fácilmente con ningún grado de atresia. Sin embargo si se considera que más del 50% de los folículos clasificados en este grupo presentan histológicamente datos de atresia inicial o primaria, no se cometerá un error muy grande si se toman los datos encontrados como manifestantes del principio del proceso de atresia folicular.

La posibilidad de diagnosticar el nivel de atresia folicular por la observación macroscópica debe ser utilizada para demostrar los cambios bioquímicos que seguramente preceden a los cambios morfológicos y que serían los eventos directamente responsables de la desviación de la maduración folicular normal hacia la atresia. En este punto es necesario hacer notar la importancia de los resultados presentados en la Fig. 7. La diferenciación microscópica del grado de atresia parece ser

posible, sin embargo, es indudable que requiere de un proceso de entrenamiento y siempre estará un poco sometido a la interpretación personal, por lo cual requiere la intervención de por lo menos dos personas que califiquen. La relación que parece existir entre el grado de atresia y la concentración de hemoglobina en líquido folicular ofrece un método totalmente cuantitativo para llegar a este diagnóstico. Su mayor inconveniente parece ser que sólo sería posible establecer este diagnóstico en los folículos grandes.

Puesto que no se hizo ningún intento de cuantificar o aislar todos los folículos presentes en cada ovario, no sería posible establecer una relación entre el número total de folículos y los diversos grados de atresia. No obstante, la distribución de los folículos aislados con respecto tanto al tamaño (diámetro), como al grado de atresia, sugiere que la incidencia de atresia folicular en la cabra está directamente relacionada con el diámetro folicular y que, aunque un folículo puede sufrir atresia en cualquier estadio de su crecimiento, la atresia es más frecuente en los folículos de más de 6 mm, estos resultados están en general de acuerdo a los obtenidos por otros investigadores. Por ejemplo en el borrego Carson et al (1979) encontraron que el 64% de los folículos menores de 2 mm son esencialmente normales, mientras que el 93% de los folículos mayores de 6 mm. son atrésicos.

Si asumimos que la selección de los folículos para ser disecados fué hecha totalmente al azar, sería posible establecer que el número total de folículos de cada grupo refleja la

probabilidad fisiológica de que un folículo de dichas condiciones se encuentre en un ovario determinado, y por lo tanto sería también relacionable con el tiempo que cada folículo pasa en cada uno de los estadios. Estudios similares realizados por Carson et al (1979) en el borrego, parecen demostrar que el tiempo requerido para que un folículo crezca de 1 a 3 mm es mayor que el tiempo requerido subsecuentemente para un crecimiento similar. Turnbull et al (1977) encontraron que el 65% de los folículos estudiados por ellos tenían entre 1.5 y 5 mm de diámetro, infiriendo de ésto que el tiempo de crecimiento es mayor para los folículos pequeños que para los grandes. Nuestros datos indican que no hay ninguna diferencia significativa entre el número de folículos menores de 6 mm y los mayores de 6 mm lo cual parece demostrar que en el caso de la cabra el crecimiento folicular es más regular, aunque ciertamente existe la tendencia de que el crecimiento anterior a 6 mm es menos rápido que el crecimiento posterior.

Después que el ovocito ha reanudado la meiosis y se ha llevado a cabo normalmente la maduración folicular, la liberación de un ovocito fertilizable se realiza mediante la ruptura del folículo y el vaciamiento de su contenido, incluyendo el ovocito, en el ambiente extraovárico. Este proceso se conoce como ovulación. La ovulación involucra algunos procesos locales que son cruciales para que el evento se realice normalmente. En el mamífero, los folículos maduros se acercan a la superficie del ovario hasta que forman sobre ella una protrusión cubierta por una delgada membrana de aspecto translúcido, llamada estigma.

El proceso de ovulación ha sido el objeto de numerosos experimentos. La evidencia acumulada indica que un prerequisite esencial para que se realice la ruptura folicular es la descomposición de la capa de tejido conectivo, fundamentalmente colágena, que cubre al folículo (Espey, 1978). Entre los elementos que se han mencionado como causantes de este proceso dinámico podemos mencionar:

- (1) Aumento en la presión intrafolicular. Esta hipótesis ha sido prácticamente descartada porque no se ha podido demostrar ningún aumento significativo en la presión intrafolicular por medio de micromanometría (Espey y Lipner, 1963; Meyer et al, 1971). Así mismo por observación directa se ha podido constatar que la ovulación no es un fenómeno explosivo, sino más bien un proceso degenerativo de la pared folicular.
- (2) Acción directa del aumento en la secreción de esteroides (Rondell, 1974). Provocando un aumento en la distensibilidad de la pared folicular. Se ha demostrado que la LH exógena, el AMP-cíclico y la progesterona inducen un marcado aumento en la distensibilidad de bandas de tejido ovárico estudiadas in vitro, efecto que puede ser inhibido por la adición de cianoquetona (Rondell, 1974) y por la adición de aminoglutetimida (un potente inhibidor de la hidrólisis de la cadena lateral del colesterol) (Testart et al (1983). Sin embargo más recientemente se ha demostrado que en un sistema más fisiológico, ovario perfundido, la adición de aminoglutetimida, a pesar de que inhibe la esteroidogénesis ovárica, no es capaz de inhibir la ovulación (Yoshimura et al, 1986). De la misma manera se ha demostrado que el

bloqueo de la síntesis de estradiol inducida por la aplicación de LH no bloquea la ovulación (Koo et al, 1984) y que la utilización in vivo de la cianoquetona como inhibidor de la esteroidogénesis tampoco previene la ovulación provocada por la aplicación de hCG.

- (3) Acción de algunas enzimas proteolíticas sobre la pared del ovario (Espey, 1974; Morales et al, 1983; Imoedemhe y Shaw, 1986; Yoshimura y Wallach, 1987). Hipótesis sobre la cual nos detendremos posteriormente.
- (4) Presencia de una reacción inflamatoria. Kitai et al (1985) han demostrado la presencia de alteraciones microvasculares en el folículo del conejo durante la ovulación. Estos cambios incluyen vasodilatación, extravasación causada por aumento en la permeabilidad vascular, degranulación de las células cebadas y defectos característicos de llenado en la región apical del folículo preovulatorio. Estas observaciones permiten sugerir que, cualquiera que sea la causa promotora, la ruptura folicular se realiza mediante la participación de estos cambios vasculares. Dos de los agentes más eficaces desde este punto de vista, son la prostaciclina y la histamina, reconocidos como mediadores químicos de la inflamación (Hamada et al, 1977; Hamada et al, 1978; Kobayashi et al, 1983; Kitai et al, 1985a). En algunos mamíferos la aplicación sistémica de indometacina, un potente inhibidor de la síntesis de prostaglandinas, inhibe la ovulación; mientras que la aplicación exógena de prostaglandina F-2a revierte este efecto (Wallach et al, 1975). En un sistema in vitro, como el ovario perfundido del

conejo, se ha encontrado que la adición de prostaglandinas induce la síntesis de prostaglandinas, particularmente prostaciclina por las células de la granulosa (Kitai et al, 1985a). En este mismo sistema las prostaglandinas son capaces de inducir la ovulación en ausencia de gonadotrofinas. Estos resultados han orientado a presentar la hipótesis de que la prostaciclina (PGI<sub>2</sub>) es un potente mediador de la función preovulatoria del ovario (Koos y Clark, 1982). Desde hace tiempo se conoce que el pico de LH aumenta la degranulación de las células cebadas presentes en la vasculatura del ovario, aumentando la concentración de histamina en el folículo (Lipner, 1974; Krishna y Terranova, 1985). La participación de la histamina en la ruptura folicular está apoyada por la observación de que la histamina sola, en ausencia de gonadotrofinas, es capaz de provocar la ruptura folicular en el ovario perfundido del conejo. Este efecto puede ser inhibido por la cimetidina, un bloqueador de los receptores H<sub>2</sub> (Kobayashi et al, 1983). Sin embargo, la eficiencia ovulatoria inducida por histamina, 40%, es menor que la obtenida por el tratamiento con gonadotrofinas, 70%. Estos datos sugieren que la participación de la histamina debe ir acompañada de la activación de algún(os) otro(s) mediador(es) químico(s).

- (5) Contractilidad ovárica. Esta hipótesis ha sido sostenida por el hallazgo de fibrillas musculares en el estroma cortical y en la teca externa de los folículos ováricos (Okamura et al, 1972). En el conejo la medición directa por medio de transductores ha demostrado el aumento en la contractilidad

ovárica en el momento de la ovulación (Wright et al, 1976). También se ha demostrado que las prostaglandinas y los agentes adrenérgicos y colinérgicos son capaces de modificar esta conducta y por lo tanto de participar en el mecanismo de la ovulación (Virutamasen et al, 1972; de la Cruz et al, 1976). Es posible que el efecto de la contractilidad folicular sea sólo el de mantener una tensión intrafolicular constante de manera de asistir la extrusión del contenido folicular en el momento de la ovulación.

- (6) Esteroidogénesis. La participación de los esteroides directamente en el proceso de la ovulación ha sido estudiado repetidamente, pero los resultados contradictorios previenen la posibilidad de elaborar alguna hipótesis firme. Es bien conocido el efecto que tiene la hormona luteinizante sobre la síntesis de progesterona por el foliculo (Thebault, 1977) y también se sabe del efecto de la P4 sobre la distensibilidad de la pared folicular. Rondell (1974) sugirió que la actividad enzimática que lleva a la ruptura folicular es estimulada por la elevación de P4 como consecuencia del pico preovulatorio de la LH. Esta tesis fue apoyada posteriormente por Testart et al (1983), quienes demostraron que la ovulación es inhibida por la supresión de la esteroidogénesis por el uso de fosfato de aminoglutetínida, un inhibidor de las cadenas laterales del colesterol. Sin embargo Yoshimura y col. (1986) utilizando este mismo inhibidor de la esteroidogénesis no observaron ningún efecto sobre la ovulación inducida por hCG. Estos datos sugieren que la ruptura folicular que se da a



consecuencia del pico de LH parece involucrar un mecanismo distinto a la esteroidogénesis.

La descomposición del tejido conectivo presente en el apex de la pared folicular parece ser un prerequisite esencial para que se realice normalmente la ruptura folicular. Esta descomposición parece ser dependiente de la presencia de enzimas con actividad proteolítica tanto en la pared como en el líquido folicular. Estudios in vitro han demostrado que las serina-proteasas son capaces de disminuir la fuerza tensil de la pared folicular (Beers, 1975). Varias enzimas con actividad proteolítica, así como de moléculas capaces de actuar como inhibidores de éstas, se hayan presentes fisiológicamente en el ambiente en que se realiza la ovulación y podrían actuar como moduladores de este proceso (Espey, 1980).

Nuestros resultados (Figs. 8A , B y 9) muestran que el líquido folicular de la cabra contiene un poderoso inhibidor de la actividad de serina-proteasa cuya cantidad está inversamente relacionada con el tamaño folicular y con el grado de atresia. Así, la actividad de este inhibidor es significativamente menor en los folículos mayores de 6 mm que no presentan fenómeno de atresia que en los folículos pequeños, menores de 6 mm, con evidentes señales de atresia.

Nuestros datos también señalan la presencia, por primera vez, de actividad proteolítica de tipo similar a la tripsina tanto en el líquido folicular como en las células de la granulosa y en la pared folicular (Figs. 12A y B). La actividad tripsinoide en el líquido folicular de la cabra es sobre todo

aparente en los folículos grandes, mayores de 6 mm, que no presentan fenómeno de atresia y que por lo tanto pueden ser considerados como aquellos folículos que están llegando al final de su evolución normal, es decir a la ovulación.

Sin embargo, debe señalarse que a pesar del aumento en la actividad tripsinoide en este tipo de folículos, su demostración experimental exige la eliminación de la actividad antitriptica. Estos resultados podrían estar de acuerdo con los de Yoshimura y Wallach (1987) que indican que la ovulación obedece a fenómenos de actividad proteolítica sujetos a procesos muy finos de regulación. Estos autores encontraron que la eficiencia ovulatoria fué significativamente aumentada cuando los ovarios fueron perfundidos con estreptocinasa en concentraciones mayores de 10 U/ml, pero menores de 60 U/ml. Cuando la cantidad de estreptocinasa perfundida rebasó esta última cantidad, 100 U/ml por ejemplo, la eficiencia ovulatoria disminuyó significativamente por debajo de las cifras obtenidas en el ovario contralateral no sujeto a ninguna perfusión. Nuestros resultados están también de acuerdo con los de Imoedemhe y Shaw (1986) y apoyan la hipótesis de que existe una relación inversa entre las actividades proteolítica y antiproteolítica presentes en el líquido folicular, este equilibrio permite la predominancia de actividad proteolítica según el folículo va progresando en su crecimiento y maduración, de manera que permitirá la digestión oportuna de la pared folicular, facilitando la ovulación.

Se conoce que las gonadotrofinas son responsables de la regulación de la producción del activador del plasminógeno en

las células de la granulosa (Wang y Leung, 1983). Strickland y Beers (1976) han sugerido que las gonadotropinas producen ovulación a través de la síntesis del activador del plasminógeno en los folículos maduros. Este activador actúa sobre el plasminógeno del líquido folicular y del tejido ovárico, produciendo plasmina. Yoshimura y Wallach (1987) proponen que la elevación de la plasmina en el líquido folicular ocasionada por el pico de LH así como el incremento de otras serina-proteasas, conducen a la activación de la colagenasa presente en el tejido conectivo del folículo y que ésto junto con una serie de sistemas enzimáticos locales, conducen a la ruptura de la pared folicular.

Yoshimura y Wallach (1987) indujeron la ovulación en ovarios de coneja perfundidos con estreptocinasa, un activador del plasminógeno, bajo condiciones en que era posible asegurar la total ausencia de hCG. En otros experimentos, la ovulación inducida por hCG fué significativamente reducida por la adición de 4-trans- (aminometil-cicloexano-ácido carboxílico), un potente inhibidor de la conversión de plasminógeno a plasmina o bien por la adición de un inhibidor de proteasas, la aprotinina (Denker et al ,1979; Petersen et al, 1985).

Nuestros resultados, en la cabra, no apoyan la hipótesis del plasminógeno-plasmina como participantes en el fenómeno de la ovulación, puesto que demuestran que la actividad proteolítica fundamental del líquido folicular se haya contenida en una molécula cuya actividad proteolítica, serina proteasa, y cuyo peso molecular, 24 000 daltons (Fig. 10), son diferentes a

las esperables en el equilibrio plasminógeno-plasmina. Observaciones recientes han cuestionado, también, el papel específico del activador del plasminógeno en el proceso de ovulación (Espey y col, 1985). Dado que la indometacina fué capaz de inhibir la ovulación en la rata sin tener efecto sobre el activador del plasminógeno.

A pesar de que la actividad proteolítica presente en el líquido folicular puede ser considerada importante, es seguramente mayor la importancia de la actividad proteolítica localizada directamente en la pared folicular. La Fig. 12 muestra que la actividad tripsinoide presente en los sacos foliculares obtenidos de folículos no atrésicos grandes, mayores de 6 mm, es de 2 a 3 veces mayor que la presente en los sacos de folículos pequeños o con evidente degeneración atrésica. Es posible postular que la liberación de esta actividad proteolítica, por las células de la granulosa, dentro del tejido conectivo de la pared folicular, puede conducir a la activación de la actividad latente de colagenasa (Morales et al, 1983). Este sistema enzimático, actuando localmente, alterará la integridad del tejido conectivo de la pared folicular facilitando su ruptura y la eclosión del ovocito.

Utilizando el modelo de privación aguda de gonadotrofinas, Bill y Greenwald (1981) encuentran que los primeros cambios indicadores de la iniciación del proceso de atresia se encuentran 4 horas después de la aplicación del anti-suero. Morfológicamente la atresia se inicia por la afectación de las células de la granulosa. En efecto a este tiempo, se observaron una gran cantidad de células de la granulosa con

núcleos picnóticos principalmente en las células que rodeaban al ovocito. A las 8 horas se observó la desintegración del cumulus oophorus aunque sin desintegración del ovocito. A las 24 horas el cumulus se observa totalmente desintegrado y el ovocito flota libremente en la cavidad antral. Ultraestructuralmente, Gondos (1982) ha observado también que los primeros cambios atrésicos se encuentran en las células de la granulosa, incluyendo condensación nuclear y modificaciones de los organelos citoplásmicos, principalmente de las mitocondrias.

En vista de esta rápida degeneración de las células de la granulosa durante el desarrollo de la atresia, es de importancia considerar que nuestros resultados indican que en el subgrupo 3a (atresia secundaria) las células de la granulosa muestran el nivel más alto en la cantidad de actividad proteolítica (Fig. 12). Esto podría indicar, tal vez, que uno de los cambios bioquímicos iniciales en el fenómeno de atresia es la liberación o activación de la actividad proteolítica dentro de las células de la granulosa, lo cual produciría degeneración, inhibición del contacto intracelular y desprendimiento de las células al interior de la cavidad folicular. Es también necesario hacer hincapié en que este aumento en la actividad proteolítica intra y extracelular de las células de la granulosa acompañan, y quizá explican, el fenómeno de relajación de la unión del cumulus a la pared folicular y finalmente la liberación del ovocito al interior del folículo con lo cual llega a su final el fenómeno de atresia.

### CONCLUSIONES

-En la cabra, la atresia folicular puede ser juzgada con bastante certeza por la observación de los folículos disecados en un microscopio estereoscópico.

-La discontinuidad de la capa granulosa es un importante parámetro para calificar el grado de atresia, dado que al estudio histológico se demostró que esta característica está altamente relacionada con la presencia de núcleos picnóticos.

-Es muy probable que uno de los cambios bioquímicos iniciales en el fenómeno de la atresia sea la liberación ó activación de un tipo de actividad proteolítica dentro de las células de la granulosa y que sea este proceso bioquímico el que preceda a los cambios morfológicos que sufre el folículo con la atresia.

-La concentración de hemoglobina, es un adecuado método cuantitativo para medir la atresia folicular en los folículos caprinos mayores de 6 mm.

-Se demostró la presencia en el líquido folicular de un poderoso inhibidor de la actividad de serina-proteasa, que tiene un peso molecular aproximado de 64,000 daltones y cuya concentración está inversamente relacionada con el tamaño y el grado de atresia folicular.

-También se demostró la presencia de una actividad similar a la tripsina, tanto en el líquido folicular como en las células de la granulosa y de la pared folicular.

-La actividad proteolítica similar a tripsina está contenida en una molécula de 24,000 daltones de peso molecular aproximado.

-La actividad tripsinoide presente en el líquido folicular de la cabra es aparente sobre todo en los folículos grandes mayores de 6 mm. que no presentan atresia y que se podría pensar que son los que van a ser ovulados, de tal manera que se podría postular que la liberación de la actividad proteolítica puede conducir a la activación, por ejemplo de colagenasa y este sistema enzimático actuar localmente alterando la integridad del tejido conectivo de la pared folicular, facilitando su ruptura durante la ovulación.

-La actividad tripsinoide presente en sacos foliculares es 2 o 3 veces mayor en los folículos grandes no atrésicos que en los pequeños o en proceso de atrésia.

-En el líquido folicular caprino, la actividad de tripsina sólo se puede demostrar después de la eliminación de la actividad antitriptica.

-En el líquido folicular existe una relación inversa entre las actividades proteolítica y antiproteolítica. Si la actividad proteolítica predomina, el folículo progresa en su crecimiento y maduración, esto parece indicar que esta actividad participa en el proceso de ovulación. Si la actividad predominante es la antitriptica, inevitablemente se trata de un folículo en degeneración o atresia

BIBLIOGRAFIA

- Ainswarth, L., Tsang, B.K., Downey, B.R., Marcus, G.J. and Armstrong, D.T. ( 1980 ). Interrelationships between follicular fluid steroid levels, gonadotropic stimuli and oocyte maturation. *Biol. Reprod.* 23: 621 - 627.
- Anderson, E. and Albertini D.H. ( 1976 ). Gaps junctions between the oocyte and companion follicle cells in mammalian Ovary. *J. Cell Biol.* 71: 680 - 686.
- Anderson, E. ( 1974 ) Comparative aspects of the ultrastructure of the female gamete. *Int. Rev. Cytol.* ( Suppl ) 4: 1-70.
- Bachvarova, R., De Leon, V. ( 1980 ). Polyadenylated RNA of mouse ova and loss of maternal RNA in early development. *Dev. Biol.* 58: 248 - 254.
- Bagdasarian, A., Wheeler, J., Stewart, J.G., Ahmed, S.S. and Calman, R.W. (1981). Isolation of alfa 1 protease inhibitor from human normal and malignant ovarian tissue. *J. Clin. Invest.* 67: 281-291.
- Baker, T.G. ( 1963 ) A quantitative and cytological study of germ cell in human ovaries. *Proc. R. Soc. London. Ser. B* 158: 417-433.
- Baker, T.G. ( 1966 ) A quantitative and cytological study of oogenesis in the rhesus monkey. *J. Anat.* 100: 761 - 776.
- Baker, T.G. and Neal, P. ( 1972 ) Gonadotropin-induced maturation of mouse graafian follicle cells in the mammalian ovary. *J. Cell. Biol.* 71: 680 - 686.
- Baker, T.G. ( 1972 ). Oogenesis and ovarian development. In *Reproductive Biology* ( Ed. H. Balin & S. Glasser ) pp. 398 - 437. Amsterdam: Excerpta Medica.
- Baker, T.G. ( 1972 a ) Oogenesis and ovulation in reproduction in mammals, Vol. 1, Germ cells and fertilization ( Ed. C.R. Austin & R.V. Short ), pp. 14 - 45. Cambridge University Press.
- Ball, G.D., Wieben, E.D. and Byers, A.P. ( 1985 ) DNA, RNA, and protein synthesis by porcine oocyte-cumulus complexes during expansion. *Biol. Reprod.* 33: 739-744.
- Baltus, E., Brachet, J., Hanocq Quertier, J., and Hubert, E. ( 1973 ) Inhibition of protein synthesis. *Diferentiation* 1: 127-143.
- Bar-Ami, S. and Tsafiri, A. ( 1981 ). The acquisition of meiotic competence in the rat : role of gonadotropin and estrogen. *Gamet Res.* 4: 463 - 472.



- Bar-Ami, S. Nimrod, A., Brodie, A.M.H., Tsafir, A. (1983) Role of FSH and oestradiol 17 in the development of meiotic competence in rat oocytes. *J. Steroid Biochem* 19: 965 - 971.
- Bar-Ami, S., Tsafir, A. ( 1986 ) The development of meiotic competence in the rat: Role of hormones and of the stage of follicular development *Gamete Research* 13: 39 - 46.
- Barbehenn, E.K., Wales, R.G. and Lowry, O.H. ( 1974 ) The explanation for the blockade of glycolysis in early mouse embryos. *Proc. Natl. Acad.Sci. USA* 71: 1056 - 1060.
- Barbehenn, E.K., Wales, R.G. and Lowry, O.H. ( 1978 ) Measurements of metabolites in single preimplantation embryos; a new means to study metabolic control in early embryos *J. Embryol.Exp.Morphol.* 43: 29 - 46.
- Bauminger, S., Lieberman, M.E. and Linder H.K. ( 1975 ) Steroid-independent effect of gonadotropins on prostaglandins synthesis in rat graafian follicles in vitro. *Prostaglandins* 9: 753 - 764.
- Beaumont, H.M. and Mandl, A.M. ( 1962 ). A quantitative and cytological study of oogonia and oocytes in the foetal and neonatal rat. *Proc. R. Soc. London, Ser. B* 155: 557 - 579.
- Beers, W. H. ( 1975 ) Follicular plasminogen and plasminogen activator and the effects of plasmin on ovarian follicle wall. *Cell.* 6: 379.
- Berridge, M.J. ( 1981 ) Phosphatidylinositol hydrolysis: a multifunctional transducing mechanism. *Mol. Cell. Endocr.* 24: 115 - 140 .
- Biggers, J.F. ( 1972 ) Metabolism of the oocyte In Oogenesis, (Eds. J.D.Biggers & A.W. Shultz.). University Park Press, Baltimore. pp. 241 - 251.
- Biggers, J.D., Whittingham, D.G., Donahue, R.P. ( 1967 ) The pattern of energy metabolism in the mouse oocyte and zygote. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 58: 560 - 567.
- Bill, C.H. and Greenwald, G.S. ( 1981 ) Acute gonadotropin deprivation. I.A model for the study of follicular atresia. *Biol. Reprod.* 24: 913 - 921.
- Billing, H., Hedin, L. and Magnusson, C. ( 1983 ) Gonadotrophins stimulate lactate production by rat cumulus granulosa cells. *Acta Endocrinol. ( Copenh )* 103: 562 - 566.
- Billing, H. and Magnusson, C. ( 1985 ) Gonadotropin - induced inhibition of oxygen consumption in rat oocyte - cumulus complexes: relief by adenosine. *Biol. of Reprod.* 33:890-898.
- Black, J.L. and Erickson, B.H. ( 1968 ) Oogenesis and ovarian development in the prenatal pig. *Anat. Rec.* 161: 45 - 55.

- Bleil, J.D. and Wassarman, P.H. ( 1980 ). Synthesis of zona pellucida proteins by denuded and follicle - enclosed mouse oocyte during culture in vitro. Proc. Nat. Acad. Sci. USA 77: 1029 - 1033.
- Bloom, A.M. and Mukherjee, B.B. ( 1972 ) RNA synthesis in maturing mouse oocytes. Exptl. Cell. Res. 74: 577 - 582.
- Boreen, S.M., Gizang, E., Schultz, R.M. ( 1983 ). Biochemical studies of mammalian oogenesis: Synthesis of 5S and 4S RNA during growth of the mouse oocyte. Gamete Res. 8:379 - 383.
- Borum, K. ( 1961 ) Oogenesis in the mouse : A study of meiotic prophase. Exptl. Cell. Res. 24: 495 - 507.
- Brachet, J. ( 1967 ) Effects of actinomycin, puromycin and cycloheximide upon the maturation of amphibian oocytes. Exptl. Cell. Res. 48: 233 - 236.
- Brachet, J., Schutter, P.D. and Hubert, E. ( 1975 ) Studies of maturation in *Xenopus laevis* oocytes. III. Energy production and requirements for protein synthesis. Differentiation, 3: 3 - 14.
- Braw, R.H. and Tsafiriri, A. ( 1980 ) Follicles explanted from pentobarbitone-treated rats provide a model for atresia. J. Reprod. Fert. 59: 259 - 265.
- Brinster, R.L. ( 1971 ). Oxidation of pyruvate and glucose by oocyte of the mouse and rhesus monkey. J. Reprod. Fert. 24: 187 -191.
- Brower, P.T., Gizang, E., Boreen, S.M., Shultz, R.M. ( 1981 ). Biochemical studies of mammalian oogenesis: Synthesis and stability of various classes of RNA during growth of the mouse oocyte in vitro. Dev. Biol. 86: 373 - 383.
- Carson, R.S., Findlay, J.K., Burger, H.G. and Trounson, A.O. ( 1979 ) Gonadotropin receptors of the ovine ovarian follicle during follicular growth and atresia. Biol. of Reprod. 27: 75 - 87.
- Cattanach, B.M., Iddon, C.A., Charlton, H.M., Chiappa, S.A., Fink, G. ( 1977 ). Gonadotrophin - releasing hormone deficiency in a mutant mouse with hypogonadism. Nature 269: 338 - 340.
- Crosby, W.H. and Furth, F.W. ( 1956 ) A modification of the benzidine method for measurement of hemoglobin in plasma and urine. Blood 11: 380 - 385.
- Cross, P.C. and Brinster, R.L. ( 1974 ) Leucine Uptake and incorporation at the three stages of mouse oocyte maturation. Exptl. Cell. Res. 86: 43 - 46
- Centola, G.M., Anderson, L.D., Channing, C.P. ( 1981 ). Oocyte maturation inhibitor ( OMI ) activity in porcine granulosa cells. Gamete Res. 4: 451 - 461.

- Challoner, S. ( 1974 ) Studies of oogenesis and follicular development in the golden hamster. I. A quantitative study of meiotic prophase in vivo. *J. Anat.* 117: 373 - 383.
- Chang, M.C. ( 1955 ). The maturation of rabbit oocyte in culture and their maturation, activation, fertilization and subsequent development in the fallopian tubes. *J. Exp. Zool.* 28: 379 - 405.
- Channing, C.P., Schaerf, F.W., Anderson, L.D. and Tsafiriri, A. ( 1980 ). Ovarian follicular and luteal physiology In *Reproductive Physiology III. International Review of physiology.* (Eds, R.O. Greep, ) Vol. 22 University Park Press, Baltimore. pp. 118 201.
- Chasalow, F.I. and Pharriss, B.B. ( 1972 ). Luteinizing hormone stimulation of ovarian prostaglandin biosynthesis. *Prostaglandins*, 1: 107 - 117.
- Cho, W.K., Stern, S., Biggers, J.D. ( 1974 ). Inhibitory effect of dibutyryl c-AMP on mouse oocyte maturation in vitro. *J. exp. Zool.* 187: 383 - 386.
- Chovinard, L.H. ( 1971 ). A light and electron- microscope study of the nucleolus during growth of the oocyte in the prepuberal mouse. *J. Cell Sci.* 9: 637 - 663.
- Crosby, I.M., Osborn, J.C., Moor, R.M. ( 1981 ). Follicle cell regulation of protein synthesis and developmental competence in sheep oocytes. *J. Reprod. Fert.* 62: 575 - 582.
- Crozet, N., Mottik, J., Szollosi, D. ( 1981 ). Nucleolar fine structure and RNA synthesis in porcine oocytes during the early stages of antrum formation. *Biol. Cell* 41: 35 - 42.
- Davidson, E.H. ( 1976 ) *Gene activity in early development* 2nd. ed. Academic Press, New York.
- De La Cruz, A., Wright, K.H., Wallach, E.E. ( 1976 ) The effects of cholinergic agents on ovarian contractility in the rabbit. *Obstet. Gynecol.* 47: 272 - 278.
- Dekel, N., Hultborn, R., Hillensjo, T., Hamberger, L and Kraicer, P. ( 1976 ). Effect of luteinizing hormone on respiration of the preovulatory cumulus oophorus of the rat. *Endocrinology* 98: 498 - 504.
- Dekel, N., Beers, W.H. ( 1978 ). Rat oocyte maturation in vitro: Relief of cyclic AMP inhibition by gonadotropins. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 75: 4369 - 4373.
- Dekel, N., Hillensjo, T. and Kraicer, P.F. ( 1979 ) Maturation effects of gonadotrophins on the cumulus-oocyte complex of the rat. *Biol. Reprod.* 20: 191 - 197.

- Dekel, N., Beers, W.H. ( 1980 ). Development of the rat oocyte in vitro: Inhibition and induction of maturation in the presence or absence of the cumulus oophorus. *Dev. Biol.* 75: 247 - 254.
- Denker, H.w. and Fritz, H. ( 1979 ). Enzymic Characterization of rabbit blastocyst proteinase with synthetic substrates of trypsin - like enzymes. *Hoppe - Seyler's Z. Phisiol. Chem.* 360 107 - 113.
- Detlaff, T.A. ( 1966 ) Action of actinomycin and puromycin upon frog oocyte maturation. *J. Embryol. Exp. Morph.* 16: 183 - 195.
- Donahue, R.P. ( 1972 ) The relation of oocyte maturation to ovulation in mammals. In *Oogenesis*, Ch. 22: 413 - 438, Eds. J. D. Biggers & A.W. Schultz. University Park Press, Baltimore.
- Downs, S.M., Eppig, J.J. ( 1984 ) Cyclic adenosine monophosphate and ovarian follicular fluid act synergistically to inhibit mouse oocyte maturation. *Endocr.* 114 418 - 427.
- Downs, S.M., Coleman, D.L., Ward - Bailey, P.F., Eppig, J.J. (1985) Hypoxanthine is the principal inhibitor of murine oocyte maturation in a low molecular weight fraction of porcine follicular fluid. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 82: 454 - 458.
- Downs, S.M., Eppig, J.J. ( 1987 ) Induction of mouse oocyte maturation in vivo by perturbants of purine metabolism. *Biol. of Reprod.* 36: 431 - 437.
- Ecker, R.E. and Smith, L.D. ( 1971 ) Influence of exogenous ions on the events of maturation in rana pipiens oocytes. *J.Cell. Physiol.* 77:61-70.
- Eisen, A.Z., Bloch, K.J. and Sakai, T.S. (1970). Inhibition of human skin collagenase by human serum. *J. Lab. Clin. Med.* 75: 258-263.
- Eppig, J.J. and Steckman M.L. ( 1974 ) Exogenous energy sources for in vitro cultivation of follicle cell-free oocyte. *J. Cell Biol.* 63: 95 a.
- Eppig, J.J. and Steckman, M.L. ( 1976 ) Comparison of exogenous energy sources for in vitro maintenance of follicle cell - free xenopus laevis oocytes. In vitro 12 (3): 173 - 179.
- Eppig, J.J. ( 1977 ) Mouse oocyte development in vitro with various culture systems. *Dev. Biol.* 60: 371 - 388.
- Eppig, J.J. ( 1982 ). The relationship between cumulus cell - oocyte coupling oocyte maturation and cumulus expansion. *Dev. Biol.* 89: 268 - 272.

- Eppig, J.J., Freter, R.R., Ward - Bailey, P.F., Schultz, R.M. (1983 ). Inhibition of oocyte maturation in the mouse participation of cAMP, steroid hormones and a putative maturation inhibitory factor. *Dev. Biol.* 100: 39 - 49.
- Eppig, J.J., Ward - Bailey, P.F., Coleman, D.L. ( 1985 ). Hypoxanthine and adenosine in murine ovarian follicular fluid: concentrations and activity in maintaining oocyte meiotic arrest. *Biol. Reprod.* 33: 1041 - 1049.
- Espey, L.L. ( 1980 ) Ovulation as an inflammatory reaction - a hypothesis. *Biol. Reprod.* 22: 73 - 106.
- Espey, L.L., Shimada, H., Okamura, H. and Mori, T. ( 1985 ). Effect of various agents on ovarian plasminogen activator activity during ovulation in pregnant mare's serum gonadotropin primed immature rats. *Biol. Reprod.* 32: 1087 - 1094.
- Espey, L.L. ( 1974 ) Ovarian proteolytic enzymes and ovulation. *Biol. Reprod.* 10: 216 - 235.
- Espey, L.L. ( 1978 ) Ovulation in the vertebrate ovary : Comparative Biology and Evolution. Ed. R.E. Jones. New York, Plenum Medical Book Co. p. 503.
- Espey, L.L. and Stutts, R.H. ( 1972 ) Exchange of cytoplasm between cells of the membrana granulosa in rabbit ovarian follicles. *Biol. Reprod.* 6: 168 - 175.
- Erickson, B.H. ( 1966 a ) Development and Radio-Response of the pre-natal bovine ovary. *J. Reprod. Fertil.* 11: 97 - 105.
- Erickson, B.H. ( 1966 b ) Development and Senescence of the postnatal bovine ovary. *J. Anim. Sci.* 25: 800 - 805.
- Farese, R.V., Sabir, A.M. ( 1979 ). Polyphosphorylated glycerolipids mimic adrenocorticotropin induced stimulation of mitochondrial pregnenolone synthesis. *Biochim. Biophys. Acta* 575: 299 - 304.
- Farese, R.V. ( 1983 ). The phosphatidate - phosphoinositide cycle: an intracellular messenger system in the action of hormones and neurotransmitters. *Metabolism* 32: 628 - 641.
- Farookhi, R. ( 1981 ) Atresia : an hypothesis. In: Dynamics of ovarian function ( N.B. Schwartz and Hunzicker - Dunn, eds. ) Academic Press, New York. pp. 13.
- Foxcroft, G.R. and Hunter, M.G. ( 1985 ) Basis physiology of follicular maturation in the pig. *J. Reprod. Fert. Suppl.* 33: 1 - 19.
- Freter, R.R., Schultz, R.M. ( 1984 ) Regulation of murine oocyte meiosis: evidence for a gonadotropin - induced, cAMP dependent reduction in a maturation inhibitor. *J. Cell. Biol.* 98: 1119 - 1128.

Gilula, M.B., Epstein, M.L. and Burs, W.H. ( 1978 ). Cell - to - cell communication and ovulation. A study of the cumulus - oocyte complex. J. Cell. Biol. 78 : 58 - 75.

Golbus, M.S., Stein, M.P. ( 1976 ) Qualitative patterns of protein synthesis in the mouse Oocyte. J. Exp. Zool. 198 : 337 - 342.

Golbus, M.S. and Stein, M.P. ( 1978 ) Qualitative patters of protein synthesis in the mouse oocyte J. Exp. Zool. 198: 337 - 342.

Gondos, B. ( 1982 ) Ultrastructure of follicular atresia in the rat. Gam. Res. 5: 199 - 206.

Greenwald, G.S. ( 1974 ) Role of follicle-stimulating hormone and luteinizing hormone in follicular development and ovulation. In Handbook of Physiology, Sect 7: Endocrinology, vol. IV. prt. 2, chap. 33 pp. 293 - 323. eds. R.O.Greep and E. B. Astwood. American Physiological Society. Washington, D.C.

Greenwald, G.S. ( 1978 ) Ovulatory response of hypophysectomized hamsters to deferred injection of LH. J. Reprod. Fert. 54: 323 - 324.

Gwatkin, R.B. and Haidri, A.A. ( 1974 ). Oxygen Requirements for maturation of hamster oocytes. J. Reprod. Fert. 37: 127 - 129.

Gwatkin, R.B. and Andersen, O.F. (1976 ). Hamster Oocyte maturation in vitro inhibition by follicular components. Life Sci. 19: 527 - 536.

Hamada, Y., Bronson, R.A., Wright, K.H., Wallach, E.E. (1977). Ovulation in the perfused rabbit ovary: the influence of prostaglandins and prostaglandin inhibitors. Biol Reprod. 17: 58-63.

Hamada, Y. Wright, K.H., Wallach, E.E. (1978) In vitro reversal of indomethacin-blocked ovulation by prostaglandin F<sub>2</sub>. Fertil. Steril. 30: 702-706.

Hanocq, F., De Schutter, A., Hubert, E. ( 1974 ). Cytochemical and biochemical studies on progesterone - induced maturation in amphibian oocytes. DNA synthesis. Differentiation 2: 75 - 90.

Harman, S.M., Louvet, J.P. and Ross, G.T. (1975). Interaction of estrogen and gonadotrophins on follicular atresia. Endocrinology 96: 1145-1152.

Hay, M.F., Gan, D.G. and Moor, R.M. (1976). Structural changes occurring during atresia in sheep ovarian follicles. Cell. Tiss. Res. 169: 515-529.

Hay, M.F., Moor, R.M., Cran, D.G. and Dott, M.H. (1979) Regeneration of atretic sheep ovarian follicles in vitro. J. Reprod. Fert. 55: 195-207.

Heller, D.T. and Schultz, R.M. (1980). Ribonucleoside metabolism by mouse oocytes. Metabolic cooperativity between the fully-grown oocyte and cumulus cells. *J. Exp. Zool.* 214: 355-364

Heller, D.T., Cahill, D.M. and Schultz, R.M. ( 1981 ). Biochemical studies of mammalian oogenesis: metabolinn cooperativity between granulosa cells and growing mouse oocytes *Dev. Biol.* 84 : 45 - 464.

Henderson, I.F. and Henderson, W.D. ( 1960 ) A Dictionary of Scientific Terms. Oliver & Boyd, Edinburg.

Hillensjo, T., Hamberger, L. and Ahrén, K. ( 1975 ). Respiratory activity of Oocyte isolated from ovarian follicles of the rat. *Acta Endocr.* 78: 751 - 759.

Hillensjo, T. ( 1976 ). Oocyte maturation and glycolysis in isolated pre-ovulatory follicles of PMS-injected immature rats. *Acta Endocr.* 82: 809 - 830.

Hillensjo, T., Ekholm, C. and Ahrén, K. ( 1978 ) Role of cyclic AMP in Oocyte maturation and glycolysis in the pre-ovulatory rat follicle. *Acta Endocr.* 87 : 377 - 388.

Hillensjo, T., Kripner, A., Pomerantz, S.H., Channing, C.P. (1979). Action of porcine follicular fluid oocyte maturation inhibitor in vitro: Possible role of cumulus cells. In ovarian Follicular and Corpus Luteum Function pp 283 - 290. Eds. C. Channing, J.M. Marsh and W.J. Sadler. Plenum. Press New York.

Hubbard, J.C. and Greenwald, S.G. (1985). Changes in DNA, cyclic nucleotides and steroids during induced follicular atresia in the hamster. *J.Reprod. Fert.* 63: 455-461.

Hubbard, J.C. and Greenwald, S.G. (1983). In vitro effects of luteinizing hormone on induced atretic graafian follicles in the hamster. *Biol. of Reprod.* 28: 849-859.

Jagiello, G., Graffeo, J., Ducayen, M., Prosser, R. ( 1977 ). Further studies of inhibitors of in vitro mammalian oocyte maturation. *Fert. Steril.* 28: 476 - 481.

Ingram, D.L. ( 1962 ) Atresia In Zuckerman, S., Mandl, A.M., Eckstein, P. eds. *The Ovary*, New York; Academic Press, vol 1 pp. 247 - 273.

Ioannou, J.M. ( 1964 ). Oogenesis in the Guinea - pig. *J. Embryol. Exp. Morphol.* 12: 673 - 691.

Jahn, C.L., Boran, M.M. and Bachvarova, R. ( 1976 ). Stability of RNA synthesized by the mouse oocyte during its major growth phase. *J. Exp. Zool.* 197: 161 - 172.

Jones, E.C. and Kron, P.L. ( 1959 ) Influence of the anterior pituitary on the ageing process in the ovary mature. *Lond.* 183: 1155 - 1158.

- Kanatani, H., Shirai, H., Nakanishi, K. and Korokawa, T. (1969). Isolation and identification of meiosis inducing substance in starfish *Asterias amurensis*. *Nature* (London) 221: 273 - 274.
- Keever, J.E. and Greewald, G.S. ( 1967 ) Effect of a estrogen and progesterone on pituitary gonadotrophic content of the cyclic hamster. *Acta Endocr. Copenh.* 56: 244 - 254.
- Kitai, H., Kobayashi, Y., Santulli, R., Wright, K.H., Wallach, E.E. (1985 a) The relationship between prostaglandins and histamine in the ovulatory process as determined with the in vitro perfused rabbit ovary. *Fertil.Steril.* 43: 646 - 651.
- Kobayashi, Y., Wright, K.H., Santulli, R., Kitai, H. and Wallach, E.E. ( 1983 ) Effect of histamine and histamine blockers on the ovulatory process in vitro perfused rabbit ovary. *Biol. Reprod.* 28: 385 - 392.
- Koj, A.E., Regoeczi, C.J., Toens, R., Laveille and Gaudie. (1978) Synthesis of antithrombin III and alpha - antitrypsin by the perfused rat liver. *Biochim. Biophys. Acta* 539: 496 - 504.
- Koos, F.D. and Clark, M.R. ( 1982 ) Production of 6 - Keto - prostaglandin F<sub>1L</sub> by rat granulosa cells in vitro. *Endocrinology* 111: 1513 - 1518.
- Krishna, A. and Terranova, P.F. ( 1985 ). Alterations in mast cell degranulation and ovarian histamine in the proestrus hamster. *Biol. Reprod.* 32: 1211 - 1217.
- Lamprecht, S.A., Zor, U., Tsafiri, A. and Linder, H.R. (1973) . Action of prostaglandin E2 and luteinizing hormone on ovarian adenylate cyclase, protein kinase and ornithine decarboxylase activity during postnatal development and maturity in the rat. *J. Endocr.* 57: 217 - 233.
- Landefeld, T.D., Campbell, K.L. and Midgley Jr., A.R. ( 1979 ). Rapid changes in the synthesis of specific ovarian granulosa cell proteins induced by choriogonadotropin. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 76: 5153 - 5157.
- Le Maire, M., Grazi, A., Moller, J.V. and Aggerbeck, L.P. (1987). The use of gel chromatography for the determination of sizes and relative molecular masses of proteins. *Biochem. J.* 243: 399 - 404.
- Leibfried, L., First, N.L. ( 1980 ) Effect of bovine and porcine follicular fluid and granulosa cells on maturation of oocytes in vitro. *Biol. Reprod.* 23 : 699 - 704.
- Leeson, T.S. and Leeson, C.R. ( 1984 ) *Histologia.* 4a ed. Interamericana, Mexico.
- Lieberman, J. ( 1969 ) Heterozygous and homozygous Alpha - antitrypsin deficiency in patients with pulmonary emphysema. *N. Engl. J. Med.* 281: 279 - 284.



- Lipner, H. ( 1971 ). Ovulation from histamine depleted ovaries. Proc. Soc. Exp. Biol. Med. 136: 111 - 114.
- Lindner, H.R., Tsafiriri, A., Lieberman, M.E., Zor, U., Kockh, Y., Bauminger, S., Barnea, A. ( 1974 ). Gonadotrophin action on cultured Graafian follicles: induction of maturation division of the mammalian oocyte and differentiation of the luteal cell. Recent Prog. Horm. Res. 30 79 - 138.
- Louvet, J.P., Harman, S.M., Shreiber, J.R. and Ross, G.T. (1975) Evidence for role androgen in follicular maturation. Endocrinology 97: 366 - 372.
- Lowry, O.H., Rosebrough, N.J., Fara, A.L. and Randall, R.J. (1951). Protein measurement with the folinphenol reagent. J. Biol. Chem. 193: 265 - 275.
- Lowenstein, W.R. ( 1979 ) Junctonal intercellular communication and the control of growth. Biochim. Biophys Acta 560:1 - 65.
- Magnusson, C., Hillensjo, T. ( 1977 ). Inhibition of maturation and metabolism in rat oocytes by cyclic AMP. J.Exp. Zool.201: 139 - 147.
- Magnusson, C., Hillensjo, T., Tsafiriri, A., Hultborn, R. and Ahrén, K. ( 1977 ). Oxygen consumption of maturing rat oocytes. Biol. Reprod. 17 9 - 15.
- Magnusson, C. ( 1980 ). Role of cumulus cells for rat oocyte maturation and metabolism. Gamete Res. 3: 133 - 140.
- Nasui, Y. and Clarke, J.H. ( 1979 ). Oocyte maturation. Int. Rev. Cytol. 57 185 - 282.
- Mercado, E. and Rosado, A. ( 1975 ) Kinetic study of proteolytic activity of intact human spermatozoo Arch. Inv. Med. 6: 65 - 74.
- Mc. Gaughey, W.R. and Van Berkomp, J. ( 1977 ). Patterns of polypeptides synthesis of porcine oocytes during maturation in vitro. Dev. Biol. 56 : 241 - 254.
- Miller, J.G. and Behrman, H.R. ( 1986 ). Oocyte maturation is inhibited by adenosine in the presence of follicle - stimulating hormone Biol. of Reprod. 35: 833 - 837.
- Moor, R.M., Hay, M.F. and Cran, D.G. Macroscopic identification and steroidogenic function of atretic follicles in sheep. J. Endocr. 77:309 - 318.
- Moor, R.M. and Smith, M.W. ( 1979 ). Aminoacid transport in mammalian oocytes. Expl Cell. Res. 119: 333 - 341.
- Moor, R.M., Smith, M.W. and Dawson, R.M.C. ( 1980 ) Measurement of intercellular coupling between oocytes and cumulus cells using intercellular markers Exp. Cell Res.126: 15 - 29.

- Moor, R.M., Osborn, J.C., Cran, D.G., Walters, D.E. ( 1981 ). Selective effect of gonadotrophins on cell coupling, nuclear maturation and protein synthesis in mammalian oocytes. *J. Embryol. exp. Morph.* 61: 347 - 365.
- Morales, T.I, Woessner, J.F, Jr., Marsh, J.M. and Le Maire, W.J. ( 1983 ). Collagen, callagenase and collagenolytic activity in rat graafian follicles during follicular growth and ovulation. *Biochim. Biophys. Acta* 756: 119-122
- Moore, G.M.P., Lintern Moore, S., Peters, H. Faber, M. ( 1974 ) RNA synthesis in the mouse oocyte. *J. Cell. Biol.* 60 : 416 - 422.
- Motta, P.M. and Van Blerkom, J. (1978) Structure and ultrastructure of ovarian follicles in human ovulation Ed. North Holland Biomedical Press, New York U.S.A.
- Motlik, J., Kopečný, V., Trávník, P., Pivko, J. ( 1984 ). RNA synthesis in pig follicular oocytes. Autoradiographic and cytochemical study. *Biol. Cell* 50 : 229 - 236.
- Mekola, M.V. and Smith, D.M. ( 1975 ). Failure of gonadotropins to induce in vitro maturation of mouse oocytes treated with dibutyryl cyclic AMP. *J. Exp. Zool.* 194: 529 - 534.
- Nelsson, L. ( 1974 ). Acute effects of gonadotrophins and prostaglandins on the metabolism of isolated ovarian follicles from PMSG-treated immature rats. *Acta Endocrinol.* 77 540 - 558.
- Nimrod, A., Linder, M.R. ( 1980 ). Heparin facilitates the induction of LH receptors by FSH in granulosa cells cultured in serum enriched medium. *FEBS Lett* 119: 155 - 157.
- Okamura, H., Virutamasen, P., Wright, K.H. and Wallach, E.e. (1972) Ovarian Smooth muscle in the human being, rabbit and cat. *Am. J. Obstet. Gynecol.* 112: 183 - 191.
- Pederson, T. ( 1970 ). Follicle Kinetics in the ovary of the cyclic mouse. *Acta Endocrinol.* 64 304 - 323.
- Peddie, M.J. ( 1977 ) Development of antral follicles and follicular atresia in Guinea - pigs immunized against oestradiol - 6 - bovine serum albumin. *J. Endocr.* 75: 48 - 49.
- Peluso, J.J., Steger, R.W. and Hafez, E.S.E. ( 1977 ) Sequential changes asociated with degeneration of preovulatory rat follicles. *J. Reprod. Fertil.* 49: 215 - 218.
- Peluso, J.J., Steger, R.W. ( 1978 ). Role of FSH in regulating granulosa cell division and follicular atresia in rats. *J. Reprod. Fertil.* 54: 275 - 278.
- Peters, A., Byskov, A.G., Himelstein - Braw, R. and Faber, M. (1975) Follicular growth: The basic event in the mouse and human ovary. *J. Reprod. Fert.*45: 559 - 566.

- Peters, H. Levy, E. and Crone, M. ( 1965 ) Oogenesis in rabbits. *J. Exp. Zool.* 158: 169.
- Petersen, L.C., Brender, J. and Suenson, C. ( 1985 ) Zimogen activation kinetics. Modulatory effects of trans - 4 ( Aminomethyl ) cyclohexane - 1 - carboxilic acid and poly - D - lysine on plasminogen activation. *Biochim. J.* 225: 149 - 158.
- Pincus, G., Enzmann, E.V. ( 1935 ). The comparative behavior of mammalian eggs in vivo and in vitro. I. The activation of ovarian eggs . *J. Exp. Med.* 62: 665 -75.
- Pitts, J.D. ( 1977 ) Direct communication in animal cells. In international cell biology ( B. R. Brinkley and K.R. Porter, eds. ) pp. 42 - 49. The Rockefeller University Press. New York.
- Ramasharma, K., Cabrera, C.M. and Choh Hao Li. ( 1986 ). Identification of insulin-like growth factor - II in human seminal and follicular fluids. *Bioch. and Biophys Research Communications.* 140:536 - 542.
- Richards, J.S., Rao, M.C. and Ireland, J.J. ( 1978 ). Action of pituitary gonadotrophins on the ovary. In control of ovulation. Chap 12 pp. 197 - 216. Eds. D.B. Crighton, G.R., Foxcroft, M.B., Haynes and Lamming, G.E. Butterworth, London.
- Rondell, P. ( 1974 ) Role of steroid synthesis in the process of ovulation. *Biol. Reprod.* 10: 199 - 215.
- Rosales, A.M., Avendaño, E. and Sanchez, F. ( 1987 ) Study on pathological disorder of goat reproductive tract. In Santana. O.P., Da Silva, A.G. and Foste, W.C. eds. Proceedings of the IV International Conference on Goats. Embrapa - DPP, Brazilia, pp. 1355.
- Rushmer, R.A. and Brinster, R.L. ( 1973 ) Carbon dioxide from pyruvate and glucose by bovine oocytes. *Exptl. Cell Res.* 82 252 - 254.
- Sadighian, J.J., Patterson, S.K., Neymark, M.A., Pepe, G.J., Dimino, M.J. ( 1985 ). The effects of phosphoinositides on mitochondrial steroidogenesis by luteal tissue. In: Strauss, J.F., Menon, K.M.J. ( eds ), Lipoprotein and cholesterol metabolism in steroidogenic tissues. Philadelphia G.F. Stickley Co., pp 257 - 259.
- Sadler, S.E., Maller, J.L. ( 1983 ). The development of competence for meiotic maturation during oogenesis in Xenopus laevis. *Dev. Biol.* 98: 165 - 172.
- Salomon, Y., Amir, Y., Azulai, R. Amsterdam, A. ( 1978 ). Modulation of inhibition of heparin of gonadotropin - stimulated ovarian adenylate cyclase. *Biochim. Biophys. Acta* 544: 262 - 272.
- Sato, E. and Ishibashi, T. ( 1977 ). Meiotic arresting action of the substance obtained from cell surface of porcine ovarian granulosa cells. *Jap. J. Zootech. Sci.* 48: 22 - 26.

- Sato, E., Koide, S.S. ( 1984 ). Forkolin and mouse oocyte maturation in vitro . J. Exp. Zool. 230: 125 - 129.
- Sato, E., Ueno, H. Koide, S.S. ( 1986 ). Mouse oocyte maturation modulated by a granulosa cell factor and by heparin and heparan sulfate. Gamete Res. 13: 115 - 124.
- Scharpe, S., Eid, M., Cooperman, W. and Lauwers, A. ( 1976 ). Antitrypsin; an inhibitor of renin. Biochim. J. 153: 505 - 507.
- Schultz, R.M. and Lambert, C.C. ( 1973 ). Changes in adenine nucleotide levels and respiration during 1 - methyladenine induced maturation of starfish oocytes. Exptl. Cell. Res. 81: 163 - 168.
- Schultz, A.W. ( 1974 ) Role of hormones in oocyte maturation. Biol. Reprod. 10: 150 - 178.
- Schultz, R.M. and Wassarman, P.M. ( 1977 ) Biochemical studies of mammalian oogenesis: Protein synthesis during oocyte growth and meiotic maturation in the mouse. J. Cell Sci. 24: 167 - 194.
- Schultz, R.M. and Wassarman, P.M. ( 1977 ). Specific changes in the pattern of protein synthesis during meiotic maturation of mammalian oocytes in vitro. Proc. Natl. Acad. Sci. USA 74: 538 - 541.
- Schultz, R.M., Letorneau, G.E. and Wassarman P.M. ( 1978 ). Meiotic maturation of mouse Oocyte in vitro: protein synthesis in a nucleate and nucleate oocyte fragments. J. Cell. Sci. 30: 251 - 264.
- Schultz, R.M., Letorneau, G.E. and Wasserman, P.M. ( 1979 ) Program of early development in the mammal: changes in the patterns and absolute rates of tubulin and total protein synthesis during oocyte growth in the mouse. Develop. Biol. 73: 120 - 133.
- Schultz, R.M., Montgomery, R.R., Ward - Bailey, P.F. Eppig, J.J. ( 1983 ). Regulation of oocyte maturation in the mouse: possible roles of intercellular communication, cAMP, and Testosterone Dev. Biol. 95: 294 - 304.
- Shaha, C. and Greenwald, G.S. ( 1982 ) Autoradiographic analysis of changes in ovarian bending of FSH and HCG during induced follicular atresia in the hamster. J. Reprod. Fert. 66: 197 - 199.
- Shirai, H. and Kanatani, H. ( 1972 ) 1 - Methyladenosine ribohydrolase in the starfish ovary and its relation to oocyte maturation. Exp. Cell Res. 75: 79 - 88
- Silavin, S.L. and Greenwald, G.S. ( 1984 ) Steroid production by isolated theca and granulosa cells after initiation of atresia in the hamster. J. Reprod. Fert. 71: 387 - 392.

Smith, L.D. and Ecker, R.E. ( 1970 ). Regulatory process in the maturation and early cleavage of amphibians eggs. Current Topics in Dev. Biol. 5: 1 - 38.

Sterlicht, A.L. and Schultz, R.M. ( 1981 ) Biochemical studies of mammalian oogenesis. Kinetics of accumulation of total and poly ( A ) containing RNA during growth of the mouse oocyte J. Exp. Zool. 215: 191 - 200.

Stone, S.L., Pomerantz, S.H., Schwartz - Kripner, A., Channing, C.P. ( 1978 ). Inhibition of oocyte maturation from a porcine follicular fluid: further purification and evidence for reversible action . Biol. Reprod. 19: 585 - 592.

Sorensen, R.A. ( 1972 ). The utilization of lactate in mouse oocyte maturation and first cleavage. Biol. Reprod. 7 : 139 - 144.

Sorensen, R.A. and Wassarman, P.M.( 1976 ) Relationship between growth and meiotic maturation of the mouse oocyte. Dev. Biol. 50: 531 - 536.

Strickland, S., Beers, W.H. ( 1976 ) Studies of role of plasminogen activator in ovulation. J. Biol. Chem. 251: 5694 - 5702.

Sturgis, S.H. ( 1961 ) Factors influencing ovulation and atresia of ovarian follicles. In control of ovulation pp. 213 - 218 Ed. C.A. Villie Pergamon Press, Oxford.

Szollosi, D. ( 1972 ) Changes of cell organelles during oogenesis in mammals. In oogenesis ( Biggers, J.D. and Schultz, A.W., eds. ) pp. 47 - 64. University Park Press, Baltimore.

Smith, L.D. and Ecker, R.E. ( 1970 ) Regulatory process in the maturation and early cleavage of amphibians eggs . Currents topics in Dev. Biol. 5: 1 - 38.

Tanaka, T., Strauss, J.F. ( 1982 ). Stimulation of luteal mitochondrial cholesterol side chain cleavage by cardiolipin. Endocrinol. 110: 1592 -98.

Telfer, W.H. ( 1975 ) Development and physiology of the oocyte - nurse cell syncytium. In Advances in insect physiology. (Trechens, J.E., Berridge, M.J. and Wigglesworth, V.B., eds.) 11: 223 - 319. Academic Press, New York.

Teplitz, R. and Ohno, S. ( 1963 ) Postnatal induction of ovogenesis in the rabbit. ( *Orytolagus cumulus* ) Exp. Cell Res. 31: 183 - 189.

Ter Haar, M.B., Harrison, M.A. and Peddie, M.J. ( 1976 ). Ovarian follicular development in immature guinea pigs treated with progesterone, testosterone or aestradiol from birth. J. Endocr. 68: 31.

- Tesarik, J., Travnik, P., Kopecny, V., Krstek, F. ( 1983 )  
Nucleolar transformation in the human oocyte after completion  
and growth. *Gamete Res.* 8: 267 - 277.
- Testart, J., Thibault, A. and Lefevre, B. ( 1983 ). In vitro  
ovulation of rabbit ovarian follicles isolated after the  
endogenous gonadotrophin surge. *J. Reprod. Fertil.* 68: 413 - 418.
- Thibault, C.G. ( 1972 ). Final stages of mammalian oocyte  
maturation. In *Oogenesis* ( J.A. Biggers and A.W. Schultz, eds. )  
pp. 397 - 411 University Park Press, Baltimore.
- Thibault, C.G. ( 1977 ) Are follicular maturation and oocyte  
maturation independent process ? *J. Reprod. Fertil.* 51 1 - 15.
- Thibier - Fouchet, C., Mulner, O. and Ozon, R. ( 1976 )  
Progesterone biosynthesis and metabolism by ovarian follicles  
and isolated oocytes of *xenopus laevis*. *Biol. Reprod.* 14: 317 -  
326.
- Tsafriri, A., Lindner, H.R., Zor, U. and Lamprecht ( 1972 ). In  
vitro induction of meiotic division in follicle - enclosed rat  
oocyte by LH, cyclic AMP and prostaglandine E2. *J. Reprod. Fert.*  
31: 39 - 50.
- Tsafriri, A. and Channing, C.P. ( 1975 ). An inhibitory  
influence of granulosa cells and follicular fluid upon porcine  
Oocyte meiosis in vivo. *Endocrinology.* 96: 922 - 927.
- Tsafriri, A., Lieberman, M.E., Ahrén, K. and Lindner, H.R.  
(1976 a ). Dissociation between LH - induced aerobic glycolysis  
and oocyte maturation in cultivated graafian follicles of the rat.  
*Acta Endocrinol. ( Copenhagen )* 81: 362 - 366.
- Tsafriri, A., Pomerantz, S.H. and Channing, C.P. ( 1976 b )  
Inhibition of oocyte maturation by porcine follicular fluid:  
partial characterization of the inhibitor. *Biol. Reprod.* 14 :  
511 - 516.
- Tsafriri, A., Channing, C.P., Pomerantz, S.H. and Lindner, H.R.  
( 1977 ). Inhibition of maturation of isolated rat Oocytes by  
porcine follicular fluid. *J. Endocrinol.* 75: 285 - 291.
- Tsafriri, A. ( 1978 ). Oocyte maturation in mammalian. In Jones  
RE ( ed ) : *The Vertebrate Ovary* . New York : Plenum Press, pp.  
409 - 442.
- Tsafriri, A., Weinstein, Y., Bar - Ami, S., Channing, C.P.,  
Pomerantz, S.H. and Lindner, H.R. ( 1979 ). The control of  
meiotic maturation of the rat oocyte. In *Research on Steroids*,  
Vol. 8 pp. 193 - 198 Ed. E. Conti. Academic Press, London.
- Tsafriri, A., Dekel, N., Bar - Ami, S. ( 1982 ). The role of  
oocyte maturation inhibitor in follicular regulation of oocyte  
maturation. *J. Reprod. Fert.* 64: 541 - 551.

- Tsonis, G.C., Carson, S.R. and Findlay, K.J. (1984). Relationships between aromatase activity, follicular fluid oestradiol-17 and testosterone concentration and diameter and atresia of individual ovine follicles. *J. Reprod. Fert.* 72: 153-163.
- Turino, G.M., Senior, R.M., Garg, B.D. (1969) Serum elastase inhibitor deficiency and alfa 1-antitrypsin deficiency in patients with obstructive emphysema. *Science (Wash. D.C)* 165: 709-711
- Uilenbroek, J. Th. J., Uburtersen, P.J.A and van der Schoot, P. (1980). Atresia of preovulatory follicles: gonadotropin binding and steroidogenic activity. *Biol. Reprod.* 23: 219-220.
- Verloes, R., Atassi, G. Dumont, P. and Kamanek, L. (1978). Tumor growth inhibition mediated by trypsin inhibitor or urokinase inhibitors. *Eur. J. Cancer.* 14: 23-31.
- Virutamases, P., Wright, K.H., Wallach, E.E. (1972). Effects of catecholamines on ovarian contractility in the rabbit. *Obstet. Gynecol.* 39: 225-236.
- Wallach, E.E. Bronson, R., Hamada, Y., Wright, K.H., Stevens, V.C. (1975). Effectiveness of prostaglandin F2 in restoration of HMG-HCG induced ovulation in indomethacin-treated monkeys. *Prostaglandin.* 10: 129-138.
- Wang, C., Leung, A. (1983). Gonadotropins regulate plasminogen activator production by rat granulosa cells. *Endocrinology.* 112: 1201-1207.
- Warnes, G.M., Moor, R.M. and Johnson, M.H. (1977) Changes in protein during maturation of sheep oocytes in vivo and in vitro. *J. Reprod. Fert.* 49: 331 - 335.
- Wassarman, P.M. and Letourneau, G.E. (1976). RNA synthesis in fully-grown mouse oocytes. *Nature.* 261: 73 - 74.
- Wassarman, P.M. and Josefowicz, W.J. (1978). Oocyte development in the mouse: A ultrastructural comparison of oocyte isolated at various stages of growth and meiotic competence. *J. Morphol.* 156: 209-236.
- Weakley, B.S. (1968). Comparison of cytoplasmic lamellae and membrane elements in oocytes of five mammalian species. *Z. Morphol. Mikroskop. Anat.* 85: 109-123
- White, M.J.D. (1973) *The chromosomes.* 6th. ed. Chapman & Hall, London.
- Wright, K.H., Wallach, E.E. Fromm, E., Jeutter, D. (1976). Studies of rabbit ovarian contractility using chronically implanted transducers. *Fertil. Steril.* 27: 310-318.

Wu, F.C., and Laskowski, M. (1960). Crystalline acidlabile trypsin inhibitor from bovine blood plasma. *J. Biol. Chem.* 235: 1680-1685.

Yoshimura, Y., Hosoi, Y., Atlas, S.J., Bongiovanni, A.M., Wallach, E.E. (1986). The effects of ovarian steroidogenesis on ovulation and fertilizability in the in vitro perfused rabbit ovary. *Biol. Reprod.* 35: 943-948.

Zamboni, L. (1970). Ultrastructure of mammalian oocytes and ova. *Biol. Reprod. Suppl.* 2: 44-63

Zamboni, L. (1972). Comparative studies on the ultrastructure of mammalian oocytes. In *Oogenesis* (J.D. Biggers and A.W. Schultz, eds.), pp 5-46. Univ. Park Press, Baltimore, Maryland.

Yoshimura, Y. and Wallach, E.E. (1987). Studies of mechanism (s) of mammalian ovulation. *Fertil and Sterility.* 47: 22 - 34.

Zeilmaker, G.H., Hulsmann, W.C., Wensinck, F. and Verhamme, C. (1972). Oxygen - triggered mouse oocyte maturation in vitro and lactate utilization by mouse oocyte and zygotes. *J. Reprod. Fert.* 29: 151 - 152.

Zeilmaker, G. H. and Verhamme. C.M. (1974). Observations on rat oocyte maturation in vitro: morphology and energy requirements. *Biol. Reprod.* 11: 145 - 152.

Zeilmaker, G.H. and Verhamme, C.M. (1977). Lactate concentrations in pre-ovulatory follicles of pro-oestrus rats before and after onset of oocyte maturation. *Acta Endocrinol.* 86: 380 - 383.

Zybina, E.G. (1969) Behaviour of the chromosomal nucleolar apparatus during the growth period of the rabbit oocytes. *Tsitologiya* 11: 25 - 31.