



**UNIVERSIDAD AUTÓNOMA METROPOLITANA
UNIDAD IZTAPALAPA**

División de Ciencias Biológicas y de la Salud

**“EFECTOS DE LA HIPEROVULACIÓN CON
GONADOTROPINAS SOBRE LA PROLIFERACIÓN
Y MUERTE CELULAR EN FOLÍCULOS DE RATAS”.**

T E S I S

**QUE PARA OBTENER EL GRADO DE MAESTRO
EN BIOLOGIA EXPERIMENTAL**

P R E S E N T A

M.V.Z. JUAN GERARDO MOSQUEDA MONROY

TUTOR

Dra. ANA MARIA ROSALES TORRES

ASESORES

**Dr. ADOLFO ROSADO GARCÍA
M. en C. CLARA ORTEGA CAMARILLO**

La Maestría en Biología Experimental con el número de registro 309-0 de la Universidad Autónoma Metropolitana Unidad Iztapalapa se encuentra dentro del padrón de excelencia del Consejo Nacional de Ciencia y Tecnología.

Mi agradecimiento al Consejo Nacional de Ciencia y Tecnología por la beca-crédito otorgada número 152995

AGRADECIMIENTOS

A MIS PADRES por el apoyo incondicional que siempre me han brindado

A la Dra. Rosales por el valioso tiempo que dedico en mi formación.

A mis compañeros de laboratorio por su ayuda y comprensión.

Al Dr. Castillo por su ayuda en la elaboración de este trabajo.

A la Dra. Yvonne M Hueze por su apoyo en la realización de esta tesis.

I N D I C E

ANTECEDENTES	1
Crecimiento y desarrollo folicular	1
Atresia folicular	11
Hiperovulación	18
PLANTEAMIENTO DEL PROBLEMA	22
OBJETIVOS	23
MATERIAL Y METODOS	24
RESULTADOS	27
DISCUSIÓN	32
CONCLUSIÓN	38
BIBLIOGRAFIA	39

ANTECEDENTES

CRECIMIENTO Y DESARROLLO FOLICULAR

Desde el punto de vista embrionario el crecimiento y desarrollo folicular son la evolución del ovocito y los 2 tipos de células que lo acompañan (teca y granulosa). En los mamíferos, ambos procesos inician con la formación de la ovogonia, resultado de un aumento en la actividad mitótica de las células germinales primordiales presentes en la cresta genital desde el día 11 de vida embrionaria en el caso del ratón y alrededor del día 35 en el caso del humano (Greenwald y Terranova 1988)

La evolución de las ovogonias a ovocitos primarios se presenta cuando inicia el proceso de reducción cromosómica o meiosis, hasta llegar a un punto específico de la meiosis llamado Diploteno. Antes de completar la reducción del material genético retornan la membrana nuclear y el nucleolo, el proceso se detiene y la célula entra la profase meiótica alargada ó dictioteno (Greenwald y Roy 1994).

Inmediatamente después de formado el ovocito es rodeado por una capa de células aplanadas llamadas "pregranulosa", estableciendo así el **Folículo primordial** (Block 1953, Forabosco et al., 1991), para algunos autores el crecimiento y la maduración folicular en roedores comienza con los folículos primordiales formados durante la vida fetal o inmediatamente después del nacimiento (Día 3) (Hirshfield 1989., McGee et al., 1997, Gelety y Magoffin 1997, Rajah 1992, Malamed 1992). Actualmente el crecimiento folicular puede ser dividido en 2 etapas: 1) crecimiento inicial y 2) crecimiento cíclico (Greenwald et al., 1994, Fauser y Van Exuden 1997, Meijs et al., 1990).

No obstante que el proceso de reducción cromosómico se haya detenido, el crecimiento de los ovocitos continúa tanto a nivel citoplasmático como nuclear, los ovocitos aumentan de tamaño (20-80 μm en el caso del ratón) y adquieren un núcleo vesiculosos llamado vesícula germinal. En tanto la actividad transcripcional y la acumulación de macromoléculas aumenta incluyendo la tubulina y la actina. También aumenta el número de ribosomas, mitocondrias, granulos corticales y saculos del aparato de Golgi. Además en esta fase se sintetizan y secretan proteínas que van a formar la capa extracelular o zona pelúcida (Paynton et al 1990).

Durante esta etapa el ovocito continúa en arresto meiótico y una vez completado su desarrollo se diferencia morfológica y bioquímicamente adquiriendo la capacidad de terminar la meiosis, lo cual ocurre antes de la ovulación. Durante el reinicio de la meiosis, los cromosomas se condensan en cromosomas bivalentes que se aparean y completan la primera división meiótica concluyendo con la eliminación del primer cuerpo polar (Payton et al 1990).

El **Crecimiento Inicial** es un proceso continuo que inicia con el reclutamiento de los folículos primordiales de la poza de reserva justo después de su formación. Incluye los estados de desarrollo folicular primario, secundario ó preantral y antral temprano. Sin embargo los mecanismos que controlan el crecimiento inicial de los folículos han sido difíciles de investigar ya que representa un proceso caracterizado por un crecimiento lento de un número sustancial de folículos pequeños en un periodo prolongado de tiempo (Hirshfield 1989). Es probable que los folículos primordiales antes de este momento se encuentren bajo una influencia inhibitoria constante de origen sistémico y/o local, que los obligaba a permanecer inactivos y que una disminución en las influencias inhibitorias y/o un aumento de factores estimuladores del crecimiento es lo que permite el crecimiento inicial del folículo (Wandji et al., 1996).

Durante esta etapa del desarrollo los folículos no poseen receptores funcionales para FSH, estos comienzan a aparecer hasta el estado secundario, por lo que el inicio del crecimiento puede deberse a la estimulación de las células de la pregranulosa por parte de algunos factores endógenos que estimulan la vía del AMPc y con esto también se inicia la expresión de receptores para aromatasa y FSH. Algunos autores han propuesto que el orden en que los folículos comienzan su crecimiento coincide con el orden en que entraron a la meiosis, lo cual se conoció como la hipótesis de "producción en línea" (Edwards et al 1977).

Vale la pena remarcar que al inicio del crecimiento folicular, las membranas de las células de la pregranulosa del folículo primordial se encuentran unidas íntimamente a través de uniones fuertes en numerosos puntos. Durante los estadios tempranos de desarrollo folicular el contacto entre las células de la granulosa se caracteriza por la adquisición de uniones que incluyen: desmosomas cortos, adherencias zonales y uniones comunicantes. La comunicación entre las células de la granulosa y el ovocito vía uniones comunicantes puede ser crucial durante la selección y la primeras etapas del desarrollo folicular; así como la transducción de las señales y el paso de segundos mensajeros tales como el AMPc y el Ca^{+2} de una célula a otra lo que permite que la respuesta folicular a un estímulo sea coordinada y sincrónica durante las etapas del crecimiento folicular (Wiesen y Midgley Jr 1993).

También se han propuesto la intervención de un factor involucrado en la comunicación celular ovocito-granulosa de los folículos temprano llamado factor de crecimiento diferencial (**GDF-9**) el cual al parecer tiene un papel muy importante en el crecimiento inicial (Parrot and Skinner 1998; Elvin et al 1999; Bedell et al., 1995; Huang et al., 1993; Kuroda et al., 1988).

El **GDF-9** es una proteína homodimérica miembro de la familia del Factor de crecimiento de transformación β (**TGF β**), secretada por el ovocito (McGrath et al., 1995; Hayashi et al., 1999; Elvin et al., 1999; Aaltonen et al., 1999) es el encargado de regular la proliferación de las células de la granulosa e inducir la división de las células en dos grandes poblaciones: 1) las células del cumulus

(aquellas que rodea el ovocito) y 2) las células muro (células que se encuentran en la periferia del antro). En ambas modula la expresión de genes, estimulando en las células de cumulus la síntesis de hialuronidasa sintetasa (**HAS2**), la ciclooxigenasa (**COX-2**) y la proteína reguladora esteroideogénica (**Star**) y por último influye en la esteroideogénesis disminuyendo el número de receptores a LH en las células del cumulus y aumentándolo en las células muro (Elvin et al., 1999)

Existen otros factores de crecimiento a los que también se les ha responsabilizado de estimular el inicio del crecimiento folicular, entre estos encontramos: 1) el factor de crecimiento similar a la insulina tipo I (**IGF-I**), el cual se ha demostrado que actúa sobre la pregranulosa estimulando la síntesis de DNA y la actividad de la aromatasa (esteroideogénesis), asimismo se sabe que en estados de desarrollo avanzado amplifica la acción de las gonadotropinas; 2) el factor de crecimiento similar a la insulina tipo II (**IGF-II**) que estimula la mitosis en la granulosa; 3) el **Factor de crecimiento epidérmico (EGF)** que es un mitógeno al cual responden las células de la granulosa y su acción es potenciada por otros factores de crecimiento, como **IGF-I** ; 4) el **Factor de crecimiento plaquetario**, que modifica las vías del AMPc que responden a FSH, especialmente las de diferenciación de la granulosa y actúa sobre la producción de prostaglandinas ; 5) el **Factor de crecimiento angiogénico**, encargado de estimular la vascularización y 6) el factor inhibitorio de la maduración de ovocito (**OMI**), que previene la reanudación de la meiosis hasta el pico preovulatorio de LH (Edwards et al., 1977, Wang y Greenwald 1993). Sin embargo hasta el momento no se conoce un mecanismo exacto que determine que y como se propicia el crecimiento inicial de los folículos primordiales.

El primer signo visible de crecimiento folicular es el aumento de tamaño del ovocito, seguido de la transformación de las células de la granulosa a cuboidales, convirtiéndose el folículo primordial en **Folículo primario**.

El folículo primario progresa al estado preantral cuando el ovocito se agranda y es rodeado por la zona pelúcida (Greenwald y Roy 1994). Las células de la granulosa proliferan a varias capas y se comienzan a formar los receptores a la hormona folículo estimulante (FSH) y la hormona luteinizante (LH). Las células de la teca comienzan a organizarse y el folículo adquiere vascularización (Greenwald y Roy 1994). Este folículo es el también denominado **Folículo secundario**.

En este estado de desarrollo folicular la estructura de las células de la granulosa no tiene mayor complicación, sin embargo las células ya han comenzado a adquirir la capacidad de sintetizar las tres clases de esteroides sexuales. La actividad de la aromatasa se encarga de la conversión de andrógenos a estrógenos y parece ser un factor limitante en la producción ovárica de estrógenos. Las células de la granulosa tienen también receptores específicos para andrógenos, los cuales no solo sirven como sustrato para la aromatización, sino que en concentraciones bajas pueden estimular la acción de la aromatasa. Cuando el folículo preantral es expuesto a un medio rico en andrógenos se

favorece la conversión de androstenediona a compuestos 5- α reducidos, que no pueden ser transformados a estrógenos e inhiben la aromatasa, lo cual conduce a la atresia del folículo (Cheng et al., 2002).

Bajo la acción de los estrógenos hay un aumento en el volumen de líquido folicular que se acumula en los espacios intercelulares de la granulosa, eventualmente uniéndose para formar una cavidad, razón por la cual en este momento el folículo adquiere el nombre de **Folículo Antral o Terciario**. Esta acumulación de líquido tiene como fin proveer de un medio endocrino especial al ovocito y las células de la granulosa ya que contiene proteínas plasmáticas, mucopolisacáridos, electrolitos, gonadotropinas y esteroides sexuales (Rosales 1998).

Como sabemos, el paso de un folículo preantral a antral temprano y todos los procesos que participan (división y diferenciación celular, esteroidogénesis, etc.), pueden ser influenciados por la acción sinérgica de gonadotropinas (FSH). Sin embargo varios estudios han demostrado que la interacción **Granulosa-Teca** tiene también un papel muy importante en esta etapa del desarrollo folicular (Elvin 1999; Eppig et al., 1997 Tsafiri 1997), a través de la liberación de algunos factores de crecimiento como: 1) el factor de crecimiento de Queranocitos (**KGF**) (Parrot and Skinnner 1998; Vanderhyden et al., 1992), 2) el factor de crecimiento de los hepatocitos (**HGF**) (Eppig et al., 1998; Elvin 1998;) y 3) el kit-ligand (**KL**) (Elvin et al 1999; Bedell et al., 1995; Huang et al., 1993).

El **KGF**, es un miembro de la familia del factor de crecimiento fibroblástico (**FGF7**), es producido por las células de la teca y tiene con función la regulación del crecimiento de las células de la granulosa y la esteroidogénesis. El **HGF**, también sintetizado por las células de la teca lleva a cabo las mismas funciones que el anterior y **KL** sintetizado por las células de la granulosa se encarga de regular la liberación de las dos anteriores en células de la teca, al mismo tiempo que se cree regula la liberación de algunos factores de crecimiento por parte del ovocito (Parrot and Skinner 1998)

Hasta antes del inicio de la pubertad, el destino normal de los folículos en crecimiento es la atresia y aunque ésta puede ocurrir en todas las fases de desarrollo folicular, la transición del estado antral temprano a preovulatorio es muy susceptible a la atresia (Hirshfield 1991). Después de la pubertad, el estímulo cíclico proporcionado por las gonadotropinas permite la supervivencia y el crecimiento de un número limitado de folículos antrales que alcanzarán el estado preovulatorio, proceso que se conoce como **Crecimiento Cíclico** (McGee y Hsueh 2000).

El crecimiento cíclico incluye los estados de desarrollo antral y preovulatorio. Ambas etapas de desarrollo folicular están caracterizadas por una explosiva proliferación y diferenciación de las células de la granulosa; procesos

biológicos que se encuentran regulados por la acción de las gonadotropinas (FSH y LH respectivamente) (Robker and Richard 1998).

La proliferación celular es controlada por varias moléculas que afectan de manera positiva y negativa los puntos críticos del ciclo celular, localizados principalmente en Intermedio de la fase G1-S y entre la fase G2 y M. Dentro de los reguladores positivos encargados de la reanudación del ciclo encontramos: 1) las ciclinas D1, D2 y D3; y 2) las cinasas dependientes de ciclinas (cdk) 4 y 6. Por otro lado dentro de los reguladores negativos del ciclo celular encontramos a los inhibidores de cdk (CKIs), la proteína *rb* y la familia de proteínas Cip/Kip: p21, p53, p27 y p57 (El-Deiry et al., 1993)

Dentro de los reguladores negativos más importantes está la proteína **p53** que es un transregulador transcripcional conocido como un gen supresor de tumores. La proteína presenta tres dominios: el N-terminal, que activa la transcripción; el central hidrofóbico, con regiones conservadas que al mutar alteran la capacidad de unión al ADN y su actividad como factor transcripcional, y el C-terminal, que participa en la oligomerización y unión específica al ADN. Entre las funciones más importantes de *p53* se encuentran su capacidad para regular la transcripción de genes que participan en el control del ciclo celular. Mutaciones de *p53* pueden inducir cambios en el ciclo celular y, por lo tanto, contribuir al desarrollo de cáncer (El-Deiry et al., 1993)

p53 funciona como un regulador negativo del ciclo celular, por lo que alteraciones en el gen que interfieren con su función conducen a la pérdida de esta regulación, lo que produce una rápida proliferación celular. La pérdida de la función de *p53* está asociada con la inmortalización y/o transformación *in vitro* y al desarrollo de neoplasias *in vivo* (Hisao et al 1995). Se ha propuesto que *p53* funciona como un punto de control para regular el paso de las células de un estado de reposo a otro de proliferación. Esto se observa cuando las células se exponen a agentes que dañan el ADN. Se sabe que la elevación de los niveles de *p53* induce a que las células se detengan al final de la fase G1 y se reparen los daños en el ADN propiamente por la maquinaria de reparación de éste, antes de continuar con su replicación en la fase S. Las células con *p53* mutado no interrumpen el ciclo celular aun después de que el ADN ha sufrido daño (Kastan et al 1992)

Como se mencionó anteriormente, se conocen dos estadios donde operan los puntos de control en la progresión del ciclo celular: en relación con el primero, al final de la fase G1 y la entrada a la fase S del ciclo celular, *p53* tiene una función central, ya que aumenta los niveles de los complejos CDK-ciclina (Mercer et al, 1990., El-deiry et al 1993) que a su vez modulan la expresión de genes que participan en la proliferación celular, específicamente en la interrupción del paso de la fase G1 a la fase S, y esto permite la reparación del ADN dañado antes de que continúe el ciclo celular, además, hay evidencias que demuestran que *p53* interactúa con los complejos CDK-ciclina (Mercer et al, 1990., El-deiry et al 1993). De esta manera, *p53* puede reprimir la expresión de genes que participan en los procesos de replicación y transcripción del ADN, como es el caso del antígeno

nuclear de proliferación celular (PCNA), B-m yb, la ADN polimerasa α , C-fos, 19 C-jun, 19 MDM2; o bien, activa genes reguladores negativos de la proliferación celular como Rb, WAF1/CIP1/SD11, GADD45 y GADA, produciendo interrupción del ciclo celular o muerte por apoptosis (Donehower 1993). En relación con el segundo estadio, donde operan los puntos de control y que comprende la transición de la fase G2 a la fase M del ciclo celular, se tiene poca información. Los puntos de control en fases tempranas del ciclo están representados por los complejos CDK-ciclina. Por ejemplo, las actividades de CDK2-E y CDK2-A son inhibidas por radiación ionizante en una manera dependiente de p53, mediante la activación transcripcional de p21 (Donehower y Bradley 1993)

El otro transregulador transcripcional más importante del ciclo celular es **Rb**, un gen supresor de tumores que inhibe la proliferación celular. Esto se ha demostrado en células tumorales que carecen de este gen, y al momento de transfectarlas con *Rb*, se observa una supresión del potencial tumorigénico. Además, se ha observado que un exceso de *Rb* puede inhibir la proliferación celular aun en células normales (Fung 1993). No se ha reportado que *Rb* tenga una regulación transcripcional, por lo que este gen se expresa constitutivamente en células en división o en estado de reposo, por lo tanto, la regulación de *Rb* ocurre a nivel postranscripcional, por fosforilación de la proteína (*pRb*). Aunque directamente la función de *pRb* no se asocia con la interrupción del ciclo celular, existen evidencias de que la forma no fosforilada de *pRb* es responsable de la interrupción de la proliferación celular. Además, la fosforilación de esta proteína es crucial para su unión con otras proteínas involucradas en la activación transcripcional y en la regulación del ciclo celular (Hall et al 1993)

Para determinar la función de *pRb*, se ha estudiado su estado de fosforilación durante el ciclo celular (Yen y Varrayanis 1994) En las fases G0 y G1 tempranas del ciclo, *pRb* se encuentra hipofosforilada (forma activa). La fosforilación de *pRb* ocurre entre las fases G1 y S, y aumenta en las fases G2 y M (forma inactiva). Cuando la célula termina la mitosis *pRb* se defosforila. La actividad de *pRb* está principalmente asociada a inhibición en la proliferación celular por contacto célula-célula, por falta de estímulos proliferativos o por la presencia de estímulos antiproliferativos como TGF- β 1 o TNF- α . En células normales en reposo, *pRb* se encuentra hipofosforilada y asociada al factor transcripcional E2F. (Hall et al 1993) Los diferentes estados de fosforilación de *pRb* durante el ciclo celular sugieren que *pRb* es un sustrato de los complejos CDK-ciclina. La expresión, fosforilación y formación de los complejos CDK-ciclina durante la fase G1 tardía, están asociados a la inactivación de *pRb*, por ejemplo, CDK2 se une con *pRb* y la fosforila en residuos de serinas o treoninas *in vivo* y CDK4-D se une y fosforila *pRb in vitro*. Las ciclinas E y D se acumulan en la fase G1 tardía, y su expresión corresponde con el momento en el que ocurre la fosforilación de *pRb*, mientras que la expresión de la ciclina A ocurre en la fase S temprana y en la fase G2, cuando *pRb* se encuentra hiperfosforilada. En general, las ciclinas D2 y D3 son más estables para formar complejos específicos con *pRb* que las ciclinas A y E. Además, en células con daño genético, la transfección con *pRb* induce interrupción de la proliferación celular en la fase G1; sin embargo, al

realizar una cotransfección con las ciclinas A o E, se libera el arresto celular inducido por pRb y se produce hiperfosforilación de pRb (Hall et al 1993).

Estudios recientes indican que el mecanismo de regulación de la proliferación y diferenciación de las células de la granulosa, por parte de las gonadotropinas es a través de una alternancia en el balance de los reguladores positivos y negativos del ciclo celular (Robker y Richard 1998). Se ha mostrado que FSH estimula la proliferación celular aumentando los niveles de ciclina D2 (regulación a la alta) vía AMPc, induciendo a la célula a entrar a la fase S del ciclo (Sicinski et al., 1996).

En trabajos realizados por Robker y Richard en 1998 se observó que en los folículos antrales tempranos, los andrógenos llevan a cabo una función muy similar a la de FSH estimulando la síntesis de algunos reguladores positivos del ciclo celular como la ciclina D2 y la síntesis de otras proteínas como P_{450arom} y PCNA vía AMPc, además de inhibir los niveles de p27 y p21, por lo que su actividad mitogénica es mayor a la de FSH.

Una vez que se ha incrementado la síntesis de P_{450arom} y por consiguiente la síntesis de estrógenos, estos van a ser transportados rápidamente a las células vecinas a través de la membrana celular por difusión simple (Cheng et al., 2002). Una vez en la célula la hormona se une a su receptor individual del tipo α localizado en el citoplasma o en fracciones nucleares, el cual tiene una estructura bioquímica similar a la de los receptores de hormona tiroidea al poseer dos dominios y una región "bisagra" (Richards 1975).

1. El dominio regulador y fijador de los esteroides: se encuentra en el extremo amino terminal. Tiene varios sitios de fosforilación y está comprometido en la activación del complejo hormona-receptor.

2. El dominio de unión a DNA: se encuentra en la parte media y es esencial para la activación de la transcripción. Esta porción es la responsable de controlar cuál gene será regulado por el receptor.

3. La región bisagra: se encuentra entre los dos anteriores dominios; contiene un área de señal importante para el movimiento del receptor hacia el núcleo después de su síntesis en el citoplasma.

Son múltiples las regiones del receptor que intervienen en la activación de la transcripción. Aunque existen dos áreas específicas conocidas como **TAF-1** y **TAF-2** que permiten la operación de la transcripción inducida por promotores. Existen genes promotores, indispensables para iniciar la transcripción y síntesis de RNAm. Los genes promotores son secuencias cortas de DNA; que actúan como potentes estimuladores de la transcripción, sirven como sitios fijadores del DNA para los complejos hormona-receptor activado y se denominan elementos de respuesta a los esteroides (**SRE**) (Richards 1975).

Una vez que los estrógenos se han unido a su receptor del tipo α , induce la síntesis de factores de transcripción esenciales para la fase de síntesis (**Fase S**) y

proteínas nucleares como la **H1** fundamental para el inicio de la fase mitogénica (**Fase M**) del ciclo celular. Al mismo tiempo induce la síntesis de otro tipo de receptores a estrógenos del tipo β (**ER β**), los cuales al unirse con su sustrato disminuyen el nivel de receptores a andrógenos, estimulando la actividad de la aromatasas e impidiendo la conversión de androstenediona a compuestos 5- α reducidos, evitando de esta manera la atresia folicular (Cheng et al., 2002)

Para poder responder al pico ovulatorio, las células de la granulosa deben adquirir receptores para LH. En los grandes folículos antrales la FSH, junto con IGF-1 inducen el desarrollo de receptores para LH. A medida que aumenta la concentración de estrógenos en el folículo, la FSH cambia su foco de acción, de su propio receptor hacia el receptor de LH. La LH puede inducir la producción de sus propios receptores en células previamente estimuladas por FSH (Hsueh et al., 1984, Harlow et al., 1988)

En este grupo limitado de folículos antrales que alcanzarán el estado preovulatorio, un folículo (o varios en el caso de especies poli-ovulatorias) crece más rápido que el resto del grupo (Zelevnik y Benyo 1994). La selección del folículo(s) dominante(s), se debe al efecto positivo que los estrógenos ejercen sobre él y a la retroalimentación negativa que éstos ejercen sobre la hipófisis quitándoles el soporte gonadotrópico al resto de los folículos, al mismo tiempo que este folículo comienza la liberación de algunos factores inhibidores del crecimiento como la inhibina y la foliculoestatina (Fauser y Van Heusden 1997).

Actualmente se sabe que el folículo dominante produce de manera autócrina concentraciones mayores de factores de crecimiento que estimulan un aumento en su vascularidad y sensibilidad a FSH como es el caso de la **Activina** cuya acción en el folículo consiste en aumentar la unión de FSH a las células de la granulosa e incrementar el estímulo para la aromatización y secreción de **Inhibina**, ésta es una proteína de 32 kD constituida por dos subunidades, encargada de frenar la secreción de FSH y asegurar la dominancia del folículo. Al mismo tiempo el folículo dominante adquiere una mayor cantidad de receptores a LH en comparación con el resto de los folículos (Evans y Fortune 1997; Adashi 1995, Giudice 1992). Al parecer FSH es el factor de supervivencia más importante para los folículos antrales tempranos. Sin embargo, en los folículos preovulatorios son numerosos los factores que promueven la supervivencia celular en el folículo (Hsueh et al., 1994, Chun et al., 1994, Eisenhauer y Chun et al., 1995), indicando así que estos factores actúan junto con la cascada hormonal manteniendo el desarrollo folicular en esta fase.

El folículo continúa su crecimiento después de ser seleccionado como dominante y entra en el estado preovulatorio, conocido también como folículo de Graaf. Las células de la granulosa aumentan y adquieren inclusiones lipídicas, mientras que la teca se vuelve vacuolada y altamente vascularizada, con lo cual el folículo adquiere un aspecto hiperhémico. A medida que llega a su madurez, aumenta la secreción de estrógenos, llegando a producir un pico 24 a 36 horas antes de la ovulación. Este pico estrogénico induce la aparición del pico de LH (Eisenhauer y Chun et al., 1995).

El aumento de LH hace que el ovocito reanude la meiosis, lo cual lleva a la expulsión del primer cuerpo polar, además provoca la luteinización de las células de la granulosa, al inducir la salida de éstas del ciclo celular, elevando los niveles de inhibidores del ciclo como p21 y p27 al mismo tiempo que disminuye los niveles de la ciclina D2 vía AMPc. Además por efecto de IGF-1 aumenta la producción de progesterona (McGee y Hsueh 2000).

Una vez que se presenta el aumento en los niveles de LH, se induce la luteinización de la granulosa y se aumenta la producción de progesterona (efecto estimulado por el IGF-I); también induce la síntesis de prostaglandinas E y F y otros eicosanoides indispensables para la ruptura del folículo. En este mismo período se pueden detectar receptores para progesterona en las células de la granulosa del folículo dominante; esta expresión de receptores es inducida por la LH y tiene como fin inhibir la mitosis en la granulosa (Hsueh et al., 1994)

Una vez que las prostaglandinas E y F aumentan en el líquido folicular y alcanzan un pico en el momento ovulatorio, actúan sobre el músculo liso permitiendo su contracción, ayudando de esta manera a la expulsión del ovocito. Todos estos eventos encadenados conducen a la ruptura de la pared folicular y a la expulsión del óvulo (Chun et al., 1994).

Después de liberado el ovocito, las células de la granulosa que se encuentran junto a la membrana basal aumentan de tamaño y cierran el folículo, adquiriendo apariencia vacuolada y un pigmento amarillo (**luteína**) convirtiéndose en células luteínicas. Una vez que se ha llevado a cabo el proceso de ovulación, la actividad ovárica no cesa, en roedores se ha demostrado que existe un aumento en los niveles de FSH posterior a la ovulación (oleada post-ovulatoria) y que este aumento en los niveles de FSH es el responsable del crecimiento y desarrollo de los folículos destinados a ovular 3-4 días después en el ciclo estral siguiente (McGee y Hsueh 2000).

CRECIMIENTO FOLICULAR DURANTE EL CICLO ESTRAL

El crecimiento, desarrollo y maduración de los folículos ováricos son procesos fundamentales que ocurren durante el ciclo estral en la mayoría de los animales domésticos y de laboratorio. De acuerdo a estos eventos endocrinológicos y de comportamiento folicular en los roedores y en otras especies de interés zootécnico, el ciclo estral se ha dividido en 4 fases que son: **Estro, Metaestro, Diestro y Proestro**. La duración de cada una de ellas y en conjunto del ciclo estral varía de una especie a otra (cuadro 1). En la rata el ciclo estral tiene una duración relativamente corta de apenas 4-6 días en comparación con otros mamíferos como el bovino cuyo ciclo estral tiene una duración de 21 días (Greenwald 1994).

Animal	Duración del ciclo estral	Duración del estro	Tiempo de la ovulación
Vaca	21 días	18 hrs.	10-15 hrs después del estro
Yegua	21-22 días	5-7 días	1-2 días antes de terminar el estro
Oveja	16-17 días	36 hrs.	12-24 hrs antes de terminar el estro
Cerda	21 días	2-3 días	30-36 hrs después de comenzar el estro
Rata	4-5 días	14 hrs.	8-15 hrs después del estro

Cuadro1: Duración del ciclo estral en diferentes especies (Greenwald and Roy 1994)

En la rata el **Proestro** tiene una duración de aproximadamente 12 horas. En esta etapa ocurre el crecimiento de los folículos en sus últimas etapas (antral y preovulatorio) gracias al estímulo proporcionado por el aumento en los niveles de gonadotropinas (FSH y LH) que ocurre en esta fase del ciclo. Además existe evidencia de que algunos factores del crecimiento actúan junto con las cascadas hormonales proporcionando el soporte necesario para el desarrollo de los folículos en sus últimas etapas. El **Estro** con una duración de apenas 9 -14 horas, es una etapa caracterizada por un aumento en el nivel de estrógenos circulantes, lo cual provoca cambios conductuales en el animal, como la hiperactividad y en presencia de otras ratas la lordosis. El **Metaestro** dura aproximadamente 24 horas en esta etapa los óvulos liberados se encuentran en el oviducto y hay un incremento en la producción de progesterona. El **Diestro** tiene una duración de 57 horas, si no hay fecundación al final de esta etapa se inicia la síntesis de postranglandinas, encargadas de la lisis del cuerpo lúteo, lo que trae como consecuencia un aumento en la producción de FSH y LH (proestro), iniciando nuevamente el ciclo reproductivo (Hsueh et al., 1994, Chun et al., 1994, Eisenhauer et al., 1995, Chun et al., 1995).

El acontecimiento central del ciclo estral es la ovulación, la cual esta precedida por un pico en los niveles de FSH, LH y estrógenos que ocurren durante el proestro (Freeman 1994). Hasta hace poco se pensaba que solo en esta etapa del ciclo era donde ocurrían estos picos, sin embargo en trabajos recientes con roedores y bovinos se ha demostrado que además del aumento en los niveles de FSH durante el proestro, existe un aumento en los niveles de FSH durante el diestro (oleada post-ovulatoria) y que este aumento en los niveles de FSH es el responsable del inicio del crecimiento y desarrollo folicular hasta el estado antral temprano (Greenwald 1994). Actualmente se ha demostrado que algunos de los folículos que iniciaron su crecimiento gracias al estímulo proporcionado por esta oleada post-ovulatoria, son los mismos que van culminar su crecimiento y a ovular en el ciclo estral siguiente (aproximadamente 4-6 días en el caso de la rata y 21 días después en el caso del bovino) gracias al estímulo proporcionado por el aumento en los niveles de FSH que ocurrirán en la fase de proestro (McGee y Hsueh 2000).

ATRESIA FOLICULAR

El término atresia es de origen griego y significa la clausura u obliteración de un orificio o pasaje del cuerpo (Hurwitz y Adashi 1992). Este término se utiliza para definir el mecanismo por el cual el ovario pierde, sin llegar a la ovulación, la gran mayoría de los ovocitos que constituyen el potencial reproductivo de las hembras. Desde el punto de vista fisiológico la atresia folicular es un proceso degenerativo que sufren la mayoría de los folículos que pueblan los ovarios (Rosales 1998).

La atresia folicular se presenta en las hembras desde la vida prenatal y continúa ininterrumpidamente durante toda la vida reproductiva. El funcionamiento de los ovarios, desde el punto de vista del desarrollo folicular es caracterizado por el continuo crecimiento y degeneración de los folículos (Hirshfiel 1991). De hecho hay algunas coincidencias que han hecho suponer que al menos en folículos preovulatorios, la ovulación y la atresia siguen un patrón de desarrollo similar aunque con finales diferentes.

En cada una de las 5 etapas del desarrollo folicular puede ocurrir el proceso degenerativo de la atresia. Sin embargo en varias especies se conoce que el porcentaje de folículos atrésicos se incrementa en la medida que aumenta el tamaño de los folículos, de manera que cuando los folículos llegan a ser antrales, una alta proporción de ellos son atrésicos. En la rata, el 70% de los folículos antrales son atrésicos; en el ratón el 50%; en la coneja, 60%, en el humano entre el 50 y el 75%, en la cerda el 73% de los folículos medianos (3-5 mm) y el 84% de los grandes (6-12 mm) son atrésicos (Jones 1956).

Aunque no son claras las razones fundamentales que llevan a la muerte masiva de las células somáticas y germinales que constituyen los folículos ováricos, posiblemente este proceso de eliminación represente una ventaja evolutiva, de manera que se seleccionen para la ovulación, sólo los ovocitos que puedan asegurar que la fertilización terminará con la producción de un nuevo ser capaz de mantener el desarrollo de la especie. De manera general podría afirmarse que, a través de mecanismos completamente diferentes pero que requieren el aparente desperdicio de la gran mayoría de las gametas producidas, el proceso evolutivo funciona, tanto en el macho como en la hembra, para seleccionar sólo aquellas gametas que aseguren de la mejor manera posible, la supervivencia de la especie.

El mecanismo de selección de los folículos durante el ciclo estral normal, depende de su exposición a la hormona folículo estimulante (FSH), lo cual debe acontecer durante un estadio crítico del desarrollo. Folículos que reciben un aporte insuficiente de FSH durante el período crítico son destinados a la degeneración atrésica. El hecho que los folículos atrésicos en estadios avanzados del desarrollo posean una actividad esteroideogénica sustancial, permite suponer que el proceso

de atresia pueda servir, además, como un mecanismo de eliminación endócrino intraovárico (Hsueh et al., 1994).

En la atresia se han identificado diversos procesos anatomo-fisiológicos y bioquímicos que participan en el proceso, entre ellas se incluye, desprendimiento y degeneración de las células de la granulosa (Hay et al., 1976), presencia de células con núcleos picnóticos en la granulosa (Hay et al., 1976), fragmentación de la lámina basal (Bagavandoss et al., 1983), la reducción en la síntesis de DNA por las células de la granulosa (Greenwald 1989), la supresión del acoplamiento metabólico por la pérdida de las uniones comunicantes (Wiensen y Midgley 1993), una disminución en la capacidad de fijación de gonadotropinas (Carson et. al. 1979), así como la disminución de la síntesis y expresión de los RNAm correspondientes a las aromatasas y a los receptores para gonadotropinas (Tilly et. al., 1992).

A nivel enzimático, además de las modificaciones en la presencia y actividad de las aromatasas, se ha demostrado la participación de enzimas lisosomales (Quirk et al., 1995; Rosales et al 2000) y enzimas con actividad proteolítica y antiproteolítica en el desarrollo de la atresia (Rosales, et al 1990), así como la de aquellas enzimas involucradas en la remodelación tisular, como colagenasas, gelatinasas, Pz-peptidasas y del activador del plasminógeno (Meinecke et al., 1982).

También se ha encontrado que durante la atresia folicular se incrementa la expresión de varios genes, entre ellos el de las proteínas que unen al Factor de Crecimiento Insulinoide (IGFBPs) (Murdoch, 1992), el de la glicoproteína-2-sulfatada, también conocida como TRPM-2 (Kaynard et al., 1992), el de una aspartil endopeptidasa lisosomal, la catepsina-D, y el del receptor para la angiotensina II (Daud et al., 1989).

Por lo menos tres modelos teóricos pueden ser propuestos (Hsueh et al., 1994) para explicar como se determina el destino de los folículos, el cual en la mayoría de los casos es la atresia.

- ❖ Los folículos que sufren atresia pueden estar predeterminados por deficiencias inherentes al ovocito, las células foliculares o por su ambiente inmediato. Como la mayoría de los folículos son capaces de crecer bajo apropiada estimulación hormonal, este mecanismo no parece ser la base para la atresia de la mayoría de los folículos.
- ❖ La mayoría, si no es que todos los folículos son capaces de llegar a la ovulación a menos que la atresia se dispare por estímulos atresiogénicos

- ❖ El destino final de todos los folículos es la atresia. Sólo los folículos que alcanzan un estado específico de desarrollo que coincida con señales hormonales críticas, son dispensados de la atresia

Existen diversas teorías que tratan de explicar las causas de la atresia (Rosado y Rosales 1991). Un evento fundamental que ocurre en la atresia es la muerte de las células que conforman el folículo. Hace algunos años se postulaba que la atresia era el resultado de las limitaciones en el aporte de nutrientes y sustratos por una reducción de la suplementación sanguínea (Greenwald, 1989; Hay et al., 1976) inducida por el rápido crecimiento del folículo. Desde este punto de vista, era posible admitir que el proceso principal por el cual se iniciaba la muerte celular durante el proceso de atresia se debía fundamentalmente a la liberación de enzimas lisosomales y la producción de necrosis celular. Sin embargo, la determinación del gasto sanguíneo del folículo, realizada mediante el uso de esferas radiactivas, no mostró diferencias significativas entre el gasto sanguíneo del folículo normal y el del folículo en las etapas tempranas de atresia (Bruce y Moor, 1976).

Uno de los avances más importantes en el entendimiento de la atresia folicular, ha sido la demostración de la participación de la apoptosis como principal tipo de muerte de las células de la granulosa (Tilly et. al., 1991, Tilly et. al., 1992). Aunque hay evidencias que sostienen la participación de más de un tipo de muerte celular en el proceso de la atresia folicular (Rosales et al 2000). Con frecuencia la intensidad del mismo estímulo, decide si es la apoptosis o la necrosis la que prevalece (Bonfoco et al., 1995; Dypbukt et al., 1994).

La apoptosis es un proceso activo, inducido por factores reguladores generalmente extrínsecos a la célula misma, gobernado por un programa genético intrínseco de muerte, que afecta a las células simples dispersas y se caracteriza por el encogimiento de la célula, condensación de la cromatina, y la formación de pequeños pedazos esféricos de membrana que contienen fragmentos nucleares, referidas como cuerpos apoptóticos (Rosales 1998). La característica fundamental de la apoptosis es la activación de una endonucleasa, dependiente de Ca^{2+} y Mg^{2+} , la cual rompe el DNA de manera específica en el espacio internucleosomal produciendo fragmentos de 180-200 pares de bases o sus múltiplos (Hsueh et al., 1996). Las células que mueren por apoptosis son fagocitadas rápidamente por las células vecinas, ya que la fagocitosis ocurre antes de que se pierda la integridad de la membrana, de tal manera que tampoco hay componentes citoplásmicos en el espacio intercelular que produzcan una reacción inflamatoria (Hsueh et al., 1994).

Hasta hace algunos años, se pensaba que la mayoría de las células que sufrían apoptosis no tenían actividad proliferativa y por lo tanto permanecían en la fase G0 del ciclo celular (Schwartz y Osborne, 1993). Los primeros histogramas obtenidos de los estudios de las células apoptóticas por citometría de flujo evidenciaron que estas células formaban una región que se diferenciaba de las

células diploides localizadas en la región G0/G1, por su menor contenido de DNA y le llamaron pico hipodiploide o Ao (Nakatani et al., 1992).

El proceso de la apoptosis ha sido subdividido en 3 fases diferentes: inductora, efectora y de degradación (Kroemer 1995; Thompson 1995).

Fase de inducción de la apoptosis: Durante la fase de iniciación o de inducción, las células reciben el estímulo de muerte, la naturaleza de los estímulos depende de la célula que se trate, algunos inductores de muerte pueden ser por ejemplo: la falta en el medio de factores de crecimiento obligados así como la unión de los receptores membranales los cuales contienen los determinantes de muerte; a sus ligandos (Fas/Apo-1/CD95 y los receptores del Factor de Necrosis Tumoral TNF) (Thompson, 1995).

Fase efectora de la apoptosis: Esta fase, igual que la de degradación, parece ser similar en todos los tipos de células. En trabajos posteriores se ha postulado la existencia de un "ejecutor central" (Kroemer et al., 1995) también llamado "máquina de muerte" (Martin y Green 1995). Investigaciones realizadas en los últimos años parecen indicar que la mitocondria juega un papel decisivo en esta fase efectora de la muerte celular. En este proceso también participan de manera muy importante las caspasa (Martin y Green 1995).

Fase de degradación de la apoptosis: La fase de degradación es similar en todos los tipos celulares, esta etapa se caracteriza por la participación de enzimas catabólicas, especialmente de caspasas (**C**ytosolic **A**spartate-**S**pecific **P**rote**ASES**) y endonucleasas, cuya actividad hidrolítica induce una serie de alteraciones ultraestructurales que contribuyen a que la célula cometa suicidio. Los cambios estructurales que presentan la mayoría de las células en esta fase del proceso se observan principalmente a nivel de cromatina y del núcleo (Martin y Green 1995)

La primera caspasa que se describió fue la caspasa-1 o ICE (del Inglés, **I**nterleukin-1 β -**C**onverting **E**nzyme), homóloga en mamíferos de la proteína CED-3 de *Caenorhabditis elegans* (Ellis 1991), producto del gen *ced-3*, necesario para la muerte celular programada en este nemátodo. Se conocen actualmente 13 caspasas en mamíferos. De ellas, 6 se relacionan preferentemente con procesos inflamatorios y no con procesos de muerte celular, aunque todas comparten semejanzas en cuanto a secuencia proteica, estructura y especificidad de sustrato (Ellis et al., 1991)

Las caspasas son sintetizadas como proenzimas inactivas, denominados procaspasas, que, una vez activados por proteólisis limitada y asociación de subunidades, adquieren la actividad catalítica para proteolisar a su vez a sus sustratos tras un residuo de aspártico. Reconocen, sin embargo, diferentes motivos tetrapeptídicos, lo cual les confiere cierta especificidad de sustrato. Las caspasas inactivas pueden ser sustrato a su vez de las activas, de manera que

unas caspasas activan a otras siguiendo un orden jerárquico y una actuación en cascada (Ellis et al., 1991).

Las caspasas que participan en la apoptosis pueden dividirse en dos grandes grupos: caspasas iniciadoras (8, 9, 2 y 10), que se activan en respuesta a señales apoptóticas y activan a las caspasas efectoras (3, 6 y 7), las cuales proteolisan sustratos celulares provocando la desorganización de la célula y los cambios morfológicos típicos de la apoptosis. Además, parece existir especificidad de tejido en cuanto a la caspasa requerida para el proceso apoptótico. Se conocen unos 40 sustratos celulares para las caspasas. Entre estos se encuentran proteínas que inhiben la muerte celular, como Bcl-2 (Cheng et al, 1997), proteínas que participan en la reparación del DNA o en la organización de la cromatina (PCNA, p53) y proteínas implicadas en la regulación del citoesqueleto (Lazebnik 1994)

Reguladores intracelulares

Los principales reguladores intracelulares de la apoptosis son la familia de proteínas relacionadas con Bcl-2, proteína de mamíferos homóloga estructural y funcionalmente a la proteína CED-9, esencial para la prevención de la apoptosis en *C. elegans*. La familia de Bcl-2 en mamíferos está constituida hasta el momento por 15 miembros (Xiang 1996) y todos ellos presentan al menos uno de los cuatro dominios conservados de homología a Bcl-2 (BH1 a BH4). Algunos miembros de la familia inhiben la muerte celular (Bcl-2, Bcl-X_L) y otros la activan (Bax, Bad, Bid). Puesto que ambos tipos pueden heterodimerizar, sus concentraciones relativas pueden regular el balance entre muerte y supervivencia. Muchas de estas proteínas presentan un dominio c-terminal hidrofóbico que les permite anclarse a la cara citoplasmática de las membranas de la mitocondria, o al retículo endoplásmico, de forma que pueden registrar daños en dichos organelos (Xiang 1996).

Papel de las mitocondrias en la muerte celular

La permeabilidad transitoria de la mitocondria (PTM) es un evento crítico en la apoptosis y la necrosis, en ambos tipos de muerte la iniciación del mecanismo de PTM podría ocupar el primer paso del suceso y los resultados de la PTM ó segundo paso, pueden delimitar el modo o tipo de muerte celular. Las consecuencias de PTM son suficientes por sí mismas para ocasionar la muerte celular: por el desacoplamiento que produce en la fosforilación oxidativa y un mayor desorden en la regulación del potencial redox con un incremento en la generación de aniones superóxido (Vayssiere et al., 1994; Zanzami et al., 1995). Además la PTM es acompañada por la liberación de moléculas intermembranales de la mitocondria, que pueden ser tóxicas para las células (Zanzami, et al., 1996).

La mitocondria, parece significar el eje central de decisión del control de la vida y la muerte, tanto por la importancia intrínseca de su funcionamiento, como por la liberación citosólica de factores que promueven la muerte celular. Uno de

estos factores trascendentales es el citocromo *C*, una proteína que normalmente sirve de puente de electrones en el complejo protéico de la membrana mitocondrial interna. Una vez liberado, el citocromo *C*, ayuda a activar la familia de proteasas asesinas "caspasas". La liberación del citocromo *C* de la mitocondria es controlada por la familia Bcl-2. Así el citocromo *C* liberado por la mitocondria que sufre PTM puede ayudar a la activación de la proteasa CPP32/Yama/apopain con la ayuda de otros factores aun no conocidos e inducir apoptosis (Liu et al., 1996).

También se ha reportado que durante la traducción de una señal de muerte celular apoptótica en la célula hay una alteración en la permeabilidad de las membranas de la mitocondria, que causa la translocación de proteínas apoptogénicas como el citocromo *C* en el citoplasma, que activa las proteínas proteolíticas que dirigen la muerte celular como las caspasas. La familia Bcl-2, regulan la muerte celular por control de la permeabilidad mitocondrial durante la apoptosis. Se han establecido modelos con liposomas que llevan los canales de porina mitocondrial; que muestran que las proteínas pro-apoptóticas Bax y Bak aceleran la apertura del canal, permitiendo al citocromo *c* pasar a través del canal fuera de los liposomas; mientras que las proteínas anti-apoptóticas Bcl-_{XL} lo cierran por unión directa a bax y bak. De esta forma se ha demostrado que los cambios dependientes de bax y bak, acarrear la pérdida del potencial transmembranal de la mitocondria ($\Delta\psi$) y la liberación de citocromo *C*, que son mediadas por canales de poliproteínas llamados poros de permeabilidad de transición (PT), que incluye VDAC, ciclofilina D y al translocador de adenina nucleótido (ANT). El VDAC es una proteína abundante en la membrana microtondrial externa que forma un gran poro dependiente de voltaje en la bicapa lipídica y actúa como un mecanismo de regulación del movimiento de sustancias a través de la membrana de la mitocondria. Bax y Bak interactúan con el poro de PT en forma activa, bax se une a ANT y pueden formar poros por asociación de ANT y PT en liposomas (Shimizu, et al., 1999). Existen dos modelos que tratan de explicar como se lleva acabo la liberación de citocromo *c* de la mitocondria.

- ❖ **Apertura de un megacanal o poro de permeabilidad transitoria (PTP) seguida de la entrada de solutos y agua.** La mitocondria se hincha, se produce la ruptura de la membrana externa y se produce la liberación de citocromo *C*. El PTP parece consistir de proteínas provenientes de la membrana interna mitocondrial (incluyendo el translocador de adenin nucleotidos de ANT y de la membrana externa (VSAC). Estas proteínas cooperan a través de sitios donde las dos membranas mitocondriales se oponen, para formar grandes canales de conducción que permiten el paso de moléculas con una masa molecular relativa (Mr) de por los menos 1500.
- ❖ **Modelo sin cambios en la membrana mitocondrial externa.** Este segundo modelo, pronostica la formación de canales lo suficientemente grandes como para permitir el paso de citocromo *C*. Este modelo está mejor asociado con la ausencia de cambios morfológicos mitocondriales, dado que el citocromo *C* es poco flexible, debido a su grupo prostético, el

diámetro de los canales debe ser necesariamente más grande que el citocromo *C* (alrededor de 3 nm).

La capacidad de algunos miembros de la familia de Bcl-2- para formar canales de iones artificiales en la membrana lipídica, junto con el hecho de que bax y bak desencadenan la liberación de citocromo *C* cuando se adicionan directamente a la mitocondria, han permitido relacionar el papel de Bax y Bak, en la formación de canales (Shimizu et al., 1999).

Algunos autores (Martinou, 1994), sugieren que Bcl-x₁ estimula que se cierren los canales VDAC en liposomas,, mientras que Bax y Bak, facilita su apertura. Sin embargo, Bax y Bak, permite el paso de citocromo *C* para pasar a través de VDAC. Esto está soportado porque el diámetro de VDAC es normalmente pequeño para permitir el paso de citocromo *C*. Shimizu et al., (1999), proponen que después de que VDAC interactúa con Bax y Bak sufren cambios conformaciones, esto permite a VDAC- posiblemente en combinación con Bax o bak- formar un megacanal que permita al citocromo *C* atravesar la membrana. Otra función de VDAC, es la concerniente a ANT, la relación ATP/ADP -que es lo que permite que el ATP se mueva fuera de la mitocondria y ADP se mueva hacia dentro-, se ha demostrado que un evento temprano en la apoptosis (antes de la liberación de citocromo *c*) es un defecto en el intercambio mitocondrial de ATP/ADP. Por lo que durante la apoptosis, el ANT o VAC (o ambos) fallan en el transporte de adenin nucleótidos. (VanderHeiden et al., 1999).

HIPEROVULACIÓN

Con el propósito de elevar la capacidad reproductiva tanto de animales domésticos como de animales de experimentación se han desarrollado diversas metodologías conocidas como **técnicas de reproducción asistida** (TRA). Estas tecnologías no solo han facilitado la difusión genética de animales más productivos, sino que también han permitido de una forma relativamente sencilla, el movimiento de material genético alrededor del mundo, han contribuido a la conservación de especies y subespecies en peligro de extinción y han permitido a los productores la obtención de híbridos altamente interesantes desde el punto de vista productivo. De todas las técnicas de reproducción asistida existentes la más ampliamente difundida ha sido la Inseminación Artificial (IA), seguida de la hiperoovulación y complementada con la Transferencia de Embriones (TE) y la Fecundación *in vitro* (FIV). Sin embargo, las diferencias en la fisiología reproductiva entre especies han resultado a menudo un obstáculo para la aplicación exitosa de las técnicas de reproducción asistida, lo que hace necesario el desarrollo de profundos estudios para adecuar dichas técnicas, sobre todo aquellos que tienen que ver con la estimulación de la actividad ovárica (Owen et al 2001)

En la mayoría de los mamíferos entre el 70 y el 99 % de los folículos ováricos son eliminados antes de alcanzar la ovulación debido a la atresia (Rosales 1998). Con el fin de aprovechar mejor la dotación folicular y elevar la capacidad reproductiva de los animales se ha desarrollado una técnica que permite la estimulación de la actividad ovárica favoreciendo el crecimiento y desarrollo folicular llamada hiperoovulación (Adams 1960; Beaumont y Smith, 1975; Armstrong y Evans 1983;); la cual puede definirse como un aumento en el número de ovocitos que son liberados en un ciclo estral, cuando dicho número se compara con el número normal en cada ciclo evolutivo (Wassarman y albertin, 1994). Esta hiperrespuesta puede inducirse en el animal por administración exógena de gonadotropinas. Esta técnica es de uso común y muy importante ya que además de cumplir con el propósito de aumentar el número de descendientes por individuo, ha permitido conocer mas sobre los mecanismos de crecimiento, desarrollo, maduración folicular y funcionamiento del ovocito, lo que ha favorecido la aplicación de programas de reproducción asistida en humanos y animales.

Para inducir la hiperoovulación se han utilizado diferentes tipos de hormonas como: la hormona folículo estimulante (FSH), luteinizante (LH), gonadotropina coriónica humana (hCG), la gonadotropina corionica equina (eCG) y algunos otros compuestos como el citrato de clomifeno (tabla 1) (Jones 1984; Greenwald 1994).

El uso de gonadotropinas hipofisiarias puras (FSH, LH) es sin duda la mejor opción, sin embargo, tienen el inconveniente de los altos costos y que si no son homólogas producen una reacción inmunológica de memoria que provoca que cada vez que se utiliza, se tenga que incrementar la dosis (Wassarman y albertin, 1994). La inducción de una respuesta hiperovulatoria con GnRH y la gonadotropina coriónica humana (hCG) han sido dos prácticas muy comunes en

los últimos años, a pesar de su alto costo. El citrato de clomifeno es un compuesto derivado del tri-fenil-etileno, aunque no es un esteroide se le ha relacionado desde el punto de vista químico como un producto con propiedades estrogénicas y aunque no se ha aclarado su mecanismo y sitio de acción se ha sugerido que el citrato de clomifeno, al igual que el GnRh, provoca un aumento en la liberación de FSH y LH a nivel central mientras que a nivel periférico actúa también sobre los receptores estrogénicos de las células de la granulosa (Jones 1984)

1. Administración de gonadotropina coriónica equina (eCG) a animales domésticos y de laboratorio.
2. eCG
3. eCG / anti-eCG
4. Hormona estimulante del folículo y hormona luteinizante (FSH y LH)
5. Citrato de clomifeno
6. Administración pulsátil del factor liberador de gonadotropinas (GnRH)
7. GnRH / Anti-GnRH
8. Gonadotropina coriónica humana (hCG)

Tabla 1: Métodos utilizados para inducir la hiperovulación (Greenwald 1994).

La eCG es una hormona no hipofisiaria, producida por las vellosidades coriónicas, formada por las células trofoblásticas, presentes en la yegua gestante en el momento de la implantación por lo que se le considera de origen fetal. Esta gonadotropina tiene un alto contenido de ácido siálico (13%) que le confiere una vida media larga (aprox. 70 h comparadas con la vida media de la FSH que es solo de 2 h). Su actividad es parecida a la FSH y en menor porción a la de LH (Armstrong y Evans 1983).

Dos características principales de la eCG son las que contribuyen a su eficiencia para estimular eficazmente el crecimiento folicular: 1) su larga vida biológica, atribuible a su alto contenido de ácido siálico, 2) su capacidad para aumentar la actividad del complejo enzimático encargado de escindir la cadena lateral del colesterol, la colesterol esterasa y del citocromo P₄₅₀, cuando se inyecta a ratas inmaduras (Leaver y Boyd, 1981, Mukumoto et al 1995), al hámster (Matson et. al., 1981) y otras especies domésticas.

Algunos autores (Tsafriri y Braw 1984) han postulado dos mecanismos alternos a través de los cuales el tratamiento hormonal aumenta en el número de folículos que se desarrollan durante la hiperovulación:

- 1) El tratamiento hormonal actúa sobre el grupo de folículos sanos pequeños (en reserva) que no forman parte del grupo ovulatorio del ciclo actual, por ser muy inmaduros y pequeños, y tampoco contribuyen al ciclo subsiguiente, por que para entonces se encontrarían en un estado de desarrollo muy avanzado para ser retenidos 4 días más. En ausencia de gonadotropinas estos folículos estarían destinados a degenerar, en este sentido el tratamiento hormonal induciría el crecimiento de estos folículos a través de la proliferación celular

impidiéndoles la entrada al proceso de atresia folicular al cual estarían destinados originalmente

- 2) La otra alternativa es que el tratamiento hormonal actúe sobre los folículos del grupo que ya empezó a degenerar. En este caso el tratamiento hormonal intervendría revertiendo o deteniendo el proceso de degeneración y regresando los folículos a la vía ovulatoria. Dicho de otra manera la eCG puede impedir la atresia folicular a través del control de la muerte celular

Algunas investigaciones realizadas en bovinos apoyan la idea del reclutamiento folicular y concluyen que el aumento en el número de folículos preantrales y antrales tempranos después del tratamiento hormonal (eCG) se debe principalmente al reclutamiento de un mayor número de folículos, más que a una disminución de la atresia (Monniaux 1984). Algunos autores fundamentan estas teorías al demostrar que cuando se cultivan los folículos primordiales son incubado con eCG el índice mitótico de las células de la granulosa aumenta (Monniaux 1984)

También se ha demostrado que los folículos ovinos atrésicos experimentan regeneración morfológica cuando se cultivan con gonadotropinas. En ausencia de eCG todos los folículos en crecimiento excepto 1 o 2 destinados a ovular se vuelven atrésicos. El aumento en el número de folículos grandes después del tratamiento con eCG se lleva a cabo por el reclutamiento y/o la reducción de atresia. Cuando en cuerpos lúteos recientes se encuentran presentes abundantes células picnóticas, se considera que estos cuerpos lúteos pertenecen a folículos que fueron rescatados de estados tempranos de atresia (Monniaux 1984)

No obstante las ventajas que se pueden obtener con la hiperovulación al contar con un número mayor de ovocitos; la variabilidad en la respuesta a los tratamientos para estimular la ovulación cualitativa y cuantitativa es un factor limitante para el desarrollo de otras prácticas como la transferencia de embriones en el ganado. Por otro lado la exposición continua a eCG puede provocar choques anafilácticos, motivo por el cual es necesaria la neutralización del efecto de eCG con la utilización de anticuerpos monoclonales para disminuir el. Además algunos estudios parecen indicar que dosis hiperovulatorias de hormonas provocan daños en la capacidad de los ovocitos para ser fecundados normalmente, lo que se refleja en una disminución en el número de ovocitos fertilizados (Walton et. al. 1983; Ma 1997) También se han mencionado fracasos en la implantación (Miller y Armstrong, 1981; Armstrong y Evans, 1983) y la inducción de una frecuencia alta de anomalías en embriones recuperados en animales domésticos (Adams, 1960; Beaumont y Smith, 1975; Miller y Armstrong, 1981; Armstrong y Evans, 1983;) y de laboratorio (Yun et. al., 1988; Dieleman et al 2001).

La disminución en la fecundidad se relaciona directamente con las dosis de gonadotropinas que se administran. La administración de dosis consideradas como fisiológicas de eCG (4-8 UI) a ratas prepúberes producen ovocitos que al ser fecundados son capaces de desarrollarse normalmente sin que haya pérdidas embrionarias o fetales significativas, sin embargo se han observado anomalías embrionarias sobre todo al principio de la gestación (Miller and Armstrong, 1981), con dosis de 20 UI, las cuales se acentúan con dosis mayores de 40 UI (Yun et al 1987). Sin embargo aun no se ha demostrado si estas alteraciones son resultado de modificaciones en la maduración del ovocito que ocurren antes o después de la ovulación (Millar y Armstrong 1981; Yun et al 1987;).

Una dosis fisiológica de eCG (4-8 UI) estimula el crecimiento y la ovulación de ovocitos semejante al que se obtiene en un ciclo normal (12-15 ovocitos por rata) produciendo una gestación normal (Miller y Armstrong 1981., Baños et al 1996). En contraste dosis altas de eCG (16-40 UI) inducen una falla continua en los estadios tempranos de la gestación (Yun et al 1987).

En estudios con dosis de 16 UI de eCG se produjo una ovulación normal pero la implantación se retardó en el 30% de los animales, lo cual produjo una disminución en el número de animales que llevó su gestación a término. Cuando se administraron 40 UI de eCG, los ovocitos ovulados fueron inmaduros y con menos células en el cumulus que los ovocitos normales. Además estos ovocitos a pesar de ser fertilizados fueron incapaces de llevar a cabo la implantación (Champlin et al 1987)

Como una de las posibles causas de anomalías embrionarias se menciona las de origen cromosómico. En el humano se han observado un aumento significativo en el número de trisomías en los fetos abortados de mujeres a quienes se les había inducido hiperovulación en comparación con mujeres no tratadas. En ratonas el tratamiento con gonadotropinas produjo un aumento significativo en el número de fetos deformes. Posiblemente esto sea causado por una condensación prematura de la cromatina, contracción del citoplasma, fragmentación y partenogénesis en los ovocitos, sin que se produzcan otros cambios importantes para la maduración de estos, como es el rompimiento de la vesícula germinal. Sin embargo el mecanismo por el cual se producen los daños foliculares o embrionarios aun no es claro (Kumar et. al., 1997).

PLANTEAMIENTO DEL PROBLEMA

Con el propósito de elevar la capacidad reproductiva tanto de animales domésticos como de animales de experimentación se han desarrollado diversas técnicas entre la que se encuentra la hiperovulación con la cual se ocasiona la estimulación de la actividad ovárica (crecimiento y desarrollo folicular) y la ovulación de un número mayor al normal de ovocitos en cada ovulación.

No obstante las ventajas que se pueden obtener con la hiperovulación al contar con un número mayor de ovocitos, la vía por la cual se estimula el aumento en el número de ovocitos producidos en una ovulación así como los efectos colaterales sobre la calidad de los ovocitos y embriones producto de este tipo de tratamientos aun no está completamente esclarecido. Algunos estudios parecen indicar que dosis hiperovulatorias de hormonas provocan daños en la capacidad de los ovocitos para ser fecundados normalmente, lo que se refleja en una disminución en el número de ovocitos fertilizados (Walton et. al., 1983). También se han mencionado fracasos en la implantación (Armstrong y Evans, 1983; Miller y Armstrong, 1981) y la inducción de una frecuencia alta de anomalías en embriones recuperados (Miller y Armstrong, 1981; Yun et. al., 1988) tanto en animales domésticos (Armstrong y Evans, 1983), como de laboratorio (Adams, 1960; Beaumont y Smith, 1975). Posiblemente esto sea causado por una condensación prematura de la cromatina de los ovocitos, sin que se produzcan otros cambios importantes para la maduración de estos, como es el rompimiento de la vesícula germinal (Kumar et. al. 1992).

Hasta el momento el mecanismo por el cual las gonadotropinas producen un efecto hiperovulatorio tampoco está completamente claro. La literatura sugiere que el aumento en el número de folículos que forman parte del grupo ovulatorio en respuesta a los tratamientos hiperovulatorios con gonadotropinas puede deberse a dos mecanismos: 1) Estos folículos pueden provenir del grupo de folículos sanos pequeños (en reserva) que no forman parte del grupo ovulatorio del ciclo actual, por ser muy inmaduros y pequeños, y tampoco contribuyen al ciclo subsiguiente, porque para entonces se encontrarían en un estado de desarrollo muy avanzado, en este sentido las gonadotropinas inducirían el crecimiento de estos folículos a través de la proliferación celular impidiéndoles la entrada al proceso de atresia folicular al cual estarían destinados originalmente; y 2) Puesto que estudios recientes sugieren que un factor determinante en la iniciación y progreso del fenómeno de atresia folicular depende de la muerte por apoptosis de las células de la granulosa, es también posible postular que las gonadotropinas actúen impidiendo la atresia folicular a través del control de la muerte celular, revirtiendo o deteniendo el proceso de degeneración y regresando los folículos a la vía ovulatoria. En ambos mecanismos cabe la posibilidad de que los folículos fisiológicamente destinados a experimentar el fenómeno de atresia, sean rescatados en fases iniciales de este proceso y lleguen a ser ovulados, sin embargo esto no garantiza que los ovocitos liberados tengan la capacidad para ser fecundados y desarrollarse en embriones sanos.

La comprensión de los procesos involucrados en la actividad ovárica, especialmente el crecimiento, desarrollo y atresia folicular, ayudará al esclarecimiento de la vía por la cual las hormonas folículo estimulante en dosis hiperovulatorias aumentan en el número de folículos producidos durante una ovulación.

Es este trabajo se observó el efecto que tienen 2 diferentes dosis hiperovulatorias de eCG (20 y 40 UI) y tres tiempos de exposición (52, 58 y 70 h), sobre la proliferación celular de las células de la granulosa el desarrollo folicular en ratas prepúberes de la cepa *Wistar*. Posteriormente se analizaron los índices de proliferación celular y de control de la muerte en las células de la granulosa de folículos preovulatorios con la finalidad de contribuir a conocer los mecanismos por los cuales las gonadotropinas producen el crecimiento y desarrollo de un gran número de folículos cuando estas se usan en dosis por encima de lo fisiológico

OBJETIVOS E HIPÓTESIS

OBJETIVO GENERAL.

Analizar el efecto de dos diferentes dosis hiperovulatorias de eCG y el tiempo de exposición a esta hormona sobre la proliferación (PCNA) y muerte de las células de la granulosa en los folículos de los ovarios tratados.

OBJETIVOS PARTICULARES.

1. Analizar el efecto del tratamiento de ratas con eCG sobre el índice de proliferación celular.
2. Determinar el control que ejerce la eCG sobre la muerte de las células de la granulosa.

HIPÓTESIS

La dosis de eCG y el tiempo de exposición a esta hormona tienen impacto sobre el patrón de inhibición de la muerte apoptótica que presentan las células de la granulosa de los folículos ováricos de la rata.

MATERIAL Y MÉTODOS.

Obtención de muestras.

Se utilizaron 54 ratas hembras prepúberes de la raza Wistar de 27 días de edad con un peso de 70 a 80 gramos, las cuales se mantuvieron a un régimen de 12 horas luz y 12 oscuridad, a una temperatura de 20 a 25°C. A los animales se les proporcionó un alimento comercial de Purina y agua *ad libitum*. Se les administró 4, 20 y 40 UI de eCG (Folligon, Intervet Internacional México), por vía subcutánea de acuerdo al siguiente esquema:

Dosis	Numero de animales por lote		
	Grupo 1 52 h	Grupo 2 58 h	Grupo 3 70 h
Grupo A : 4 UI ⁺	6	6	6
Grupo B: 20 UI ⁺⁺	6	6	6
Grupo C: 40 UI ⁺⁺⁺	6	6	6
Total = 18 por dosis			

⁺ Dosis considerada como fisiológica (grupo control) por Yun et al, 1987 y Baños et al 1996

⁺⁺ Dosis considerada como hiperovulatoria media por Greenwald and Roy 1994

⁺⁺⁺ Dosis considerada como hiperovulatoria alta por Greenwald and Roy 1994

En investigaciones realizados por Yun y colaboradores en 1987 y validados por nuestro grupo de investigación se ha podido constatar que la ovulación en la rata ocurre en tres tiempos post-tratamiento con eCG: 54, 60 y 72 horas, por lo que en este estudio las ratas fueron sacrificadas por dislocación cervical 2 horas antes de los tiempos de ovulación, es decir 52, 58 y 70 horas postratamiento, con el fin de tener la certeza que los folículos antrales de más de 500 μ m que observamos son folículos preovulatorios. Posteriormente se procedió a perfundir el cuerpo por vía intracardiaca haciendo uso de 10 ml de formol al 10% en PBS (0.1m y pH 7.4). Los ovarios de cada animal se disecaron y fijaron en formol al 10%. Posteriormente se embebieron con parafina para proceder a realizar los cortes histológicos (4-6 μ) en tres diferentes niveles del tejido ; las dos caras longitudinales del ovario y la parte central con una distancia de 400 μ m entre cada uno. De cada ovario /dosis /tiempo se tuvieron tres resultados de la expresión de PCNA y Bcl-2 por inmunohistoquímica.

EXPRESIÓN DE PCNA POR INMUNOHISTOQUÍMICA

Para la inmunolocalización del antígeno nuclear de proliferación celular (PCNA) como un índice de proliferación celular (Harrison RF et al., 1993) se utilizó un estuche comercial de los laboratorios Zymed (PCNA staining kit) con número de catalogo 93-1143.

PCNA staining kit

- ❖ Solución bloqueadora
- ❖ Anticuerpo biotinilado de ratón anti-PCNA
- ❖ estreptovidina marcada con peroxidasa de rabano
- ❖ Mezcla DAB (tetracloruro de diaminobenzidina)
- ❖ Hematoxilina

Procedimiento de trabajo

1. Los cortes fueron desparafinados en dos cambios de xileno por 5 minutos cada uno y rehidratados en serie de alcoholes (100, 70, 50, 30 y 10 %).
2. La actividad de la peroxidasa endógena se bloqueó con 50 µl de H₂O₂ al 3% en metanol por 10 minutos.
3. Se lavaron los cortes en tres cambios de PBS durante 2 minutos cada uno.
4. Se aplicó 50 µl de solución bloqueadora para cubrir el corte y se Incubó 10 min a temperatura ambiente, con el fin de eliminar las reacciones inespecificas.
5. Se drenó la solución y se aplicaron 25 µl del anticuerpo biotinilado de ratón anti-PCNA para cubrir el corte y se incubo 30-60 min a temperatura ambiente.
6. 3 lavados con PBS durante 2 min
7. Se aplicaron 25 µl de estreptavidina marcada con peroxidasa para cubrir el corte e incube 10 min a temperatura ambiente.
8. Se lavó tres veces con PBS durante 2 min
9. Se aplicaron 25 µl de mezcla DAB para cubrir el corte. Se incubó 2-5 min y se lavo con agua destilada
10. Para la coloración de contraste se adiciono 50 µl de Hematoxilina hasta cubrir el corte durante 1-2 min, el corte se lavo en agua destilada. Se coloco el tejido en PBS hasta que las secciones tomaron una coloración azul (aprox 30 seg).
11. Se Deshidrataron los cortes en una serie de alcoholes, se aclaro en dos cambios de xileno y se monto para el análisis en el microscopio

INMUNODETECCIÓN DE Bcl-2

Para la inmunolocalización de la proteína anti-apoptótica Bcl-2 se utilizó un estuche comercial de laboratorios St. Cruz Biotechnology Inc. (Bcl-2 rat igG2c) con número de catálogo SC-578.

Bcl-2 rat igG2c

- ❖ Solución bloqueadora
- ❖ Anticuerpo primario anti-bcl2
- ❖ Anticuerpo secundario biotinilado
- ❖ estreptovidina marcada con peroxidasa de rabano
- ❖ Mezcla DAB (tetracloruro de diaminobenzidina)
- ❖ Hematoxilina

Procedimiento de trabajo

1. Los cortes fueron desparafinados en dos cambios de xileno por 5 minutos cada uno y rehidratados en serie de alcoholes (100, 70, 50, 30 y 10 %).
2. La actividad de la peroxidasa endógena se bloqueo con 50 µl de H₂O₂ al 3 % en metanol por 10 minutos y se lavaron los cortes en tres cambios de PBS durante 2 minutos cada uno.
3. Se aplicaron 25 µl de solución bloqueadora y se incubó 10 min a temperatura ambiente, con el fin de eliminar las reacciones inespecíficas.
4. Se drenó la solución y se aplicó 25 µl de anticuerpo primario anti Bcl-2 para cubrir el corte e incubó a 4°C durante toda la noche.
5. Se incubó con 25 µl del anticuerpo secundario biotinilado durante 30 min y se lavó 3 veces con PBS durante 2 min
6. Se aplicaron 25 µl de streptavidin preoxidasa para cubrir el corte y se incubó 10 min a temperatura ambiente y se enjuagó con PBS tres veces durante 2 min
7. Se aplicaron 25 µl de DAB mixture para cubrir el corte y se incubó 30 seg y se lavó con agua destilada
8. Para la coloración de contraste se adicionaron 50 µl de Hematoxilina hasta cubrir el corte 1-2 min, el corte se lavó en agua destilada. El tejido se colocó en PBS hasta que las secciones se tiñeron de color azul (aprox 30 seg).
9. Se deshidrataron los cortes en una serie de alcoholes, se aclaró en dos cambios de xileno y se montó para el análisis en el microscopio

ANALISIS ESTADISTICO

Después de haber efectuado las pruebas inmunohistoquímicas para PCNA y Bcl-2, se procedió a realizar el conteo de 100 células de la granulosa de cada uno de los folículos preovulatorios encontrados para cada dosis de eCG (4, 20 y 40 UI) y tiempo (52, 58 y 70 h) clasificando como positivas para PCNA y Bcl-2 aquellas que adquirieron una coloración marrón. Los datos obtenidos se utilizaron para analizar el efecto de la dosis y el tiempo sobre el número de folículos encontrados y el nivel de expresión de PCNA y Bcl-2 en estos.

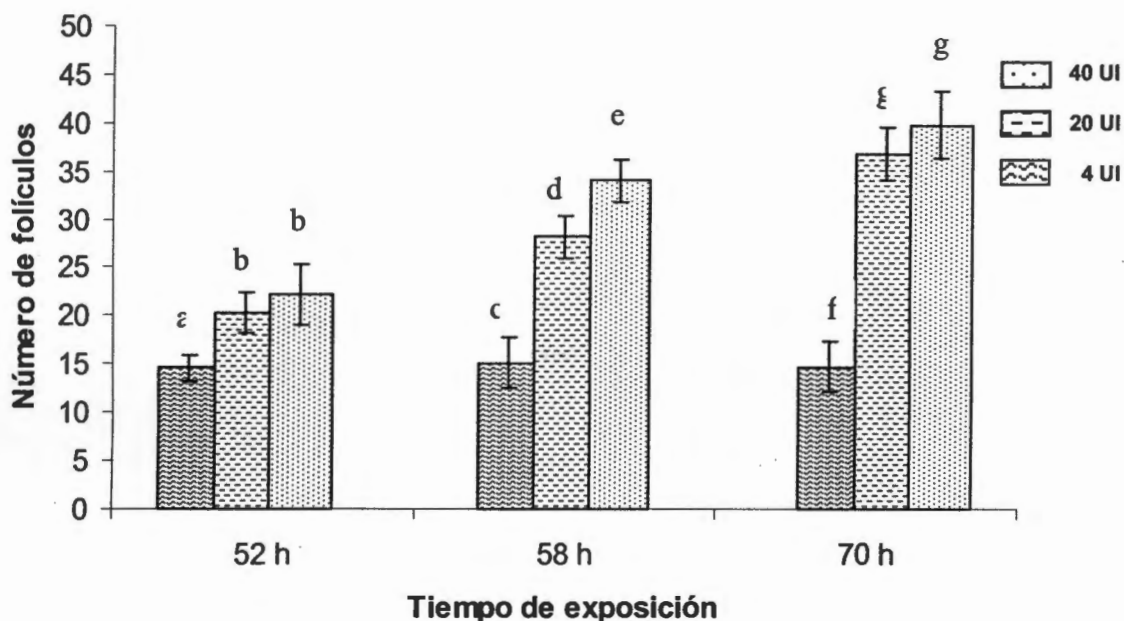
Los datos obtenidos se utilizaron para llevar a cabo un análisis estadístico que consistió en un análisis de varianza (ANOVA), seguido de una prueba de tukey, con el fin de analizar el efecto de la dosis y el tiempo sobre el número de folículos encontrados y el nivel de expresión de PCNA y Bcl-2 en estos.

RESULTADOS

La tabla 2 y grafica 1 muestra el número de folículos encontrados en cada uno de tiempos seleccionados, con una dosis considerada como fisiológica (4 UI) y dos dosis hiperovulatorias (20 y 40 UI) de eCG. Claramente se puede observar el efecto estimulador que ejerce la dosis y el tiempo sobre el número de folículos encontrados en un mismo tiempo, a las 52 h el promedio de folículos encontrados era de solo 14.60 ± 1.36 incrementándose de manera significativa ($p < 0.05$) hasta los 20.30 ± 2.10 folículos, al utilizar la dosis hiperovulatoria intermedia de 20 UI, y de manera no significativa con dosis de 40 UI siendo el promedio de 22.16 ± 3.10 folículos. Algo muy similar ocurre a las 58 horas al observarse nuevamente el efecto estimulador de la eCG sobre el número de folículos encontrados en este tiempo, solo que a diferencia de lo ocurrido a las 52 horas el incremento en el número de folículos entre 20 (28.16 ± 2.10) y 40 UI (34.00 ± 2.19) si fue estadísticamente significativo ($p < 0.05$). A las 70 horas el efecto positivo de la dosis se mantiene, sin embargo el incremento entre 20 (36.83 ± 2.40) y 40 UI (39.80 ± 3.48) nuevamente deja de ser significativo.

Tiempo de exposición	Dosis	Promedio de Folículos
52 h	4 UI	14.60 ± 1.36 a
	20 UI	20.30 ± 2.10 b
	40 UI	22.16 ± 3.10 b
58 h	4 UI	15.16 ± 2.63 c
	20 UI	28.16 ± 2.10 d
	40 UI	34.00 ± 2.19 e
70 h	4 UI	14.69 ± 2.87 f
	20 UI	36.83 ± 2.40 g
	40 UI	39.80 ± 3.48 g

Tabla 2.- Promedio de folículos preovulatorios encontrados en cada tiempo y dosis utilizada. Diferente literal indica diferencias significativas ($p < 0.05$).

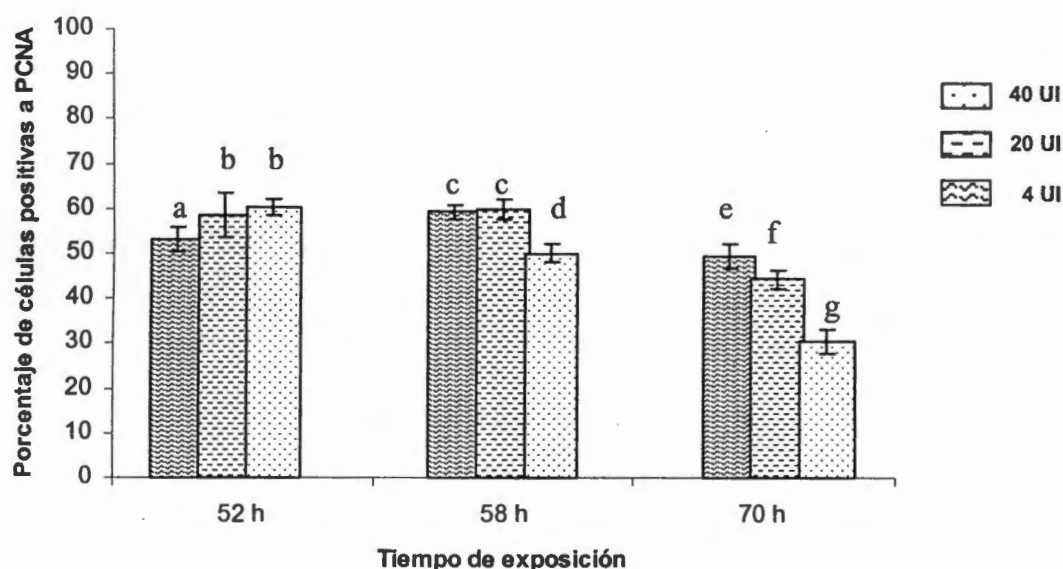


Grafica 1: efecto del tiempo sobre el número de folículos preovulatorios en ratas hiperovuladas con 4, 20 y 40 UI de eCG. En el eje de las Y se grafica el promedio $\pm$ DS del número de folículos preovulatorios encontrados en cada dosis. En el eje de las X se muestra el tiempo de exposición a la hormona. Diferente literal muestra diferencias significativas en un mismo grupo ($p < 0.05$)

En la tabla 3 se muestran los resultados del tratamiento con 2 dosis hiperovulatorias de eCG (20 y 40 UI) y una dosis fisiológica de 4 UI (control), con respecto a la expresión de PCNA y Bcl-2 en cada uno de los tiempos seleccionados (52, 58 y 70 h). En la grafica 2 se muestra el efecto que tiene la dosis sobre la expresión de PCNA, a las 52 horas se puede observar que existe aumento en la expresión de PCNA directamente proporcional con dosis utilizada, no obstante, el aumento es significativo ($p < 0.05$) solo entre 4 ($53.15\% \pm 2.65$) y 20 UI ($58.59\% \pm 4.81$) y no entre 20 y 40 UI ($60.33\% \pm 1.69$). A las 58 horas se puede observar un incremento en el número de células positivas a PCNA con la dosis de 20 UI ($60.0\% \pm 1.29$) en relación a lo obtenido con 4 UI ($59.25\% \pm 1.51$), aunque cabe mencionar que este aumento no es estadísticamente significativo, con la dosis de 40 UI se observó una disminución significativa ($p < 0.05$) en la expresión de PCNA con respecto a las otras dosis.

Tiempo de exposición	Dosis	PCNA	BCL-2
52 h	4 UI	53.15 % $\pm$ 2.65 a	34.06 % $\pm$ 2.07 a
	20 UI	58.59 % $\pm$ 4.81 b	48.14 % $\pm$ 1.57 b
	40 UI	60.33 % $\pm$ 1.69 b	31.60 % $\pm$ 2.15 c
58h	4 UI	59.25 % $\pm$ 1.51 c	32.47 % $\pm$ 2.38 d
	20 UI	60.00 % $\pm$ 1.29 c	40.73 % $\pm$ 2.06 e
	40 UI	50.15 % $\pm$ 1.75 d	42.63 % $\pm$ 5.36 e
70 h	4 UI	49.67 % $\pm$ 2.61 e	39.93 % $\pm$ 2.06 f
	20 UI	44.42 % $\pm$ 2.28 f	50.59 % $\pm$ 1.26 g
	40 UI	30.85 % $\pm$ 2.60 g	60.08 % $\pm$ 3.81 h

Tabla 3.- expresión de células positivas y negativas a PCNA y Bcl-2 en cada dosis y tiempo seleccionado. Diferente literal indica diferencias significativas ($p < 0.05$) entre el mismo grupo

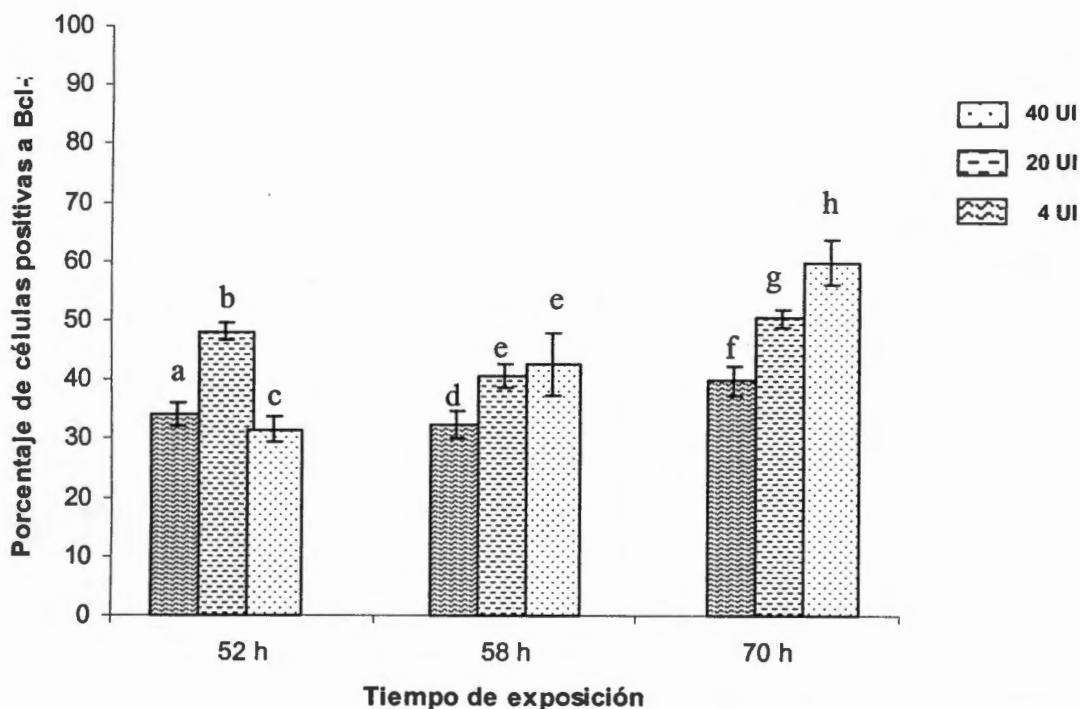


Grafica 2: Análisis del efecto de cada uno de los tiempos sobre el porcentaje de células positivas a PCNA en folículos preovulatorios de ratas hiperovuladas con 4, 20 y 40 UI de eCG. El eje de las Y se grafica el promedio $\pm$ DS del porcentaje de células positivas a PCNA. En el eje de las X se muestra el tiempo de exposición a la hormona. Diferente literal muestra diferencias significativas en tre un mismo grupo ($p < 0.05$)

A las 70 horas se repite el mismo efecto que el ocurrido a las 58 h con la dosis hiperovulatoria alta (40 UI). La expresión de PCNA disminuye de manera significativa ($p < 0.05$) conforme la dosis de eCG aumenta, disminuyendo del 49.67% $\pm$ 3.61, encontrado con 4 UI hasta el 30.85% $\pm$ 2.60 encontrado con 40 UI.

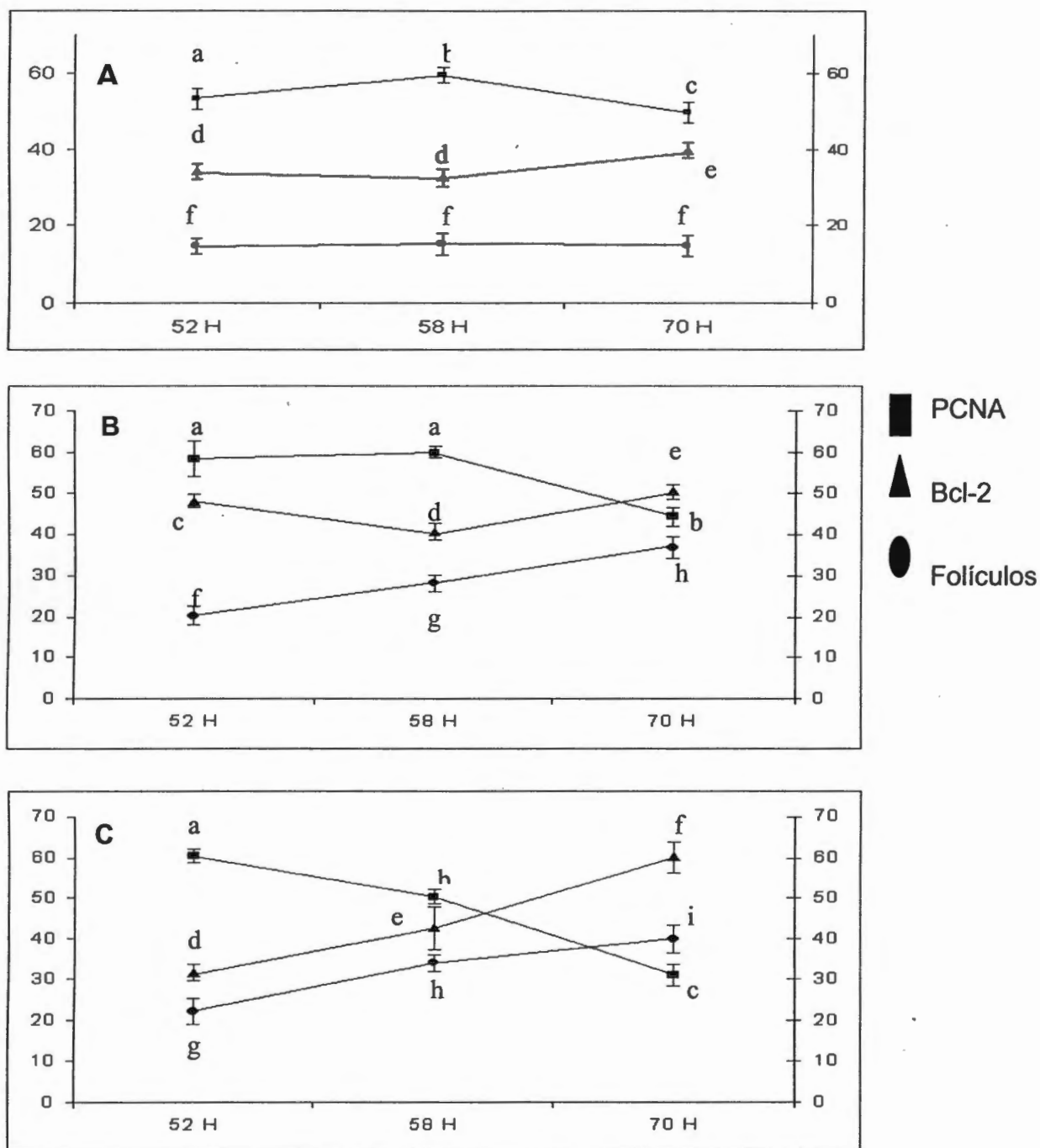
En la grafica 3 se muestra el efecto de las 3 diferentes dosis de eCG sobre la expresión de Bcl-2. A 52 horas existe un aumento significativo ($p < 0.05$) en la expresión de Bcl-2 con 20 UI (48.14 % $\pm$ 1.57) con relación a la expresión mostrada con 4 UI (34.06 % $\pm$ 2.07), con 40 UI (31.60 % $\pm$ 2.15) ocurre una disminución en la expresión de Bcl-2 significativa ($p < 0.05$). A 58 horas el nivel de expresión para Bcl-2 encontrado con 4 UI fue 32.47% $\pm$ 2.38, aumentando de manera significativa a 40.73% $\pm$ 2.06 con la dosis media de 20 UI y aumentando nuevamente con 40 UI a 42.63% $\pm$ 5.36 aunque de manera no significativa. A 70

horas postratamiento la expresión de Bcl-2 aumenta de manera significativa de acuerdo a la dosis de eCG suministrada, siendo el porcentaje de expresión mas bajo el encontrado con 4 UI ($32.47\% \pm 2.06$) y el mas alto el que se obtuvo con 40 UI ($42.63\% \pm 3.81$).



Grafica 3: Análisis del efecto de cada uno de los tiempos sobre el porcentaje de células positivas a Bcl-2 en folículos preovulatorios de ratas hiperoovuladas con 4, 20 y 40 UI de eCG. El eje de las Y se grafica el promedio $\pm$ DS del porcentaje de células positivas a Bcl-2 encontradas en folículos preovulatorios. En el eje de las X se muestra el tiempo de exposición a la hormona. Diferente literal muestra diferencias significativas ($p < 0.05$) dentro del mismo grupo.

La grafica 4a muestra el porcentaje de células positivas a PCNA, Bcl-2 y el número de folículos preovulatorios encontrados en cada uno de los tres tiempos de exposición a la hormona (52, 58 y 70 h) con la dosis fisiológica de 4 UI de eCG. En primera instancia se observa que el porcentaje de células positivas a PCNA depende del tiempo de exposición que tengan las células a eCG, primero aumentando de manera significativa ($p < 0.05$) de $53.15\% \pm 2.65$ a las 52 h, hasta el $59.25\% \pm 1.31$ a las 58 h y posteriormente disminuyendo también de manera significativa hasta el $49.67\% \pm 2.61$ a las 70 horas. En el caso de Bcl-2 el porcentaje de expresión a las 52 horas fue del $34.06\% \pm 2.07$, disminuyendo a las 58 horas al $32.47\% \pm 2.38$ y aumentando a las 70 horas al 39.93 ± 2.06 por lo que análisis estadístico mostró que no existe diferencia significativa ($p < 0.05$) entre los 2 primeros tiempos, pero si con relación al tercero. En cuanto al número de folículos encontrados en cada uno de los tiempos puede observar que no existe diferencia significativa ($p < 0.05$) en el número de folículos encontrados en los diferentes tiempos de recuperación.



Grafica 4: A) efecto de la dosis sobre el porcentaje de células positivas a PCNA y Bcl-2 en folículos preovulatorios de ratas hiperovuladas con 4 UI de eCG. El eje de las Y se grafica el promedio $\pm$ DS del porcentaje de células positivas a PCNA, Bcl-2 y en eje secundario de las Y el número de folículos preovulatorios encontrados en cada punto. En el eje de las X se muestra el tiempo de exposición a la hormona. Diferente literal muestra diferencias significativas ($p < 0.05$). B) efecto de la dosis sobre el porcentaje de células positivas a PCNA y Bcl-2 en folículos preovulatorios de ratas hiperovuladas con 20 UI de eCG. En el eje de las Y se grafica el promedio $\pm$ DS del porcentaje de células positivas a PCNA, Bcl-2 y en el eje secundario de las Y el número de folículos preovulatorios encontrados en cada punto. En el eje de las X se muestra el tiempo de exposición a la hormona. Diferente literal muestra diferencias significativas ($p < 0.05$). C) efecto de la dosis sobre el porcentaje de células positivas a PCNA y Bcl-2 en folículos preovulatorios de ratas hiperovuladas con 40 UI de eCG. En el eje de las Y se grafica el promedio $\pm$ DS del porcentaje de células positivas a PCNA, Bcl-2 y el número de folículos preovulatorios encontrados en cada punto. En el eje de las X se muestra el tiempo de exposición a la hormona. Diferente literal muestra diferencias significativas ($p < 0.05$) dentro del mismo grupo.

En la grafica 4b se muestra el porcentaje de células positivas a PCNA, Bcl-2 y el porcentaje de folículos preovulatorios encontrados en cada uno de los tres tiempos de exposición a la hormona (52, 58 y 70 h) con la dosis hiperovulatoria media de 20 UI. En el caso de PCNA el porcentaje de células positivas a 52 h ($58.59\% \pm 4.81$) y 58 h ($60.00\% \pm 1.29$) no mostraron diferencias significativas, pero sí a las 70 h donde el porcentaje disminuyó hasta el $44.42\% \pm 2.28$. En el caso de Bcl-2 el nivel de expresión obtenido a las 52 ($48.14\% \pm 1.57$), disminuyo de manera significativa a las 58 h hasta el $40.73\% \pm 2.06$ y aumento también de manera significativa a las 70 horas ($50.5\% \pm 1.26$). El número de folículos encontrados con esta dosis (20 UI) presentes a las 52 h ($20.3\% \pm 2.1$), 58 h ($28.16\% \pm 2.11$) y 70 h ($36.83\% \pm 2.4$), aumentaron conforme al tiempo de exposición a la hormona también aumentaba.

En la grafica 4c se presentan los porcentajes de células positivas a PCNA, Bcl-2 y el porcentaje de folículos preovulatorios encontrados en cada uno de los tres tiempos de exposición a la hormona (52, 58 y 70 h) con la dosis hiperovulatoria alta (40 UI). En cuanto a la expresión de Bcl-2 se puede observar que existe un aumento significativo directamente proporcional al tiempo de exposición a la hormona ya que a las 52 el porcentaje de expresión fue de $31.60\% \pm 2.15$, incrementándose a las 58 h al $42.63\% \pm 5.36$ y alcanzando su valor máximo a las 70 horas ($60.08\% \pm 3.81$). Sin embargo en el caso de PCNA ocurre lo contrario claramente se observa una disminución significativa en los porcentajes de células positivas a las 52 ($60.33\% \pm 1.69$), 58 ($50.15\% \pm 1.75$) y 70 horas ($30.85\% \pm 2.68$) conforme el tiempo de exposición a la hormona aumenta. Al igual que con la dosis hiperovulatoria media (20 UI), el número de folículos encontrados a las 52 ($22.16\% \pm 3.1$), 58 ($34.00\% \pm 2.19$) y 70 horas ($39.80\% \pm 3.48$) mostraron un aumento significativo ($p < 0.05$) conforme el tiempo de exposición a la hormona aumenta

DISCUSIÓN

En el ovario, los ovocitos de los folículos primordiales pueden permanecer latentes durante años (en la mujer hasta 50 años) hasta ser estimulados para su desarrollo. En el reclutamiento de los folículos latentes hacia el grupo de los folículos en crecimiento, están involucrados una compleja red de señales endócrinas y parácrinas, con lo que los folículos progresan por estadios del desarrollo bien caracterizados hasta llegar a la ovulación (Hsueh et al 1994; Kaipia Hsueh 1997; Robker y Richards 1998; Richards et al 1998; McGee y Hsueh 2000). Se han identificado dos tipos distintos de desarrollo folicular: el crecimiento inicial y el crecimiento cíclico. Durante el reclutamiento inicial, algunos folículos primordiales entran al grupo de folículos en crecimiento y se desarrollan hasta el estadio antral temprano. Estos folículos antrales constituyen el grupo en el cual ocurrirá el reclutamiento cíclico en cada ciclo estral. En cada ciclo uno o un pequeño grupo de folículos alcanzarán la ovulación, pero la mayoría sufrirán atresia (Kumar et al 1997; Kumar et al 1998; McGee y Hsueh AJ 2000).

La FSH y los estrógenos son esenciales para que los folículos escapen a la atresia y alcancen el estado preovulatorio (Kumar et al McGee y Hsueh AJ 2000). El principal papel de la FSH en este proceso es elevar la concentración de estrógenos a través de la estimulación de la expresión de $P_{450arom}$ en las células de la granulosa (Kaipia y Hsueh AJ 1997).

En el ovario de los roedores, los receptores a estrógenos (ER)- α y el ER- β son expresados en distintos tipos celulares. ER- β es expresado en las células de la granulosa de folículos primarios, secundarios y maduros pero no en epitelio germinal, células de la teca, lúteas e intersticiales. La proteína ER α , no se detecta en células de la granulosa, pero se encuentra en epitelio germinal y en células intersticiales y de la teca (Krege et al 1998; Fitzpatrick et al 1999; Rosenfeld et al 1999; Sar y Welsch 1999; Couse y Korach 1999). El patrón de distribución de estos dos receptores en el ovario sugiere que ellos median diferentes aspectos de la acción de los estrógenos en este órgano (Cheng et al 2002).

Los andrógenos tienen dos funciones distintas en el ovario. Como sustrato de $P_{450arom}$ ellos son productores de estrógenos, pero también actúan vía receptores de andrógenos (ARs) en dos estadios del desarrollo folicular. Durante el reclutamiento inicial, los andrógenos son un factor estimulante que incrementa el reclutamiento de folículos primordiales hacia el grupo de folículos en desarrollo (Vendola et al 1999; Vendola et al 1999b), sin embargo durante el reclutamiento cíclico los andrógenos promueven la atresia (Hsueh et al 1994; Richards et al 1998; McGee y Hsueh AJ 2000).

En folículos primarios y preantrales, hay una baja actividad de $P_{450arom}$ y AR. La Androstenediona, se difunde de las células de la teca hacia las de la granulosa, en donde se convierte a testosterona. La testosterona activa AR y esto a su vez permite la expresión del receptor para IGF-1 (IGF-1R), estimula la proliferación de las células de la granulosa y refuerza los efectos de FSH en la inducción de $P_{450arom}$, lo cual ocasiona o favorece el cambio del ambiente androgénico hacia un ambiente estrogénico que requiere el folículo para alcanzar el estado antral y preovulatorio (Cheng et al 2002).

Un trabajo muy reciente (Cheng et al 2002) con ratones "knockout" para ER β demuestra que estos ratones tienen un desarrollo folicular anormal y fertilidad muy reducida. Los ovarios presentaban una gran cantidad de folículos atrésicos y estos folículos presentan niveles altos en la expresión del receptor de andrógenos (AR) y del receptor de IGF-1. Estos resultados sugieren que en ausencia de ER β , se pierde la regulación de AR que no impide el reclutamiento inicial de los folículos pero al no ocurrir el cambio del ambiente androgénico (folículos preantrales) a una dominancia de estrógenos como debe ser en el estadio de folículo antral tardío para lo cual se requiere una menor expresión de AR, si AR no disminuye su expresión y permite este cambio de ambiente hormonal, el folículo no puede escapar a la atresia.

El incremento en la concentración plasmática de estrógenos ocasionado por el desarrollo folicular también causa una menor secreción de FSH por la hipófisis y consecuentemente una reducción en la expresión génica de aromatasa dependiente de FSH. En los folículos menos desarrollados esta reducción en la aromatasa resulta en un microambiente androgénico que los lleva al proceso de atresia (Speroff, et al., 1999; Tetsuka y Hiller 1997).

Los conocimientos que se han alcanzado por estudios realizados en animales de laboratorio y de granja sobre los fundamentos moleculares y endocrinológicos que ocurren en el desarrollo folicular y la atresia de folículos durante el ciclo estral en las diferentes especies, han permitido aplicar técnicas que tienden a la optimización de la expresión reproductiva de las especies domésticas. Existen numerosos esquemas de tratamiento para producir hiperovulación en las distintas especies, sin embargo poco se conoce sobre los mecanismos que llevan a una hembra a aumentar de manera tan exagerada su tasa ovulatoria. La aplicación de 10 UI eCG a ratas inmaduras, ha revelado que esta hormona no hipofisiaria induce crecimiento folicular *in vivo* y sobrevivencia celular en células foliculares *in vitro*, la cual está asociada más que a la expresión de Bcl-2 y bcl-x, a una marcada reducción en el mensajero de bax. Estudios por Southern blot han permitido distinguir que existen dos formas de bcl-x, la larga (bcl-x_{long}) y la corta (bcl-x_{short}). La disminución en la expresión de bcl-x y el mantenimiento en los niveles del mRNA de Bcl-2 y bcl-x_{long} se han asociado a una reducción muy importante en la muerte apoptótica de las células de la granulosa, en contraste, la apoptosis de las células de la granulosa inducidas por privación del soporte trófico, estuvo asociada con el incremento en los mensajeros de bax y una reducción en los de bcl-x_{long} y cambios no detectados en el mRNA de bcl2, estos datos indican que la habilidad de las gonadotrofinas para prevenir la apoptosis y la atresia en los folículos ováricos puede ser ligada a un cambio en la relación entre la expresión génica de represores de muerte (Bcl-2 y bcl-x_{long}) e inductores (bax y bcl-x_{short}) (Tilly, et al., 1995).

El tratamiento de ratas inmaduras o prepúberes tratadas con suero de yegua gestante, PMSG o actualmente conocida como gonadotropina coriónica equina o eCG, seguida de hCG ha sido usado extensivamente como un modelo del desarrollo folicular (Chakraborty et al., 1991), la ovulación (Hillensjo, et al., 1974) y gestación (Nutty 1975). Por su alto contenido de glicoproteínas, la eCG tiene una vida media prolongada de 70 h y consecuentemente rescata folículos antrales pequeños de la atresia en el ovario de ratas inmaduras (Braw y Tsafriri 1980).

En ratas intactas, el día 25 de edad se ha localizado el mRNA para el receptor de FSH en células de la granulosa de folículos pequeños (350-500 μ m de diámetro), mientras que el mRNA para el receptor de LH está limitado a las células de la teca y al intersticio. Dos días después de la inyección de 10 UI de eCG en el día 23, el mRNA para el receptor de LH ovárico se incrementó cerca de 5 veces, y el mRNA para el receptor de FSH aumentó al doble comparado con el

control (Camp et al., 1991). La expresión del receptor para FSH aumentó con mayor rapidez entre el día 4 y 16 de edad en ratas prepúberes no tratadas, correlacionando con la concentración máxima de FSH en suero; el mayor incremento en los receptores para LH ocurrió entre el día 16 y 28 de edad, presumiblemente en respuesta al pico sérico de FSH (Whitess y Ojeda 1981).

Utilizando un modelo de ratas prepúberes de 23-24 días de edad, inyectadas con 5 UI de eCG, en el cual se recuperaron ovarios para el estudio de receptores a FSH y hCG se observó que después de 24 horas postratamiento, la teca y el intersticio de los folículos preantrales y antrales no atrésicos contienen receptores a LH, además de observarse hipertróficos y epiteloideos. Para este tiempo la unión de FSH a células de la granulosa fue mayor en folículos antrales que en preantrales. A las 48 horas postratamiento hubo más receptores a FSH en folículos antrales grandes, mientras que los receptores a hCG estuvieron presentes solo en la tercera parte de los folículos antrales (Hisashi y Greenwald 199). En investigaciones realizados por Yun y colaboradores (1987) y validados por nuestro grupo de investigación se pudo constatar que la ovulación en la rata ocurre en tres tiempos post-tratamiento con eCG: 54, 60 y 72 horas, con lo cual podemos decir que los folículos antrales de más de 500 μm que observamos en este trabajo a las 52, 58 y 70 horas después de la aplicación de la hormona son folículos preovulatorios.

En los resultados de este trabajo se encontró que cuando se induce el crecimiento y desarrollo folicular en ratas prepúberes tratadas con 4 UI de eCG (gráfica 4a), en los ovarios recuperados después de 52 y 58 horas de la estimulación, el desarrollo se explica principalmente debido principalmente a la gran proporción de células positivas al marcador de proliferación celular PCNA y en menor proporción a la expresión de la proteína Bcl-2 que tiene efectos antiapoptóticos. El marcador de proliferación celular PCNA tuvo un aumento significativo ($p < 0.05$) con respecto al tiempo siendo mayor el número de células positivas a las 58 horas postratamiento en comparación con las 52 horas. Mientras que de 52 a 58 horas postratamiento, el porcentaje de células positivas a PCNA aumenta, el porcentaje de células positivas a Bcl-2 disminuye, lo cual quiere decir que en estos tiempos predomina la proliferación celular sobre la protección a la muerte. A las 70 horas postratamiento el número de células positivas a PCNA encontradas en los folículos recuperados disminuye de manera significativa, al mismo tiempo que el número de células positivas a Bcl-2 aumenta de manera estadísticamente significativa. Si tomamos en cuenta que 4 UI es considerada como una dosis fisiológica podríamos decir que esto es lo que ocurre de manera normal en el desarrollo folicular de cada ciclo. Los resultados encontrados con esta dosis para la expresión de bcl-2 están de acuerdo con lo encontrado por otros autores quienes aseguran que no existen cambios importantes en la expresión del mRNA de Bcl-2 en ovarios recuperados a 24 y 48 horas postratamiento con 5 UI de eCG en (Tilly et al., 1995).

Estudios de algunos autores han encontrado que las células de la granulosa de folículos sanos expresan un marcador de proliferación denominada ciclina D2, (Robker RL and Richards JS 1998) que no se expresa en células de folículos atrésicos, lo cual parece indicar que es inhibida en presencia de andrógenos (Cheng, et al., 1999), en nuestros resultados también se evidencia la presencia de un marcador de proliferación celular llamado PCNA, como consecuencia de la acción de eCG.

Con dosis hiperovulatoria media de 20 UI (grafica 4b), con la cual se obtuvo un número de folículos significativamente mayor ($p < 0.05$) en los tres tiempos comparados con 4 UI, se observó que el crecimiento y desarrollo se debió al efecto de eCG sobre la expresión de PCNA y Bcl-2, ya que a las 52 horas se observa un aumento en el número de células positivas para ambas proteínas, cuando se compara con lo encontrado con 4 UI en este mismo tiempo (52 h). sin embargo a las 58 horas postratamiento ya no se observa una diferencia significativa entre en número de células positivas a PCNA encontradas con 4 y 20 UI, pero sí para Bcl-2, lo cual quiere decir que eCG en este tiempo tiene un mayor efecto sobre la expresión de Bcl-2, favoreciendo la sobrevivencia celular. A las 70 horas postratamiento es más claro el efecto estimulador de eCG sobre expresión de la proteína antiapoptótica Bcl-2, ya que el aumento es estadísticamente significativo ($p < 0.05$) comparado con lo encontrado con 4 UI en este mismo tiempo. Mientras que para PCNA no hubo diferencias significativas.

Cuando se utilizó la dosis hiperovulatoria alta de 40 UI de eCG solo tuvo efecto positivo sobre la expresión de PCNA a las 52 horas ya que en los otros dos tiempos de recuperación fue muy claro el efecto negativo que la hormona ejerce sobre la expresión de esta proteína, mientras que el efecto fue positivo para el caso Bcl-2 en los tres tiempos de recuperación, siendo esto aun más evidente a las 70 horas postratamiento donde se alcanza el 60% de células positivas a Bcl-2. lo anterior quiere decir que con dosis altas de eCG el mayor número de folículos que se obtienen a partir de las 58 horas son el resultado principalmente de la expresión celular de la proteína antiapoptótica Bcl-2 más que debido a la inducción de la proliferación de las células de la granulosa. Estos resultados coinciden con otros autores quienes explican el crecimiento como un complejo proceso que refleja un continuo incremento en el número de células, que depende en su momento de un balance entre la proliferación y la muerte celular (Raff 1996).

En la sobrevivencia de las células que conforman los folículos preovulatorios participa un elaborado control intrafolicular (Hsueh et al 1996) en este proceso participan la hormona del crecimiento (GH) (Eisenhauer KM et al 1995) factores locales como IGF-I, el factor de crecimiento epidérmico, $TGF\alpha$ y el factor de crecimiento fibroblástico-2 que parecen suprimir la apoptosis celular en los folículos (Chun SY et al 1994; Tilly JL 1992). La interleucina -1 β , a través de su acción en el incremento en la producción de óxido nítrico también es un importante factor de sobrevivencia, sin embargo las gonadotropinas FSH y la LH

son los factores de sobrevivencia más importantes para los folículos preovulatorios (McGee y Hsueh 2000).

Los resultados de este trabajo sugieren que muy probablemente eCG actúe simulando la acción de FSH sobre el desarrollo folicular uniéndose a los receptores de esta hormona y favoreciendo la aparición de receptores a LH en granulosa y teca, así como la presencia de $P_{450arom}$ que convierte la testosterona producida por la teca en estradiol, los estrógenos producidos de esta manera activan el receptor β para esta hormona en las células de la granulosa y el cual en su momento regula a la baja el receptor de andrógenos, esto permite que el ambiente folicular es estrógeno dominante con lo cual los folículos escapan a la atresia (Cheng et al 2002). Los estrógenos además de las funciones descritas, tienen una acción cooperadora con la FSH en su efecto mitogénico y proliferativo, como han propuesto otros autores (Tilly et al 1995) por evidencias del efecto de 10 UI de eCG aplicados a ratas prepúberes, comparadas con animales de la misma edad no tratados.

El estradiol producido en los ovarios juega un papel endócrino crítico en la regulación de la síntesis y secreción de gonadotropinas en el eje hipotálamo hipofisiario. Se conocen diversos efectos paracrinós/autócrinos del estradiol dentro del ovario, entre ellos se incluye el incremento en el peso ovárico, estimulación de las células de la granulosa para su crecimiento, potencializado por FSH y la atenuación de la apoptosis. Los estrógenos son esenciales para el crecimiento y diferenciación de los folículos, en ratas y hamster disminuye la producción de estrógenos y andrógenos en folículos atrésicos (Braw y Tsafri 1980; Terranova 1981). En humanos, ovinos y porcinos, también disminuye la producción de estradiol aunque se incrementa la de andrógenos (Carson et al 1981; Masón et al 1985). Está demostrado que el estradiol promueve la expresión de Bcl-2 en varios tipos celulares, entre las que se encuentran: células lúteas (Goodman et al 1998), células de cáncer mamario (Dong et al 1999) y células de la granulosa (Tilly et al 1995). Los estrógenos promueven la supervivencia celular, su efecto protector radica en su capacidad para liberar antioxidantes endógenos. Están bien documentadas sus propiedades antioxidantes y supresoras del estrés oxidativo en diferentes tipos celulares, como las neuronas y otras líneas celulares neuronales (Behl 1999, Behl and Manthley 2000) así como en células lúteas del conejo (Goodman et al 1998; dharmarajan et al 1999). Sin embargo se ha visto que en condiciones in vitro se requieren altas concentraciones de estradiol (10^{-5} M) para producir su efecto antioxidante, esta capacidad es dependiente de la presencia del grupo hidroxilo en la posición C-3 del anillo A de la molécula del esteroide y es independiente de la activación del receptor al estrógeno (Culmsee et al 1999; Behl y Montley 2000). En tejido neuronal, se ha visto que el estradiol puede reducir el estrés oxidativo por la inducción de la expresión de Bcl-2, ya que este atenúa la generación de especies reactivas de oxígeno (Bogdanov et al 1999). El estradiol produce una regulación a la baja de moléculas proapoptóticas como Nip-2 y Par 4 y regulación a la alta de moléculas antiapoptóticas como Bcl-2 y bcl-x_{long} (Vegeto et al 1999), otra posibilidad que se ha planteado es que estradiol pueda afectar directamente la transcripción del gen Bcl-2 (Teixeira et al 1995).

Según los resultados de esta investigación en células de la granulosa de folículos preovulatorios puede ocurrir algo similar a lo descrito en otras células, ya que en este trabajo pudimos observar que la mayor expresión de Bcl-2 fue en las células foliculares provenientes de folículos tratados con 40 UI, recuperados a las 70 horas después del tratamiento y en cuyo caso se obtuvieron el mayor número promedio de folículos preovulatorios 39.8 ± 3.48 (tabla 2 y grafica 1). Seguramente la gran cantidad de folículos que se producen en los tratamientos hiperovulatorios especialmente cuando los ovarios se recuperan después de 70 horas de la aplicación de eCG ocasiona un ambiente folicular hiperestrogénico que favorece la acción antioxidante con la mayor expresión de Bcl-2 y la sobrevivencia celular en los folículos con mayor estimulación (dosis y tiempo) con gonadotropinas. Cabe señalar que si las altas concentraciones de estrógenos favorece la sobrevivencia de las células de la granulosa de los folículos hiperovulados, sería importante evaluar si existen efectos adversos en estas células a la que artificialmente se le impidió morir o bien si las células estimuladas para sobrevivir no conservan todas sus capacidades fisiológicas. Si consideramos que el ovocito sobrevive gracias a los nutrientes que adquiere de las células que lo rodean, por lo que también sería importante evaluar la capacidad de estos ovocitos para ser fertilizado y desarrollar un embrión sano.

CONCLUSIONES

Con dosis fisiológicas de 4 UI de eCG no hay diferencias en el número de folículos obtenidos en los diferentes tiempos de recuperación. Con esta dosis el número de folículos que se obtiene es principalmente por la estimulación de la proliferación de las células de la granulosa de estos folículos y en menor proporción a la presencia en estas células de la proteína antiapoptótica Bcl-2. Existen cambios importantes en el comportamiento de la expresión de las dos proteínas estudiadas con respecto al tiempo de recuperación de los ovarios después del tratamiento, a las 58 horas, se incrementa la expresión de PCNA y disminuye Bcl-2, y a las 70 horas disminuye proliferación y aumenta la expresión de Bcl-2. Con dosis de 20 UI se tiene una importante respuesta hiperovulatoria. En los folículos que respondieron al tratamiento se encuentran cambios importantes con respecto a la dosis fisiológica ya que aunque hubo estimulación con respecto a la proliferación celular a las 52 horas después de la hormona, en los horarios posteriores solo se observaron efectos positivos de la hormona sobre la expresión de Bcl-2, ya que el número de células positivas a ella aumentó en los horarios de 58 Y 70 horas , mientras que el porcentaje de células positivas a PCNA disminuyó, esto quiere decir que con 20 UI cuando los folículos se recuperan a las 58 y 70 horas hay un mayor efecto sobre la sobrevivencia celular que sobre la proliferación. Con dosis de 40 UI de eCG hay un efecto negativo de eCG sobre la proliferación celular y positivo a la expresión de Bcl-2 en los folículos estimulados, ya que el porcentaje de células positivas a PCNA disminuyó conforme avanzó el tiempo de recuperación , mientras que el porcentaje de células positivas a Bcl-2 aumento, esto quiere decir que dosis altas de eCG favorecen especialmente la sobrevivencia celular que la proliferación.

BIBLIOGRAFIA

- Aaltonen J**, Laitinen MP, Vuojolainen K, Jaatinen R, Horelli-Kuitunen N, Seppa L, Louhio H, Tuuri T, Sjoberg J, Butzow R, Hovata O, Dale L, Ritvos O. 1999. Human growth differentiation factor 9 (GDF-9) and its novel homolog GDF-9B are expressed in oocytes during early folliculogenesis. *J Clin Endocrinol Metab* 84:2744–2750
- Adams CE**. 1960. Prenatal mortality in the rabbit *Oryctolagus cuniculus*. *J reprod fertil*. 1: 36–44.
- Adashi EY** 1995 Insulin-like growth factors as determinants of follicular fate. *J Soc Gynecol Invest* 2:721–726
- Armstrong DT, Evans G**. 1983. Factors influencing success of embryo transfer in sheep and goats. *Theriogenology* 19: 31–42.
- Bagavandoss P.**, Midgley Jr. A.R. and Wicha M. 1983 Developmental changes in the ovarian follicular basal lamina detected by immunofluorescence and electron microscopy. *J. Histo. Cytoc.* 31:633–640.
- Baños EM.**, Rosales T. AM., Ballesteros LM., Hernandez-Perez., Rosado A. 1996. Changes in lisosomal enzyme activities in pre-ovulatory follicles and endometrium of ECG superovulated rats. *Arch Med Res.* 27 (1): 49–55.
- Beaumont HM**, Smith AF. 1975. Embryonic mortality during the pre and post-implantation periods of pregnancy in immature mice after superovulation. *J Reprod Fertil*. 45: 437–448.
- Bedell MA**, Brannan CI, Evans EP, Copeland NG, Jenkins NA, Donovan PJ 1995 DNA rearrangements located over 100 kb 5' of the Steel (Sl)-coding region in Steel-panda and Steel-contrasted mice deregulate Sl expression and cause female sterility by disrupting ovarian follicle development. *Genes Dev* 9:455–470
- Behl C**; Holsboer F; 1999. the female sex hormone of strogen as a neuroprotectan. *Trends pharmacol Sci.* 20, 441–444
- Behl C** and Manthey D; 2000 neuroprotective activities of strogen: and update. *J. neurocytol.* In press.
- Block E** 1953 A quantitative morphological investigations of the follicular system in newborn female infants. *Acta Anat (Basel)* 17:201–206
- Bogdanov MB**; Ferrante RJ; Muller G; Ramos LE; Martinou JC; 1999. Oxidative stress is attenued in mice overspressing BCL-2. *Neurosci Lett* 262 33–36
- Bonfoco E.**, Krainc D., Ankarcona M., Nicotera P. and Lipton S.A. 1995 Apoptosis and Necrosis: two distinct events induced respectively by mild and intense insults with NMDA or nitric oxide/superoxide in cortical cell cultures. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* 92:7162–7166.
- Bruce N.W.** and Moor R.M. 1976. Capillary blood flow to ovarian follicles, stroma and corpora lutea-anaesthetized sheep. *J. Reprod. Fertil.* 46:299–304.
- Carson R.S.**, Findlay J.K., Burger H.G., Trounson A.O. 1979 Gonadotropin receptors of the ovine ovarian follicle during follicular growth and atresia. *Biol Reprod.* 21:75–87.

- Champlin AK**, Kuiza SJ, Rice RA, Mobraaten IE., 1987. cell surface characteristics of blastocyst from spontaneously ovulating and gonadotropin-treated mice. *Biol reprod* 36:439-444.
- Cheng Guojun**, Zhang Weihua, Sirpa Ma"kinen, Sari Ma"kela, Shigehira Saji, Margaret Warner, Jan-A ke Gustafsson and Outi Hovatta. 2002. A Role for the Androgen Receptor in Follicular Atresia of Estrogen Receptor Beta Knockout Mouse Ovary. *Biology of reproduction* 66, 77-84
- Cheng, E. H.**, Kirsch, R. J. Clem, R. Ravi, M. B. Kastan, A. Bedi, K. Ueno, and J. M. Hardwick. 1997. Conversion of Bcl-2 to a Bax-like death effector by caspases. *Science* 278: 1966-1968.
- Chun SY**, Billig H, Tilly JL, Furuta I, Tsafiri A, Hsueh AJW 1995 Gonadotropin suppression of apoptosis in cultured preovulatory follicles: mediatory role of endogenous insulin-like growth factor *Endocrinology* 135:1845-1853
- Couse JF**, Korach KS. 1999 Estrogen receptor null mice: what have we learned and where will they lead us? *Endocr Rev*; 20:358-417.
- Darmarajan S**; Hisheh B; Singh S; Parkinson Kim I; Tilly and Jonathan Tilly. 1999. Antioxidants mimic the ability of corionic gonadotropin to suppress apoptosis in the rabbit corpus luteum in vitro: a novel role for superoxide dismutase in regulating bax expression. *Endocrinology* 140 (6) 2555-2561.
- Daud A.I.**, Bumpus F.M. and Husain A. 1989 Evidence for selective expression of angiotensin II receptors on atretic follicles in the rat ovary: an autoradiographic study. *Endocrinol.* 122:2727-2734
- Dieleman SJ**, Hendriksen PJ, Viuff D, Thomsen PD, Hyttel P, Knijn HM, Wrenzycki C, Kruip TA, Niemann H, Gadella BM, Bevers MM, Vos PL. 2002 Effects of in vivo prematuration and in vivo final maturation on developmental capacity and quality of pre-implantation embryos. *Theriogenology* Jan 1;57(1):5-20
- Donehower LA**, Bradley A. 1993 The tumor suppressor p53. *Biochem Biophys Acta* 1155:181-205.
- Dypbukt J.M.**, M. Ankarcrona, M. Burkitt, A. Sjöholm, K. Ström, S. Orrenius, and Nicotera P. 1994 Different prooxidant levels stimulate growth, trigger apoptosis or produce necrosis of insulin-secreting RINm5F cells. The role of intra cellular polyamines. *J. Biol. Chem.* 269:30533-30560.
- Edwards RG**, Fowler RE, Gore-Langton RE, Gosden RG, Jones EC, Readhead C, Steptoe PC 1977 Normal and abnormal follicular growth in mouse, rat and human ovaries. *J Reprod Fertil* 51:237-263
- Eisenhauer KM**, Chun SY, Billig H, Hsueh AJW 1995 Growth hormone suppression of apoptosis in preovulatory rat follicles and partial neutralization by insulin-like growth factor binding protein. *Biol Reprod* 53:13-20
- El-Deiry WS**, Tokino T, Velculescu VE, Levy DB, Persons R. Trent JMI 1993. WAF1, a potential mediator of p53 tumor suppressor gene. *Cell* 75: 817-825.
- Ellis R.E.**, Yuan J. and Horvitz H.R. 1991. Mechanisms functions and functions of cell death. *Annu Rev. Cell Biol.* 7:663-698.
- Elvin JA**, Clark AT, Wang P, Wolfman NM, Matzuk MM 1999 Paracrine actions of growth differentiation factor-9 in the mammalian ovary. *Mol Endocrinol* 13:1035-1048

- Elvin JA, Matzuk MM** 1998 Mouse models of ovarian failure. *Rev Reprod* 3:183–195
- Eppig JJ, Chesnel F, Hirao Y, O'Brien MJ, Pendola FL, Watanabe S, Wigglesworth K** 1997 Oocyte control of granulosa cell development: how and why. *Hum Reprod* 12:127–132
- Evans AC, Fortune JE** 1997 Selection of the dominant follicle in cattle occurs in the absence of differences in the expression of messenger ribonucleic acid for gonadotropin receptors. *Endocrinology* 138:2963–2971
- Fauser BC, Van Heusden AM** 1997 Manipulation of human ovarian function: physiological concepts and clinical consequences. *Endocr Rev* 18:71–106
- Forabosco A, Sforza C, De Pol A, Vizzotto L, Marzona L, Ferrario VF** 1991 Morphometric study of the human neonatal ovary. *Anat Rec* 231:201–208
- Fung YK, T'Ang A, Murphree AL, Zhang FH, Qiu WR, Wang SW.** 1993 The Rb gene suppresses the growth of normal cells. *Oncogene* 8: 2659–2672.
- Gelety TJ, Magoffin DA** 1997 Ontogeny of steroidogenic enzyme gene expression in ovarian theca-interstitial cells in the rat: regulation by a paracrine theca-differentiating factor prior to achieving luteinizing hormone responsiveness. *Biol Reprod* 56:938–945
- Giudice LC** 1992 Insulin-like growth factors and ovarian follicular development. *Endocr Rev* 13:641–669
- Goodman S.B., K. Kugu, S.H. Chen, S. Preutthipan, K.I. Tilly, J.L. Tilly, and A.M. Dharmarajan.** 1998 Estradiol-Mediated Suppression of Apoptosis in the Rabbit Corpus Luteum Is Associated with a Shift in Expression of Bcl-2 Family Members Favoring Cellular Survival biology of reproduction 59, 820–827.
- Greenwald G, Roy SY** 1994 Follicle development and its control. In: Knobil E, Neill J (eds) *The Physiology of Reproduction*. Raven Press, New York, pp 629–724
- Greenwald G.S.** 1989 Temporal and topographic changes in DNA synthesis after induced follicular atresia . *Biol. Reprod.* 41: 175–181.
- Greenwald GS, Terranova PF** 1988 Follicular selection and its control. In: Knobil E, Neill J (eds) *The Physiology of Reproduction*. Raven Press, New York, pp 387–435
- Greve T, Callesen H, Hyttel P.** 1983 Endocrine profiles and egg quality in the superovulated cow. *Nord Vet Med* Nov;35(11):408–21
- Hall FL, Williams RT, Wu L, Wu F, Carbonaro-Hall DA, Harper JW.** 1993 Two potentially oncogenic cyclins, cyclin A and cyclin D1, share common properties of subunit configuration, tyrosine phosphorylation and physical association with the Rb protein. *Oncogene* 8:1377–1384.
- Harlow CR, Shaw HJ, Hillier SG, Hodges JK** 1988 Factors influencing follicle-stimulating hormone-responsive steroidogenesis in marmoset granulosa cells: effects of androgens and the stage of follicular maturity. *Endocrinology* 122:2780–2787
- Hay M.F., Cran D.G. and Moor R.M.** 1976 Structural changes occurring during atresia in sheep ovarian follicles. *Cell Tiss. Res.* 169: 515–529
- Hayashi M, McGee EA, Min G, Klein C, Rose UM, van Duin M, Hsueh AJW** 1999 Recombinant growth differentiation factor-9 (GDF-9) enhances growth

- and differentiation of cultured early ovarian follicles. *Endocrinology* 140:1236–1244
- Hirshfield AN** 1989 Granulosa cell proliferation in very small follicles of cycling rats studied by long-term continuous tritiated-thymidine infusion. *Biol Reprod* 41:309–316
- Hirshfield AN** 1991 Development of follicles in the mammalian ovary. *Int Rev Cytol* 124:43–101
- Hisao O**, Yoshihiko M, Shinji O, Yoshihisa S, Yuji Y, Keizo S. 1995 Growth pattern and p53 overexpression in patients with early gastric cancer. *Cancer*;75:1454S-1459S.
- Hsueh A.J.W.**, Eisenhauer K., Chun Y.S., Hsu S.Y. and Billig H. 1996 Gonadal cell apoptosis. *Rec. Prog Horm Res.* 51:433–491.
- Hsueh AJW**, Adashi EY, Jones PB, Welsh Jr TH 1984 Hormonal regulation of the differentiation of cultured ovarian granulosa cells. *Endocr Rev* 5:76–127
- Hsueh AJW**, Billig H, Tsafiri A 1994 Ovarian follicle atresia: a hormonally controlled apoptotic process. *Endocr Rev* 15:707–724
- Hsueh AJW**, Eisenhauer K, Chun SY, Hsu SY, Billig H 1996 Gonadal cell apoptosis. *Recent Prog Horm Res* 51:433–455
- Huang EJ**, Manova K, Packer AI, Sanchez S, Bachvarova RF, Besmer P 1993 The murine steel panda mutation affects kit ligand expression and growth of early ovarian follicles. *Dev Biol* 157:100–109
- Hurwitz A.** and Adashi E. 1992. Ovarian follicular atresia as an apoptotic process: a paradigm for programmed cell death in endocrine tissue. *Molecular and Cell Endocrinol.* 84:19-23
- Jones E.C.** 1956 Ovarian follicle atresia: a hormonally controlled apoptotic process. *Endocrin. Rev.* 15:707-724. 1994
- Jones GS.** 1984 Update on in vitro fertilization. *Endocr Rev* 5: 62-75
- Kaipia A**, Hsueh AJ. 1997 Regulation of ovarian follicle atresia. *Annu Rev Physiol* 59:349–363.
- Kastan MB**, Zhan Q, El-Deiry WS, Carrier F, Jacks T, Wawsch WV. 1992 A mammalian cell cycle checkpoint pathway utilizing p53 and GADD45 is defective in ataxia-telangiectasia. *Cell* 71:587-597.
- Kaynard A.H.**, Periman L.M., Simard J. and Melner M.H. 1992 Ovarian 3 β -hydroxysteroid dehydrogenase and sulfated glycoprotein-2 gene expression are differentially regulated by the induction of ovulation, pseudopregnancy, and luteolysis in the immature rat. *Endocrinol.* 130:2192-2200.
- Krege JH**, Hodgkin JB, Couse JF, Enmark E, Warner M, Mahler JF, Sar M, Korach KS, Gustafsson J-A°, Smithies O. 1998 Generation and reproductive phenotypes of mice lacking estrogen receptor beta. *Proc Natl Acad Sci U S A* 95:15677–15682.
- Kroemer G.**, Petit P.X., Zanzami N., Vayssiere J.L. and Mignotte B. 1995 The biochemistry of programmed cell death. *FASEB J.* 9: 1277-1287.
- Kumar TR**, Low MJ, Matzuk MM. 1998 Genetic rescue of follicle-stimulating hormone beta-deficient mice. *Endocrinology* 139:3289–3295.

- Kumar TR**, Wang Y, Lu N, Matzuk MM. 1997 Follicle stimulating hormone is required for ovarian follicle maturation but not male fertility. *Nat Genet* 15:201–204.
- Kuroda H**, Terada N, Nakayama H, Matsumoto K, Kitamura Y 1988 Infertility due to growth arrest of ovarian follicles in SI/Slt mice. *Dev Biol* 126:71–79
- Lazebnik Y.A.**, Kaufmann S.H., Desmoyers S., Poirier G. and Earnshaw W.C. 1994. Cleavage of poly (adp-ribose) polymerase by a proteinase with properties like ICE. *Nature (Lond.)*, 371:346-347
- Lever HA** and Boyd GS. 1981. Action of gonadotrophin hormones and cholesterol side chain cleavage and cholesterol ester hydrolase in the ovary of the immature rat. *J reprod fertile* 63:101-108.
- Liu C.**, Kim N., Yang J., Jemmerson R. and Wang X. 1996 Induction of apoptotic program in cell-free extracts: requirement for dATP and cytochrome c. *Cell*, 86:147-157
- Ma S**, Kalousek DK, Yuen BH, Moon YS. 1997. Investigation of effects of pregnant mare serum gonadotropin (ECG) on the chromosomal complement of CD-1 mouse embryos. *J Assist Reprod Genet* Mar;14(3):162-9
- Malamed S**, Gibney JA, Ojeda SR 1992 Ovarian innervation develops before initiation of folliculogenesis in the rat. *Cell Tissue Res* 270:87–93
- Martin, S.J.** and Green R. 1995 Protease activation during apoptosis: death by a thousand cuts? *Cell*, 82:349-352.
- Martinou, J. C.**, Dubois-Dauphin-M. Staple, J. K., Rodriguez, I., Frankowski, H., Missotten M., Albertini P., Talabot D., Catsikas S., Pietra C. and Huarte J. 1994 *Neuron*, 13:1017-1030
- Matson PL** and Tiler JPP 1981. follicular steroid contents and oocyte meiotic status after ECG stimulations of immature hamsters. *J reprod fertile* 97:443-452
- McGee EA**, Hsueh AJ. 2000 Initial and cyclic recruitment of ovarian follicles. *Endocr Rev* 21:200–214
- McGee EA**, Perlas E, LaPolt PS, Tsafiriri A, Hsueh AJW 1997 Follicle-stimulating hormone enhances the development of preantral follicles in juvenile rats. *Biol Reprod* 57:990–998
- McGrath SA**, Esquela AF, Lee SJ 1995 Oocyte-specific expression of growth/differentiation factor-9. *Mol Endocrinol* 9:131–136
- Meijs-Roelofs HM**, Van Cappellen WA, van Leeuwen EC, Kramer P 1990 Short- and long-term effects of an LHRH antagonist given during the prepubertal period on follicle dynamics in the rat. *J Endocrinol* 124:247–253
- Meinecke B.**, Meinecke-Tillmann S. and Gips H. 1982. Experimentelle untersuchungen zur steroidsekretion intakter and atretischer follikel in vitro. *Berl. Munch Tierarztl Wochenschr.*, 95:107-111
- Mercer WE**, Shields Mt, Amin M, Sauve GJ, Appella E, Romano JW. 1990 Negative growth regulation in a glioblastoma tumor cell line that conditionally express human wild-type p53. *Proc Natl Acad Sci U S A* 87: 6166-6170.
- Miller BG.**, Armstrong DT. 1981. Superovulatory doses of pregnant mare serum gonadotropin cause delayed implantation and fertility in mature rats. *Biol reprod* 25: 253-260.

- Monniaux D**, Marianna JC, Gibson WR. 1984. action of ECG on follicular populations in the heifer. *J reprod fertile* 70:243-253
- Murdoch W.J.** 1992 Comparative morphometry and steroidogenic function of antral ovine follicles destined for ovulation or atresia. *Dom. Anim. Endocrinol.* 9(3): 219-224.
- Nakatani A.**, Shimasaki S., Erickson G.F. and Ling N. 1992 Tissue-specific expression of four insulin-like growth factor-binding proteins (1, 2, 3 y 4) in the ovary. *Endocrinol.* 131:2350.
- Owen K.** Davis M.D., Zev Rosenwaks M.D. 2001 Superovulation Strategies for Assisted Reproductive Technologies. *Semin Reprod Med* 19: 207-212
- Parrott JA**, Skinner MK 1998 Thecal cell-granulosa cell interactions involve a positive feedback loop among keratinocyte growth factor, hepatocyte growth factor, and Kit ligand during ovarian follicular development. *Endocrinology* 139:2240–2245
- Paynton BV**, Rempei R and Bachvanova R. 1990. changes in maternal RNAs during oocyte maturation in fertilization of mammals. *Bavister BD* pp 25-34
- Quirk S.M.**, Cowan R.G., Joshi S.G. and Henrikson K.P. 1995. Fas antigen-mediated apoptosis in human granulosa/luteal cells. *Biol. Reprod.* 52: 279-287
- Rajah R**, Glaser EM, Hirshfield AN 1992 The changing architecture of the neonatal rat ovary during histogenesis. *Dev Dyn* 194:177–192
- Richards JS** 1975 Estradiol receptor content in rat granulosa cells during follicular development: modification by estradiol and gonadotropins. *Endocrinology* 97:1174–1184
- Richards JS**, Russell DL, Robker RL, Dajee M, Alliston TN. 1998 Molecular mechanisms of ovulation and luteinization. *Mol Cell Endocrinol* 145:47–54.
- Robker RL**, Richards JS. 1998. Hormonal control of the cell cycle in ovarian cells: proliferation versus differentiation. *Biol Reprod* 59:476– 482.
- Rosado A.** y Rosales Torres AM 1991 Maduración folicular en el mamífero; Atresia determinantes bioquímicos. *Ciencia* 42:81-97.
- Rosales, A. M.** Hernández-Pérez, O, Domínguez, R., Mercado, E. and Rosado, A. 1990 "Proteolytic and Antiproteolytic Activities in Goat Antral Follicles". *Animal Reproduction Science* 23:213-222.
- Rosales Torres AM.** 1998. *Biología de la reproducción*, Capítulo 9 Atresia folicular. UAM-X, Pág. 200-261
- Rosales-Torres Ana María**, Avalos-Rodríguez Alejandro, Vergara-Onofre Marcela, Hernández Pérez Omar, Ballesteros Luz María, García-Macedo Rebeca, Ortiz-Navarrete Vianney and Rosado Adolfo. 2000. *Multiparametric Study of Atresia in Ewe Antral Follicles: Histology,, Flow Cytometry, Internucleosomal DNA Fragmentation and Lysosomal Enzyme Activities in Granulosa Cells and Follicular Fluid..* *Molecular Reproduction and Development.* 55:270-281.
- Roy SK**, Greenwald GS. 1989 Hormonal requirements for the growth and the differentiation of hamsters preantral follicles in long term culture. *J. Reprod Fertil* 87:103-114
- Sar M**, Welsch F. 1999 Differential expression of estrogen receptor-beta and estrogen receptor-alpha in the rat ovary. *Endocrinology*; 140: 963–971.

- Schwartz** and Osborne B.A. 1993 Programmed cell death, apoptosis and killer genes. *Immunol Today*, 14:582-590.
- Shimizu S.**, Narita M. and Tsujimoto Y. 1999 Bcl- family proteins regulate the release of apoptogenic cytochrome c by the mitochondrial channel VDAC. *Lett. to Nature*, 399:483-487.
- Sicinski P**, Donaher JL, Geng Y, Parker SB, Gardner H, Park MY, Robker RL, Richards JS, McGinnis LK, Biggers JD, Eppig JJ, Bronson RT, Elledge SJ, Weinberg RA 1996 Cyclin D2 is an FSH-responsive gene involved in gonadal cell proliferation and oncogenesis. *Nature* 384:470-474
- Speroff L**, Glass RH, Kase N. 1999 *Clinical Gynecologic Endocrinology and Infertility*, 6th ed. Philadelphia: Lippincott Williams & Wilkins 201-246.
- Tetsuka M**, Hillier SG. 1997 Differential regulation of aromatase and androgen receptor in granulosa cells. *J Steroid Biochem Mol Biol*; 61:233-239.
- Thompson C.B.** 1995 Apoptosis in the pathogenesis and treatment of disease. *Sci.* 267:1456-1462.
- Tilly J.L.**, Kowalski K.I., Johnson A.L. and Hsue A.J.W. 1991 Involvement of apoptosis in ovarian follicular atresia and postovulatory regression. *Endocrinol.* 129:2799-2801
- Tilly JL**, Billing H, Kowalski KI, Hsueh AJW. 1992. Epidermal growth factor and basic fibroblast growth factor suppress the spontaneous onset of apoptosis in cultured rat granulosa cells and follicles by a tyrosine kinase-dependent mechanism. *Mol. End* 6:1942-1959.
- Tilly JL**, Tilly KI, Kenton Maura and Johnson AL 1995. Expression of members of Bcl-2 gene family in the immature rat ovary: equine chorionic gonadotropin mediated inhibition of granulosa cell apoptosis is associated with decreased bax and consecutive Bcl-2 and Bcl-xlong messenger ribonucleic acid levels. *Endocrinology* 136:1
- Tsafriri A** 1997 Follicular development: impact on oocyte quality. In: Fauser BCJM (ed) *FSH Action and Intraovarian Regulation*. Parthenon Press, New York, pp 83-105
- Tsafriri A** Brawn RH. 1980. Experimental approaches to atresia in mammals. *Oxford rev. reprod biol.* 6: 266-275
- Tsafriri A**, Braw RH 1984 Experimental approaches to atresia in mammals. *Oxf Rev Reprod Biol* 6:226-265
- VanderHeiden M. G.**, Chandel N. S. Schumacker P. and Thompson C. B. 1999 *Mol. Cell.* 3:159-167.
- Vanderhyden BC**, Telfer EE, Eppig JJ 1992 Mouse oocytes promote proliferation of granulosa cells from preantral and antral follicles *in vitro*. *Biol Reprod* 46:1196-1204
- Vayssiere O' JL.**, Petit P. X., Risler Y. and Mignotte B. 1994 *Proc. Natl. Aca. Scie. USA* 91:11752-11756.
- Vendola K**, Zhou J, Wang J, Bondy CA. 1999 Androgens promote insulinlike growth factor-I and insulin-like growth factor-I receptor gene expression in the primate ovary. *Hum Reprod*; 14:2328-2332.

- Vendola K**, Zhou J, Wang J, Famuyiwa OA, Bievre M, Bondy CA 1999B. Androgens promote oocyte insulin-like growth factor I expression and initiation of follicle development in the primate ovary. *Biol Reprod* ; 61:353–357.
- Walton EA** and Evans G. 1983. Ovulation response and fertilization failure in immature rat induced to superovulate. *J reprod fertile* 67:91-96
- Wandji SA**, Srsen V, Voss AK, Eppig JJ, Fortune JE 1996 Initiation *in vitro* of growth of bovine primordial follicles. *Biol Reprod* 55:942–948
- Wang XN**, Greenwald GS 1993 Hypophysectomy of the cyclic mouse. I. Effects on folliculogenesis, oocyte growth, and follicle-stimulating hormone and human chorionic gonadotropin receptors. *Biol Reprod* 48:585–594
- Wassarman PM.**, and Albertin FD. 1994. The mammalian ovum en *Physiology of reproduction*. 2da ed. editado por Knobil E and Neill JD. Raven Press, Ltd NY pg. 79-122
- Wiensen J.F.** and Midgley R.A. Jr. 1993 Changes in expression of connexin 43 gap junction messenger ribonucleic acid protein during ovarian follicular growth. *Endocrinol.* 133:741-746
- Xiang J.**, Chao D.T., and Korsmeyer, S. J. 1996 Cell-death may no require interleukina 1-beta converting enzyme like proteases. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.*, 93:14 559-14563.
- Yen A**, Varvayanis S. 1994Late dephosphorylation of the Rb protein in G2 during the process of induced cell differentiation. *Exp Cell Res* 214:250-257.
- Yun YW**, Ho Yuen B., Moon YS. 1987. Effects of superovulatory doses of pregnant mare serum gonadotropin on oocyte quality and ovulatory and esteroid hormone responses in rat. *Gamete res.* 16: 109-120.
- Zanzami N.**, Marchetti P., Castedo M., Decaudin D., Macho A., Hirsch, T., Susin, S., Petit O.X. Mignotte B. and Kroemer, G. 1995 Sequential reduction of Mitochondrial Transmembrane potential and generation of reactive oxygen species in early programmed cell death. *J. Exp. Med.* 182:367-377
- Zanzami N.**, Susin S.A., Marchetti P., Hirsch T., Gómez-Monterrey L., Castedo M. and Kroemer G. 1996 Mitochondrial control of nuclear apoptosis. *J. Exp. Med.* 183:1533-1544.
- Zelevnik AJ**, Benyo DF 1994 Control of follicular development, corpus luteum function, and the recognition of pregnancy in higher primates. In: Knobil E, Neill J (eds) *The Physiology of Reproduction*. Raven Press, New York, pp 751–782

El jurado designado por la División de Ciencias Biológicas y de la Salud de la Universidad Autónoma Metropolitana Unidad Iztapalapa aprobó la presente tesis el día 14 de junio de 2002.

Dra. Ana María Rosales Torres



Presidente

Dr. Héctor Fernando Serrano



Secretario

Dr. Adolfo Rosado García

Vocal

Dr. Pablo Damián Matsumura



Vocal

M. en C. Clara Ortega Camarillo



Vocal