



**UNIVERSIDAD AUTONOMA METROPOLITANA-IZTAPALAPA**

**DIVISION DE CIENCIAS BIOLOGICAS Y DE LA SALUD**

**126931**

**ACTIVIDAD DE ALGUNAS ENZIMAS  
HIDROLITICAS EN FOLICULOS Y  
ENDOMETRIO DE RATAS  
SUPEROVULADAS**

**T E S I S**

**QUE PARA OBTENER EL GRADO DE  
MAESTRO EN CIENCIAS EN BIOLOGIA  
DE LA REPRODUCCION ANIMAL  
P R E S E N T A :  
MARTHA ELENA / BAÑOS TAPIA**

**DIRECTOR DE LA TESIS: DR. ADOLFO ROSADO GARCIA**

**México, D. F.**

**1992**

*[Faint stamp or text at the bottom of the page]*

126931

**SINODALES:**

**DR. ADOLFO ROSADO GARCIA.**

**DR. ROBERTO DOMINGUEZ CASALA.**

**M. EN C. JOSE LUIS CONTRERAS.**

**DR. OMAR HERNANDEZ PEREZ.**

**M. EN C. ANA MARIA ROSALES TORRES.**

**U. A. M IZTAPALAPA BIBLIOTECA**

*Dr. Adolfo Rosado Garcia*

## AGRADECIMIENTOS

Al Dr. Adolfo Rosado García mi profundo agradecimiento por su gran disposición en la dirección del presente trabajo, así como por su apoyo y confianza para llevar a cabo estos estudios.

Al Laboratorio de Biología Molecular del Instituto Mexicano del Seguro Social y de manera especial al Dr. Omar Hernández Pérez y la Q.F.B. Luz María Ballesteros por las sugerencias metodológicas en el desarrollo de esta tesis.

A la M. en C. Ana María Rosales Torres y la Q.F.B. Marcela Vergara Onofre por su amistad y su ayuda incondicional en el trabajo experimental.

A los miembros del Jurado por el tiempo que tan amablemente dedicaron a la lectura de este trabajo, así como por sus valiosos comentarios y sugerencias.

Al Consejo Nacional de Ciencia y Tecnología, por el apoyo financiero recibido.

A los Profesores del Departamento de Biología de la Reproducción por las enseñanzas recibidas.

## DEDICATORIAS

A mis padres: Sr. Amadeo Baños Silva.  
Graciela Tapia de Baños.

Con todo mi cariño, respeto y admiración, por el apoyo incondicional de siempre.

A mis hijos: César y Lourdes Elena.

Por quienes este sueño de la vida tiene más sentido.

A mi esposo: René Carlos Duchén Mostajo.

Porque me ha brindado confianza, tranquilidad y la dicha de compartir plenamente cada momento de mi vida.

Con amor fraternal a mi hermano Jesús, mi cuñada Rosa - María y mi sobrino Amadeito.

A la familia Duchén Mostajo con cariño y estimación.

A la familia Pérez Martínez por su amistad sincera e in condicional.

A la familia Murillo Silva quienes me brindaron su compañía y afecto en los buenos y malos momentos.

A mis familiares.

A mis compañeros de estudio: Ricardo, Marco, Demetrio y Mario, con quienes compartí dos años de inmensa alegría estu diantil.

I N D I C E

INTRODUCCION .....	1
MATERIAL Y METODOS.....	50
RESULTADOS.....	57
DISCUSION.....	71
BIBLIOGRAFIA.....	83

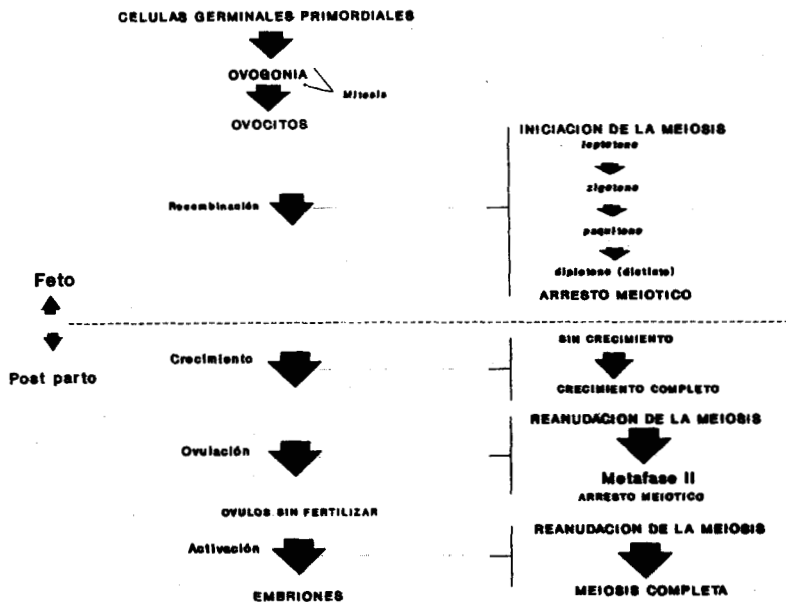
## INTRODUCCION

### **OVOGENESIS.**

En los mamíferos, la ovogénesis comienza al principio de la vida fetal y finaliza en la hembra adulta sexualmente madura. La ovogénesis inicia con la formación de las células germinales primordiales y abarca una serie de transformaciones celulares; de células germinales primordiales a ovogonia (feto), de ovogonia a ovocito (feto) y de ovocito a óvulo (adulto). Este proceso tan perfectamente sincronizado da como resultado una célula única que al unirse con el espermatozoide del macho, es capaz de dar origen a un nuevo individuo que expresa y mantiene las características de la especie (Fig. 1) (153).

Los óvulos se originan de las células germinales primordiales que tienen un origen extragonadal; la formación de estas células en los embriones presomíticos señala el inicio de la ovogénesis.

Las células germinales primordiales se encuentran inicialmente en la región alantoidea y se pueden reconocer por su tamaño, su forma y sus características citoquímicas; posteriormente, al principio por transferencia pasiva en el epitelio endodérmico y luego por movimientos ameboides, las células migran a través del mesenterio dorsal hasta la cresta genital, el sitio del desarrollo gonadal. Parece probable que durante la migración de las células germinales primordiales a la gónada, opere un mecanismo quimiotáctico.



**Fig. 1.- Ovogénesis en la rata.** Progresión de células germinales primordiales a ovocitos cuyo desarrollo se ha detenido, así como de los ovocitos que no están en desarrollo a óvulos fertilizados en las hembras adultas maduras sexualmente (153).

Las células germinales primordiales aumentan en número como resultado de su actividad mitótica continua y colonizan las crestas genitales; dichas células germinales son el origen único de las células germinales adultas. Es importante señalar que el origen y la migración de las células germinales primordiales a las crestas genitales, es semejante en el macho que en la hembra. En el caso del ovario, una vez que las crestas genitales han sido colonizadas completamente, las células germinales primordiales se mueven dentro de la corteza, y al mismo tiempo, con el apoyo de las células epiteliales dan origen a los cordones sexuales corticales. Los componentes somáticos del ovario se originan en el epitelio celómico y el mesénquima de la parte dorsal, formándose un ovario diferenciado con virtualmente todas las células sexuales primordiales convertidas en ovogonias que se dividen activamente en los cordones sexuales (8, 77).

Poco después de la última división mitótica, las ovogonias inician la meiosis, de modo que alrededor del nacimiento, en la mayoría de las especies, casi todos los ovocitos están finalizando el diploteno ("diploteno difuso"), o también llamado estado de dictioteno (10); estos ovocitos se encuentran rodeados por las células foliculares escamosas (10, 77, 119). Aproximadamente la mitad de estos ovocitos se pierden durante las primeras dos semanas después del nacimiento, sin embargo, en este mismo periodo muchos ovocitos (aproximadamente el 5%) empiezan a crecer. El inicio del crecimiento de los ovocitos aparentemente tiene una regulación intraovárica, de manera que



el número de ovocitos que entran a la fase de crecimiento está en función de la poza de ovocitos que no lo están. Los ovocitos y las células foliculares que lo rodean crecen coordinadamente progresando mediante una serie de estados morfológicos definidos (117, 119).

#### **CRECIMIENTO DEL OVOCITO.**

Durante la vida reproductiva de las hembras de los mamíferos, sus ovarios contienen un número determinado de ovocitos detenidos en el estado de dictioteno de la primera profase meiótica y no es sino hasta que los ovocitos alcanzan un tamaño determinado cuando son capaces de reiniciar la meiosis. Después, el crecimiento es continuo, terminando el ciclo reproductivo en la ovulación de un ovocito maduro, o en la degeneración (atresia) del ovocito y su folículo (74).

Al mismo tiempo que el ovocito crece, hay un aumento en el número de células de la granulosa que lo rodean y un agrandamiento del folículo. El crecimiento del ovocito depende de su acoplamiento metabólico con las células de la granulosa; in vitro, los máximos índices de crecimiento se observan cuando los ovocitos se cultivan asociados con células de la granulosa, sin que se rompan los contactos funcionales ovocito-células de la granulosa (53). Esto sugiere que las células de la granulosa producen alguna(s) sustancia(s) necesaria(s) para el crecimiento del ovocito que sólo puede transmitirse al ovocito mediante comunicaciones funcionales célula-célula.

Por otro lado, parece ser que el reclutamiento de los

ovocitos en el grupo en crecimiento, al igual que la adquisición de la capacidad meiótica dependen de las gonadotropinas hipofisiarias LH (Hormona Luteinizante) y FSH (Hormona Foliculo Estimulante) (12, 133); no obstante, cabe señalar que experimentalmente Blandau y colaboradores (17) demostraron que los ovocitos cultivados a partir de fragmentos ováricos de fetos de ratonas, crecen adecuadamente; al igual que en animales hipofisectomizados, y en cultivos in vitro (153). Daniel y colaboradores (32) cultivaron ovarios de ratas de 10-11 días, demostrando que los ovocitos crecen y adquieren la competencia meiótica en ausencia de esteroides o gonadotropinas. Sin embargo comentan que no puede excluirse la función de los esteroides en el desarrollo del ovocito ya que los folículos producen cantidades medibles de esteroides durante el cultivo.

Entre los cambios morfológicos importantes que acompañan al crecimiento del ovocito se encuentra el aumento de tamaño de la llamada vesícula germinal (GV); al mismo tiempo los nucléolos y los cuerpos extranucleolares muestran cambios característicos, progresivos, mientras que los cromosomas permanecen como bivalentes altamente difusos.

El crecimiento del ovocito implica el aumento substancial en el número de mitocondrias, que se acompaña de cambios marcados en su morfología. Los ovocitos pequeños contienen mitocondrias alargadas las que conforme el ovocito crece se tornan redondas u ovals y vacuoladas. Lo mismo ocurre con el Complejo de Golgi, el cual sufre cambios ultraestructurales

importantes durante esta época. En los ovocitos pequeños, las membranas del Golgi aparecen como cisternas arqueadas apiladas y aplanadas que están asociadas con muy escasas vacuolas o gránulos. Conforme el ovocito crece, se vuelven más activas, las cisternas se hinchan y aumentan en número, aparecen más vacuolas, gránulos y vesículas lipídicas. Estos cambios concuerdan con la importante participación del complejo de Golgi en el procesamiento y concentración de productos de secreción y la formación de gránulos corticales durante el crecimiento del ovocito. Los gránulos corticales son organelos pequeños, esféricos, unidos a membranas, parecidos a los lisosomas, que se encuentran en la región cortical de los óvulos maduros. Cuando ocurre la fertilización, estos gránulos se fusionan con el citoplasma y liberan su contenido (que contiene proteinasas) en el espacio perivitelino, alterando las propiedades funcionales de la zona pelúcida y actuando de esta manera como un bloqueo secundario para la polispermia. Otro cambio que se observa es el aumento del número y el diámetro de los ribosomas.

En esta etapa es cuando aparece también la zona pelúcida, la cual es una cubierta extracelular relativamente gruesa que rodea a todos los óvulos de los mamíferos y cuyo espesor aumenta conforme aumenta el diámetro del ovocito; los ovocitos que no están en crecimiento no tienen zona pelúcida (31, 49, 80).

La zona pelúcida aparece como un material formado por finos filamentos interpuestos entre el ovocito y las células

foliculares. Posteriormente, se transforma en una malla densa y gruesa de filamentos interconectados que rodea al ovocito y lo separa de las células foliculares. No obstante continúa el contacto entre el ovocito y la capa más íntima de células foliculares mediante complejas uniones que se forman entre las microvellosidades del ovocito y de las células foliculares que penetran a la zona pelúcida. Parece ser que la comunicación entre el ovocito y las células de la granulosa tiene una función importante en la transferencia de nutrientes y probablemente también esté involucrada en el desarrollo y la maduración del ovocito (32).

En los roedores, la aparición de la capacidad meiótica coincide con la formación del antro (12), en la cerda y la vaca, el antro folicular está diferenciado totalmente en los folículos de aproximadamente 0.5 mm; sin embargo en este tiempo el ovocito sólo ha alcanzado tres cuartas partes de su tamaño final y tiene una limitada capacidad de iniciar la maduración nuclear *in vitro* (108).

#### **CRECIMIENTO FOLICULAR.**

Las etapas finales del crecimiento del ovocito coinciden con el inicio del crecimiento del folículo. En una primera etapa comienza a observarse la formación de capas de células cuboidales de la granulosa (aprox. 900 células) y se empieza a distinguir la teca. Durante un periodo de varios días, mientras que el ovocito permanece en un tamaño constante, las células foliculares se dividen rápidamente, aumentando a más de 50,000

células, resultando en un Folículo de De Graaf, que en el ratón tiene un diámetro mayor de 600  $\mu\text{m}$ ; este folículo muestra un antro incipiente y conforme el antro se expande, el ovocito rodeado por células granulosas toma una posición acéntrica. La capa más interna de células de la granulosa toma una forma columnar y forma la corona radiada (Fig. 2).

El crecimiento del folículo puede ser dividido en 4 etapas según su tamaño, el número de células granulosas (o de capas de las mismas) en la membrana granulosa, el desarrollo de la teca, la formación del antro que se produce por la secreción del líquido folicular y la posición del ovocito dentro del cúmulo ovárico que lo rodea.

El folículo tipo 1 se denomina folículo primario debido a la capa celular simple que lo envuelve. Las células foliculares se multiplican y configuran dos capas de células alrededor del ovocito formando el folículo secundario. Posteriormente se formarán otras capas de células cuboidales, de modo que se constituirá una masa celular alrededor del ovocito en desarrollo; durante este tiempo la estructura se denomina folículo en crecimiento, hasta que las células foliculares terminan de multiplicarse y se separan para formar huecos rellenos de líquido, los cuales se fusionan para constituir la cavidad folicular denominada antro.

Durante el crecimiento del folículo los capilares sanguíneos invaden la capa de células que rodean al folículo y

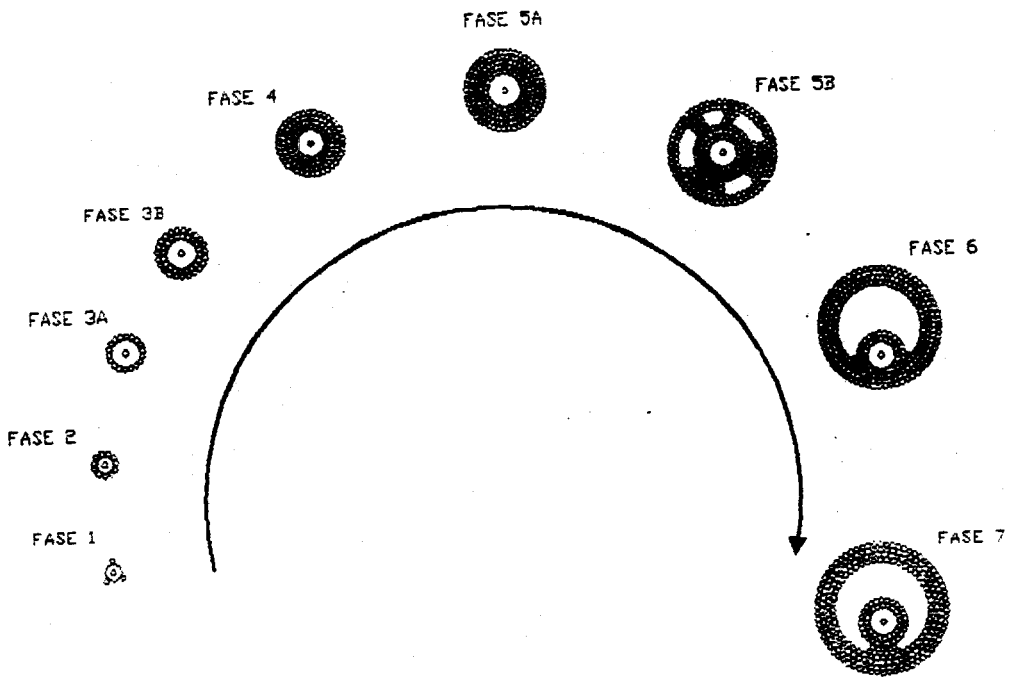


FIG. 2. CINETICA DEL CRECIMIENTO DEL FOLICULO (8).

juntos forman la capa vascular o teca interna. Esta capa está rodeada por los fibroblastos de la teca externa y es la principal fuente de sustancias nutritivas para la capa granulosa y el ovocito.

Cuando el folículo alcanza su tamaño máximo, recibe el nombre de folículo de De Graaf, y contiene un antro totalmente expandido dentro del cual se encuentra un ovocito que ocupa una posición lateral rodeado de dos o más capas de células de la granulosa. La capa más interna de células toma una forma columnar y constituye la corona radiada, que está separada del ovocito únicamente por la zona pelúcida. La disolución de estas células mientras el ovocito se encuentra dentro del folículo, es un signo seguro de que hay cambios degenerativos que llevarán a la atresia del folículo.

La cronología de las fases del crecimiento se ha estudiado mediante la incorporación de timidina tritiada en las células de la granulosa; de esta manera se ha podido determinar el tiempo de tránsito para cada fase folicular. Dichos estudios demostraron que el crecimiento folicular es un proceso continuo y que el número de folículos en cada una de las fases entre la 1 y la 3 fluctúa muy poco en relación con las fases del ciclo reproductor. Las poblaciones están por lo tanto en un estado de equilibrio y los folículos pasan de una fase a la siguiente para mantener este equilibrio dinámico.

### **MADURACION MEIOTICA.**

Se conoce como maduración meiótica al cambio del estado de dictioteno (ovocito) a la metafase II de la meiosis (óvulo), y se caracteriza por 1). disolución de la membrana nuclear (vesícula germinal) (GVBD), 2). condensación de la cromatina en bivalentes distintas, 3). separación de los cromosomas homólogos, 4). emisión del primer cuerpo polar y, 5). detenimiento meiótico, en el cual los cromosomas se encuentran alineados en el huso de la metafase II. Después de ser ovulados, estos óvulos, al ser fertilizados completan la meiosis, con la separación de las cromátides y la emisión de un segundo cuerpo polar (segunda división reductiva).

La maduración meiótica se refiere específicamente a la transformación del ovocito completamente desarrollado (que se encuentra en los folículos antrales) en un óvulo no fertilizado justo antes de la ovulación. Este proceso cuando se lleva a cabo en condiciones normales depende de la secreción endógena de las gonadotrofinas hipofisiarias (36, 78); o en condiciones experimentales por la administración exógena de las mismas (36, 37, 46, 146)

Cuando los ovocitos maduros de ratón se cultivan in vitro, en pocas horas pasan por la fase llamada Ruptura de la Vesícula Germinal (GVBD). Pocos minutos después de colocar al ovocito en un medio de cultivo, se observan ondulaciones suaves de la envoltura nuclear, que aumentan en intensidad durante las siguientes 1 o 2 horas. Posteriormente los poros desaparecen y la ruptura de la vesícula germinal se hace manifiesta



aproximadamente 3 horas después de que se inicia el cultivo.

Al progresar la maduración meiótica, los cromosomas (bivalentes) se condensan mucho, los quiasmas se mueven hacia el final de los cromosomas, la cromatina se vuelve heterocromatínica y contiene gránulos densos que aumentan de número conforme aumenta la condensación de los cromosomas; cuando los cromosomas están altamente condensados, pierden su contacto con los fragmentos de la envoltura nuclear y se alinean en el ecuador del huso de la Metafase I. Conforme se acerca la Anafase los cromosomas bivalentes se mueven hacia los polos opuestos del huso. El siguiente paso es la separación de los cromosomas homólogos seguida de la ruptura asimétrica del citoplasma del ovocito, que contiene la mitad del complemento cromosómico original (última Telofase), lo que dará origen al primer cuerpo polar, el que además de cromosomas contiene una pequeña cantidad de organelos.

Se desconoce el mecanismo que regula la maduración meiótica, así como la prolongada etapa de reposo del ovocito en el estado de dictioteno. En 1935, Pincus y Enzman (en 146) observaron que los ovocitos maduran espontáneamente cuando se liberan del folículo, lo que llevó a suponer que la meiosis es, de alguna manera, inhibida por el folículo. En varias especies se ha demostrado, que existe una acción inhibitoria sobre la maduración espontánea del ovocito, ejercida por las células de la granulosa (146) y por el fluido folicular (29, 146). No obstante cuando los ovocitos desnudados se cultivan, son capaces de lograr la maduración meiótica, pero raramente se desarrollan

más allá de la primera división (105), mientras que los ovocito que maduran in vivo son fértiles y capaces de desarrollar un producto normal (144).

Se han llevado a cabo diversos experimentos, con la finalidad de conocer el mecanismo fisiológico de la maduración meiótica tanto nuclear como citoplásmica del ovocito, que termina con el detenimiento meiótico, y se ha visto que varios compuestos impiden el proceso en diferentes etapas.

Son varias las moléculas a quienes se les implica en el mantenimiento del arresto meiótico, entre ellas se encuentra el adenosin monofosfato cíclico (cAMP) (20, 35, 36, 47), algunos péptidos (149), hormonas esteroides (23, 102, 104, 105, 116, 133) y las purinas (44, 48, 55, 56, 101).

#### cAMP.

In vitro, la maduración espontánea de los ovocitos de ratón, no ocurre cuando se cultivan en presencia de análogos del cAMP permeables a las membranas, tales como el db-cAMP y el 8-bromo-cAMP o los inhibidores de la fosfodiesterasa de los nucleótidos cíclicos, como la isobutil metilxantina y la teofilina (36, 131, 154). Además, cuando a los ovocitos que se cultivan en presencia de isobutil metilxantina se les administra una microinyección de fosfodiesterasa, se revierte el efecto inhibitorio de la isobutil metilxantina sobre la maduración, lo cual indica que el cAMP tiene un efecto inhibitorio sobre la maduración del ovocito (19).

En el ovocito, se ha identificado y caracterizado una presencia de Fosfodiesterasa, que está relacionada con la

membrana y es modulada por la calmodulina. Su actividad parece variar de alguna manera concomitante con la variación de las concentraciones de cAMP en el ovocito, durante la maduración espontánea, lo que sugiere que el cAMP interviene de alguna manera en el detenimiento meiótico en el estado de dictioteno. El descenso de las concentraciones intracelulares de cAMP puede disparar la señal del reinicio a la meiosis; de hecho, tanto in vivo, como in vitro, las concentraciones de cAMP disminuyen significativa justo antes de la GVBD (37).

De la misma manera, in vitro, otros agentes que elevan las concentraciones intracelulares de cAMP mediante la activación de la adenilato ciclasa, también evitan la maduración espontánea de los ovocitos de la rata y del ratón. El forskolin, que activa la adenilato ciclasa en preparaciones de células rotas y en tejidos intactos, ha mostrado un posible efecto inhibitorio sobre la maduración espontánea en ovocitos de rata y ratón desnudos o envueltos en su cumulus. Sin embargo, cuando se prolonga el tiempo de incubación, la mayoría de estos ovocitos reinician la meiosis, mismo efecto que se observa en los ovarios de coneja perfundidos con este compuesto. Las dosis de forskolin que aceleran la reanudación de la meiosis también estimulan la síntesis intrafolicular de cAMP. Sin embargo, la concentración de cAMP vuelve a las concentraciones iniciales que se observan en los ovarios no estimulados 6 h después de iniciar la perfusión. La capacidad del forskolin para inducir el reinicio de la meiosis sugiere que el aumento en la concentración del cAMP puede tomarse como

una señal inductora del y no como un factor importante en el arresto meiótico intrafolicular (35).

Resultados semejantes se observan en los experimentos de Yoshimura y Wallach (162) en los que, la perfusión transitoria de los ovocitos con  $(\text{Bu})_2\text{cAMP}$ , acelera significativamente el reinicio de la meiosis, lo cual no ocurre cuando la exposición de los ovocitos es continua y por un periodo de perfusión de 12 horas (36). Estos resultados indican que es posible que, después de la secreción de gonadotrofinas, se requiera la elevación transitoria y no continua de las concentraciones de cAMP en los folículos preovulatorios (162).

A partir de estos resultados se puede afirmar que:

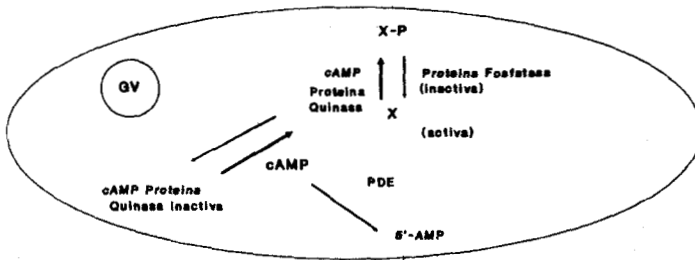
- El cAMP inhibe significativamente la maduración espontánea de los ovocitos rodeados por su cumulus, mientras que en los folículos preovulatorios, la elevación del cAMP induce el reinicio de la meiosis.
- La exposición continua al cAMP tiene un efecto inhibitorio sobre la maduración de los ovocitos dentro de los folículos preovulatorios, en tanto que la exposición transitoria acelera el reinicio de la meiosis. De manera alternativa, las concentraciones intrafoliculares elevadas de cAMP pueden ser un prerrequisito esencial para reanudar la meiosis durante el proceso de ovulación (35, 115, 150).

Como en muchas otras situaciones biológicas, el cAMP actúa mediante una proteína cinasa dependiente de cAMP. Esta es una enzima compuesta de 2 subunidades, una catalítica (C) y una

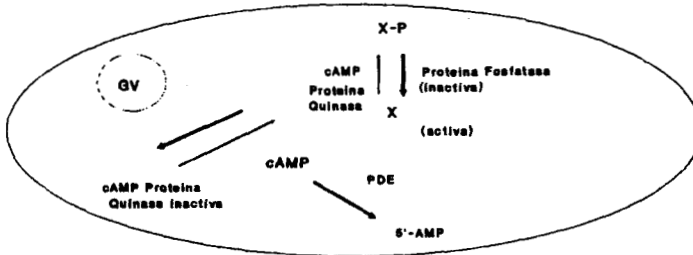
regulatoria (R); el complejo R:C es enzimáticamente inactivo, pero la unión del cAMP a la subunidad R (inhibitoria) produce la disociación del complejo y la activación de la subunidad C. Si para mantener el arresto meiótico es esencial que la PK fosforile continuamente una o más proteínas del ovocito, entonces las concentraciones de cAMP pueden regular la maduración meiótica al controlar la cantidad de subunidad C libre (bajo cAMP), cuando las fosfoproteínas pertinentes sean defosforiladas, se iniciará la maduración meiótica. Además, en condiciones experimentales, los cambios en los patrones de fosforilación de las proteínas de los ovocitos, concuerdan con este esquema regulatorio (19) (Fig. 3). Sin embargo, otras evidencias sugieren que el cAMP es sólo uno de los componentes de un complejo sistema que interviene en el detenimiento meiótico.

El hecho de que la calmodulina esté involucrada en el reinicio de la maduración meiótica, compromete también al calcio (21). In vitro, dos inhibidores del transporte transmembrana del calcio, el verapamil y la tetracaína, previenen la GVBD y aumentan la efectividad del dbcAMP como inhibidor de la maduración meiótica. De esta manera, las concentraciones intracelulares de calcio y cAMP pueden actuar sinérgicamente mediante un paso dependiente de calmodulina para regular la maduración meiótica del ovocito en los mamíferos.

### Mantenimiento del Arresto Meiótico



### Reinicio de la Maduración Meiótica



**Fig. 3.- Modelo de la regulación del arresto meiótico y reinicio de la meiosis.** El modelo propone que una fosfoproteína, X-P, mantiene el arresto meiótico, la forma defosforilada, X, promueve el reinicio de la meiosis. X es fosforilada por una proteína quinasa y X-P es defosforilado por una fosfoproteína fosfatasa; las actividades de estas dos enzimas determinan que los niveles de X-P y X se mantengan en un estado estable en el ovocito. La reanudación de la meiosis es iniciada por una disminución en el cAMP que lleva a la disminución en la actividad de la proteína quinasa. Si se asume que la actividad de la proteína fosfatasa no cambia, esta disminución en la actividad de la proteína quinasa puede inducir una defosforilación neta de X-P, marcando el reinicio de la meiosis (19).

Una hipótesis atractiva que se ha formulado es que la maduración meiótica se inhibe por la transmisión del CAMP entre las células foliculares y el ovocito, mediante uniones celulares comunicantes (gap-junctions).

Las uniones comunicantes representan regiones de continuidad física entre membranas celulares que funcionan como mediadores de comunicación intercelular y acoplamiento metabólico por el paso de pequeñas moléculas entre las células; de esta manera, una célula puede influenciar a otra funcionalmente diferente (69, 88).

Durante el crecimiento y la maduración meiótica, hay un acoplamiento iónico y metabólico entre el ovocito y las células del cumulus por medio de las uniones comunicantes mediante un sistema que emana de las células del cumulus y atraviesa la zona pelúcida y una red de uniones comunicantes que interconecta todas las células del folículo y el ovocito (68, 69, 157).

Justo antes de la ovulación hay una disminución significativa en el número de uniones comunicantes, al mismo tiempo que disminuye el acoplamiento iónico (38, 68, 157). Esto sugiere que in vitro, la maduración meiótica espontánea es el resultado de la remoción de los ovocitos de la influencia inhibitoria de las células foliculares.

En experimentos en la rata, se ha visto que en los ovocitos obtenidos 2 a 3 hr. después de administrar una dosis ovulatoria de hCG (Human Corionic Gonadotropin), el área neta de las uniones comunicantes entre las células del cumulus

disminuye aproximadamente 15 veces (87), lo cual está correlacionado temporalmente con la expansión del cumulus (87, 129). Sin embargo, el inicio de la maduración meiótica no se puede atribuir exclusivamente a la finalización de la comunicación intercelular entre las células del cumulus y el ovocito, ya que los análisis de criofractura demuestran que antes de iniciarse la GVBD disminuyen significativamente las uniones comunicantes en las células del cumulus, mientras que las uniones comunicantes entre el cumulus y el ovocito están intactas durante el periodo en que se reinicia la meiosis. En base a estos resultados los autores sugieren que para el control del detenimiento meiótico y la maduración del ovocito deben requerirse otros factores además de las uniones comunicantes entre el ovocito y el cumulus (157).

#### **Péptidos.**

Se ha observado que los ovocitos rodeados por su cumulus e injertados en células de la granulosa de folículos abiertos experimentalmente no reinician la meiosis, lo cual sí ocurre en los ovocitos desnudos. Por otro lado, Tsafiriri y Channing (148) observaron que la adición de células de la granulosa o fluido folicular a los cultivos evitaba la maduración espontánea de los ovocitos aislados. A partir de estos hechos se sugiere que el inhibidor de la maduración de los ovocitos (OMI), es un producto de las células granulosas que se encuentra en el fluido folicular y mantiene a los ovocitos en el estado de dictioteno de la primera profase meiótica (4, 137,



146, 147, 148, 149).

El OMI se aisló y purificó parcialmente del fluido folicular del cerdo, y se observó que se trataba de un polipéptido pequeño (137); cuyo peso molecular es menor de 2,000 daltones.

Centola y colaboradores (27) trabajando en folículos de cerdo y Channing y colaboradores (30) en humanos, demostraron que la concentración del posible factor se relaciona con la etapa de la maduración en la que se encuentre el ovocito dentro del folículo, de tal forma que en los folículos preovulatorios hay concentraciones de OMI relativamente bajas. El OMI no inhibe la maduración espontánea de los ovocitos desnudos (36), lo cual sugiere que la acción inhibitoria se ejerza mediante las células del cumulus (4, 146), por lo que es necesario que el OMI sea lo suficientemente pequeño para pasar a través de las uniones comunicantes entre el cumulus y las células del ovocito (146). Es posible que la acción inhibitoria del OMI sea potencializada por el cAMP, lo cual podría explicar algunos de los efectos del cAMP sobre los ovocitos envueltos en su cumulus que se observan in vitro (20, 47).

Existen dos hipótesis que explican la forma en que el OMI ejerce su acción inhibitoria, en ambas se sugiere que la actividad del OMI está mediada por un mecanismo hormonal (4, 12). Por un lado, Anderson y colaboradores (4) proponen que cuando se presenta la liberación preovulatoria de LH, su presencia termina la secreción de OMI por las células de la granulosa.

El mecanismo propuesto por Bar-Ami y Tsafriri (12) es similar; la LH induce la reanudación de la meiosis mediante la estimulación de las células de la granulosa, lo cual de alguna manera actúa suspendiendo la síntesis de OMI o factores inhibidores secundarios, al mismo tiempo que se induce la involución del mecanismo de acoplamiento metabólico evitándose el transporte de OMI a través de las uniones comunicantes.

Otros péptidos aparentemente funcionan como factores inhibidores de la maduración. Se ha detectado la presencia de un péptido de aproximadamente 10,000 daltones (72), que al parecer interfiere la acción activadora de la LH sobre la maduración de los ovocitos, y más recientemente, se ha identificado un nuevo péptido, más grande que el OMI y con mayor capacidad para inhibir la maduración del ovocito; este compuesto ha sido llamado factor preventivo de la maduración del ovocito (OMPF) y su función parece estar relacionada con la presencia de ciertos glucosaminoglicanos, principalmente con la heparina y el heparin sulfato en el folículo.

#### **Purinas.**

Otros compuestos que parecen tener alguna importancia en el detenimiento meiótico son las purinas. En los experimentos de Downs y colaboradores (44) se demostró que la hipoxantina se encuentra en el fluido folicular en concentraciones que pueden explicar una acción inhibidora sobre los ovocitos. En el fluido folicular del ratón además de la hipoxantina hay adenosina y las dos sustancias actúan sinérgicamente para inhibir la

maduración espontánea del ovocito de ratón (56).

La más potente de las purinas para inhibir la maduración de los ovocitos es la guanosina (44), que sin embargo no se encuentra en concentraciones detectables; no obstante, parece que la conversión de hipoxantina en un derivado de la guanina es importante en el efecto de la hipoxantina (45).

En cuanto a su eficacia se ha observado que el efecto de la adenosina es transitorio, pero la hipoxantina y la guanosina inhiben la maduración durante todo el experimento (24 horas); siendo la guanosina el compuesto más efectivo (44, 48).

Se ha observado que tanto la FSH (145) como el cAMP potencializan el efecto inhibitorio de las dos purinas, lo cual puede indicar que estos compuestos actúan conjuntamente en el detenimiento meiótico del ovocito (44, 56).

Con base en estos resultados Tornel y colaboradores (145) sugieren tres mecanismos teóricos para explicar el efecto inhibitorio de las purinas sobre el reinicio de la meiosis:

1. Inhibición de la fosfodiesterasa en el ovocito. El hecho que la hipoxantina y la adenosina aumenten las concentraciones de cAMP en el ovocito, y que el efecto inhibitorio de las purinas se anule con una microinyección de un inhibidor de la Proteína Cinasa dependiente de cAMP, puede indicarnos que el efecto sinérgico de las purinas con el cAMP posiblemente se deba a la inhibición de la fosfodiesterasa y por consiguiente no haya degradación de cAMP.
2. Conversión de derivados de la guanina a GTP. Como se

sugiere en los experimentos con inhibidores enzimáticos, los derivados de la guanina son importantes en el detenimiento meiótico, además que la guanosina es un inhibidor de la meiosis más potente que la hipoxantina, por lo que la guanosina puede ser degradada a guanina que es convertida a GMP por la enzima hipoxantina-guanina fosforil transferasa. El GMP puede ser fosforilado a GTP, el cual puede unir a proteínas importantes involucradas en la producción de cAMP.

3. Formación de cGMP a partir de GTP. El GTP es el sustrato para que la guanilato ciclasa produzca cGMP. En experimentos recientes se demostró que las concentraciones de GMP en el ovocito disminuyen antes de que se reinicie la meiosis y que la maduración espontánea puede ser retardada con una microinyección de cGTP en el ovocito y mediante la estimulación de la guanilato ciclasa en las células del cumulus. El aumento en el contenido de cGMP puede inhibir una fosfodiesterasa del ovocito.

#### Hormonas.

Se acepta ampliamente que el intermediario que marca el reinicio de la meiosis en el ovocito es la liberación de gonadotrofinas. Sin embargo, no es muy clara la respuesta individual de los compartimientos ováricos a los diferentes patrones de gonadotrofinas circulantes, las interacciones entre estas respuestas y los cambios que inducen estas hormonas en el microambiente folicular.

Aunque es muy probable que las células foliculares estén implicadas en la fase inductiva de la maduración, aún es incierta la naturaleza precisa de las señales que se transmiten de las células foliculares al ovocito. Sin embargo, es bien conocido que la reanudación de la meiosis se acompaña de cambios secuenciales en la concentración de esteroides foliculares (3, 104, 144), lo cual sugiere que los esteroides pueden actuar como señales inductoras en las primeras fases de la maduración (116).

En el experimento de Osborn y Moor (116) se midieron las concentraciones de hormonas esteroides foliculares alrededor del tiempo en que ocurre la liberación de LH, observándose que la LH estimula la secreción de andrógenos y estrógenos y posteriormente hay una marcada inhibición de la secreción total de esteroides, siendo la secreción de estrógenos inhibida antes que la de andrógenos. Posteriormente, conforme las concentraciones de estrógenos y andrógenos disminuyen, la proporción de progesterona aumenta, de tal manera que 18 horas después de la liberación de LH la progesterona forma el 90% del contenido intrafolicular de esteroides.

Por otro lado, en folículos cultivados en presencia de inhibidores de la esteroidogénesis como la aminoglutarimida (116, 161) y la 7-cloro-3,4-dihidro-2(3-piridil)-1-(2h)-naftalenona, se observa que la cantidad de ovocitos con desarrollo normal del pronúcleo se reduce significativamente y aumenta la proporción de ovocitos bloqueados en o antes de la metafase I. Estos resultados apoyan la hipótesis de que los

esteroides actúan como efectores de los cambios citoplásmicos en la maduración de los ovocitos. Además, cuando se alteran los perfiles normales de los esteroides secretados durante la maduración, se producen anomalías en el ovocito tanto bioquímicas como estructurales (116).

Cuando en experimentos de perfusión se utiliza cianocetona como un bloqueador de la síntesis de esteroides ovárica, los resultados que se obtienen son similares, lo que muestra que la producción de esteroides participa en la maduración citoplásmica del ovocito. La adición de estradiol al medio de perfusión revierte los efectos adversos de la cianocetona sobre la fertilidad del ovocito.

Estos resultados sugieren que para que se lleve a cabo una maduración normal del ovocito es necesario un balance preciso o secuencial de esteroides; siendo los estrógenos probablemente la señal esteroidea principal durante la fase inductiva crítica de la maduración (46, 116).

La hipótesis de que las gonadotrofinas no se requieren para el crecimiento y la capacitación meiótica del ovocito se apoya en los experimentos de Blandau y colaboradores (17) quienes demuestran que los ovocitos crecen hasta su tamaño máximo en cultivos de fragmentos ováricos de fetos de ratonas de 16 días; ya que este proceso no es modificado por la adición de gonadotrofinas o esteroides al medio.

Cuando se cultivan juntos los ovocitos de ratonas (54, 55) o ratas (32) prepúberes con sus células de la granulosa, crecen y desarrollan la capacidad meiótica en ausencia de

gonadotrofinas o esteroides. En este caso la adición de progesterona o estradiol al medio tampoco tiene efecto. No obstante, en el caso de la rata no debe excluirse una función para los esteroides ya que los folículos de la rata producen cantidades significativas de esteroides durante el cultivo aún en ausencia de gonadotrofinas en el medio; aunque el aumento en la actividad esteroidogénica del folículo y el desarrollo del ovocito pueden concordar sin que por ello estén relacionadas. Otra interpretación de estos resultados es que la función de las células foliculares es regulada por el ovocito en desarrollo (32).

En cuanto a los andrógenos hay dos puntos importantes: 1) En el ratón, ni la testosterona ni la dihidrotestosterona afectan la capacidad meiótica, pero ambos andrógenos suprimen el crecimiento del ovocito in vitro (89). 2) En los folículos de la cerda la 19-Nortestosterona y la testosterona no inhiben la maduración folicular, pero potencializan la acción inhibidora del (Bu)<sub>2</sub>CAMP (165).

#### **OVULACION.**

La ovulación es la culminación de la serie de eventos inducidos por las gonadotrofinas. Poco antes de que ocurra la ovulación, las células de la granulosa presentan cambios morfológicos funcionales que las hacen similares a las células del cuerpo lúteo, fenómeno que ha sido llamado "luteinización"; se reestructura la pared folicular y se rompe el folículo de De Graaf.

Los datos recopilados indican que un prerrequisito esencial para que se rompa el folículo es la descomposición de la capa de colágeno que lo cubre (162). A continuación se mencionan algunos factores que se han propuesto como los responsables de este fenómeno:

-Aumento de la síntesis de esteroides.

Aunque se ha estudiado extensamente, hasta la fecha no se aclara completamente cual es la función de las hormonas esteroides en el proceso de ovulación.

En la rata, el aumento preovulatorio de la progesterona (P) circulante favorece de la ovulación (97); mientras que, al administrar un antisuero anti-P (106) o cianocaroteno (un inhibidor de la actividad de la  $3\beta$ -hidroxiesteroide deshidrogenasa) (91) se inhibe significativamente la ovulación en ratas inmaduras (106).

En cultivo de tejidos, algunos compuestos como la LH, el cAMP y la P inducen un aumento marcado en la distensibilidad de la pared folicular y promueven la ovulación. Por lo que se sugiere que la LH estimula la síntesis folicular de P, que a su vez puede inducir un aumento de la actividad enzimática en la pared del folículo y en consecuencia aumenta la distensibilidad.

Se ha demostrado que la ovulación se puede inhibir suprimiendo la producción de esteroides mediante el uso de fosfato de aminoglutetimida (142). Sin embargo, también se ha reportado que en ratas inmaduras, la administración local de



aminoglutetimida in vivo inhibe la esteroidogénesis inducida por la hCG sin afectar la ovulación. Bullock y Kappauf (24) encontraron que la cianocetona evita la ovulación inducida por la hCG pero no afecta la síntesis de esteroides y observaron que la adición de 4-hidroxi-androstano-3,17-diona bloquea el aumento del estradiol inducido por la LH pero no evita la ovulación. Estos datos permiten sugerir que en las ratas inmaduras existe una disociación de la ovulación inducida por las gonadotrofinas y la esteroidogénesis, de manera que es probable que la ruptura del folículo pueda ser precipitada por un mecanismo diferente del estímulo esteroidogénico ovárico después de administrar gonadotrofinas (84).

#### **-Enzimas proteolíticas ováricas.**

La descomposición del tejido conectivo en el ápice de la pared folicular depende de la actividad de enzimas proteolíticas. Se piensa que las enzimas colagenolíticas, presentes en el folículo de De Graaf durante el proceso de ovulación juegan un papel importante en la ruptura de la pared folicular. Strickland y Beers (139) sugieren que las gonadotrofinas inducen la ovulación mediante el estímulo de la síntesis de un activador del plasminógeno en los folículos ováricos maduros. El activador del plasminógeno actúa sobre el plasminógeno en el fluido folicular y el tejido ovárico y se produce plasmina, que a su vez, rompe el tejido de la pared folicular. In vitro, se ha demostrado que las proteasas de serina son capaces de reducir la fuerza de tensión de la pared

del folículo.

Muchas proteasas de la serina e inhibidores de las proteasas que se piensa están involucradas en el proceso de la ruptura folicular son constituyentes normales del fluido folicular. La plasmina es una proteasa de la serina formada a partir del plasminógeno. Los inhibidores de proteasa de la serina plasmática tales como la  $\alpha$ 1-antiplasmina,  $\alpha$ 2-macroglobulina y  $\alpha$ 1-antitripsina reaccionan rápida e irreversiblemente con la plasmina e inhiben así su actividad de proteasa (162).

Después de administrar hCG, la eficiencia ovulatoria se reduce significativamente al adicionar inhibidores de proteasas de serina. Estos datos concuerdan con las observaciones de que en el criceto varios inhibidores de las proteasas microbianas bloquean completamente la ovulación. Sin embargo, la eficacia de la estreptoquinasa para inducir la ovulación es menor que el de la hCG y los agentes antiplasmina bloquean completamente la ovulación inducida por la hCG, por lo que para que ocurra la ruptura folicular posiblemente se requirieran otros componentes dentro del ambiente folicular preovulatorio, además del sistema que genera la plasmina.

Con base en estos resultados se puede proponer un modelo del mecanismo de la ruptura de la pared folicular en los mamíferos: Después de que ocurre la secreción de gonadotrofinas, las células de la granulosa producen el activador del plasminógeno, que es el responsable de la formación de plasmina. Al elevarse la concentración del

activador del plasminógeno en el folículo, se produce un incremento en las concentraciones intrafoliculares de plasmina. La plasmina y otras proteasas inducen la activación de la colagenasa latente en el tejido conectivo del folículo, por lo que la serie de sistemas enzimáticos que actúan localmente alteran la integridad estructural de la pared del folículo y facilitan la ruptura folicular (162).

En el proceso de la ovulación también se ha involucrado a las enzimas lisosomales (16, 25) ya que se ha observado una acumulación máxima de los lisosomas en el epitelio apical en los folículos preovulatorios. Este punto se trata con detenimiento en la sección que analiza la importancia de las enzimas lisosomales.

#### **-Reacción inflamatoria.**

Espey (59) propone que la secreción preovulatoria de las gonadotrofinas puede inducir una reacción inflamatoria en la pared de los folículos maduros. En los estudios utilizando preparaciones de ovario de coneja perfundidos, se ha demostrado la función de los mediadores químicos comunes de la inflamación, tales como las prostaglandinas y la histamina, en el proceso de la ruptura folicular.

#### **-Prostaglandinas.**

Existen evidencias que permiten sugerir que las prostaglandinas pueden ser importantes en el proceso de ovulación a través de sus acciones locales a nivel del ovario.

La administración sistémica de la indometacina (un inhibidor de la síntesis de prostaglandinas), inhibe la ovulación en la rata y el conejo. En monos rhesus tratados con gonadotrofinas, la inyección de prostaglandina F<sub>2</sub>α (PGF<sub>2</sub>α) revierte los efectos inhibitorios que produce la indometacina sobre la ovulación. Además, en preparaciones de ovario de coneja perfundidos la PGF<sub>2</sub>α induce la ovulación.

In vitro, las células de la granulosa de la rata tienen la capacidad de sintetizar prostacilina (PGI<sub>2</sub>) (83). La LH aumenta la capacidad de inducir a las células de la granulosa para convertir ácido araquidónico en 6-ceto- así como en PGE, por lo que se sugiere que la PGI<sub>2</sub> puede ser un mediador potencial de la función preovulatoria del ovario. La administración de hCG al medio de perfusión aumenta significativamente la producción de prostaglandinas, especialmente la PGI<sub>2</sub>, reflejada en su metabolito 6-ceto-PGF<sub>1</sub>α; la PGF<sub>2</sub>α y PGE representan menos de la mitad de la concentración de la 6-ceto-PGF<sub>1</sub>α. Estos datos suministran un apoyo más de la importancia de la PGI<sub>2</sub> en el proceso de ovulación (162).

Finalmente, Kitai y colaboradores (81) demostraron la presencia de alteraciones en la microvasculatura (vasodilatación, extravasación, etc.) de la pared del folículo ovárico de conejo durante el proceso de la ovulación. Estas observaciones indican que la ruptura folicular requiere de la vasodilatación y el aumento en la permeabilidad vascular dentro de la pared del folículo preovulatorio. Ya que la PGI<sub>2</sub> es un vasodilatador más potente que las otras prostaglandinas, y

además actúa como un mediador inflamatorio químico, como la PGE2, es posible que la PGI2 pueda ser el mediador más importante de los cambios vasculares perifoliculares durante la ovulación.

#### **-Histamina.**

En la rata (90), el conejo (107) y el criceto (86) se observa un aumento significativo de las concentraciones de histamina ovárica que coincide con la secreción de gonadotrofinas. El origen principal de la histamina son los mastocitos que se encuentran en el hilio ovárico y rodean a los vasos del ovario. Debido a que la liberación de histamina por los mastocitos se asocia con su degranulación y que la secreción de gonadotrofinas induce degranulación de los mismos, se sugiere que la liberación de histamina puede ser un evento fisiológico significativo en el proceso de la ovulación (86).

También se ha mostrado que la histamina, en ausencia de gonadotrofinas, es capaz de inducir la ruptura del folículo en ovarios de coneja perfundidos in vitro y la ovulación inducida por la histamina puede prevenirse con la cimetidina (bloqueador H2) lo cual da más apoyo a la actividad de la histamina en la estimulación de la ovulación. Sin embargo, ni la cimetidina ni la clorfeniramina (Bloqueador H1) pueden bloquear completamente la ovulación inducida por la hCG, lo cual suscita la posibilidad de que la hCG induce la ovulación mediante una activación de otros mediadores locales además de la histamina (162).

**-Contractilidad ovárica.**

La identificación de fibras del músculo liso en el estroma cortical y en la teca externa de los folículos ováricos ha llevado a proponer que el músculo liso ovárico puede participar en el proceso ovulatorio. En el conejo, se ha demostrado que la contractilidad aumenta conforme se aproxima la hora de la ovulación. Por lo que se sugiere que el aumento de la actividad del músculo liso ovárico mantenga la tensión constante en la pared del folículo en desarrollo, lo cual favorece la ruptura del folículo y facilita la expulsión del contenido folicular (124).

**-Aumento de la presión intrafolicular.**

Se ha propuesto que la ruptura del folículo se lleva a cabo como resultado de un aumento en la presión intrafolicular, ya que existen cambios dinámicos en la superficie del folículo alrededor del tiempo de la ovulación (60, 124, 125). Sin embargo, no se han demostrado cambios significativos en la presión intrafolicular de los folículos maduros que se aproximan a la ovulación (162).

**SUPEROVULACION.**

La administración de gonadotrofinas exógenas es una técnica bien establecida en diversas especies de mamíferos, que permite inducir la ovulación de un número normal o mayor (superovulación) de ovocitos. La superovulación tiene diversas

aplicaciones:

1. En el laboratorio con objetos de experimentación, para estudios analíticos del proceso y mecanismos de crecimiento, maduración y fertilización del ovocito.
2. En la ganadería con el fin de obtener un mayor número de óvulos con superioridad genética capaces de ser fertilizados in vitro y transferidos a hembras receptoras en programas de transferencia de embriones.
3. En mujeres, para obtener una mayor cantidad de óvulos que pueden ser fertilizados in vitro y transferidos al útero como un medio para establecer la gestación en ausencia de oviductos funcionales.

La técnica de superovulación se originó a partir de los experimentos en ratas llevados a cabo por Engle en 1927 (en 18); varios años después se indujo en cricetos dorados inmaduros (18, 160) y maduros (70).

Hay dos tipos de hormonas que se utilizan frecuentemente para inducir la superovulación; estas son la PMSG (Pregnant Mare Serum Gonadotropin) y la hCG, las cuales son gonadotrofinas extrahipofisiarias, aunque también se llegan a utilizar las gonadotrofinas hipofisiarias LH y FSH.

La hCG fue descubierta en 1927 por Ascheim y Zondek al estudiar las hormonas excretadas en la orina de la mujer embarazada. Esta hormona que se produce en la placenta; es una glucoproteína que contiene galactosa, hexosamina y manosa, y tiene un PM de 100,000 daltones. La parte glúcida representa alrededor del 30% de su peso (77).

Los efectos de la PMSG fueron observados por primera vez en 1930 por Cole y Hart. Es una glucoproteína producida por los cálices endometriales del útero de la yegua preñada, por lo que se considera de origen fetal y no materno. Su efecto gonadotrófico es similar al de las gonadotrofinas hipofisiarias LH y FSH (130).

El uso de las gonadotrofinas en los campos mencionados anteriormente se ha vuelto una práctica normal de mucho valor. Sin embargo, parece que las dosis superovulatorias utilizadas provocan algún tipo de deterioro en la fertilidad de los ovocitos, la cual se refleja en: disminución de la frecuencia de fertilización (152), fracasos en la implantación (6, 99, 100) y alta frecuencia de anormalidades en los embriones recuperados (99, 163), tanto en animales domésticos (6, 62) como de laboratorio (2, 13). Sin embargo aún no se ha mostrado si las alteraciones principales ocurren en el ovocito antes o después de la ovulación (98, 99, 163).

Con el fin de identificar las causas de estas anormalidades en los ovocitos superovulados, sobre todo los factores que determinan el número y la calidad de los ovocitos, además de conocer la fisiología y bioquímica de la superovulación, se han llevado a cabo estudios que enfocan el problema desde varios puntos de vista.

La disminución de la fertilidad se relaciona directamente con la dosis de gonadotrofinas que se administra. Se ha observado que las dosis "fisiológicas" de PMSG (4-8 UI) producen óvulos que al ser fertilizados son capaces de



desarrollarse normalmente sin que haya pérdidas embrionarias o fetales significativas (112); sin embargo, al aumentar la dosis (20 UI) se observan algunas anormalidades embrionarias sobre todo al principio de la gestación (99) que aumentan cuando se utilizan dosis mayores (40 UI) (164).

Miller y Armstrong (98) observaron que la dosis de 16 UI de PMSG produce una ovulación normal, pero la implantación se retarda en el 30% de los animales, lo que provoca que disminuya el número de animales que llevan sus fetos a término. Cuando se administran 40 UI de PMSG, los ovocitos ovulados son inmaduros y con menos células en el cumulus que los normales. Además, los óvulos de estos animales que se recuperan al tercer día aparecen degenerados y 5 días después de la ovulación no se observan blastocistos en el útero y no se produce gestación.

Como una de las causas de las anormalidades embrionarias se mencionan las anormalidades cromosómicas. En comparación con mujeres no tratadas, Boué y Boué (22) observaron un aumento significativo en el número de trisomías en los fetos abortados de mujeres a quienes se les había inducido la ovulación. En el ratón el tratamiento con gonadotrofinas produjo un aumento significativo en el número de fetos deformes (50). Maudlin y Frazer (96) utilizaron dosis de 5 y 10 UI y observaron una relación dosis-respuesta entre la PMSG y la incidencia de poliploidías, principalmente triploidías, sugiriendo que estas anormalidades se produjeron como resultado de polispermia, lo cual se explica por defectos en la Zona Pelúcida.

Champlin y colaboradores (28) estudiaron al microscopio

electrónico los efectos de dos dosis de PMSG inyectadas a ratonas maduras e inmaduras. Observaron que las células de los blastocistos de ambos grupos tenían menos microvellosidades y más áreas lisas que los no tratados. La presencia de microvellosidades en la superficie de las células embrionarias se asocia con el grado de mitosis (26), de manera que es posible que los blastocistos provenientes de las hembras testigo, en el momento en que se recolectaron los blastocistos (justo antes de la implantación), tuvieran un mayor índice de mitosis en comparación con las hembras tratadas. Por otro lado, se dice que un fenómeno importante en la implantación es la interrelación entre las microvellosidades de las células del trofoblasto del embrión y las microvellosidades del útero, de manera que es posible que los blastocistos con pocas microvellosidades tengan poca oportunidad de implantación (28).

Moor y colaboradores (103) sugieren que las dosis elevadas de PMSG aumentan la eficiencia de la esteroidogénesis ovárica y activan prematuramente a los ovocitos, produciéndose anomalías debidas probablemente al ambiente folicular inadecuado para su maduración y la sobremaduración al momento de ser ovulados. De la misma manera, Miller y Armstrong (98) y Walton y Armstrong (151) observaron, en ratas inmaduras superovuladas, picos excesivos de hormonas esteroides ováricas (sobre todo de estradiol) antes y después del tiempo de ovulación esperado.

Parece probable que el tratamiento superovulatorio induzca la ovulación de muchos ovocitos que se encuentran dentro de

folículos totalmente desarrollados pero atrésicos, que en ciclos normales no tienen oportunidad de ovular. De manera contraria también pueden ser activados prematuramente algunos ovocitos que no tienen la "edad" adecuada para ser ovulados. Estos dos grupos de ovocitos probablemente contribuyen a la producción de las anomalías encontradas durante la superovulación. Yun y colaboradores (164) observaron que las dosis de 20 y 40 UI de PMSG producen un alto porcentaje de ovocitos anormales con signos visibles de degeneración (contracción del citoplasma, fragmentación, partenogénesis). El porcentaje de ovocitos anormales aumentó de una manera dosis dependiente, de tal forma que con 20 UI el porcentaje mayor de anomalías se observó a las 72 hr y fue del 35 %, y con 40 UI a las 60 hr y fue del 60%.

Yun y colaboradores (165) realizaron un estudio minucioso de la morfología de la maduración del núcleo en ovocitos de ratas inmaduras tratadas con 4 UI (testigo) y 20 UI de PMSG. Los ovocitos se recuperaron después de 24, 48 y 72 hr de la administración de la PMSG (Tabla 1). Se observa que a las 72 horas, la mayoría de los ovocitos provenientes de los animales testigo se encontraban en la Metafase II, mientras que en los superovulados se observaron ovocitos con maduración nuclear que variaba desde la Profase I hasta la Metafase II a las 24, 48 y 72 horas. Estos resultados muestran que la PMSG induce ovulaciones atípicas con una maduración nuclear prematura o asincrónica.

**TABLA I. Efectos del tratamiento superovulatorio sobre la maduración nuclear de los ovocitos recuperados de los oviductos en ratas.**

Tiempo después de adm. PMSG (hr)	Estados de la meiosis (%)				
	Profase I	Anafase I	Telofase I	Metafase I/II	Indetex minado
Control <sup>b</sup> 72	--	1 (1.8)	--	51 (91.0) <sup>c</sup>	4 (7.1)
Superov <sup>d</sup> 24	10 (66.7)	--	--	--	5 (33.3)
48	19 (23.2)	13 (15.9)	--	39 (47.6)	11 (13.4)
72	1 (0.9)	51 (44.7)	7 (6.1)	45 (39.5)	10 (10.8)

<sup>b</sup> Ratas a quienes se dieron 4 UI de PMSG.

<sup>c</sup> Ovocitos que mostraron configuración típica de metafase II.

<sup>d</sup> Ratas a quienes se dieron 40 UI de PMSG.

Referencia (166).

El mecanismo preciso por el cual la PMSG produce la superovulación no es completamente claro, aunque parece que se relaciona con el aumento de la esteroidogénesis ovárica. Según Sasamoto y colaboradores (130), el hecho de que la PMSG tenga una vida media prolongada (54-60 hr) y su actividad predominantemente parecida a la de la FSH, pueden ser las responsables de la activación prematura de los ovocitos, especialmente en aquellos folículos que muestran un alto grado de diferenciación de receptores en el momento en que se administra la gonadotropina (103).

Los estudios del curso temporal de la superovulación usando varios depresores del SNC (76, 135) e hipofisectomía sugieren que en las ratas inmaduras la liberación endógena de LH se produce 53-57 hr después de la administración de PMSG. Sin embargo, en una investigación llevada a cabo por Yun y colaboradores (164) se observó que puede haber ovulaciones ya a las 24 hr después de la inyección de PMSG.

En este estudio se inyectaron ratas inmaduras (de 28 días) con dosis de 4, 20 y 40 UI de PMSG. Los animales se sacrificaron cada 6 o 12 horas; se determinaron las concentraciones de hormonas esteroides en sangre y homogeneizado del ovario y se confirmó la ovulación contando los ovocitos en el oviducto. Los resultados se muestran en la Fig. 4 donde se observa que las dosis superovulatorias (20 o 40 UI de PMSG) inducen una primera ovulación alrededor de 24-36 hr y un segundo pico entre las 48 y 72 hr dependiendo de la dosis.

El número de ovocitos que se recuperaron en la primera ovulación fue similar al que se obtiene en una ovulación normal (aproximadamente 15 ovocitos por rata), pero en la segunda aumentaron a más de 58 ovocitos por rata.

Estos resultados parecen indicar que la respuesta a las dosis superovulatorias de PMSG posiblemente se lleva a cabo por mecanismos diferentes dependiendo del tiempo que transcurra después de la inyección.

Las hormonas esteroides ováricas regulan la respuesta ovulatoria, las concentraciones plasmáticas de estrógenos (E) inducidas por la administración de PMSG, ejercen su efecto estimulador sobre el hipotálamo y adicionalmente la progesterona (P) junto con los E facilita la liberación de las gonadotropinas en las ratas inmaduras (73). Esta acción facilitadora puede deberse a la disminución del umbral hipotalámico para liberar el Factor Liberador de Gonadotropinas, de manera que la primera ovulación puede ser el resultado del efecto parecido al de la LH que tiene la PMSG (103). No obstante la presencia de anomalías ovocíticas en esta primera ovulación probablemente se debe a un ambiente folicular inapropiado para su maduración y a una sobremaduración en el momento en que ocurre la ovulación.

La segunda elevación en la tasa de ovulación puede haber sido provocada por la liberación endógena de LH mediante un estímulo de retroalimentación positiva iniciada por la elevación de los esteroides o pudo haber sido provocado por las actividades endógenas y exógenas de la LH (164).

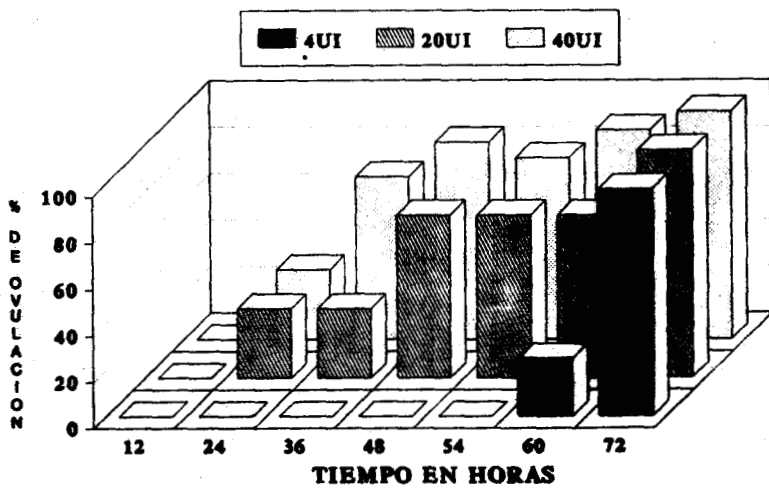


Fig. 4.- % de ratas que ovularon después de la inyección de 4, 20 o 40 UI de PMSG. (165) Ver texto.

La superovulación provoca un aumento temprano y prolongado en las concentraciones séricas de E y P, pero sobre todo se observa una elevación persistente de andrógenos (A), la cual parece de gran importancia, ya que la administración del antiandrógeno flutamida después de una dosis superovulatoria de PMSG mejora parcialmente el desarrollo potencial de los ovocitos después de que son fertilizados (164).

En el fluido folicular también se observan alteraciones en la concentración de esteroides provocadas por la superovulación. Se altera el contenido de P y particularmente A, consecuentemente se modifican los cambios secuenciales en las relaciones de A/P, P/E y P/A.

Miller y Armstrong (99) observaron que en la rata superovuladas se pueden obtener gestaciones y fetos aparentemente normales, si se ovariectomizan dentro de las 24 horas posteriores a la ovulación y fertilización y se da un régimen hormonal apropiado para sensibilizar al útero. Estos resultados sugieren que lo que interfiere el desarrollo normal de la gestación es un ambiente hormonal uterino inadecuado, y no los defectos en la maduración del ovocito, la ovulación o la fertilización.

Walton y colaboradores (152) neutralizaron una dosis de 40 U.I. de PMSG con un antisuero anti-PMSG y transfirieron los embriones a ratas receptoras. El porcentaje de ovocitos recuperados y fetos viables (aproximadamente el 50%) fue similar, por lo que concluyeron que la pérdida del 50% de los blastocistos no fue el resultado de anomalías



blastocísticas sino que el tratamiento superovulatorio causó un cambio en el ambiente uterino que no pudo evitarse completamente con el antisuero.

Con base en lo anterior se puede afirmar que las investigaciones para tratar de conocer el origen de las anomalías provocadas por la superovulación han tenido principalmente un enfoque esteroideogénico y morfológico, sin que hasta ahora se tenga un conocimiento preciso de los cambios bioquímicos que participan en la presentación de todos estos fenómenos. Por esto, nuestro interés es dirigir esta investigación al estudio de la participación de las enzimas lisosomales tanto a nivel del endometrio como en los diferentes compartimientos del folículo.

Como hemos visto, el ovario adulto es un sistema complejo que contiene diversas estructuras con funciones diferentes, y cuya fisiología cambia con la etapa del ciclo en que se encuentre. En el ovario, como en otros sistemas morfogenéticos, los procesos de diferenciación normal se acompañan de regresión o degeneración. En éste proceso, así como en algunos otros en que participan fenómenos de remodelación tisular, juegan un papel muy importante las hidrolasas lisosomales.

A finales de los años cincuenta el estudio de las enzimas líticas entró en una nueva fase cuando de Duve y colaboradores (33) sugirieron que la enzima fosfatasa ácida y otras enzimas involucradas en procesos de ruptura tisular y regresión estaban contenidas en partículas subcelulares llamadas lisosomas.

Durante el ciclo estral, el ovario, el oviducto y el útero

requieren de la acción de las hidrolasas para asegurar la degradación de las macromoléculas que acompañan la ovulación y proliferación del endometrio.

Se han llevado a cabo varios estudios citoquímicos, histoquímicos y bioquímicos, para conocer la variación de algunas enzimas lisosomales en los órganos de la reproducción de la hembra, tanto in vivo como in vitro.

En experimentos in vitro se ha observado que las hormonas esteroides pueden actuar directamente sobre las membranas lisosomales (39, 155). Cuando se incuban ovarios en presencia de PMSG se observa una disminución de la fosfatasa y ribonucleasa ácidas, lo cual sugiere que es posible que la gonadotrofina tenga un efecto estabilizante sobre las membranas de los lisosomas, lo que in vivo podría ayudar a la PMSG a estimular el crecimiento folicular (39).

Mediante métodos histoquímicos, en experimentos in vivo llevados a cabo en rata, se observó que después de promover el desarrollo folicular mediante la administración de una dosis superovulatoria de PMSG, los folículos antrales de los ovarios contenían más productos de reacción que los folículos preantrales de los testigo. Específicamente, las células esteroidogénicas de la teca mostraron más productos de reacción dentro de grandes vesículas densas y el aparato de Golgi y múltiples sitios de reacción dispersos asociados con el retículo endoplásmico liso. Estos resultados permiten sugerir que el sistema lisosomal del ovario está involucrado en algunos aspectos de la esteroidogénesis, posiblemente promoviendo la

disponibilidad de sustratos para la síntesis de esteroides, facilitando la secreción de los mismos, o ambos.

Utilizando la misma metodología se ha observado que la regresión folicular en el ovario adulto se acompaña de la presencia de vacuolas autofágicas de gran tamaño; que son un tipo de lisosoma secundario (92). Por otra parte, en varios mamíferos se ha determinado la actividad de la fosfatasa ácida y se ha visto que se forma en las células de la granulosa y su actividad aumenta cuando el folículo se vuelve atrésico (71, 118).

Dado que la ovulación no depende de un aumento en la presión intrafolicular (60, 124), los investigadores involucraron a las enzimas colagenolíticas en el proceso de ovulación (57, 61). Después de la liberación de LH, cambia la actividad esteroidogénica del ovario, lo que provoca un aumento en la síntesis de enzimas proteolíticas en el epitelio que cubre los folículos preovulatorios; estas enzimas se sabe que están involucradas en la desintegración de la pared del ápice del folículo. Además, Cajander y Bjersing (25) observaron una acumulación máxima de lisosomas en el epitelio apical de los folículos preovulatorios 8 hr después de administrar una dosis superovulatoria de hCG; estos lisosomas desaparecieron en el transcurso de la última hora antes de la ruptura del folículo (16, 25). De este modo, la presencia de enzimas en el fluido folicular puede servir como marca de una ovulación inminente e indicar la presencia de un ovocito maduro, pero sobre todo, es posible que estas enzimas tengan un efecto directo sobre el

óvulo mediante su acción en la zona pelúcida, preparándolo para la penetración del espermatozoide. Esta hipótesis se apoya en evidencias de que los cambios en la fosforilación de los componentes del óvulo juegan un papel importante en los eventos de maduración y capacitación del ovocito y en la fertilización (58).

Al estudiar las capas de la pared folicular de ovarios de coneja perfundidos in vitro, se observa que la fosfatasa ácida se encuentra virtualmente en todos los tipos de células de la pared del folículo y su actividad parece intensificarse antes de la ovulación en la túnica albugínea y la teca externa. Alrededor del tiempo de la ovulación, hay una actividad importante de fosfatasa ácida en las células de la granulosa, que puede ser importante en la división mitótica que se lleva a cabo en estas células durante los primeros estados de luteinización. Los autores sugieren que la fosfatasa ácida (y enzimas relacionadas) están involucradas en el reacomodo del tejido folicular que se presenta durante la ovulación y al iniciarse la luteinización de las células del folículo ovárico (111). La actividad de la fosfatasa ácida se ha asociado con la regresión del cuerpo lúteo (CL) (41). En la rata, durante la gestación, la actividad enzimática en el CL varía inversamente con la concentración de P en la sangre (132).

Por último, se han llevado a cabo estudios de la actividad enzimática en el endometrio durante el ciclo estral, los cuales han proporcionado valiosa información acerca de los cambios metabólicos que ocurren en ésta parte del aparato reproductor

de la hembra, sobre todo los relacionados con la regresión e implantación del ovocito (66, 75, 126).

Se dice que las enzimas lisosomales participan en la rápida regresión de tejidos que precede a la ovulación sin fertilización; en los mamíferos inferiores mediante la rápida regresión de tejidos (134) y en los primates y el hombre mediante el complejo fenómeno conocido como menstruación (75, 126).

Mediante estudios histoquímicos (66), y bioquímicos (126) del endometrio durante el ciclo menstrual, se ha observado que en la fase proliferativa se desarrolla el sistema de Golgi y hay un aumento continuo en el número de lisosomas, mientras que durante la fase secretora hay un aumento significativo de la actividad de la fosfatasa ácida (66, 126), glucosaminidasa y  $\beta$ -glucuronidasa (126). El aumento en las actividades enzimáticas que se observa durante la fase secretora es posible que sea provocado por la presencia de hormonas esteroides que actúen desestabilizando la membrana lisosomal (126).

En el endometrio de los mamíferos con ciclos de cuatro días como la rata, se observa también un aumento en la actividad enzimática (66). Estos cambios, seguramente tienen importancia en el proceso de implantación del ovocito. Se ha observado que los lisosomas del epitelio del endometrio destruyen el citoplasma justo antes o durante la implantación, removiendo de esta manera la barrera para la penetración del trofoblasto en el epitelio uterino (1). En el criceto se observa un aumento en el contenido de hidrolasas lisosomales

alrededor del día 3.5 del ciclo, que corresponde al periodo de preimplantación. Además, estas actividades enzimáticas son aún más pronunciados cuando se da una dosis superovulatoria de PMSG (123). Si estas observaciones se relacionan con el hecho que alrededor del tiempo de la implantación ocurre un pico de estrógenos, se puede pensar que la implantación depende estrictamente de la liberación de enzimas, las cuales a su vez son reguladas endocrinológicamente (121).

## MATERIAL Y METODOS

Se utilizaron ratas hembras Wistar inmaduras, obtenidas a los 24 días de edad del Bioterio de la U.A.M.-Xochimilco; las cuales se mantuvieron bajo condiciones de luz y temperatura controladas, alimentadas con nutrimentos estándar para ratas y agua ad libitum.

A la edad de 28 días y con un peso de alrededor de 60 gramos, las ratas recibieron 4 U.I. (dosis testigo) o 40 U.I. (dosis superovulatoria) de PMSG (164).

Las ratas se sacrificaron por dislocación cerebral. 48 horas después de la inyección se obtuvieron los ovarios y se colocaron en medio Hepes 0.1 M pH 7.0, frío.

Inmediatamente se disecaron los folículos bajo el microscopio estereoscópico equipado con fuente de iluminación eléctrica, aumento de 120 x (AMERICAN OPTICAL INSTRUMENT COMPANY). Durante todo el proceso de disección los folículos se mantuvieron en cajas petri, sumergidos en medio hepes y en un baño de hielo para mantener la temperatura de la solución a 4°C (Fig. 5).

El esquema de trabajo se eligió con base en los estudios de Yun y colaboradores (164), en los que la primera ovulación significativa se observa 48 horas después de administrar 40 U.I. de PMSG, posteriormente a las 60 y 72 horas hay otros dos picos de ovulación mayores que el primero, lo cual nos asegura a las 48 horas la obtención de un gran número de folículos maduros.

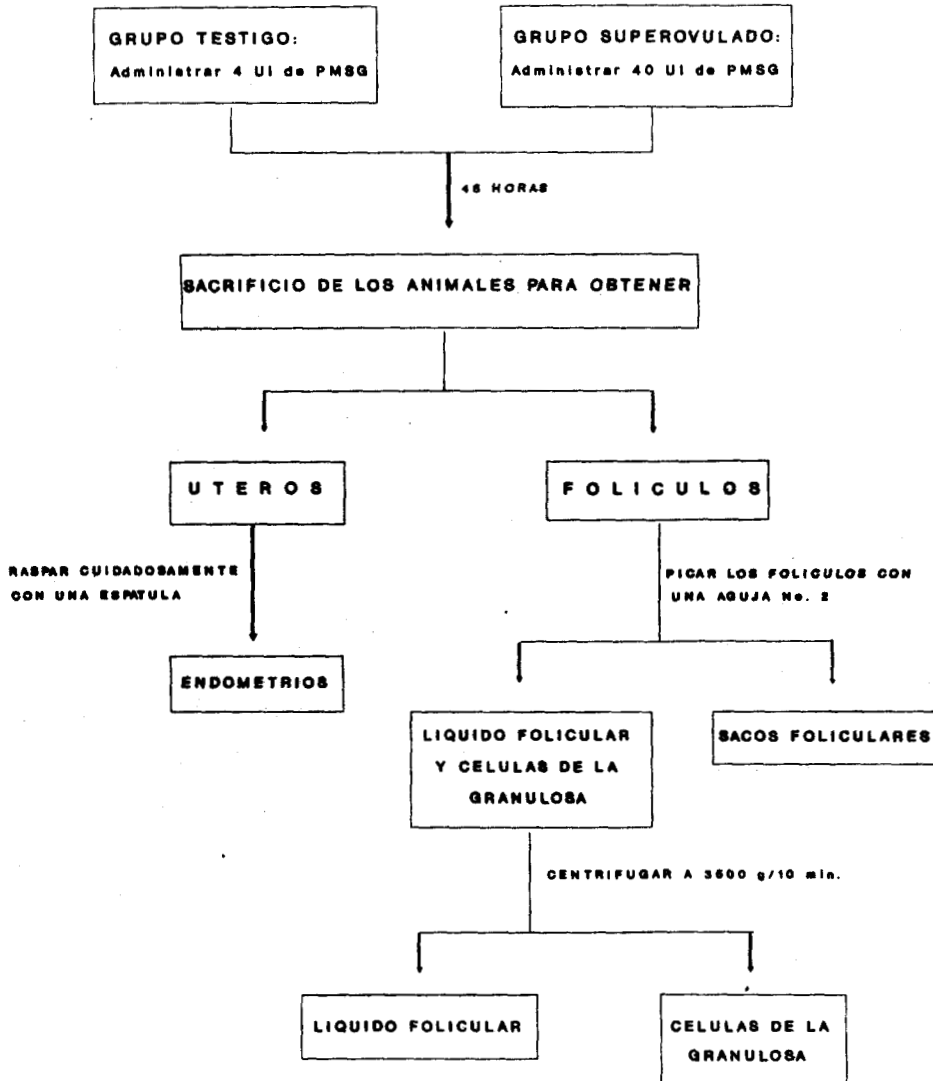


Fig. 5.- Metodología de superovulación y obtención de muestras.



De los folículos obtenidos de ambos grupos, se eligieron los de mayor tamaño (mayores de 1 mm).

Los folículos se puncionaron para extraer el líquido folicular en el que estaban contenidas las células de la granulosa y se separaron los sacos foliculares vacíos.

Para obtener las células foliculares (de la granulosa), los líquidos foliculares se centrifugaron a 3500 g. durante 10 min. El precipitado se resuspendió en 300  $\mu$ l de una solución de sacarosa 0.25 M en Hepes 0.1 M pH 7.0 y se homogeneizó en un homogeneizador coaxial (Potter Elvehjem), con émbolo de teflón. Los sacos foliculares vacíos también se homogeneizaron en 300  $\mu$ l de la solución anterior.

Conjuntamente con la obtención de los ovarios se llevó a cabo la disección de los úteros, y de éstos, mediante raspados, se obtuvieron los endometrios; los cuales también se homogeneizaron en 300  $\mu$ l de la solución de sacarosa 0.25 M. La homogeneización, al igual que la disección de las estructuras, se llevó a cabo en frío.

Una vez obtenidos los homogeneizados de las células foliculares, los sacos foliculares y los endometrios, se llevó a cabo el proceso que se muestra en la Figura 6, con el fin de obtener las fracciones de enzimas libres dentro de la célula y unidas a membranas.

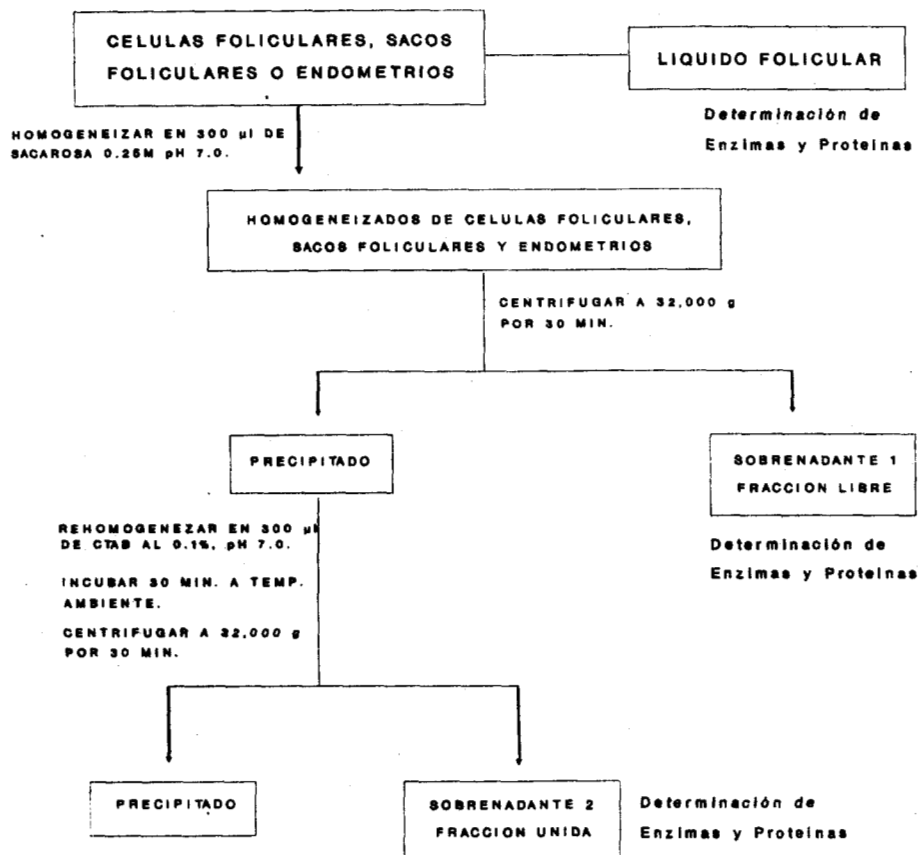


Fig. 6.- Metodología para la obtención de las fracciones celulares para la determinación de enzimas y proteínas.

### Determinación de Proteínas:

Las proteínas se cuantificaron por el método de Lowry y colaboradores (95), modificado por la incorporación del tartrato de sodio y potasio a la solución alcalina, con lo cual se le da mayor estabilidad a los reactivos.

En la curva de referencia se utilizó Albúmina Sérica Bovina Liofilizada. Los rangos manejados fueron de 15 a 90  $\mu\text{g}$ /sistema.

En las determinaciones de las muestras de líquido folicular y homogeneizados de células foliculares y endometrios se utilizaron 10  $\mu\text{l}$ . Cuando se obtuvo una lectura mayor a la del último punto de la curva estándar, fue necesario diluirla y cuando la lectura fue menor a la del primer punto de la curva, se repitió la determinación con un volumen mayor.

### Determinación de Enzimas:

#### Fosfatasa Ácida y Alcalina y N-Acetil- $\beta$ -D-Glucosaminidasa:

La determinación de la fosfatasa ácida y alcalina se llevó a cabo por el método de Lowry (94), las de la N-acetil- $\beta$ -D-glucosaminidasa por el método de Findlay y Levvy (63).

Para la determinación de la actividad de la Fosfatasa ácida se utilizó un amortiguador de citrato/cítrico 0.1 M pH 4.1, como sustrato al p-nitro-fenil fosfato 0.1 M y para detener la reacción se usó carbonato de sodio 0.1 M. En el caso de la fosfatasa alcalina se usó el mismo sustrato; la solución

amortiguadora fue Glicina 0.02 M pH 9.6.

La actividad de la N-Acetil- $\beta$ -D-Glucosaminidasa se determinó utilizando como sustrato al p-nitro-fenil-N-Acetil- $\beta$ -D-Glucosaminido y como amortiguador el citrato/cítrico 0.1 M pH 5.7.

La determinación de la actividad enzimática se realizó midiendo el p-Nitrofenol liberado del sustrato cuando éste se hidrolizó. El p-nitrofenol liberado es de color amarillo en soluciones alcalinas y se mide a 410 nm. La actividad de las enzimas mencionadas es directamente proporcional a la cantidad de p-nitrofenol liberado en la unidad de tiempo.

En la Curva estándar de p-NO<sub>2</sub>-Fenol, las determinaciones se realizaron a concentraciones de 2 a 10  $\mu$ g.

#### $\beta$ -Glucuronidasa.

La actividad de la  $\beta$ -Glucuronidasa se midió por el método de Fishman (65) utilizando como sustrato a la fenolftaleína del ácido  $\beta$ -glucurónido y una solución amortiguadora de acetato/acético 0.5 M pH 4.7.

El método se basa en la determinación colorimétrica de la fenolftaleína liberada del sustrato  $\beta$ -glucurónido por la acción de la  $\beta$ -glucuronidasa. La fenolftaleína en solución alcalina es de color rojo y se mide a 550 nm. Las determinaciones para la Curva estándar de Fenolftaleína se realizaron a concentraciones de 5 a 20  $\mu$ g.

Una vez obtenida la cantidad de proteína y de p-NO<sub>2</sub>-Fenol

o Fenoftaleína, se hicieron los cálculos para determinar la actividad enzimática en  $\mu\text{g}/\text{mg}$  de proteína/ hora:

$$\text{ACTIVIDAD ENZIMATICA} = \frac{\mu\text{g de p-NO}_2\text{-Fenol o Fenoftaleína}}{\text{mg de proteína}} * 2$$
$$= \mu\text{g de sustrato convertido/mg proteína/ h}$$

Análisis de los Datos.

La significancia de los datos se calculó empleando la prueba de "t" de student.

## RESULTADOS.

Nuestros resultados claramente indican que la administración de una dosis superovulatoria de PMSG (40 UI) a ratas prepúberes (de 28 días de edad), produce alteraciones bioquímicas en las células foliculares, el líquido folicular y el endometrio.

En este estudio se demuestra que las cuatro enzimas, fosfatasa ácida (Fig. 7), N-acetil- $\beta$ -D-glucosaminidasa (Fig. 8),  $\beta$ -glucuronidasa (Fig. 9) y fosfatasa alcalina (Fig. 10), se encuentran en todos los compartimientos del folículo y en el endometrio.

En la Fig. 7 se muestra el efecto de la PMSG sobre la actividad de la fosfatasa ácida. En esta figura también podemos apreciar que la actividad enzimática en las células de la granulosa es mucho menor que en las células de la teca.

En las células de la teca la dosis superovulatoria indujo un aumento en las actividades de la Fosfatasa ácida (Fig. 11), tanto libre como unida a membranas. En las células de la granulosa del grupo superovulado, también se observa que hay mayor actividad libre y unida a partículas (Fig. 12).

**Fig. 7.- Actividad de Fosfatasa Acida en células foliculares y endometrio de la rata.** Efecto de la administración de una dosis superovulatoria (40 UI) de PMSG sobre la actividad libre y unida de la fosfatasa ácida en las células foliculares y el endometrio, comparadas con las encontradas después de la administración de una dosis control (4UI). Las barras indican la media de 8 determinaciones individuales  $\pm$  la desviación estándar. Las letras diferentes indican diferencias estadísticamente significativas entre las barras ( $p < .01$ ) calculadas con la prueba de "t" de student.

**Fig. 8.- Actividad de N-acetil- $\beta$ -D-glucosaminidasa en células foliculares y endometrio de la rata.** Ver leyenda de la Fig. 7

**Fig. 9.- Actividad de  $\beta$ -glucuronidasa en células foliculares y endometrio de la rata.** Ver leyenda de la Fig. 7.

**Fig. 10.- Actividad de Fosfatasa Alcalina en células foliculares y endometrio de la rata.** Ver leyenda de la Fig. 7.

**Fig. 11.- Actividad de enzimas lisosomales en células de la teca de folículos de rata.** Efecto de la administración de una dosis superovulatoria (40. UI) de PMSG sobre la actividad libre y unida de las diferentes enzimas en las células de la teca, comparadas con las encontradas después de la administración de una dosis control (4UI). Las barras indican la media de 8 determinaciones individuales  $\pm$  la desviación estándar. Las letras diferentes indican diferencias estadísticamente significativas entre las barras ( $p < .01$ ) calculadas con la prueba de "t" de student.

**Fig. 12.- Actividad de enzimas lisosomales en células de la granulosa de rata.** Ver leyenda de la Fig. 11.

**Fig. 13.- Actividad de enzimas lisosomales en células de la granulosa de rata.** Ver leyenda de la Fig. 11.

**Fig. 14.- Actividad de enzimas lisosomales en el líquido folicular de la rata.** Efecto de la administración de una dosis superovulatoria (40 UI) de PMSG sobre la actividad de las diferentes enzimas en el líquido folicular, comparadas con las encontradas después de la administración de una dosis control (4UI). Las barras indican la media de 8 determinaciones individuales  $\pm$  la desviación estándar. Las letras diferentes indican diferencias estadísticamente significativas entre las barras ( $p < .01$ ) calculadas con la prueba de "t" de student.

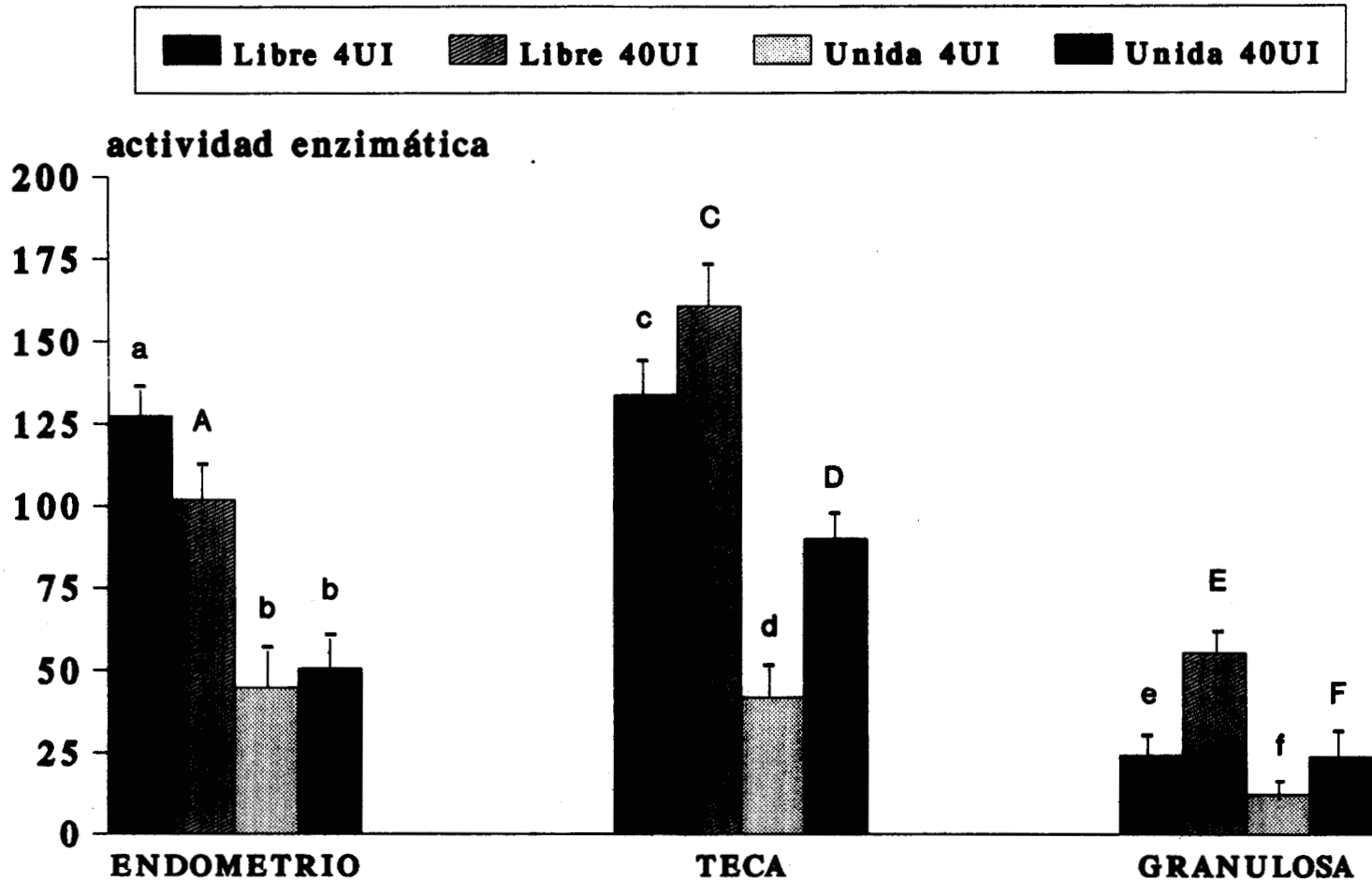


Fig. 7.- Actividad de fosfatasa ácida en células foliculares y endometrio de rata.



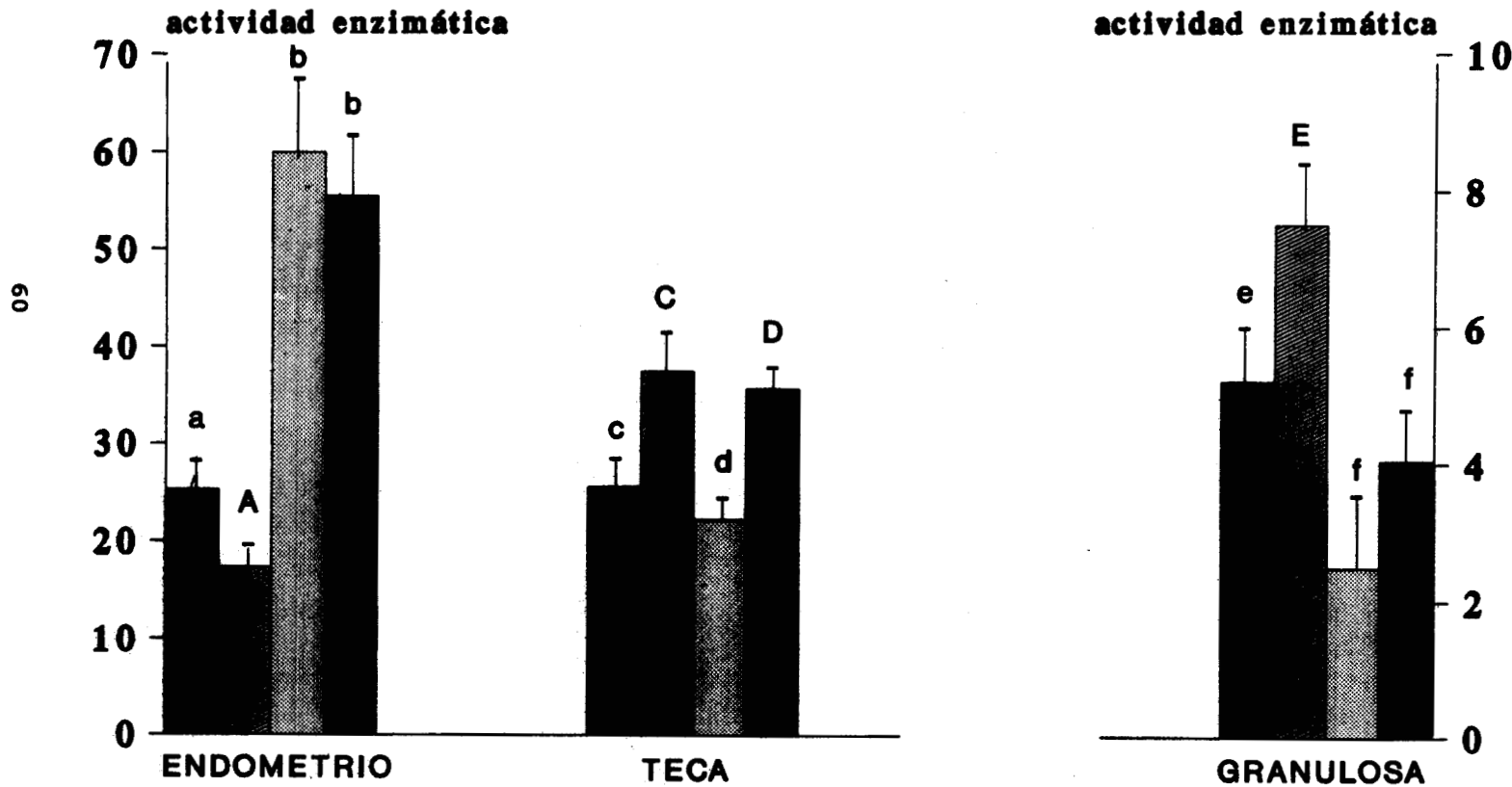


Fig. 8.- Actividad de N-acetil-β-D- glucosaminidasa en células foliculares y endometrio de rata.

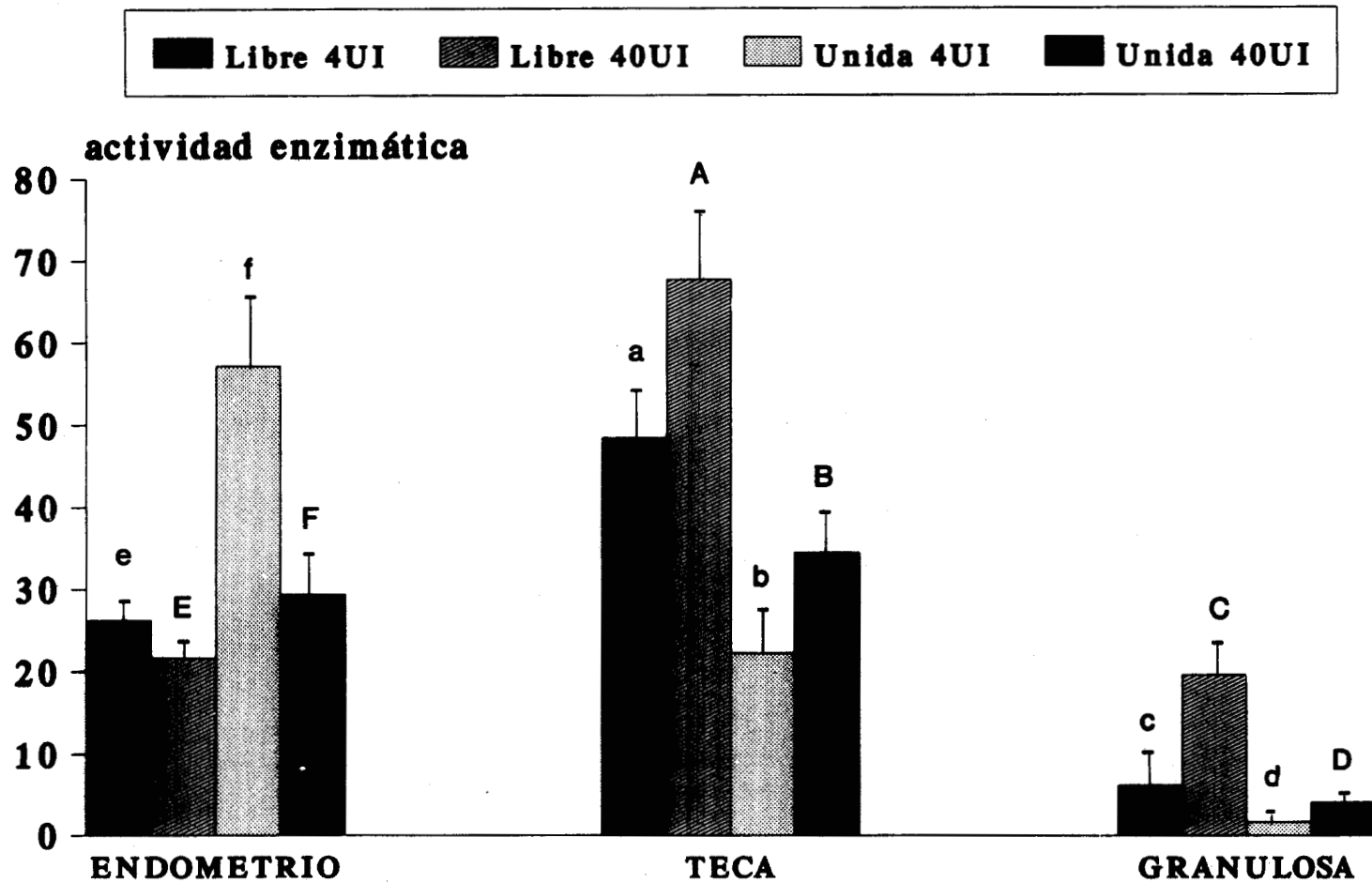


Fig. 9.- Actividad de  $\beta$ -glucuronidasa en células foliculares y endometrio de rata.

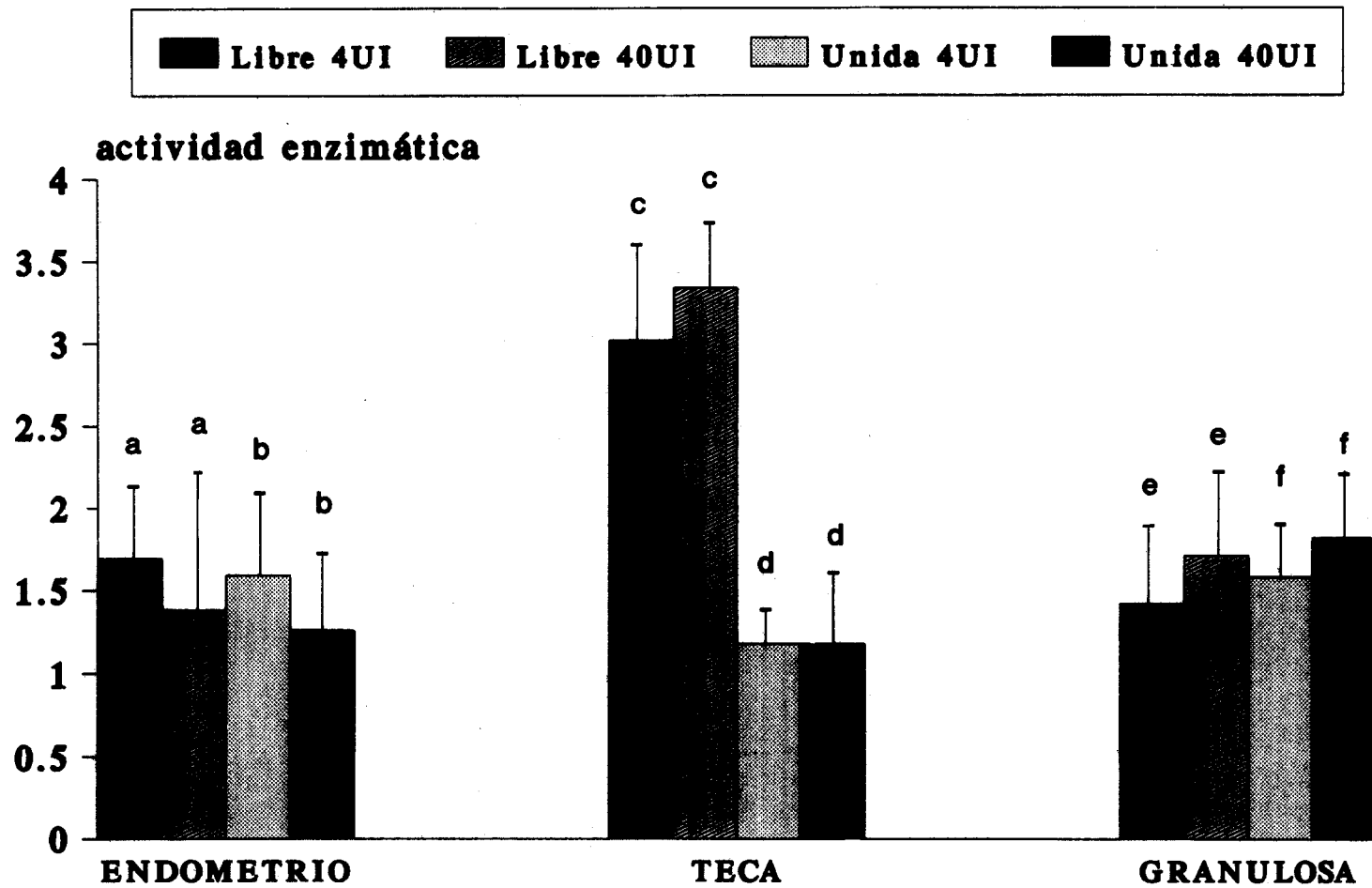


Fig. 10.- Actividad de fosfatasa alcalina en células foliculares y endometrio de rata.

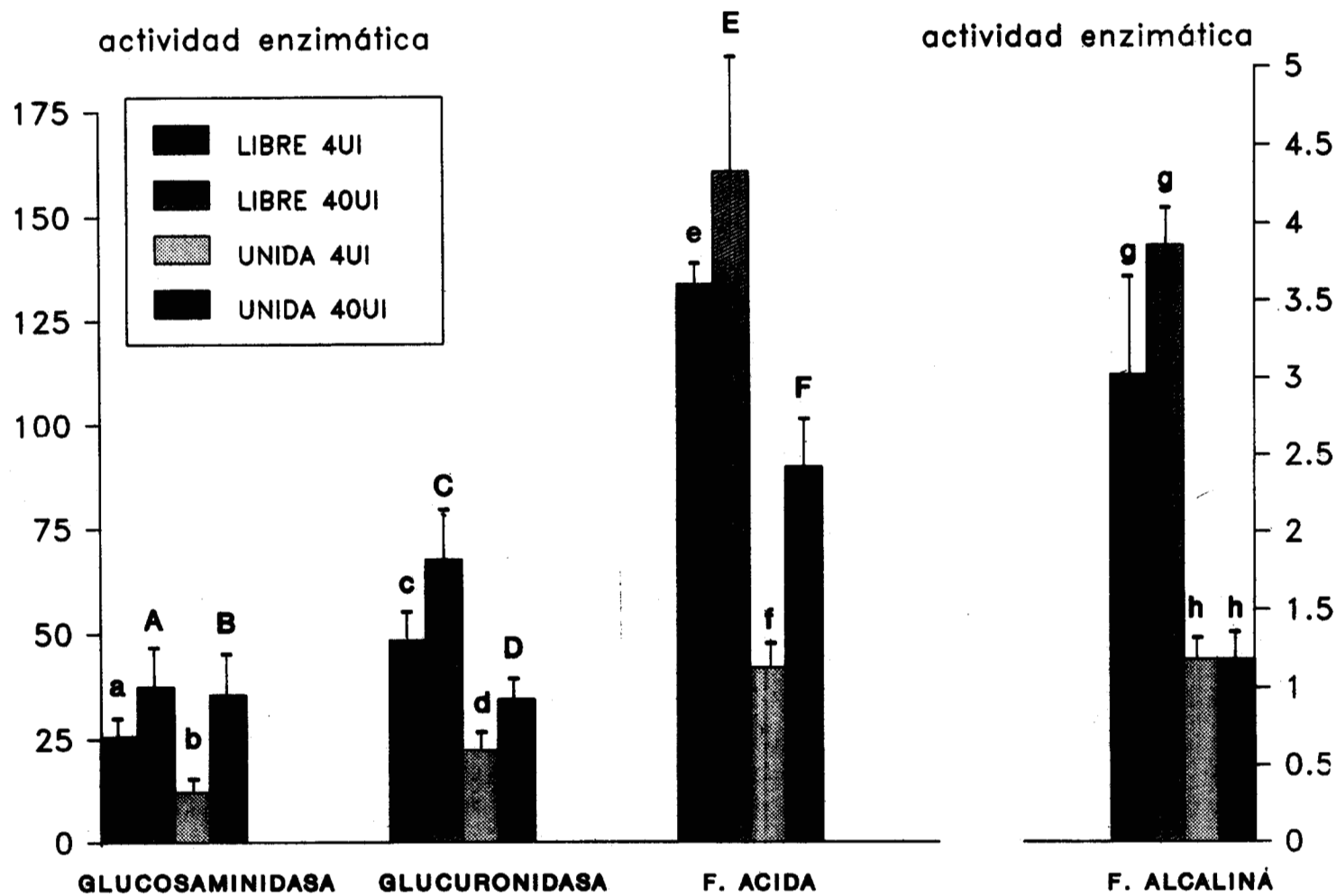


Fig. 11.- Actividad de enzimas lisosomales en células de la teca de folículos de rata.

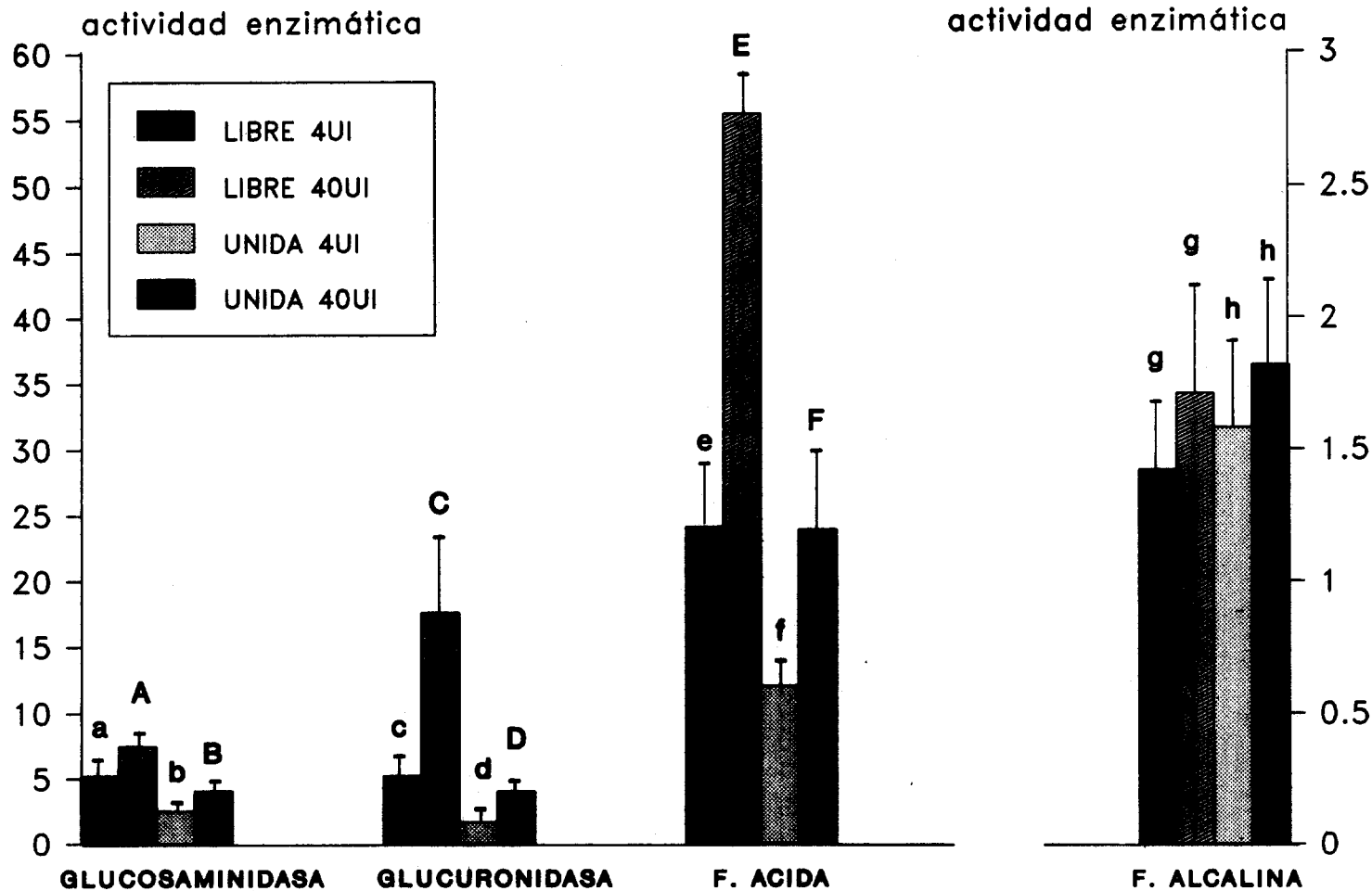
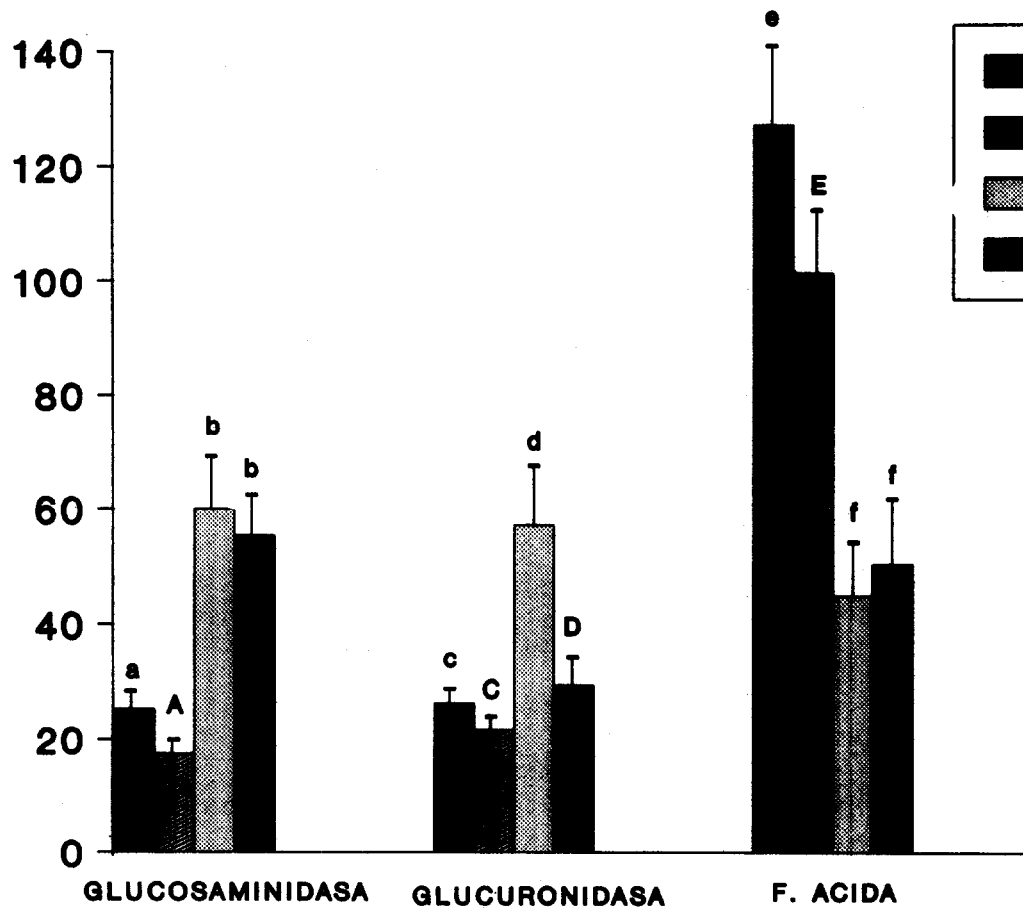


Fig. 12.- Actividad de enzimas lisosomales en células de la granulosa de folículos de rata.

## actividad enzimática



## actividad enzimática

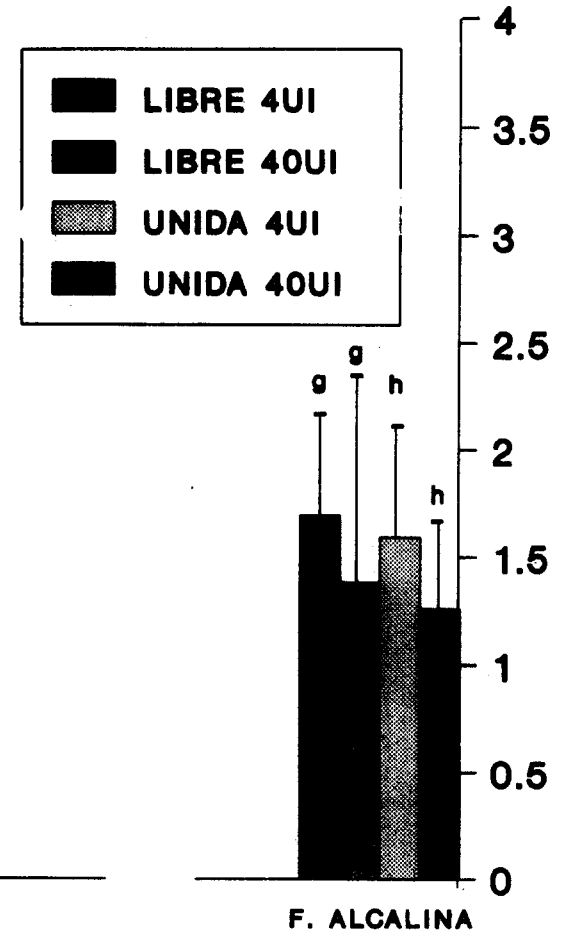


Fig. 13.- Actividad de enzimas lisosomales en endometrio de rata.

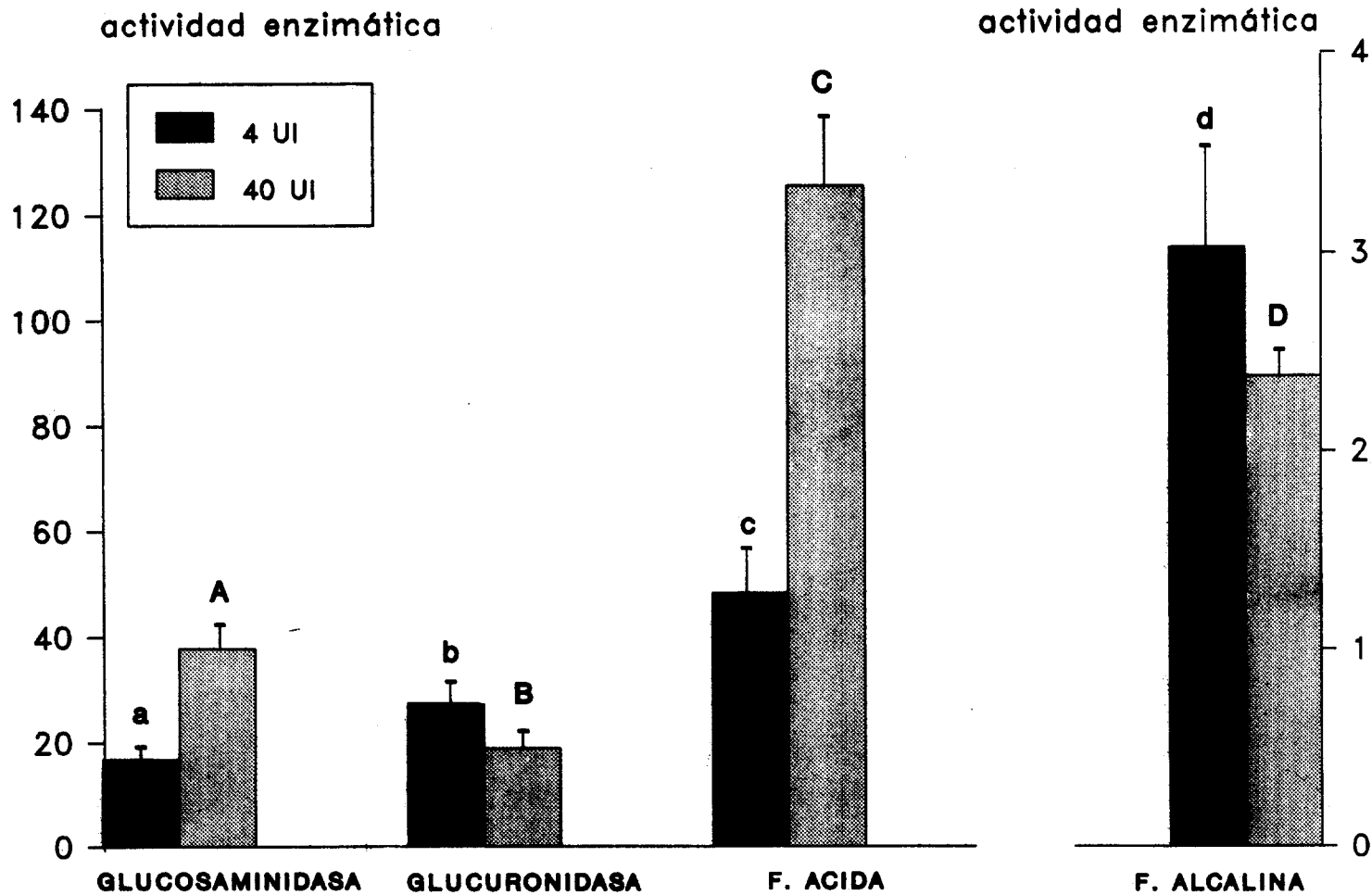


Fig. 14.- Actividad de enzimas lisosomales en líquido folicular de rata.

La actividad de la Fosfatasa ácida en el endometrio también se alteró con el tratamiento superovulatorio (Fig. 13). En este caso se observa una disminución significativa de la actividad libre en el grupo superovulado. La actividad unida a partículas fue similar en ambos grupos.

La actividad de la enzima N-Acetil- $\beta$ -D-glucosaminidasa después del tratamiento superovulatorio muestra una respuesta semejante a la de la Fosfatasa ácida (Fig. 8).

En las células de la teca la superovulación indujo un aumento significativo de las actividades libre y unida a partículas, comparadas con el grupo testigo (Fig. 11).

En las células de la granulosa se observa un aumento significativo en la actividad libre del grupo superovulado con respecto al testigo. Sin embargo, en la actividad unida a membranas no hay diferencias estadísticamente significativas, aunque se observa cierta tendencia a aumentar (Fig. 12). La actividad de esta enzima también es mayor en las células de la teca que en las células de la granulosa (Fig. 8).

Al comparar las actividades de la N-Acetil  $\beta$ -D-glucosaminidasa en el endometrio de los animales superovulados y los testigo, se observan diferencias estadísticamente significativas en la actividad libre. En la actividad unida, aunque no hay diferencias estadísticamente significativas, el



grupo superovulado también mostró una tendencia a la disminución (Fig. 13).

En la Figura 9 se presenta la actividad de la  $\beta$ -glucuronidasa. Las actividades libre y unida de la enzima en las células de la teca de los folículos superovulados es mayor que en los del grupo testigo.

En las células de la granulosa, la superovulación indujo un aumento en las actividades enzimáticas tanto libre como unida a partículas. En estas las células, la actividad es muy baja comparada con la que se obtuvo en las células de la teca.

En el endometrio la  $\beta$ -glucuronidasa responde a la superovulación con una disminución en las actividades libre y unida de la enzima (Fig. 13).

En la figura 10 se presentan los resultados de la actividad de la Fosfatasa alcalina. No se obtuvieron diferencias significativas en las actividades libre y unida de la enzima en las células de la teca ni en las de la granulosa, sin embargo, se observa que las actividades del grupo superovulado tienden levemente a aumentar.

En el endometrio tampoco se observaron diferencias significativas en la actividad de la fosfatasa alcalina entre los dos grupos; no obstante, se puede observar una clara

tendencia a la disminución en las actividades de la enzima de los animales superovulados.

Para el líquido folicular el análisis se hizo por separado (Fig. 14). Los resultados muestran que la superovulación induce alteraciones en el contenido en las actividades de las 4 enzimas ya que en todas las comparaciones entre los controles y los superovulados hubo diferencias significativas. La actividad de la Fosfata ácida fue mayor (más del 100%) en el líquido folicular de los folículos superovulados. En esta misma figura se muestra la actividad de la N-Acetil- $\beta$ -D-glucosaminidasa, la cual también fue significativamente mayor en el grupo superovulado. En el caso de la enzima  $\beta$ -glucuronidasa la superovulación indujo una disminución en la actividad. En el fluido folicular, la enzima Fosfatasa alcalina se alteró de manera semejante a la  $\beta$ -glucuronidasa, de manera que el tratamiento superovulatorio provocó una disminución en su actividad.

Nuestros resultados indican heterogeneidad de los lisosomas del folículo con respecto al contenido de enzimas y a la distribución de las células dentro del mismo. La fosfatasa ácida se distribuyó de una manera más o menos uniforme en las células de la teca y de la granulosa; sin embargo, la actividad en las primeras, fue 3 o 4 veces mayor que en las segundas, además de que la superovulación indujo un aumento significativo en las actividades libre y unida a partículas en los dos tipos

de células foliculares. La N-acetil- $\beta$ -D-glucosaminidasa y la  $\beta$ -glucuronidasa muestran un patrón de actividad parecido; en las células de la teca las actividades libre y unida son mayores que en las células de la granulosa, y aumentan en respuesta a la superovulación (Fig. 8, 9 y 11). Como observamos, el contenido de enzimas en estas células no es homogéneo.

## DISCUSION.

Los lisosomas son un tipo de partículas citoplásmicas a las que se encuentran asociadas algunas enzimas hidrolíticas. Morfológicamente se describen como partículas densas con un diámetro promedio de 0.3 a 0.5 $\mu$ . Poseen una membrana simple que es semipermeable y separa efectivamente los complementos enzimáticos del resto de los constituyentes celulares. Estas hidrolasas son fácilmente solubles, y tienen en común un pH óptimo ácido (43).

El antiguo concepto de los lisosomas, considerados como una "bolsa suicida", en el sentido de que el sistema lisosomal estaba involucrado principalmente en procesos patológicos conduciendo a una inevitable muerte celular por autólisis (34), ha evolucionado en un concepto completamente nuevo que tiende a unir la función lisosomal con el control de algunos sucesos importantes en la economía del metabolismo normal (126). Este cambio se debió principalmente a las observaciones de Szego y Seeler (1973) (141) quienes demostraron que el concepto "todo o nada" de la activación de la membrana lisosomal necesitaba ser cambiado por uno nuevo en el que este proceso podía variar desde la mera labilización de la membrana lisosomal, lo cual produce una "salida pausada" del contenido lisosomal, hasta un "estallamiento drástico" de los lisosomas estructuralmente intactos. Esta graduación de la desestabilización está en

función de la intensidad y calidad del estímulo y participa como un factor regulador en muchas funciones importantes. Además, hay evidencias que demuestran que existen poblaciones de lisosomas funcionalmente diferentes (14) que se caracterizan por la heterogeneidad de su contenido enzimático.

Un concepto también reciente se refiere a la extraordinaria movilidad intracelular de los lisosomas. Se ha demostrado que estos organelos pueden ir desde la membrana plasmática, hasta el interior del núcleo. Los lisosomas parece que se unen con la membrana plasmática para interactuar con una variedad de sustancias químicas acumuladas preferentemente en estos organelos, debido a los cambios en el ambiente intracelular. Uno de estos cambios son las señales hormonales, por lo que se ha propuesto que la población lisosomal primitiva es importante en la recepción del agente activo en la superficie celular y funciona como vector para este rápido traslado a la zona nuclear (140, 141).

Algunos de los efectos de las hormonas esteroides sobre sus células blanco se ha visto que están mediados por la síntesis de proteínas, algunas de las cuales son específicas en el tracto reproductivo de varios mamíferos.

Las evidencias que relacionan la función lisosomal con la acción de las hormonas esteroides y gonadotróficas ha surgido de varias líneas de investigación.

En estudios de incubación in vitro se demuestra que las gonadotrofinas LH y FSH tienen un efecto directo sobre los lisosomas ováricos, ya que aumentan la liberación de enzimas, lo cual sugiere un posible efecto labilizante sobre las membranas lisosomales (39). Por otro lado, la PMSG in vitro, induce disminución de la fosfatasa ácida liberada, lo que sugiere un posible efecto estabilizante sobre las membranas lisosomales (93). La administración de PMSG a ratas inmaduras induce un aumento de la actividad de la fosfatasa ácida en las células que secretan esteroides (51, 111). En un estudio histoquímico utilizando microscopía electrónica Krausova y Presl (85) observaron que el inicio de la esteroidogénesis de las células de la teca se asocia con el desarrollo de vesículas identificadas morfológicamente como lisosomas.

Examinando estas evidencias se ha propuesto que las hormonas esteroides, así como las gonadotrofinas ejercen algunos de sus efectos sobre sus órganos blanco mediante procesos enzimáticos, que involucran a las hidrolasas lisosomales (40, 123, 126, 140).

En relación a esta modalidad de su acción se han propuesto varios mecanismos acerca de la manera cómo ejercen su efecto las hormonas gonadotróficas y esteroides, ya sea:

1. Modificando la velocidad de síntesis de las enzimas lisosomales (11, 113, 132).
2. Alterando la permeabilidad de los lisosomas (155).

3. Afectando la fragilidad y distribución subcelular de los lisosomas (141).
4. Aumentando la velocidad de liberación de las enzimas lisosomales (34).

Por otro lado, hay algunos otros puntos de interrelación entre las hormonas esteroides y gonadotróficas y los lisosomas. Hay evidencias de que los lisosomas pueden participar en el metabolismo mismo de estas hormonas (118). De manera muy interesante se ha estudiado el metabolismo de la hCG, la cual como sabemos es una hormona glucoproteica compuesta de dos subunidades diferentes, una  $\alpha$  y una  $\beta$  que se combinan mediante puentes hidrofóbicos. Gilligan y colaboradores (67) observaron que cuando se administra esta hormona, se forma el complejo Hormona-Receptor en la superficie celular, el cual se internaliza en las células ováricas por endocitosis mediada por receptores. Dentro de la célula, gran parte de esta hCG es transportada finalmente a los lisosomas y degradada; de manera que este mecanismo contribuye a la degradación del complejo hormona-receptor y, por lo tanto, ayuda a regular la acción fisiológica de estas hormonas (140).

Además, se ha demostrado que la LH y la FSH promueven la labilización de los lisosomas ováricos produciéndose un aumento en la liberación de las enzimas por arriba de los valores basales (40, 114, 123); así como un aumento posterior en el número de lisosomas (51). Puesto que la actividad total, es decir, las actividades libre y unida de las enzimas lisosomales

estudiadas aumenta en las células de la teca y de la granulosa como efecto de la estimulación (Fig. 11 y 12), es posible que la PMSG, al igual que la LH actúe sobre estas células estimulando la síntesis de estas enzimas (140).

En el fluido folicular, las actividades de la Fosfatasa ácida y la N-acetil- $\beta$ -D-glucosaminidasa aumentaron con la superovulación, mientras que la  $\beta$ -glucuronidasa disminuyó (Fig. 14). Como sabemos, el fluido folicular es un complejo de componentes que proceden tanto de los elementos séricos como de algunos sintetizados en el folículo, de manera que su composición guarda una estrecha relación con los fenómenos bioquímicos que se estén llevando a cabo dentro de las células foliculares. En varias investigaciones se ha relacionado la presencia de actividades altas de fosfatasa ácida en el líquido folicular con los folículos pequeños durante el crecimiento (11, 93, 127, 136, 158). Con base en estas observaciones podemos decir que, ya que en nuestro estudio la administración 40 UI de PMSG indujo un aumento significativo de la actividad de la fosfatasa ácida en el fluido folicular; es probable que los folículos obtenidos mediante superovulación, a pesar de que su crecimiento es aparentemente adecuado, su metabolismo bioquímico es semejante al de un folículo pequeño. Esta alteración en la actividad enzimática es posible que también afecte la maduración del ovocito.

Tratando de relacionar este esquema con las alteraciones enzimáticas inducidas por la superovulación y la participación



de los lisosomas en el metabolismo de las hormonas esteroides y de las gonadotrofinas, debe recordarse que los receptores que unen esteroides son proteínas fosforiladas (7, 43) y su actividad puede ser modificada por la acción de la fosfatasa ácida y alcalina. Enteman y colaboradores (52) han propuesto que la deshidrogenación de Estradiol, para formar un metabolito menos activo como lo es la Estrona, puede llevarse a cabo mediante una 17- $\beta$ -deshidrogenasa asociada a una subpoblación de lisosomas. En una investigación reciente (11), se estudiaron las actividades de algunas enzimas lisosomales que se encuentran en los compartimientos que constituyen el folículo en crecimiento, tanto libres como fijadas a la membrana, durante la maduración folicular, observándose una disminución de la actividad total de la fosfatasa ácida en las células de la teca y de la granulosa según el crecimiento de los folículos. De este modo, las altas actividades de las enzimas Fosfatasa ácida y N-acetil- $\beta$ -D-glucosaminidasa en las células de la teca y de la granulosa de los folículos superovulados (Fig. 7 y 8), pueden reflejar una disminución en la actividad del receptor para esteroides en estas células. Esta posibilidad se refuerza por el aumento concertado en ambas actividades libres e intralisosomales de estas enzimas, indicando la existencia de un mecanismo activo de regulación de su distribución y síntesis intracelular.

La enzima  $\beta$ -glucuronidasa muestra un mecanismo diferente ya que, mientras que en las células foliculares se observa un

aumento significativo de las actividades tanto libres como unidas (Fig. 9), en el líquido folicular su actividad disminuye (Fig. 14). En el organismo, los esteroides se metabolizan por la formación de conjugados hidrosolubles con el ácido sulfúrico y glucurónico que se eliminan lentamente del torrente sanguíneo, por lo que se piensa que pueden ser reservas o amortiguadores que ayuden a mantener relativamente constante el nivel de esteroides libres (9). Ya que la PMSG induce un aumento en la actividad esteroidogénica de las células foliculares, es posible que el aumento de la actividad de la  $\beta$ -glucuronidasa participe en la producción de un aumento en la cantidad de esteroides libres que se necesitan para mantener el equilibrio hormonal en las células foliculares y en el líquido folicular. Es pues posible que la PMSG induzca un aumento en la síntesis de la enzima y/o una labilización de los lisosomas, aumentando de esta manera la concentración de esteroides.

Se ha postulado que la descomposición del tejido conectivo en el ápice de la pared folicular, prerequisite esencial para la ruptura del folículo, depende de la actividad de las enzimas hidrolíticas (16, 25). Las micrografías electrónicas han mostrado lisosomas Fosfatasa ácida positivos en los fibroblastos dentro de la teca externa y su actividad parece ser más intensa en la túnica albugínea y las capas de la teca antes de la ovulación (111). En estudios de microscopia electrónica de los folículos ováricos de rata, se observaron agregados de cuerpos multivesiculares en los ovocitos maduros

grandes, antes de la ovulación. Estos organelos, que corresponden a una clase de lisosomas, aumentan dramáticamente en cantidad conforme avanza la maduración del ovocito (113). Nuestros resultados demuestran que en los folículos de las ratas superovuladas hay un aumento en el número de los lisosomas en las células de la teca, así como una liberación sustancial de la actividad de las hidrolasas lisosomales en los compartimientos libres de estas células, por lo tanto, parece ser razonable proponer que los lisosomas en los fibroblastos de la teca pueden desempeñar una función importante en la degradación del tejido conectivo en la pared folicular durante la ovulación, permitiendo que ovocitos no completamente maduros sean ovulados.

Se ha demostrado que en los mamíferos las enzimas lisosomales participan en la remodelación tisular del endometrio que es indispensable para la nidación del huevo (6, 75, 126). Por otro lado, puesto que no hay evidencias satisfactorias de que el trofoblasto secreta cantidades significativas de enzimas hidrolíticas (14), se ha establecido que los cambios en las actividades de las enzimas lisosomales en el endometrio relacionadas con la implantación del ovocito, son completamente dependientes de la actividad hidrolítica del endometrio mismo.

El estudio histoquímico del proceso de nidación (5) parece indicar que los lisosomas llevan a cabo una función importante

en las células endometriales, destruyendo su citoplasma justo antes o durante la implantación de manera que se remueva la barrera para que penetre el trofoblasto en el epitelio uterino.

En nuestro estudio la inducción de superovulación produjo una disminución en las actividades de las tres enzimas lisosomales en el tejido endometrial. Esta disminución es particularmente notable en el caso de la Fosfatasa ácida y de la N-acetil- $\beta$ -D-glucosaminidasa, cuyas actividades libres disminuyeron significativamente mientras que la actividad unida a partículas no sufrió cambios (Fig. 7 y 8). Como mencionamos antes, algunos autores mencionan que la falla en la implantación de los ovocitos superovulados, no es causada por alteraciones en el ovocito (99), sino que se debe a que las gonadotrofinas inducen una esteroidogénesis ovárica inapropiada, lo cual va a promover un ambiente uterino hostil a la implantación. En este sentido, es posible que debido al aporte inadecuado de esteroides en el endometrio durante la fase proliferativa no haya un estímulo adecuado para la síntesis requerida de enzimas (actividad intralisosomal) o bien que no se induzca una labilización de los lisosomas, promoviéndose de esta manera una disminución de la liberación de las enzimas (Fig. 13), y por lo tanto, deficiencias importantes en el mecanismo de implantación del ovocito fertilizado.

Puesto que los esteroides incrementan la tasa de

liberación de las enzimas lisosomales (34) y cambian la permeabilidad de las membranas de los lisosomas (156), así como la distribución celular y su concentración (140, 141); la disminución de la actividad de la  $\beta$ -glucuronidasa tanto en la fracción libre como en la unida a partículas (Fig. 9), puede ser indicativo de una disminución tanto en la síntesis como en la liberación de estas enzimas. En el caso de la  $\beta$ -glucuronidasa esta disminución no sólo daría como resultado una deficiente preparación del endometrio para la nidación, sino que interferiría también con la presencia de una adecuada concentración de esteroides libres, por la incapacidad de transformar los glucuronidatos de esteroides en hormonas libres, activas (9).

La actividad de la fosfatasa alcalina se ha relacionado con las transformaciones metabólicas de la nutrición en el embrión durante las primeras etapas del desarrollo y con la implantación (110). Mediante técnicas histoquímicas, se ha demostrado la localización y actividad de la enzima y se le ha asociado con la reacción decidual (64). En el ratón, durante las primeras etapas de la gestación hay un aumento de la actividad de la fosfatasa alcalina en el estroma del útero, alcanzándose la actividad máxima alrededor del séptimo día (110). La superovulación no indujo cambios en las actividades libres y unidas de esta enzima, no obstante se observó una tendencia a disminuir (Fig. 10 y 13).

En relación con la actividad de la fosfatasa alcalina, se

ha indicado que generalmente la enzima es muy activa en aquellos tejidos comprometidos con el transporte de nutrientes y con frecuencia se encuentra en órganos secretorios y en los tejidos de velocidad metabólica alta, como ocurre en el útero deciduado, en donde se han encontrado altas actividades específicas de esta enzima (110). De acuerdo a esto, la disminución en la actividad de Fosfatasa alcalina encontrada en este trabajo podría, al menos en parte, explicar la implantación inadecuada de los ovocitos superovulados por la carencia de un aporte apropiado de nutrientes.

Como conclusión podríamos decir que el conocimiento actual apoya la idea de que las enzimas lisosomales participan en varias de las acciones de las hormonas gonadotróficas (67) y esteroides (51) que intervienen en el proceso reproductivo. También es conocido que en particular las hormonas esteroides son capaces de modificar las propiedades membranales de las células endometriales, modificando la permeabilidad de los diferentes organelos intracelulares. Es pues posible aceptar que las hormonas ejerzan parte de su actividad alterando la permeabilidad de los lisosomas (156), su fragilidad, su distribución subcelular (140, 141), así como aumentando la velocidad de síntesis y liberación de las enzimas lisosomales (34), de manera que éstas constituyan factores importantes en varios procesos involucrados en la reproducción, tales como regresión tisular (42), maduración folicular (141), ovulación (16, 25), implantación (64, 78) e inicio de la gestación (109).

Todos estos fenómenos deben estar íntimamente relacionados y en perfecto equilibrio, de manera que la alteración de alguno de ellos puede provocar que se desequilibre todo el sistema. Nuestros resultados permiten concluir que muchas de las alteraciones reproductoras observadas después de la superovulación pueden ser explicadas por alteraciones de la participación de actividades lisosomales, tanto al nivel del ovario, como a nivel del endometrio.

## BIBLIOGRAFIA

1. Abraham, R., Hendy, R., Doubherty, W.J., Fulfs, J.C., Goldberg, L. (1970): Participation of lysosomes in early implantation in the rabbit. *Exp. Mol. Pathol.* 13:329-334.
2. Adams, C.E. (1960): Prenatal mortality in the rabbit *Oryctolagus cuniculus*. *J. Reprod. Fertil.* 1:36-44.
3. Ainsworth, L., Tsang, B.K., Downs, B.R., Marcus, G.T., Armstrong, D.T. (1980): Interrelationships between follicular fluid steroid levels, gonadotropic stimuli and oocyte maturation during preovulatory development of porcine follicles. *Biol. Reprod.* 23: 621-627.
4. Anderson, L.D., Stone, S.L., Channing, C.P. (1985): Influence of hormones on the inhibitory activity of oocyte maturation present in conditioned media of porcine granulosa cells. *Gamete Research* 12: 119-130.
5. Anton, E., Brandes, D., Barnard, S. (1969): Lysosomes in uterine involution: Distribution of acid hydrolases in luminal epithelium. *Anat. Rec.* 146: 231-238.
6. Armstrong, D.T., Evans, G. (1983):. Factors influencing success of embryo transfer in sheep and goats. *Theriogenology* 19: 31-42.
7. Auricchio, F., Migliaccio, F., Castoria, G., Lastoria, S., Sciavone, E. (1981): ATP-dependent enzyme activating hormone binding of estradiol receptor. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 101: 1171-1179.
8. Austin, C.R., Short, R.V. (1972): *Procesos de Reproducción en Mamíferos. Células Germinales y Fertilización.* Ediciones científicas La Prensa Médica Mexicana. pp 15-48.
9. Austin, C.R., Short, R.V. (1972). *Procesos de Reproducción en Mamíferos. Hormonas en la Reproducción.* Ediciones científicas La Prensa Médica Mexicana. pp 11-20.
10. Baker, T.G. (1972). Oogenesis and ovarian development. *En Reproductive Biology* (Ed. H. Balin & S. Glasser) pp 398-437. Amsterdam: Excerpta Medica.
11. Ballesteros, L.M., Rosales, A.M., Rosado, A., Hernández-Pérez, O. (1991): Activity, compartmentalization and subcellular distribution of lysosomal enzymes during follicular distribution of lysosomal enzymes during follicular maturation on the goat.
12. Bar-Ami, S., Tsafiriri, A. (1986). The development of meiotic competence in the rat: Role of hormones and stage of follicular development. *Gamete Res.* 13: 39-46.



13. Beaumont, H.M., Smith, A.F. (1975). Embryonic mortality during the pre and post-implantation periods of pregnancy in immature mice after superovulation. *J. Reprod. Fertil.* 45: 437-448.
14. Bergstrom, S. (1970): Estimation of proteolytic activity at mouse implantation sites by gelatin digestion method. *J. Reprod. Fertil.* 23:481-486.
15. Bhattachayra, R. Mayersbach, H.V. (1976): Gonadotrophin-induced inhibition of oxygen consumption in rat oocyte-cumulus complexes: relief by adenosine. *Biol. Reprod.* 33:890-898.
16. Bjersing, L., Cajander, S. (1974): Ovulation and the mechanism of follicle rupture. III. Transmission electron microscopy of rabbit germinal epithelium prior to induced ovulation. *Cell. Tissue. Res.* 149:313-327.
17. Blandau, R.J., Warrick, E., Rumery, R.E. (1965). In vitro cultivation of fetal mouse ovaries. *Fertil. Steril.* 16: 705-715.
18. Bodemer, C.W., Rumery, R.E., Blandau, R.J. (1959). Studies on induced ovulation in the intact immature hamster. *Fertil. Steril.* 10: 350-360.
19. Bornslaeger, E., Mattei, P., Schultz, R. (1986). Involvement of cAMP-dependent protein kinase and protein phosphorylation in regulation of mouse oocyte maturation. *Dev. Biol.* 114: 453-462.
20. Bornslaeger, E., Schultz, R. (1984) Regulation of mouse oocyte maturation: Effect of elevating cumulus cell cAMP on oocyte cAMP levels. *Biol. Reprod.* 33: 698-704.
21. Bornslaeger, E., Wilde, M., Schultz, R. (1984): Regulation of mouse oocyte maturation: Involvement of cyclic AMP phosphodiesterase and calmodulin. *Dev. Biol.* 105: 488-499.
22. Boué, J.G., Boué, A. (1973). Increased frequency of chromosomal anomalies in abortions after induced ovulation. *Lancet* i: 679.
23. Braw, R.H., Tsafiriri, A. (1980). Effect of PMSG on follicular atresia in the immature rat ovary. *J. Reprod. Fertil.* 59: 267-272.
24. Bullock, D.W., Kappauf, B.H. (1973). Dissociation of gonadotropin-induced ovulation and steroidogenesis in immature rats. *Endocrinology* 92: 1625-1631.

25. Cajander, S., Bjersing, L. (1976): Further studies of the surface epithelium covering preovulatory follicles with special reference to lysosomal alterations. *Cell. Tissue. Res.* 169: 129-141.
26. Calarco, P.G., Epstein, C.J. (1973). Cell surface changes during preimplantation development in the mouse. *Dev. Biol.* 32: 208-213.
27. Centola, G.M., Anderson, L.D., Channing, C.P. (1981). Oocyte maturation inhibitor (OMI) activity in porcine granulosa cells. *Gamete Research* 4:451-461.
28. Champlin, A.K., Kuzia, S.J., Rice, B.A., Mobraaten, L.E. (1987). Cell Surface characteristics of blastocyst from spontaneously ovulating and gonadotropin-treated mice. *Biol. Reprod.* 36:439-444.
29. Chang, M. (1955): The maturation of rabbit oocytes in cultured and their maturation, activation, fertilization and subsequent development in the fallopian tubes. *J. Exp. Zool.* 128: 378-405.
30. Channing, C.P., Liu, C.Q., Jones, G.S., Jones H. (1983): Decline of follicular oocyte maturation inhibitor coincident with maturation inhibitor coincident with maturation and achievement of fertilizability of oocytes recovered at midcycle of gonadotropin-treated women. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 80: 4184.
31. Chiquoine, A. (1960): The development of the zona pellucida of the ovum. *A. J. Anat.* 106: 149-170.
32. Daniel, S.A.J., Armstrong, D.T., Gore-Langton, R.E. (1989): Growth and development of rat oocytes in vitro. *Gamete Res.* 24:109-121.
33. De Duve, C., Pressman, D.C., Gianetto, R., Wattiaux, R., Appelmann, F. (1955): Tissue fractionation studies 6. Intracellular distribution patterns of enzymes in rat liver tissue. *Biochem J.* 60: 604-617.
34. De Duve, C., Wattiaux, R. (1966): Functions of lysosomes. *An Rev. Physiol.* 28:435-592.
35. Dekel, N., Aberdam, E., Sherizly, I. (1984): Spontaneous maturation in vitro of cumulus-enclosed rat oocytes is inhibited by forskolin. *Biol. Reprod.* 31: 244-250.
36. Dekel, N., Beers, W. (1978): Rat oocyte maturation in vitro. Relief of cyclic AMP inhibition with gonadotropins. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* 74: 4369-4373.
37. Dekel, N., Beers, W. (1980): Development of rat oocyte

in vitro: Inhibition and induction of maturation in the presence or absence of the cumulus oophorus. *Dev. Biol.* 75: 247-254.

38. Dekel, N., Kraicer, P., Phillips, D., Sánchez, R., Segal, S. (1978): Cellular associations in the rat oocyte cumulus cell complex: Morphology and ovulatory changes. *Gamete Res.* 1:47-57.

39. Dimino, M., Reece, R. (1973): Effects of gonadotropic hormone on rat ovarian lysosomes. *Biol. Reprod.* 8: 523-530.

40. Dimino, M.J., Malcom, S.E., Elfornt, E.A. (1977): Changes in acid hydrolase activities of ovarian subcellular fractions of immature rats after gonadotropic treatment. *Biol. Reprod.* 17: 780-786.

41. Dingle, J.T., Hay, M.F., Moor, R.M. (1968): Lysosomal function in the corpus luteum of the sheep. *J. Endocr.* 40: 325-336.

42. Dott, H.M. (1973). Lysosomes and lysosomal enzymes in reproduction. *Adv. Reprod. Physiol.* 6:213-220.

43. Dougherty, J.J., Puri, R.K., Toft, D.O. (1982): Phosphorylation in vitro of chicken oviduct progesterone receptors. *J. Biol. Chem.* 257:14226-14230.

44. Downs, S. M., Coleman, D.L., Ward-Bailey, P.F., Eppig, J.J. (1985). Hypoxanthine is the principal inhibitor of murine oocyte maturation in a low molecular weight fraction of porcine follicular fluid. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 82: 454-458.

45. Downs, S.M., Coleman, D.L., Eppig, J.J. (1986). Maintenance of murine oocyte meiotic arrest. Uptake and metabolism of hypoxanthine and adenosine by cumulus cell-enclosed and denuded oocytes. *Dev. Biol.* 117: 174-183.

46. Downs, S.M., Daniel, S.A.J., Eppig, J.J. (1988). Induction of maturation in cumulus cell enclosed mouse oocytes by follicle stimulating hormone and epidermal growth factor. Evidence for a positive stimulus of somatic cell origin. *J. Exp. Zool.* 245: 86-96. (101).

47. Downs, S.M., Eppig, J. (1984): Cyclic adenosin monophosphate and ovarian follicular fluid act synergistically to inhibit mouse oocyte maturation. *Endocrinology* 114: 418-427.

48. Downs, S.M., Eppig, J.J. (1987): Induction of mouse oocyte maturation in vivo by perturbants of purine metabolism. *Biol. Reprod.* 36: 431-437.

49. Dunbar, B., Wardrip, N., Hendrick, J. (1980): Isolation, physicochemical properties, and macromolecular

composition of zona pellucida from porcine oocytes. *Biochemistry* 19: 356-365. (10).

50. Elbling, L. (1973): Does gonadotrophin-induced ovulation in mouse cause malformations in the offspring. *Nature* 246: 37-39. (138).

51. Elfont, E.A., Roszka, J.P., Dimino, M.J. (1977). Cytochemical studies of acid ovarian follicles: A suggested role for lysosomes in steroidogenesis. *Biol. Reprod.* 17:787-795.

52. Entemann, A.H., Sierralta, W., Jungblut, P.W. (1980): Studies on the involvement of lysosomes in strogens action. III. The dehydrogenation of stradiol to strone by porcine endometrial lysosomes. *Hoppe-Seyle's Z. Physiol. Chem.* 361:250-267.

53. Eppig, J.J. (1977): A comparison between oocyte growth in coculture with granulosa cell-oocyte junctional contact maintained in vitro. *J. Exp. Zool.* 209: 345-353.

54. Eppig, J.J., Daniel, S.A.J., Schroeder, A.C. (1988). Growth and development of mouse oocytes in vitro. *Ann. NY Acad. Sci.* 541: 205-210.

55. Eppig, J.J., Downs, S.M. (1987). The effect of hypoxantine on mouse oocyte growth and development in vitro. Maintenance of meiotic arrest and gonadotropic-induced oocyte maturation. *Dev. Biol.* 119: 313-321.

56. Eppig, J.J., Ward-Bailey, P.F., Coleman, D.L. (1985). Hypoxantine and adenosine in murine ovarian follicular fluid: Concentrations and activity in maintaining oocyte meiotic arrest. *Biol. Reprod.* 33:1041-1049.

57. Espey, L.L. (1967): Ultrastructure of the apex of the rabbit Graafian follicle during the ovulation process. *Endocrinology* 81: 267-276.

58. Espey, L.L. (1974): Ovarian proteolytic enzymes and ovulation. *Biol. Reprod.* 10:216-235.

59. Espey, L.L. (1980): Ovulation as an inflammatory reaction-a hypothesis. *Biol. Reprod.* 22: 73-77.

60. Espey, L.L., Lipner, H. (1963): Measurements of intrafollicular pressures in the rabbit ovary. *Amer. J. Physiol.* 205: 1067-1072.

61. Espey, L.L., Lipner, H. (1965). Enzyme induced rupture of rabbit Graafian follicle. *Amer. J. Physiol.* 208: 208-213.

62. Evans, G., Robinson, T.J. (1980). The control of

fertility in sheep: Endocrine and ovarian response to progesterone-PMSG treatment in the breeding season and in anestrus. *J. Agric., Camb.* 94: 69-88.

63. Findlay, J., Levvy, G.A. (1960): Purification of  $\beta$ -D-N acetyl glucosaminidase from the pig epidymis. *Biochem. J.* 77:170-175.

64. Finn, C.A., McLaren, A. (1967): A study of the early stages of implantation in mice. *J. Reprod. Fert.* 13:1197-1203.

65. Fischman, W. H., Bernfeld, P. (1955): *Methods in Enzymology*. Academic Press. New York 1:262.

66. García-Bunuel, R., Brandes, D. (1966). Lysosomal enzymes in human endometrium. A histochemical study of acid phosphatase, non-specific esterase and E 600 resistant esterase. *Am. J. Obstet.* 94: 1045-1052.

67. Gilligan, A., Turner, A., Vaitukatis, J.L. (1986). Divergent metabolism of human chorionic gonadotropin subunits within rat ovarian lysosomes. *Biochem. Biophys. Res.* 134:1197-1203.

68. Gilula, N., Epstein, M., Beers, W. (1978). Cell-to-cell communication and ovulation: A study of the cumulus-cell-oocyte complex. *J. Cell. Biol.* 78: 58-75.

69. Gilula, N., Reeves, O., Steinbach, A. (1972). Metabolic coupling, ionic coupling, and cell contacts. *Nature* 235: 262-265.

70. Greenwald, G.S. (1962). Analysis of superovulation in the adult hamster. *Endocrinology* 71: 378-389.

71. Guyara, S.S., Greenwald, G.S. (1964). A comparative histochemical study of interstitial tissue and follicular atresia in the mammalian ovary. *Anat. Rec.* 149: 411-434.

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

73. Hagino, N., Goldzieher J.W. (1970). Effect of timing and quantity of estrogen on gonadotrophin-induced ovulation in immature rats. *Endocrinology* 86: 29-33.

74. Heller, D.T., Cahill, D.M., Schultz, R.M. (1981). Biochemical studies of mammalian oogenesis: Metabolism cooperativity between granulosa cells and growing mouse oocytes. *Dev. Biol.* 84:456-464.

75. Henzl, M.R., Smith, R.E., Boost, G., Tyler, E.T. (1972): Lysosomal concept of menstrual bleeding in humans. *J. Clin. Endocr.* 34:860-865.

76. Hillensjo, T., Barnea, A., Nilsson, L., Herlitz, H., Ahren, K. (1974). Temporal relationship between serum LH levels and oocyte maturation in prepuberal rats injected with pregnant mare serum gonadotropin. *Endocrinology* 95: 1762-1766.

77. Holy, L. *Biología de la Reproducción Bovina*. Escuela Superior de Medicina Veterinaria de La Habana. Ed. Científico Técnica. La Habana.

78. Jelinek, J., Jelinkova, M. (1975). Changes in the endometrial enzymes of rats during the estrous cycle and early pregnancy. *Acta Endocrinol. Copenh., Suppl.* 199:273, (Abstr).

79. Jones, R., Editor (1978). *The vertebrate ovary. Comparative Biology*. Plenum Press, New York.

80. Kang, Y. (1974). Development of the zona pellucida in the rat oocyte. *Am J. Anat.* 139: 535-566.

81. Kitai, H., Yoshimura, Y., Wright, K.H., Santulli, R., Wallach, E.E. (1985). Microvasculature of preovulatory follicles: comparison of in situ and in vitro perfused rabbit ovaries following stimulation of ovulation. *Am. J. Obstet. Gynecol.* 152: 889-993.

82. Kleiman, D., Insler, V., Leiberman, J.R., Glezerman, M., Albotiano, S., Potashnik, G., Meizner, I. (1987). Acid phosphatase levels in follicular fluids following induction of ovulation in in vitro fertilization patients. *J. of in vitro Fert. and Embryo Transfer.* 4: 181-187.

83. Koos, R.D., Clark, M.R. (1982). Production of 6-keto-prostaglandin  $F_{1\alpha}$  by rat granulosa cells in vitro. *Endocrinology* 111: 1513-1518.

84. Koss, R.D., Feirtag, M.A., Brodie, A.M.H., Le Maire, W.J. (1984). Inhibition of estrogen synthesis does not inhibit luteinizing hormone-induced ovulation. *Am. J. Obstet. Gynecol.* 148: 939-945.

85. Krausova, H., Presl, J. (1971). Fine structural differentiation of steroid-producing cells in the ovary of immature rat. *Experientia* 27:1487-1488.

86. Krishna, A., Terranova, P.F. (1985). Alterations of mast cell degranulation and ovarian histamine in the proestrus hamster. *Biol. Reprod.* 32: 1211-1217.

87. Larsen, W., Wert, S., Brunner, G. (1986). A dramatic loss of cumulus cell gap junctions is correlated with germinal

vesicle break-down rat oocytes. Dev. Biol. 113: 517-521.

88. Lawrence, T., Beers, W., Gilula, N. (1978). Transmission of hormonal stimulation by cell-to-cell communication. Nature 235: 262-265.

89. Legault, Y., Bleau, G., Chapdelaine, A., Roberts, K.D. (1980). Steroid sulfatase activity of the hamster reproductive tract during the estrous cycle. Biol. Reprod. 23: 720-725.

90. Lipner, H. (1971). Ovulation from histamine depleted ovaries. Proc. Soc. Exp. Biol. Med. 136: 111-114.

91. Lipner, H., Wendelkem, L. (1971). Inhibition of ovulation by inhibition of steroidogenesis in immature rats. Proc. Soc. Exp. Biol. Med. 136: 1141-1147.

92. Lobel, B.L., Rosenbaum, R.M., Deani, H.W. (1961). Enzymic correlates of physiological regression of follicles and corpora lutea in ovaries of normal rats. Endocrinology 68: 232-247.

93. Lobel, L.B., Levy, E. (1968). Enzymatic correlates of development, secretory function and regression of follicles and corpora lutea in the bovine ovary. Acta Endocrinol. 132 (Suppl.1):7.

94. Lowry, O.H., Roberts, N.R., Wu, M., Liu Hixson, U.S., Crawford, E.J. (1954): The quantitative histochemistry of brain II. Enzyme measurement. J. Biol. Chem. 207: 19-37.

95. Lowry, O.H., Rosebroug, N.J., Farr, A.L., Randall R.J. (1951): Protein measurement with the Folin phenol reactive. J. Biol. Chem. 193:265-269.

96. Maudlin, I., Fraser, L.R. (1977). The effect of PMSG dose on the incidence of chromosomal anomalies in mouse embryos fertilized in vitro. J. Reprod. Fert. 50: 275-280.

97. Meyer, R.K., Karavolas, Klausung, M., Norgard, W. (1971). Blood progesterone and pregnenolone levels during phenobarbital (PB) block of PMSG-induced ovulation in immature rats. Endocrinology 88: 983-987.

98. Miller, B.G., Armstrong, D.T. (1981). Effect of superovulatory dose of pregnant mare serum gonadotropin on ovarian function, serum estradiol and progesterone levels and early embryo development in immature rats. Biol. Reprod. 25: 261-271.

99. Miller, B.G., Armstrong, D.T. (1981): Superovulatory

doses of pregnant mare serum gonadotropin cause delayed implantation and infertility in immature rats. *Biol. Reprod.* 25: 253-260.

100. Miller, B.G., Armstrong, D.T. (1982). Infertility in superovulated immature rats. Role of ovarian steroid hipersecretion. *Biol. Reprod.* 26:861-868.

101. Miller, J.C.O., Behrman, H.R. (1986). Oocyte maturation is inhibited by adenosine in the presence of follicle-stimulating hormone. *Biol. Reprod.* 35: 833-837.

102. Moor, R. (1978). Role of steroids in the maturation of ovine oocytes. *Annls. Biol. Anim. Biochem. Biophys.* 18:477-482.

103. Moor, R.M., Osborn, J.C., Crosby, I.M. (1985). Gonadotropin-induced abnormalities in sheep oocytes after superovulation. *J. Reprod. Fertil.* 74: 167-172.

104. Moor, R.M., Polge, C., Willadsen, S.M. (1980) Effect of follicular steroid on the maturation and fertilization of mammalian oocytes. *J. Embryol. Exp. Morphol.* 56: 319-335.

105. Moor, R.M., Trounson, A.O. (1977). Hormonal and follicular factors affecting maturation of sheep oocytes in vitro and their subsequent developmental capacity. *J. Reprod. Fert.* 49: 101-109.

106. Mori, T., Suzuki, A., Nishimura, T., Kambegawa, A. (1977). Inhibition of ovulation in immature rats by antiprogesterone antiserum. *J. Endocrinol.* 75: 185-191.

107. Morikawa, H., Okamura, H., Okazaki, T., Nishimura, T. (1976). Changes of histamine in rabbit ovary during ovulation. *Acta Obstet. Ginecol. Jpn.* 28: 504-510.

108. Motlik, J. Kopečný, V., Trávník, P., Pivko J. (1984). RNA synthesis in pig follicular oocytes. Autoradiographic and cytochemical study. *Biol. Cell.* 50: 229-236.

109. Moulton, B.C., Koenig, B.B., Borkan, S.C. (1978). Uterine lysosomal enzyme activity during ovum implantation and early decidualization. *Biol. Reprod.* 19:167-170.

110. Murdoch, R.N., Kay, D.J., Cross, M. (1978). Activity and subcellular distribution of mouse uterine alkaline phosphatase during pregnancy and pseudopregnancy. *J. Reprod. Fert.* 54:293-300.

111. Narimoto, K., Okamura, H., Mori, T., Sakai, M., Espey, L.L. Ogawa, K. (1985). Citochemical localization of acid phosphatase in the rabbit ovarian follicle. *Acta Biochem.*



Cytochem. 18: 525-537.

112. Nuti, K.M., Sridharan, B.N., Meyer, R.K. (1975). Reproductive biology of PMSG primed immature female rats. *Biol. Reprod.* 13: 38-44.

113. Odor, D.L. (1960): Electron microscopic studies on ovarian oocytes and unfertilized tubal ova in the rat. *J. Biophys. Biochem. Cytol.* 7:567-574.

114. Okasaki, T., Straus, III J.F., Flickingher, G.L. (1977): Lysosomal phospholipase A activities of rat ovarian tissue. *Biochem. Biophys. Acat.* 487:343-353.

115. Oliewsky, P., Beers, W. (1983). cAMP synthesis in the rat oocyte. *Dev. Biol.* 100:287-293.

116. Osborn, J.C., Moor, R.M. (1983). The role of steroid signals in the maturation of mammalian oocyte. *J. Steroid. Biochem.* 18: 133-137.

117. Pedersen, T (1969). Follicle growth in the immature mouse ovary. *Acta Endocrinol (Copenh)* 62: 117-132.

118. Peluso, J.J., Steger, R.W., Hafez, E. (1977). Sequential changes associated with the degeneration of preovulatory rat follicles. *J. Reprod. Fertil.* 49: 215-218.

119. Peters, H. (1969). The development of mouse ovary from birth to maturity. *Acta Endocrinol (Copenh.)* 62: 98-116.

120. Peters, H. (1978). Folliculogenesis in mammals. En *The vertebrate ovary*. Edited by R. Jones pp 121-144. Plenum Press, New York.

121. Psychoyos, A. (1966). Recent research in egg implantation. In *Egg implantation*. Ciba Symposium Study Groups No. 23, pp 4-15.

122. Rahi, H, Srivastava, P.N. (1983). Hormonal regulation of lysosomal hydrolases in the reproductive tract of the rabbit. *J. Reprod. Fert.* 10:57-66.

123. Rahi, H, Srivastava, P.N. (1984). Lysosomal hydrolases in reproductive organs during estrous cycle of the hamster. *Gamete Res.* 10:57-66.

124. Rondell, P. (1964). Follicular pressure and distensibility in ovulation. *Amer. J. Physiol.* 207: 590-594.

125. Rondell, P. (1970). Biophysical aspects of ovulation. *Biol. Reprod. (Suppl)* 2:64.

126. Rosado, A., Mercado, E., Gallegos, A.J., Wens, M.A., Aznar, R. (1977). Subcellular distribution of lysosomal enzymes

in the human endometrium. I. Normal menstrual cycle. *Contraception* 16: 287-298.

127. Rosado, A., Rosales, A.M. (1991): Maduración folicular en el mamífero. Atresia, determinantes bioquímicos. *Ciencia* 42: 81-97.

128. Saldarini, R.J., Yochim, J.J. (1967): Metabolism of the uterus of the rat during early pseudopregnancy and its regulation by estrogen and progesterone. *Endocrinology* 80:81-97.

129. Salustri, A., Siracusa, G. (1983). Metabolic coupling cumulus expansion and meiotic resumption in mouse cumuli oophori cultured in vitro in presence of FSH or dbcAMP, or stimulated in vivo by hCG. *J. Reprod. Fertil.* 68:335-341.

130. Sasamoto, S., Sato, K., Naito, H. (1972). Biological active life of PMSG on mice with special reference to follicular ability to ovulate. *J. Reprod. fertil.* 30: 371-379.

131. Schultz, R., Montgomery, R., Belanoff, J. (1983). Regulation of mouse oocyte meiotic maturation. Implication of a decrease in oocyte cAMP and protein dephosphorylation in commitment to resume meiosis. *Dev. Biol.* 97: 264-273.

132. Smith, A.J., Waynforth, H.B. (1970). Acid phosphatase activity in viable and regressing rat corpora lutea. *J. Endocrinol.* 47: 167-176.

133. Smith, D.M., Tenney, D.Y. (1979). Effect of hypofisectomy on mouse oocyte maturation in vitro. *J. Reprod. Fertil.* 55: 415-422.

134. Smith, M.S.R. (1970). Histochemical observations on the mouse uterus during the oestrus cycle. *J. Reprod. Ter.* 22: 461-469.

135. Sorrentino, S. Jr., Reiter, R.J. Lee, L.A., Schalch, D.S., (1972). Timing and neural pathways involved in release of luteinizing hormone after pregnant mare serum administration. *Neuroendocrinology.* 9:341-348.

136. Stallcup, O.T. (1970). Enzyme activity of bovine follicular fluid. *J. Dairy Sci.* 53:382 (Abstr).

137. Stone, S.L., Promerantz, S.H., Kripner, A.S., Channing, C.P. (1978). Inhibitor of oocyte maturation from porcine follicular fluid further purification and evidence for reversible action. *Biol. Reprod.* 19: 585-590.

138. Strauss, W.F., Meyer, R.K. (1962). Neural timing of ovulation in immature rats treated with gonadotropin. *Science, NY.* 137: 860-861.

139. Strickand, S., Beers, W.H. (1975). Studies on the role of plasminogen activator in ovulation. *J. Biol. Chem.* 25:5494-5702. (117).

140. Szego, C.M. (1974). The lysosome as a mediator of hormone action. *Recent Prog. in Horm. Res.* 30:171-233.

141. Szego, C.M., Seeler, B.J. (1973) Hormone-induced activation of target-specific lysosomes: acute translocation to the nucleus after administration of gonadal hormones in vitro. *J. Endocr.* 56:347-360.

142. Testart, J., Thibault, A. Lefevre, B. (1983). In vitro ovulation of rabbit ovarian follicles isolated after the endogenous gonadotropin surge. *J. Reprod. Fertil.* 68: 413-418.

143. Thibault, C., Gérard, M. (1973). Cytoplasmic and nuclear maturation of rabbit oocytes in vitro. *Annls. Biol. Biochem. Biophys. Suppl.* 13: 145-156.

144. Thibault, C., Gérard, M., Menezo, Y. (1975). Preovulatory and ovulatory mechanisms in oocyte maturation. *J. Reprod. Fertil.* 45: 606-610.

145. Tornel, J., Brännström, M., Magnusson, C., Billig, H. (1990). Effects of follicle stimulating hormone and purines on rat oocyte maturation. *Mol. Reprod. Dev.* 27: 254-260.

146. Tsafiriri, A. (1978). Oocyte maturation in mammals. *En Vertebrate Ovary*, edited by R. Jones pp 409-442. Plenum Press, New York.

147. Tsafiriri, A., Channing, C., Promerantz, S., Lindner, H. (1977). Inhibition of maturation of isolated rat oocytes by porcine follicular fluid. *J. Endocrinol.* 75:258-291.

148. Tsafiriri, A., Channing, C.P. (1975). Influence of follicular maturation and culture conditions on the meiosis of pig oocytes in vitro. *J. Reprod. Fertil.* 43: 149-153.

149. Tsafiriri, A., Promerantz, S., Channing, C. (1976). Inhibition of oocyte maturation by porcine follicular fluid: Partial characterization of the inhibitor. *Biol. Reprod.* 14: 511-516.

150. Urner, F., Hermann, W., Baulieu, E., Schorderet-Slatkine, S. (1983). Inhibition of denuded mouse oocyte maturation of forskolin, an activator of adenylate cyclase. *Endocrinology* 113: 1170-1172.

151. Walton, E.A., Armstrong, D.T. (1981). Ovarian function and early embryo development in immature rats given a superovulatory dose of PMSG, later neutralized by antiserum.

Biol. Reprod. 27: 841-846.

152. Walton, E.A., Evans, G., Armstrong, D.T. (1983). Ovulation response and fertilization failure in immature rat induced to superovulate. *J. Reprod. Fert.* 67: 91-96.

153. Wassarman, P. M. (1988). The mammalian ovum. In the *Physiology of Reproduction*, Edited by E. Knobil and J. Neill et al. Raven Press Ltd., New York.

154. Wassarman, P., Josefowicz, W., Letoumeau, G. (1976). Meiotic maturation of mouse oocytes in vitro: Inhibition of maturation at specific sates of nuclear progression. *J. Cell. Sci.* 22:531-545.

155. Weissman, G. (1964). Labilization and stabilization of lysosomes. *Fed. Proc.* 23: 1038-1044.

156. Weissman, G. (1965) Lysosomes. *New Eng. J. Med.* 273:1084-1090.

157. Wert, S.E., Larsen, J.W. (1989). Meiotic resumption and gap-junction modulation in the cultured rat cumulus-oocyte complex. *Gamete Res.* 22: 143-162.

158. Wise, T. (1987). Biochemical analysis of bovine follicular fluid: albumin, total protein, lysosomal enzymes, ions, steroids and ascorbic acid content in relation to follicular size, rank, atresia classification and day of estrous cycle. *J. Anim. Sci.* 64:1153-1169.

159. Yanagimachi, R. (1969). In vitro capacitation of hamster spermatozoa by follicular fluid. *J. Reprod. Fert.* 18: 275-286.

160. Yanagimachi, R., Chang, M.C. (1964). In vitro fertilization of golden hamster ova. *J. Exp. Zool.* 156: 361-376.

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

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

163. Yun, Y.W., Ho Yuen M., Moon Y.S. (1988). Effects of an antiandrogen, flutamide, on oocyte quality and embryo development in rats superovulated with pregnant mare's serum gonadotropin. *Biol. Reprod.* 39: 279-286.

164. Yun, Y.W., Ho Yuen, B.H., Moon, Y.S. (1987). Effects of superovulatory doses of pregnant mare serum gonadotropin on oocyte quality and ovulatory and steroid hormone responses in rats. Gamete Res. 16: 109-120.

165. Yun, Y.W., Yu, F.H., Yuen, B.H., Moon, Y.S. (1989). Effects of a superovulatory dose of pregnant mare serum gonadotropin on follicular steroid contents and oocyte maturation in rats. Gamete Res. 23: 289-298.