

T
346

 XOCHIMILCO SERVICIOS DE INFORMACION
ARCHIVO HISTORICO

87218

UNIVERSIDAD AUTÓNOMA METROPOLITANA

X O C H I M I L C O



Casa abierta al tiempo

CARACTERIZACIÓN DE LA PZ-PEPTIDASA DURANTE
LA MADURACIÓN Y LA ATRESIA FOLICULAR
EN LA CABRA Y LA OVEJA

T E S I S

QUE PARA OBTENER EL GRADO DE
DOCTOR EN CIENCIAS BIOLÓGICAS
PRESENTA
M. EN C. ROMÁN ESPINOSA CERVANTES

MÉXICO, D.F.

ENERO 14 DE 2004

El Doctorado en Ciencias Biológicas de la Universidad Autónoma Metropolitana pertenece al Padrón de Posgrados de excelencia del CONACYT y además cuenta con apoyo del mismo Consejo, con el convenio PFP-20-93


El jurado designado por las Divisiones de Ciencias Biológicas y de la
Salud de las Unidades Iztapalapa y Xochimilco
aprobó la tesis que presentó

Román Espinosa Cervantes

Enero 14 de 2004

Tutor: Dr. Omar Hernández Pérez 

Co-tutor: Dr. Adolfo Rosado García 

Asesores: Dr. Efraín Mercado Pichardo 

Dr. Javier Valencia Méndez

Sinodal: Dra. Ana María Rosales Torres 

COMITÉ TUTORIAL

Tutor

Dr. Omar Hernández Pérez

Co-tutor:

Dr. Adolfo Rosado García

**Profesor Distinguido. Universidad Autónoma Metropolitana-
Iztapalapa**

Investigador Emerito del Sistema Nacional de Investigadores

Asesor

Dr. Efraín Mercado Pichardo

**Profesor titular "C" Universidad Autónoma Metropolitana-
Iztapalapa**

Asesor

Dr. Javier Valencia Méndez

**Profesor titular "C" Universidad Nacional Autónoma de México
Facultad de Medicina Veterinaria y Zootecnia**

Sinodal

Dra. Ana María Rosales Torres

**Profesor titular "C" Universidad Autónoma Metropolitana-
Xochimilco**

**Dr. Adolfo Rosado García, muchas gracias por
compartir sus conocimientos, por su paciencia y su
entrega a la investigación.**

Agradecimientos

A cada uno de los miembros del comité tutorial, por su disposición y participación en la realización de esta tesis

Dr. Omar Hernández Pérez

Dr. Efraín Mercado Pichardo

Dr. Javier Valencia Méndez

Dra. Ana María Rosales Torres

**A mis padres, hermanos, sobrinos y a mi esposa por su
apoyo.**

INDICE

Resumen	1-2
Summary	3
Introducción	4
Metaloproteinasas	6
Pz-peptidasa	10
Hipótesis	13
Objetivos	13
Materiales y Métodos	14
Determinación de Pz-peptidasa	16
Dependencia del pH de la actividad de Pz-peptidasa	16
Inhibidores específicos de la Pz-peptidasa	16
Separación de Pz-peptidasa	17
Determinación de colagenasa	17
Determinación de colagenasa intersticial	18
Determinación de gelatinasa	19
Determinación de proteínas	21
Resultados	22
Dependencia del pH de la actividad de Pz-peptidasa	32
Inhibidores específicos de la Pz-peptidasa	35
Separación de Pz-peptidasa	38
Discusión	39
Literatura citada	50
Artículos publicados	

RESUMEN

Se estudió la participación de algunas metaloproteinasas en el crecimiento, la maduración y la atresia folicular en la cabra y la oveja. Los folículos se disecaron y clasificaron según su diámetro en tres tamaños: <3 mm, 3-6 mm y >6 mm. Posteriormente los folículos se clasificaron macroscópicamente de acuerdo a su grado de atresia en 4 grupos: no atrésicos o normales (grupo I), inicialmente atrésicos (grupo II), moderadamente atrésicos (grupo IIIa) y francamente atrésicos (grupo IIIb). La actividad de Pz-peptidasa, colagenasa intersticial y gelatinasa fueron determinadas (en muestras reducidas y aciladas después de su activación con APMA) en líquido folicular (LF) libre de células, sacos foliculares que representan tejido techal completo (CT) y células de la granulosa (CG). La Pz-peptidasa es particularmente activa en las CG, en las cuales éstas pueden tener de 3 a 7 veces más actividad que la encontrada en las CT. Por el contrario la Pz-peptidasa está casi ausente o totalmente inhibida en el LF. En el caso de los folículos no atrésicos la actividad de la Pz-peptidasa mostró un aumento significativo cuando los folículos crecieron de menos de 3 mm a folículos de 3-6 mm. En los folículos mayores de 6 mm, la actividad de Pz-peptidasa aumentó en las CG mientras que en el LF y en las CT disminuyó significativamente. Por el contrario no se encontraron cambios en la actividad de Pz-peptidasa en las CG durante la atresia de los folículos de 3-6 mm, pero si mostró una disminución altamente significativa en las CT. Un comportamiento inverso se observó en los folículos >6 mm. En las CT de los folículos normales pequeños (<3 mm) y medianos (3-6 mm), la actividad de colagenasa intersticial fue constante, con un pequeño aumento no significativo en los folículos medianos. Un pequeño pero significativo aumento en la actividad de la colagenasa fue encontrado en CT de los folículos normales mayores de 6 mm. En los folículos normales la colagenasa intersticial de las CG siempre fue menor que la actividad en las CT y mostró un decremento significativo en los folículos mayores >6 mm. La atresia invariablemente se acompañó por una disminución en la actividad de colagenasa de las CT, la cual sigue un patrón lineal en los folículos de 3-6 mm. En los folículos > 6 mm la actividad

también disminuyó pero no mostró el mismo patrón lineal. El progreso de la atresia en las CT de los folículos de tamaño intermedio fue acompañado por un decremento en la actividad gelatinolítica, de tal manera que en el estado IIIb no se detectó actividad gelatinolítica. En general, en los folículos >6 mm no se observó cambio alguno en el patrón de la actividad gelatinolítica en las CT durante el progreso de la atresia. Sin embargo, en el estadio IIIb este proceso se acompañó de la aparición de algunas bandas de actividad gelatinolíticas en la región de alto peso molecular. Por todo lo anterior concluimos que la actividad remodelante del tejido conectivo del ovario consiste de un complejo multienzimático junto con sus modificadores presentes en el folículo. Modificaciones en el equilibrio de este sistema participan en la regulación del proceso por el cual la maduración normal y la atresia conducen a un apropiado número de folículos ovulatorios durante los ciclos reproductivos de cada especie animal.

SUMMARY

Metalloproteinases are an important group of hydrolytic enzymes which participate in interstitial matrix degradation during tissue remodelling processes and therefore may be required during follicular growth and maturation. The activity of metalloproteinases (collagenases, gelatinase, and Pz-peptidase), was measured during growth, maturation and atresia of goat antral follicles. These follicles (n = 67) were separated by size and also classified into four groups: non-atretic (Group I); early atretic (Stage I) (Group II); moderately atretic (Stage II) (Group IIIa); and, late atretic (Stage III) (Group IIIb). Pz-peptidase was greater in granulosa than in thecal cells, and almost absent in follicular fluid. In non-atretic follicles, activity in granulosa cells increased with increasing follicle size, whereas activity peaked in 3-6 mm follicles in thecal cells. Atresia was associated with declining activity in thecal cells from follicles in the 3-6 mm range and in granulosa cells from the > 6 mm range. Interstitial collagenase activity was significant and similar in granulosa and thecal cell extracts and low in follicular fluid from non-atretic follicles. Activity increased significantly in thecal cells, but decreased significantly in granulosa cells from large (> 6 mm) non-atretic follicles. Atresia was associated with declining activity in both types cells and increasing activity in follicular fluid. Gelatinase activity was some times associated with five regions corresponding to molecular weights of 22.1, 30.7, 39.6, 63.8 and 71.4 kDa, and rarely at 91.3 and 81.2 kDa. Overall activity declined with atresia in thecal cells from follicles in the 3-6 mm range, but not in those > 6 mm. In granulosa cells from follicles 3-6 mm, activity varied widely with stage of atresia, while in cells from follicles > 6 mm, activity was greatly increased in atretic follicles.

***Keywords:* Metalloproteinases, Follicular growth, Follicular atresia, Goat and Sheep ovarian follicles**

INTRODUCCIÓN

Durante el desarrollo de los ovocitos en el ovario se presentan dos grandes periodos en los que predomina la degeneración celular: degeneración de las células germinales, caracterizado por una gran pérdida de ovocitos (Richards *et al.*, 2002) principalmente en la etapa prenatal y la degeneración folicular (atresia) que ocurre durante la vida reproductiva. En el ovario humano, se estima que al nacimiento el número de ovocitos es de ~2 millones, cifra que se reduce conforme el individuo alcanza la pubertad, momento en el cual aproximadamente 400 000 folículos están presentes. Sin embargo, solo 400 folículos son ovulados durante la vida reproductiva de la hembra (Khandoker, 2001). La mayor parte de los ovocitos nunca alcanza la maduración total necesaria para ser ovulado, por tal motivo cualquier ovario normal contiene habitualmente en la edad reproductiva numerosos ovocitos en degeneración dentro de folículos que no podrán alcanzar su desarrollo total. A este proceso se le conoce como atresia (Kaipia y Hsueh, 1997).

Se ha estimado que en los humanos, y en otros animales monotocos, más del 99% de los folículos terminan su maduración siendo atrésicos, mientras que en la ratona, y otros animales politocos, cerca del 77% de ellos terminan atrésicos (Hsu, y Hsueh, 1998). Una vez que un folículo entra a la poza de folículos en crecimiento tiene dos destinos: ovular o volverse atrésico. Los folículos se pueden hacer atrésicos en cualquier estadio de desarrollo; como ya mencionamos arriba los folículos en la poza de no crecimiento también pueden degenerar. Por lo tanto puede plantearse la siguiente pregunta: ¿Se puede predecir cuándo un folículo se hará atrésico? Es decir, ¿Existen en el momento actual marcadores bioquímicos que indiquen cuales folículos están destinados a la atresia?

En la búsqueda de estos marcadores se han desarrollado diversos modelos de atresia. Estudios morfológicos y bioquímicos han demostrado que la muerte de las células germinales y somáticas en el ovario es frecuentemente mediado por apoptosis (Hsueh *et al.*, 1996). La apoptosis de las células del folículo ovárico está regulada por varios factores extraováricos: hormonas polipeptídicas, factores locales de crecimiento,

citocinas, óxido nítrico, y esteroides (Hsu y Hsueh, 2000). Muchos de estos factores son importantes para promover la proliferación celular y para mantener la viabilidad celular. En contraste el Factor de necrosis tumoral (TNF)- α , la interleucina-6 y la GnRH actúan como factores apoptóticos a nivel intraovárico (Quirk *et al.*, 1998). Es importante mencionar que, estudios *in vivo* han involucrado a los estrógenos como hormonas antiapoptóticas en el folículo ovárico, mientras que los andrógenos son proapoptóticos (Billig *et al.*, 1996).

Ha sido claramente demostrado que la mayoría de los folículos sufren apoptosis cuando alcanzan el estado preantral (en roedores) o antral (en humanos) a menos que sean rescatados por las gonadotropinas (principalmente por la FSH) (Chun y Hsueh, 1998). Sin embargo, el mecanismo de la muerte folicular programada y el papel de las células de la granulosa y de la teca aún no son suficientemente claros. Es necesario estudiar el papel de varios factores apoptóticos a nivel intraovárico durante el desarrollo folicular.

El ovario es un órgano heterogéneo que presenta una característica muy especial, contienen folículos que crecen y degeneran continuamente durante el ciclo estral (Khandoker *et al.*, 2001). Por criterios histológicos se sabe que en la vaca el número de folículos no atrésicos mayores de 5 mm de diámetro es bajo (≤ 3 folículos sanos por ciclo) debido a una alta incidencia de atresia en los folículos que crecen de 2 mm a 5 mm de diámetro (Hägglund *et al.*, 2001).

A pesar de la importancia de la atresia folicular (Kaipia y Hsueh, 1997), los mecanismos celulares y moleculares de este fenómeno, aún no están claramente definidos. Sin embargo, se han realizado muchos estudios para esclarecer la atresia folicular. Los factores primarios que se han usado para clasificar las etapas foliculares, son la citología (en células de la granulosa y de la teca) y la concentración de esteroides (progesterona, andrógenos y estrógenos) en el líquido folicular (Carson *et al.*, 1981). Algunos estudios han sugerido que los cambios degenerativos asociados a la aparición de la atresia se inician en las células de la granulosa (CGs) (Kaipia y Hsueh, 1997). La muerte de las CGs provoca la destrucción completa de la capa de CGs que revisten el interior de la pared folicular (Rajakoski, 1996) y de este modo activan la

atresia folicular. Otro estudio ha demostrado que la muerte celular de las CGs durante la atresia folicular en la oveja, la cerda y la vaca ocurre debido a la apoptosis (Khandoker *et al.*, 2001).

En la última década numerosos grupos de investigación han mostrado el papel esencial de las enzimas proteolíticas, incluyendo colagenasas específicas y sus inhibidores fisiológicos, en la ruptura folicular y por tanto en el proceso de ovulación en los mamíferos (Nagase y Woessner, 1999). Sin embargo, pocos de estos estudios se han orientado a estudiar la participación de esas enzimas en el crecimiento, desarrollo y maduración normal de los folículos (García *et al.*, 1997) y mucho menos estudios se han realizado en la posible participación de las metaloproteinasas (MMPs) en la génesis y progreso de la atresia.

Las MMPs se han asociado a varios procesos relacionados con la reproducción, incluyendo la activación de la proacrosina, la reacción acrosomal y la penetración de los espermatozoides al ovocito. La ovulación requiere de la participación y el control de las metaloproteinasas y sus inhibidores (Ohnishi *et al.*, 2001; Curry *et al.*, 2001a; Endo *et al.*, 2001). La implantación del embrión parece que involucra la elaboración específica de la gelatinasa β por el embrión (Hirata *et al.*, 2003), así como la modulación de la invasión del útero por el blastocisto por la producción del inhibidor tisular de las metaloproteinasas (TIMPs) en la decidua (Walter y Boos, 2001). También se han implicado a las MMPs como mediadores de la involución de la glándula mamaria después de la lactancia (Visse y Nagase, 2003). Del útero en involución después del parto, se ha aislado una metaloproteinasa llamada metrilisina (Rudolph-Owens *et al.*, 1998) que parece ser indispensable para el desarrollo normal del proceso. Una característica común a todos estos eventos es que son procesos regulados por hormonas.

Durante el desarrollo y la maduración folicular, el almacén de colágena del tejido circundante debe llevar a cabo una serie compleja de cambios dinámicos que permitan la organización estructural de las complejas capas que constituyen la matriz extracelular y que deben ser constantemente modificadas durante el crecimiento y desplazamiento de los folículos en maduración. Durante estos eventos también son

cruciales las modificaciones de las tecas externa e interna y de la membrana basal que rodea a las células de la granulosa (Monniaux *et al.*, 1997). Conforme el folículo crece, las capas foliculares deben ser remodeladas continuamente, proceso que involucra una síntesis selectiva de proteínas de la matriz extracelular y una proteólisis concurrente por proteinasas degradadoras de dicha matriz, secretadas localmente. Por lo tanto, podemos asegurar que la remodelación del tejido ovárico, incluyendo tanto la síntesis como la degradación de la colágena, lo cual requiere la actividad de las enzimas conocidas como matriz metaloproteinasas, son indispensables para asegurar el crecimiento y la maduración folicular normal.

El ovario es rico en tejido conectivo, incluyendo colágena, elastina, glucosaminglucanos, proteoglucanos y glicoproteínas (Espey y Richards, 2002); aunque como en otros tejidos el principal componente de la matriz extracelular ovárica es la colágena. El crecimiento del folículo preovulatorio requiere de una remodelación profunda de la estructura de la colágena de la pared folicular y del estroma ovárico que lo rodea. García *et al.*, (1997), han hecho hincapié en que además de la colagenólisis observada antes de la ovulación, un proceso extenso de remodelación tisular debe ocurrir durante todas las fases del crecimiento y maduración folicular. Este proceso extenso de remodelación tanto del tejido intrínseco como extrínseco permitirá el crecimiento del folículo, así como su acercamiento a la superficie ovárica a través de la cual será expulsado el ovocito maduro (Curry y Osteen, 2003).

Las metaloproteinasas son un grupo de enzimas dependientes de zinc, responsables de la degradación de los componentes de la matriz extracelular tales como colágenas intersticiales, colágena tipo IV de la membrana basal, fibronectina, laminina, varios proteoglicanos y en todos aquellos procesos que experimentan remodelación tisular, ya sea bajo condiciones normales o patológicas (Powell *et al.*, 1999; Vu y Werb, 2000; Hägglund *et al.*, 2001; Shrimpton *et al.*, 2002).

Las colagenasas se secretan como proenzimas que necesitan ser activadas por un proceso que seguramente involucra a la plasmina y probablemente al activador del plasminógeno (Murphy *et al.*, 2000; Gilabert-Estelles *et al.*, 2003). Esta activación se

puede realizar también *in vitro* por algunos productos químicos tales como el acetato de p-amino fenil mercurio (APMA) (Cawston *et al.*, 1981). Además, para la expresión completa de sus actividades hidrolíticas, las colagenasas deben ser liberadas de sus inhibidores, que se encuentran usualmente formando un complejo con la enzima, entre estos potentes inhibidores se incluyen el llamado inhibidor tisular de las metaloproteinasas (TIMP) y probablemente la α 2-macroglobulina (α 2M) (Baker *et al.*, 2002). De hecho, la presencia de inhibidores específicos cuya concentración se modifica, aumenta o disminuye, simultáneamente al de la actividad enzimática, nos indica que una regulación muy precisa de esas enzimas debe ser muy importante en los procesos en los cuales están involucradas (Hirata *et al.*, 2003; Nothnick, 2003). Como consecuencia de esto, es conveniente realizar la determinación de la actividad colagenolítica en extractos tisulares después de la eliminación de estos inhibidores con agentes reductores del grupo disulfuro, como el ditioneol o por su acilación con sustancias como la iodoacetamida, procesos cuyo efecto ha sido ya bien descrito (Curry y Osteen, 2003).

Morales *et al.*, (1983) mostraron que el contenido de colágena de los folículos de ratas inmaduras aumentó 3 veces, 35 a 56 horas después del tratamiento con gonadotrofinas de suero de yegua embarazada (PMSG), pero disminuyó significativamente hasta un 25% 61 a 66 horas después de la aplicación de dicha gonadotropina. A partir de los experimentos de Fukumoto *et al.*, (1981) y de Morales *et al.*, (1983), se ha mostrado que las metaloproteinasas juegan un papel importante en los mecanismos de degradación tisular que preceden a la ruptura folicular. Recientemente se ha demostrado, que varias proteinasas colagenolíticas capaces de degradar la matriz de forma específica están presentes en el ovario y que sus actividades son más altas alrededor de la ovulación (Driancourt *et al.*, 1999). La integridad estructural de la pared folicular depende de la presencia de una red de fibrillas colágenas que se han formado debido a la actividad sintética de las capas teca (Yurchenko y Schittny, 1990; Alexander *et al.*, 1996; Espey y Lipner, 1994;). Por lo tanto la ovulación está precedida por cambios sintéticos e hidrolíticos dentro de la matriz conectiva de la teca, particularmente en la región apical de los folículos

(Murdoch y McCormick, 1992; Curry y Osteen, 2003), la actividad concertada de estos procesos debe finalmente llevar a la ruptura de la pared folicular y permitir la expulsión del ovocito maduro. Se ha mostrado también que la presencia de los inhibidores de la colagenasa es capaz de bloquear la ovulación casi por completo (Smith *et al.*, 1996; Inderdeo *et al.*, 1996; Chaffin y Stouffer, 1999).

Aunque muchas proteasas pueden degradar las moléculas de la matriz extracelular, ahora se sabe que las MMPs son los mediadores fisiológicos más importantes en la degradación de la matriz (Nagase y Woessner, 1999; Murphy *et al.*, 1999). Las razones para esto son varias: **a)** las metaloproteinasas son enzimas que se secretan en lugar apropiado para la degradación de la matriz extracelular, **b)** sus actividades enzimáticas son más potentes a valores de pH neutro. **c)** hay varios niveles en los cuales la expresión y la actividad de las metaloproteinasas son reguladas, dándole al proceso de la remodelación de la matriz el estricto control que tiene durante los procesos normales **d)** la presencia en el ambiente extracelular de inhibidores específicos de la acción de las MMPs (Visse y Nagase, 2003).

Las MMPs se han dividido en cuatro grupos por su relación estructural e incluye: **1.-)** Las colagenasas de mamíferos tipo I (MMP-1,-8, -13) actúan sobre la colágena en un solo sitio, resultando fragmentos que se desnaturalizan formando gelatina no helicoidal. La gelatina es entonces susceptible a una mayor degradación por varias proteinasas incluyendo gelatinasas (Robker *et al.*, 2000). Existen dos miembros de la subclase de colagenasa intersticial que ataca a las colágenas fibrilares: la colagenasa intersticial y la colagenasa de neutrófilos. Ambas enzimas tienen la capacidad característica de romper las cadenas alfa del colágeno tipo I, II y III en un sitio específico (Curry y Osteen, 2001b). Aunque estas enzimas hidrolizan otros sustratos además de las colágenas fibrilares, el rompimiento de las colágenas fibrilares intactas está limitado específicamente a estas enzimas. Generalmente se piensa que las colágenas desnaturalizadas (gelatinas) así como la colágena tipo IV de la membrana basal, son los sustratos específicos de las gelatinasas (Matrisian, 1990; García *et al.*, 1997). Sin embargo, algunos estudios indican que la colágena tipo IV nativa es un sustrato muy pobre para esas enzimas (Mackay *et al.*, 1990). También se ha propuesto

que la colágena tipo IV y la elastina son buenos sustratos para dichas enzimas (Khandoker, *et al.*, 2001).

2.-) Las gelatinasas. Son dos, la gelatinasa A (MMP-2) de 72 kDa está ampliamente distribuida y su actividad frecuentemente se encuentra elevada en tumores malignos. Las MMP-2 hidrolizan gelatinas, colágeno I, IV, V, VII y XI, fibronectina, laminina y elastina y la gelatinasa B (MMP-9) tiene la habilidad de activar la hidrólisis de las gelatinas, colágeno III, IV, V, XIV, elastina y entactina. Tradicionalmente se ha considerado a la gelatinasa B de 92 kDa como gelatinasa de los macrófagos, pero también se ha descrito que se expresa en células transformadas y derivadas de tumores, neutrófilos, células epiteliales de la córnea, citotrofoblastos y queratinocitos (Curry y Osteen, 2001b; Shimokawa *et al.*, 2002).

3.-) El tercer grupo de las metaloproteinasas son las estromelisininas (MMP-3, -7, -10, -11), así llamadas debido a la relativamente amplia especificidad del sustrato de dichas enzimas (McCawley y Matrisan, 2000). Esta familia incluye dos enzimas altamente homogéneas, las estromelisininas 1 y 2, y una tercera enzima más pequeña llamada ahora metrilisina (Hägglund *et al.*, 1999). Estas enzimas usan como sus sustratos naturales proteoglicanos y glicoproteínas tales como la fibronectina y la laminina.

4.-) Algunos investigadores han descrito un cuarto grupo que incluye a las MMP-12, -18 y -19 -26 (Chang y Werb, 2001; Goffin *et al.*, 2003)

En los últimos años nuestro grupo de investigación (García *et al.*, 1997) estudió en la cabra la participación de las colagenasas, incluyendo a las gelatinasas y la entonces conocida como Pz-peptidasa en la atresia y el desarrollo folicular. La Pz-peptidasa o peptidasa semejante a colagenasa es una enzima presente en los tejidos de los mamíferos que actúa sobre el péptido sintético: 4-fenilazobenziloxicarbonil-(Pz)-Pro-Leu-Gli-Pro-D-Arg (Pz-péptido), el cual originalmente fue diseñado para estudiar la actividad de la colagenasa de *Clostridium histolyticum*. Puesto que el Pz-péptido no es un sustrato para las colagenasas habituales en los mamíferos, las enzimas en los tejidos de mamíferos que rompen este sustrato artificial se han denominado Pz-peptidasas o más recientemente Timet oligopeptidasas (Tisljar, 1993).

Estas enzimas se han descrito también como “endopeptidasas tisulares degradantes de sustratos sintéticos de colagenasa” (EC3.4.99.31). Además, se ha encontrado que esta enzima es idéntica a la endopeptidasa (EC 3.4.24.15) (Barret y Tisljar, 1989). También la Pz-peptidasa de conejo se ha encontrado que es idéntica con la endo-oligopeptidasa A (EC 3.4.22.19) (Tisljar y Barret, 1989), una enzima que previamente se ha considerado como cisteína peptidasa. Posteriormente las oligopeptidasas se clasificaron como un grupo distinto de enzimas proteolíticas llamadas MMP-3 pertenecientes a la familia de las estromelisininas (Jacchieri *et al.*, 1998).

La actividad de MMP-3 (Pz-peptidasa) está asociada con el recambio de los componentes del tejido conectivo y, en general, se ha encontrado una actividad alta de Pz-peptidasa en tejidos con una actividad de remodelación alta tales como los folículos dentales en el bovino, en los granulomas de la rata, en el útero de la rata en involución, y en el cuello uterino de mujeres con embarazo avanzado (Shrimpton *et al.*, 2002)

La Pz-peptidasa no tiene efecto sobre la caseína, la albúmina sérica, la gelatina, la colágena y las cadenas α de la colágena aisladas (Shimokawa *et al.*, 2002). La actividad de la Pz-peptidasa tiende a elevarse bajo situaciones biológicas en las cuales la degradación de la colágena se acelera, lo cual ha llevado a proponer que la Pz-peptidasa desempeña un papel importante en los estadios finales de la degradación de la colágena (Tisljar, 1993; Gacko y Glowinski, 1998).

Esta metaloproteínasa neutra hidroliza preferentemente a sus sustratos en el extremo α amino de los aminoácidos hidrofóbicos (Shrimpton *et al.*, 2002). Esta enzima no se inhibe por la α 2 Macroglobulina (Lamont y Jenkinson 1998).

Dentro del sistema nervioso central, la Pz-peptidasa tiene una amplia distribución, con altas concentraciones en áreas ricas en neuropéptidos, como en la hipófisis anterior, el cerebelo y el hipotálamo (Cummins *et al.*, 1999), esto sugiere que la Pz-peptidasa tiene un papel importante en el metabolismo de algunos péptidos bioactivos, como es el caso de la GnRH (hormona liberadora de gonadotropinas), uno de los principales péptidos reguladores en la reproducción. Se ha demostrado que la Pz-peptidasa rompe a la GnRH en la unión Tyr5-Gli6 *in vitro* (Smith *et al.*, 2000).

Otros péptidos con actividad fisiológica en la reproducción son la neurotensina y la bradicinina que son degradados en los sitios donde existe el sustrato específico para la Pz-peptidasa (Kimura *et al.*, 2001). También se ha demostrado que la Pz-peptidasa genera Leu y Met-enkefalinas a partir de pro-enkefalinas de mayor tamaño (Molineaux y Ayala, 1990).

La Pz-peptidasa muestra actividad contra algunos factores de crecimiento y citocinas como: el factor de crecimiento epidermal (EGF), el (TNF α), las taquicinas, las fisaleminas y la sustancia P (Sternlicht y Werb, 2001).

HIPÓTESIS

La actividad de la Pz-peptidasa y de otras MMPs tiende a elevarse bajo situaciones biológicas en las cuales la degradación de la colágena se acelera. La Pz-peptidasa desempeña un papel importante en los estadios finales de la degradación de la colágena requerida para la remodelación tisular del tejido perifolicular durante la maduración del folículo y la ovulación. La actividad insuficiente de estas enzimas, como parte del complejo de proteínas hidrolíticas necesarias durante el proceso ovulatorio normal, formará una parte muy importante en la deteminación del desarrollo de la atresia folicular.

OBJETIVO GENERAL

Estudiar la participación de algunas metaloproteinasas entre ellas, colagenasas, gelatinasas; y demostrar a través de un estudio cinético, así como de la acción de inhibidores específicos, sí la actividad de la Pz-peptidasa presente en los folículos ováricos está formada por la Pz-peptidasa A ó B, o es una enzima característica de los folículos.

OBJETIVOS PARTICULARES

- Demostrar que las metaloproteinasas como las colagenasas, gelatinasas y Pz-peptidasa son importante en los procesos de maduración y atresia folicular.
- Caracterizar la actividad de Pz-peptidasa en los diferentes compartimentos foliculares.

MATERIALES Y MÉTODOS

Se obtuvieron a lo largo del año ovarios de cabras y ovejas criollas adultas sacrificadas en el rastro de Milpa Alta, D.F. Se utilizaron únicamente los ovarios que a la exploración microscópica (120x) no presentaron cuerpos lúteos (CL) y que no mostraron anomalías reproductivas aparentes. Los ovarios fueron trasladados al laboratorio de Reproducción Animal Asistida de la Universidad Autónoma Metropolitana-Iztapalapa en NaCl_2 0.154 M a 4 °C en un lapso de tiempo no mayor de 60 min. Antes de iniciar la disección de los folículos, los ovarios se lavaron dos veces con solución salina fría (4 °C), para eliminar la mayor cantidad de sangre contaminante. La disección de los folículos, se realizó bajo un microscopio estereoscópico (American optical instrument company) equipado con fuente de iluminación eléctrica, utilizando un aumento de 120x tratando de quitar la mayor cantidad de tejido estromal. Durante todo este proceso las muestras se mantuvieron en amortiguador MOPS-NaCl (ácido 3-[N-Morpholino] etan sulfónico) 50 mM-NaCl 0.10 M, pH 7.0 a 4 °C (sobre hielo). Los folículos antrales se separaron en tres grupos según su diámetro mayor: menores de 3 mm, 3 a 6 mm y mayores de 6 mm. Posteriormente se clasificaron por su grado de atresia, en cuatro grupos: no-atréticos (grupo I), atresia inicial (grupo II), moderadamente atréticos (grupo IIIa) y francamente atréticos (grupo IIIb), bajo el microscopio estereoscópico antes mencionado, siguiendo la técnica validada en nuestro laboratorio (Rosales, 1990). En el grupo I se incluyeron los folículos normales, en el grupo II se incluyen los folículos con atresia inicial en el cual se incluyen aquellos folículos que presentaron apariencia grisácea o que han perdido su apariencia translúcida, pero que todavía presentaron adecuada vascularización sanguínea y escasos desprendimientos de la capa granulosa. En el tercer grupo se incluyeron los folículos claramente atréticos, cuya apariencia opaca obedece a que la mayor parte de los vasos sanguíneos se encuentran vacíos, así como a la presencia de grandes desprendimientos de la granulosa y de una gran cantidad de glóbulos blanquecinos, "cuerpos atréticos", dentro de la cavidad folicular.

1870
1871
1872
1873
1874
1875
1876
1877
1878
1879
1880
1881
1882
1883
1884
1885
1886
1887
1888
1889
1890
1891
1892
1893
1894
1895
1896
1897
1898
1899
1900

DETERMINACION DE PZ-PEPTIDASA

La actividad de Pz-peptidasa se determinó por el método de Lessley y Garner (1983; 1984; 1985; 1990), en los sobrenadantes obtenidos del homogeneizado de las células de la granulosa y en el líquido folicular. Respetando siempre el procedimiento siguiente: de manera breve, a 250 µl de la muestra diluida 1:4 se agregó a 1.0 ml de sustrato preincubado 30 minutos a 30 °C que contenía 2.5 mM de Pz-péptido y 0.1 mM de Ditiotreitól en 50 mM Mops y 50 mM NaCl₂, todo ajustado a pH 7.4. La incubación se continuó a la misma temperatura por 30 minutos. Durante la incubación se separaron cinco alícuotas de 0.20 ml con intervalos de 60 minutos cada una y se acidificaron por la adición de 0.20 ml de H₃PO₄ 200 mM. El producto de la hidrólisis se extrajo de la solución acidificada con 2.5 ml de acetato de butilo y su concentración se midió por espectrofotometría a 322 nm. La actividad total de Pz-peptidasa se calculó por análisis de regresión lineal de los resultados obtenidos para cada uno de los cinco puntos en cada ensayo. La actividad enzimática se expresa en µg de sustrato hidrolizado por mg de proteína por hora.

La caracterización de la Pz-peptidasa se llevó a cabo mediante;

a) DEPENDENCIA DEL pH EN LA ACTIVIDAD DE PZ-PEPTIDASA

La actividad de Pz-peptidasa fue determinada entre límites de pH de 6.5-8.0 con amortiguador MOPS-NaCl₂ (Lessley y Garner, 1983).

b) INHIBIDORES ESPECÍFICOS DE LA PZ-PEPTIDASA:

Los inhibidores en varios grados de especificidad son herramientas valiosas en el estudio de las enzimas proteolíticas. Reportes previos indican que Pz-peptidasa es fuertemente inhibida por agentes metaloquelantes (Barret y Tisljar, 1989).

La caracterización de los tipos de la Pz-peptidasa se llevó a cabo mediante el uso de inhibidores específicos como: iodoacetamida 1 mM, MnCl₂ 1 mM, ortofenantrolina 1

mM, CuCl_2 0.1 mM, *p*-hidroximercuribenzoato 0.1 mM y CoCl_2 0.1 mM, siguiendo el método de Barret y Tislar (1989).

La mezcla de incubación tenía la misma composición para la determinación de Pz-peptidasa, la única modificación fue la presencia del inhibidor al momento de colocar la muestra.

c) SEPARACIÓN DE PZ-PEPTIDASA A Y B

Se llevó a cabo usando la fracción soluble (FS) del homogeneizado de las células de la granulosa y del líquido folicular centrifugado, mantenido a una temperatura de 0-4 °C.

La obtención de Pz-peptidasa A y B se realizó por filtración en gel en una columna de Sephadex G-50 (1 cm x 10 cm) y fracciones de 0.5 ml eluidas con volumen vacío fueron colectadas y representan la actividad de Pz-peptidasa A, la fracción eluida después del volumen vacío representó Pz-peptidasa B.

La fracción soluble del homogeneizado de las células de la granulosa y el centrifugado del líquido folicular se pasaron a través de una columna de Sephadex G-50 equilibrada previamente con sal de sodio de 3-(*N*-morfolino) etansulfónico (Na-MOPS) y 50 mM de NaCl y ajustado a pH 7.4. Todas las fracciones que contenían proteínas por absorbancia fueron colectadas, combinadas y concentradas hasta 1 ml aproximadamente y almacenadas a -20 °C hasta su determinación.

DETERMINACIÓN DE COLAGENASAS Y METALOPROTEINASAS.

La determinación se llevó a cabo en células de la granulosa, células de la teca y líquido folicular. La actividad folicular de las metaloproteinasas se realizó siguiendo la metodología propuesta por Weeks *et al.*, (1976). Los homogeneizados obtenidos de los sacos foliculares y de las células de la granulosa se centrifugaron a 4 °C en una centrifuga refrigerada Beckman a 33 100 x g durante 20 min. Los precipitados fueron rehomogeneizados en 200 µl de amortiguador Tris 50 mM a pH 7.4 conteniendo 100

mM de CaCl_2 y se incubaron a 60°C durante 4 min para disociar la colagenasa unida al colágeno y se recentrifugaron bajo las mismas condiciones mencionadas anteriormente. Los sobrenadantes de las células de la teca y de las células de la granulosa se dializaron durante toda la noche contra un exceso de la solución T-B x100. El líquido folicular fue también calentado a 60°C durante 4 min después de la adición de CaCl_2 a una concentración final de 100 mM y dializados bajo las mismas condiciones.

Para inactivar las metaloproteinasas y activar las colagenasas foliculares los sobrenadantes dializados (de las células de la teca y la granulosa) y el dializado del líquido folicular se trataron con ditioneitol (DTT) 2 mM a 37°C durante 30 min y después con iodoacetamida 5 mM a la misma temperatura durante otros 30 min y se dializaron durante toda la noche contra una solución de T-B bajo las condiciones anteriormente descritas. Las muestras tratadas y dializadas fueron activadas por incubación en presencia de acetato aminofenilmercurio (AMPA) 1 mM durante 4 horas y redializadas durante toda la noche contra la solución T-B (Matrisian, 1992).

DETERMINACIÓN DE COLAGENASA INTERSTICIAL.

La actividad colagenolítica se determinó en células de la granulosa, células de la teca y líquido folicular, por la liberación enzimática de fragmentos de colágena marcada ^3H , siguiendo la metodología descrita por Johnson-Wint y Gross (1980). Como sustrato se usó el telopéptido libre, (N-[propionato-2,3- ^3H]-colágena de rata tipo I, NET 660, 0.26 mCi/mg actividad específica), diluido 1:20 con ácido acético 5 mM. En cada uno de los pozos de una placa de ELISA se adicionaron: 10 μl (0.025 μCi) de propionato de colágeno tipo I tritiado y 50 μl de amortiguador NaHCO_3 0.1 M a pH 9.0. Para fijar la colágena a la pared de los pozos, se permitió que el líquido se evaporara durante 24 horas a temperatura ambiente en un desecador conectado a una bomba de vacío y cada pozo se lavó tres veces con agua destilada. Posteriormente se adicionó a cada pozo la siguiente mezcla de reacción: Tris-HCl 3.3 mM a pH 7.8, N-etil-maleimida 7.5 mM, CaCl_2 10 mM y el volumen de homogeneizado de los problemas equivalente a 10

μg de proteína y se ajustó a $150\ \mu\text{l}$. Se incluyeron blancos sin enzima, y los testigos con $20\ \text{mM}$ de EDTA en lugar de calcio y se incluyeron también reacciones con $2\ \mu\text{g}$ de colagenasa bacteriana (con 100% de actividad). Cada muestra se corrió por duplicado. Las placas se incubaron a $35\ ^\circ\text{C}$ durante 48 horas en una incubadora humidificada y después se centrifugaron en una centrífuga refrigerada ICM a $1500\ \text{rpm}$ por $10\ \text{min}$. El sobrenadante de cada pozo se recuperó y se contó en un contador de centelleo líquido Beckman LS-6000SE. La actividad enzimática se calculó como las dpm liberadas por mg de proteína por 24 horas. Todos los valores se corrigieron por la cantidad de actividad que se encontró en los blancos (sin enzima) y en los testigos (sin calcio, más EDTA).

DETERMINACIÓN DE GELATINASA.

Las determinaciones de gelatinasa se hicieron por zimografía de la fracción enzimática activada y acilada de los homogeneizados de las células de la granulosa y de la teca siguiendo el método descrito por Heussen y Dowdle (1980). Para esto, la fracción final de tejido obtenida como se describió anteriormente, se ajustó a una concentración final de proteínas de $0.5\ \text{mg/ml}$ ($1.0\ \text{mg/ml}$ en el caso del líquido folicular) usando amortiguador de Tris a $\text{pH}\ 7.4$, conteniendo $\text{CaCl}_2\ 5\ \text{mM}$, dodecil sulfato de sodio al $2\%\ \text{v/v}$ (SDS) y 20% de glicerol. Alícuotas de $20\ \mu\text{l}$ de cada muestra se aplicaron a minigeles de poliacrilamida al $10\%\ (\text{p/v})$ copolimerizada con gelatina al $0.1\%\ (\text{p/v})$. La electroforesis se realizó en cuarto frío (4°C) a una corriente constante de $25\ \text{mA/gel}$ bajo condiciones no reductoras hasta que el colorante marcador alcanzó el fondo del gel de resolución.

Después el gel se lavó durante 2 horas en solución acuosa de Triton X-100 al 2.5% para eliminar el SDS, se lavaron tres veces con agua destilada y se incubaron durante toda la noche en atmósfera húmeda a $37\ ^\circ\text{C}$ en el mismo amortiguador en el que se preparó el sustrato: Tris $0.1\ \text{M}$ a $\text{pH}\ 7.4$ que contenía $\text{CaCl}_2\ 0.01\ \text{M}$. El gel se fijó y retendió durante una hora de incubación con 0.05% de azul brillante de Coomassie en una mezcla de agua, metanol y ácido acético (6:3:1) y posteriormente se destiñó

durante una hora de incubación en la misma mezcla sin el colorante de Coomasie. Las enzimas degradadoras de gelatina se identificaron por su habilidad para digerir el gel. Para estimar el tamaño molecular final de las bandas obtenidas por zimografía en gel se usaron marcadores de pesos moleculares Rainbow (Amersham, Arlington Heights, IL).

La actividad gelatinolítica se identificó por la incorporación de inhibidores de metaloproteasas en el amortiguador de incubación y comparando contra los testigos sin el inhibidor. Los inhibidores usados fueron: ácido etilen diamino tetraácetico (EDTA) (10 mM), ditioneitol (DTT) (5 mM), fluoruro de O-fenil-metil-sulfonilo (1mM), 2-orto-fenantrolina (5mM), pestatina A (1µl/ml) y N-etil-melamida (10mM).

La actividad proteolítica no-específica fue medida usando como sustrato caseína incorporada a los geles siguiendo el procedimiento descrito por Heussen y Dowdle (1980). En este caso, después de la electroforesis, los geles fueron lavados con una solución al 2.5% de Triton X-100 y posteriormente con agua destilada, e incubados durante 10 min en Tris-HCl 0.1 M a pH 7.4, conteniendo CaCl_2 0.01M e inmediatamente puestos sobre geles de acrilamida al 7.5% preparados recientemente que contenían caseína como sustrato. La solución del sustrato se preparó por ebullición durante una hora de una solución de 1 g de caseína en 20 ml de ácido bórico 0.2 M preparado en NaCl 0.160 M a pH 8. La caseína solubilizada se enfrió a temperatura ambiente, se centrifugó a 12 000 x g durante 30 min y se filtró a través de una membrana de Millipore con un poro de 0.45 µm. Una vez en contacto los geles se colocaron entre dos placas de vidrio, se envolvieron enrollados en papel aluminio y se incubaron a 37 °C durante 24 horas en una atmósfera húmeda. Después de la incubación los geles se fijaron, se tiñeron y se destiñeron de la misma manera que se describió anteriormente.

La medición de la actividad de gelatinasa se realizó por análisis de imágenes computarizado usando densitometría bidimensional (Gel Scan XL, LKB Pharmacia). Los pesos moleculares (Mrs) de las proteinasas se estimaron por comparación de su movilidad electroforética con los marcadores de pesos moleculares estándares.

DETERMINACION DE PROTEINAS

A todas las muestras se les determinó la concentración de proteínas por el método de Lowry *et al.*, (1951), modificado por la incorporación del tartrato de sodio y potasio a la solución alcalina, con lo cual se le da mayor estabilidad a los reactivos.

Las muestras de líquido folicular se diluyeron 1:4 en agua destilada mientras que los homogeneizados de las células foliculares se usaron al 10% P/V y de ambas muestras se utilizaron 10 μ l.

Para la curva estándar se utilizó albúmina sérica bovina liofilizada. Las concentraciones utilizadas son de 15 a 90 μ g/sistema. Las concentraciones se midieron con un espectrofotómetro Coleman Junior 620 a 550 nm.

ANALISIS DE DATOS.

Todos los datos representan el resultado de experimentos por duplicado y generalmente se presentaran como el promedio \pm el error estándar. La existencia de diferencias estadísticas se realizó por análisis de varianza (ANOVA) y prueba de Tukey.

RESULTADOS

La actividad de la Pz-peptidasa en las células de la granulosa fue 3 a 7 veces mayor que la actividad encontrada en las células de la teca (sacos foliculares) (Tabla I). Por el contrario, está casi ausente o completamente inhibida en el líquido folicular cuya actividad es casi 100 veces menor que en la granulosa. Sin embargo, puesto que se midió la Pz-peptidasa en muestras reducidas y alquiladas, si en el líquido folicular existe algún inhibidor éste debe ser de un tipo diferente al que usualmente se describe como inhibidor de las metaloproteinasas de la matriz extracelular.

TABLA I Actividad enzimática de Pz-peptidasa en las diferentes estructuras foliculares.

Grupo	Atresia	n	Células de la Granulosa	Células de la Teca	Líquido Folicular
<3	I	5	40.45±4.05*	24.25±4.10*	1.92±0.18*
3-6	I	7	107.06±20.08**a	51.93±7.11**a	1.51±0.13**a
	II	6	106.35±21.94a	33.92±5.70b	1.11±0.14b
	IIIa	8	93.70±12.90a	22.44±5.04c	1.02±0.16b
	IIIb	9	113.24±14.08 ^a	13.41±4.04d	1.05±0.13b
>6	I	8	146.28±18.71***a	22.34±4.29*a	0.94±0.13***a
	II	10	95.64±14.74b	19.33±3.67 ^a	1.06±0.09a
	IIIa	8	91.80±11.12b	20.18±5.45 ^a	0.71±0.09b
	IIIb	6	68.30± 9.15c	24.43±4.74a	0.95±0.14a

Los resultados se expresan como µgramos de sustrato hidrolizado/mg de proteína y representan el promedio ± la desviación estándar.

^aLetras diferentes indican la existencia de diferencia estadística significativas, $p < 0.05$ entre los diferentes grupos de folículos del mismo tamaño.

* $P < 0.05$ ** < 0.01 *** < 0.001

En la tabla I se muestra que la actividad de Pz-peptidasa del líquido folicular, de las células de la granulosa y de las células de la teca de los folículos en crecimiento no atrésicos, mostró un aumento significativo durante el crecimiento folicular. En los últimos estadios de crecimiento folicular, la actividad de la Pz-peptidasa aumentó en

las células de la granulosa mientras que en el líquido folicular y en las células de la teca disminuyó significativamente (Tabla I). Durante la atresia folicular, en las células de la granulosa de los folículos de 3-6 mm la actividad de esta enzima no tuvo cambios importantes. Por el contrario, la actividad de la Pz-peptidasa de las células de la teca en este mismo grupo de folículos mostró una disminución altamente significativa con una correlación lineal respecto al progreso de la atresia. En los folículos mayores de 6 mm el comportamiento fue inverso. En este caso las células de la granulosa mostraron una disminución constante en la actividad de Pz-peptidasa con relación al avance de la atresia; mientras que esta actividad en las células de la teca no tuvo cambios importantes que pudieran relacionarse con el grado de atresia. En la tabla II se muestra que en las células de la teca de folículos pequeños y medianos no-atrésicos, la actividad de colagenasa intersticial se mantuvo casi constante, con un incremento pequeño no significativo en los folículos medianos (3-6 mm).

TABLA II Actividad de Colagenasa Intersticial (Tipo I)
(dpm/24h/mg de proteína) x 10⁻⁴

Grupo	Atresia	n	Células Granulosa	Células Teca	Líquido Folicular
<3	I	5	23.0±3.7*	30.1±3.7*	-
3-6	I	7	25.9±3.4*a	36.4±4.4*a	4.8±1.2a
	II	5	23.3±3.7a	24.1±3.7b	5.6±0.9a
	IIIa	6	24.6±2.9a	19.5±2.7b	6.4±1.9a
	IIIb	9	14.4±1.1b	4.8±0.8c	13.3±3.7b
>6	I	8	15.9±2.5**a	48.6±5.4**a	-
	II	8	12.7±1.3a	25.7±3.0b	-
	IIIa	7	23.8±3.5b	20.6±4.6b	9.4±2.1 ^a
	IIIb	6	6.7±1.3c	14.7±1.8c	15.3±4.7b

Los valores representan el promedio del número de casos (n) ± la desviación estándar.

*Número diferente de asteriscos indican una diferencia estadística significativa, p<0.05, entre folículos no atrésicos de diferente tamaño usando la prueba t de Student.

^a Letras diferentes indican la existencia de diferencias estadísticas significativas, p<0.05 entre diferentes grupos de folículos del mismo tamaño, usando el método de análisis de varianza de una vía, seguido de la prueba de Student-Newman-Keuls para analizar las diferencias.

- No se detectó actividad enzimática.

Por el contrario, la actividad de la colagenasa de las células de la teca obtenidas de folículos normales mayores de 6 mm mostró un pequeño aumento, pero estadísticamente significativo. La actividad de colagenasa intersticial de las células de la granulosa de los folículos no atrésicos, siempre fue menor que la observada en las células de la teca y además mostró una disminución significativa en los folículos >6 mm.

La actividad de la colagenasa durante los estadios iniciales de atresia (grupo II y IIIa) en las células de la granulosa de los folículos de 3-6 mm, fue similar a la actividad encontrada en los folículos normales, pero en los folículos con atresia avanzada (IIIb) la colagenasa mostró una disminución altamente significativa ($p < 0.005$) (Tabla II). Cuando la atresia alcanzó las características del grupo IIIb, en los folículos grandes >6 mm, la colagenasa intersticial en este mismo tipo de células, mostró un aumento en los folículos del grupo IIIa seguido por una disminución brusca (Tabla II).

La atresia, aún en los estadios iniciales, fue acompañada invariablemente por una disminución en la actividad de la colagenasa de las células de la teca (Tabla II). Esta disminución en la actividad colagenolítica en los folículos de 3-6 mm de tamaño siguió un claro patrón lineal cuyo coeficiente de correlación calculado en función al progreso de la atresia es de 0.566 con una $p < 0.02$ y una pendiente de $-5.71 \text{dpm} \times 10^{-4}$. En los folículos mayores de 6 mm también se observó una disminución lineal, aunque la significancia del coeficiente de correlación correspondiente disminuyó por la presencia de un incremento de la actividad de colagenasa de los folículos del grupo IIIa. La actividad más baja de colagenasa intersticial se observó en las células de la teca de los folículos del grupo IIIb.

La actividad de colagenasa en el líquido folicular (Tabla II) fue muy pequeña comparada con la actividad encontrada en las células, tanto de la teca como de la granulosa y prácticamente no medible en los folículos <3 mm y en los folículos >6 mm de los grupos I y II. Sin embargo, en los estadios avanzados de atresia, grupo IIIb, la actividad colagenolítica del líquido folicular fue excepcionalmente alta.

La identificación zimográfica de la actividad gelatinolítica folicular reveló la presencia de varias zonas deficientes en gelatina. Las regiones de gelatina digerida fueron

diferentes dependiendo del extracto tisular estudiado, pero, en general, normalmente se identificaron 5 zonas por análisis de imagen. De éstas, dos fueron casi siempre predominantes con masa molecular de 63.8 ± 2.4 y 30.7 ± 1.8 kDa. Las otras zonas observadas se encontraron en regiones que corresponden a pesos moleculares de 71.4 ± 2.1 , 39.6 ± 2.2 y 22.1 ± 0.8 kDa. Excepcionalmente se encontraron dos bandas de actividad hidrolítica de alto peso molecular cuyos valores fueron de 91.3 y de 81.2 kDa.

Todas las bandas con actividad colagenolítica representaron actividad verdadera de metaloproteinasas ya que hubo una pérdida total de actividad en el zimograma en presencia de agentes quelantes de metales (ortofenantrolina, EDTA) y otros compuestos inhibidores (Figura 1).

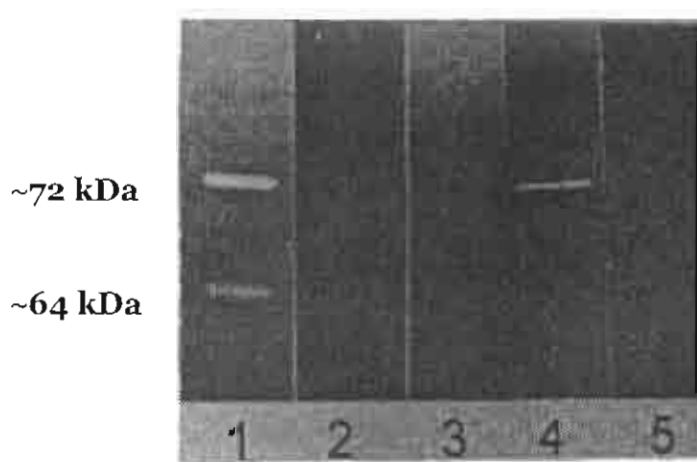


Figura 1. Sensibilidad de la actividad de gelatinasa de los extractos foliculares completos a diferentes tipos de inhibidores durante la electroforesis en geles SDS-Poge (geles de poliacrilamida-dodecil sulfato de sodio) copolimerizados con gelatina. La actividad gelatinolítica se caracterizó por comparación de los geles que tenían las muestras incubadas en presencia de inhibidores de metaloproteasas contra los geles que contenían los controles (carril 1). Los inhibidores usados fueron: 2 orto-fenantrolina 5 mM carril 2, ácido etilen diamino tetracético 10 mM (EDTA) (carril 3), ditioneitol 5 mM (no mostrado), fluoruro de *o*-fenil-metil-sulfonilo 1 mM (carril 4), pestatina A 1 μ l/ml (carril 5) y N-etil maleimida 10 mM (no mostrado).

En el caso del líquido folicular inactivado (Figura 2) casi toda la actividad gelatinolítica estuvo presente en la banda localizada a ~72 kDa. Esta actividad colagenolítica mostró un incremento claro y transitorio en los folículos atrésicos en el estado IIIa (Figura 2, carril 3). Cuando el líquido folicular se pretrató con AMPA se observaron dos bandas de actividad gelatinolítica, una a 72 kDa y otra mejor definida a 64 kDa (Figura 2b no mostrada). Esas dos últimas actividades enzimáticas tienden a aumentar conforme progresa la atresia.

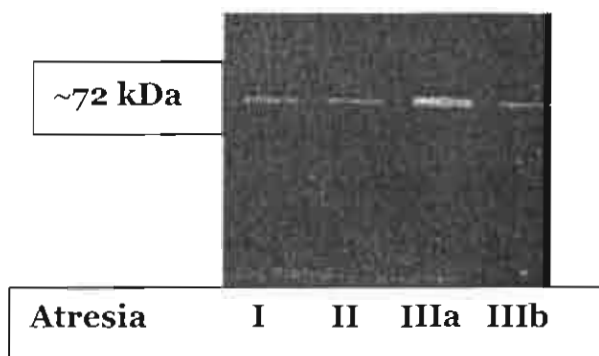


Figura 2. Zimograma representativo de la actividad gelatinolítica en gel del líquido folicular colectado de folículos normales atrésicos mayores de 6 mm, sin activar y activado con acetato de p-amino fenil mercurio (para las condiciones experimentales vea la figura 1). En el caso del líquido folicular sin activar (a) casi toda la actividad gelatinolítica estuvo presente en la banda localizada a ~72 kDa. Esta actividad gelatinolítica mostró un incremento claro y transitorio en los folículos en el estadio IIIa de atresia (a, banda 3). Cuando el líquido folicular se pretrató con acetato de p-amino fenil mercurio, se observaron dos bandas con actividad gelatinolítica: una a 72 kDa y otra mejor definida a 64 kDa (figura no mostrada). Estas dos actividades enzimáticas tienden a aumentar conforme progresa la atresia. Los números a la derecha corresponden al tamaño molecular (en kDa) de la región hidrolizada.

Las figuras 3 y 4 presentan los zimogramas obtenidos de extractos de células de la teca (Figura 3) y de células de la granulosa (Figura 4) durante el crecimiento folicular normal y durante la atresia. Las tablas III y IV ilustran la medición densitométrica de zimogramas representativos de extractos tanto de la teca como de la granulosa respectivamente. En el caso del crecimiento folicular normal, las células de la teca de folículos <3 mm se caracterizaron por la presencia de pequeñas cantidades de gelatinasas con masas moleculares de 92, 81.2 y 71.4 kDa y por actividades elevadas

de gelatinasas de 64 y 31 kDa (Figura 3a carril 1, Tabla III). Este patrón se preservó en los folículos no atrésicos de 3-6 mm pero con una actividad considerablemente menor (Figura 3a carril 2).

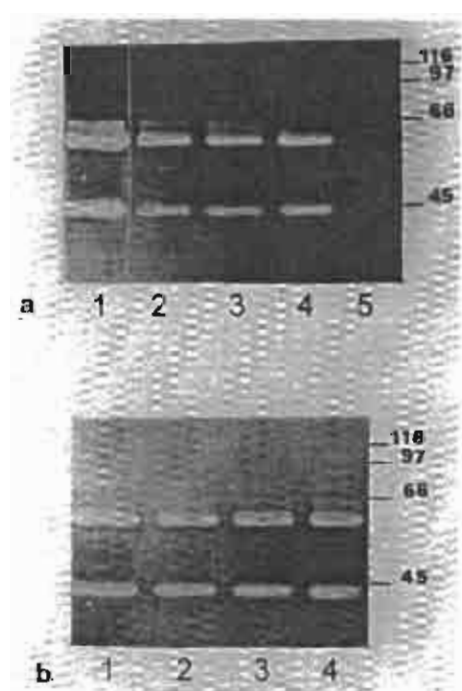


Figura 3. Zimograma representativo de la actividad de gelatinasa de los extractos de las células de la teca obtenidas de folículos normales y atrésicos de diferentes tamaños (ver la figura 1 para las condiciones experimentales). Folículos <3 mm figura a, carril 2. Folículos atrésicos de 3-6 mm, con atrésia inicial (grupo II) figura a carril 3, con atrésia moderada (grupo IIIa) figura a carril 4, con atrésia avanzada (grupo IIIb) figura a carril 5. Folículos mayores de 6 mm no atrésicos (grupo 1) figura b carril 1, folículos del grupo II carril 2, del grupo IIIa carril 3 y del grupo IIIb carril 4. Los números a la derecha corresponden al tamaño molecular (en kDa) de la zona hidrolizada.

Tabla III. Determinación densitométrica de la zimografía de la actividad Gelatinolítica en células de la teca durante el crecimiento folicular normal y en diferentes estadios de la atresia.

Tamaño	<3 mm	3-6 mm				>6 mm			
Grupo		I	II	IIIa	IIIb	I	II	IIIa	IIIb
Mr									
91.3	28	32	95						67
81.2	90	154	182						97
71.4	235	220	265	180		110	95	112	
63.8	749	509	480	615	115	360	348	325	312
52.0				130		128			
39.6	110		110	64	12	128			
30.7	694	410	390	494	87	320	295	282	300
22.1							115	95	

El patrón de gelatinólisis producido por extractos de las células de la teca obtenidos de folículos normales >6 mm se caracterizaron especialmente por tener actividad alta de estromelisin y de colagenasa tipo IV (Figura 3 carril 1). Las células de la granulosa de los folículos <3 mm mostraron una actividad alta de colagenasas con masas moleculares de 64 y 31 kDa y algo de actividad en la zona de 72 kDa (Figura 4 carril 1, Tabla IV).

Tabla IV. Determinación densitométrica de la zimografía de la actividad gelatinolítica en células de la granulosa durante el crecimiento folicular normal y en diferentes estadios de la atresia.

Tamaño	<3 mm	3-6 mm				>6 mm			
Grupo		I	II	IIIa	IIIb	I	II	IIIa	IIIb
Mr									
91.3			105						305
81.2			225						47
71.4	93	63	490	150		39	38	14	67
63.8	325	152	140	508	83	133	90	74	380
52.0				63		33			60
39.6				60		7			12
30.7	405	70	185	340	25	34	31	6	190

Este patrón se preservó también en los folículos no atrésicos de 3-6 mm (Figura 4 carriles 2 y 3) y en los folículos no atrésicos >6 mm, pero con una actividad mucho menor de estromelina (Figura 4a carriles 2 y 3, Figura 4b carril 1).

El progreso de la atresia en las células de la teca (Figura 3a carriles 3-5, Tabla III) obtenidas de folículos medianos (3-6 mm) se acompañó por una disminución progresiva de la actividad gelatinolítica, de tal manera que en el estado IIIb casi no se detectó actividad gelatinolítica (Figura 3a carril 5). En general no se observaron modificaciones en el patrón de actividad gelatinolítica durante el transcurso de la atresia en las células de la teca obtenidas de folículos >6 mm (Figura 3b carriles 2-4). Sin embargo, este proceso se acompañó en el estado IIIb de la aparición de algunas bandas hidrolíticas en la región de alto peso molecular (Figura 3b carril 4, Figura 5).

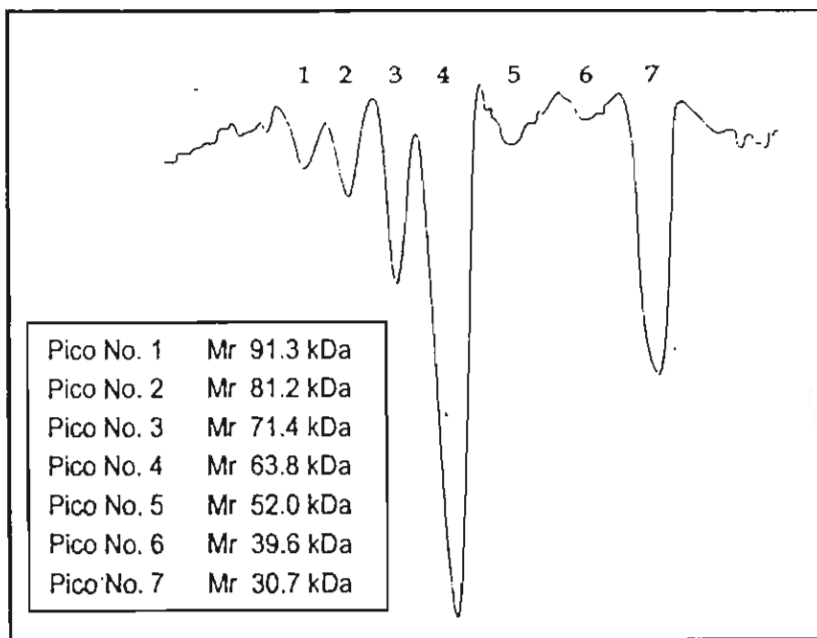


Figura 5. Determinación de la actividad gelatinolítica en un zimograma por análisis computarizado de imagen, usando un densitómetro bidimensional (Gel Scan XL, LKB Pharmacia). La imagen representa el análisis densitométrico de un zimograma representativo de la actividad enzimática de las células de la teca obtenidos de folículos >6 mm del grupo IIIb (Figura 3b carril 4). El peso molecular (Mr) de las regiones hidrolizadas, se estimó comparando sus movilidades electroforéticas con las de proteínas estándares. Los picos 4 y 7 tienen una movilidad que corresponde a pesos moleculares de 63.8 ± 2.4 y 30.7 ± 1.8 y que corresponden a la gelatinasa tipo IV activada (MMP-2) y a las estromelisininas (MMP-3 y MMP-10) respectivamente. Las otras bandas corresponden a la colagenasa tipo IV latente. (Mr= 71.4 ± 2.1 kDa) (pico 3), a la colagenasa tipo I activada (Mr= $39.62.2$ kDa) (pico 6). Las dos regiones de actividad hidrolítica con peso molecular alto pueden estar relacionadas a las formas latentes y activadas de la colagenasa tipo V (MMP-9) (Mr= 91.3 y 81.2 kDa, pico 1 y 2 respectivamente). El pico 5 puede representar colagenasa tipo I activada.

La figura 5 muestra la imagen que representa el análisis densitométrico de un zimograma representativo de la actividad enzimática de las células de la teca obtenidos de folículos >6 mm del grupo IIIb.

El inicio del proceso atrésico en las células de la granulosa de folículos de 3-6 mm se caracterizó por el aumento de la actividad gelatinolítica de alto peso molecular, particularmente de colagenasas tipo IV activas y de colagenasas tipo IV latentes de 71.4 kDa las cuales tuvieron la actividad más alta (Figura 4a carril 4, Tabla IV). En el caso de las células de la teca, el avance de la atresia se acompañó de una disminución

progresiva de la actividad colagenolítica de tal manera que en el estado IIIb de los folículos de 3-6 mm casi no se detectó dicha actividad (Figura 4a carril 6). El patrón que se observó en las células de la granulosa de los folículos no atrésicos >6 mm se preservó durante los estados iniciales de atresia, pero con una disminución progresiva en la actividad de estromelina (Figura 4b carriles 2 y 3). En el estadio IIIb, dicho patrón se caracterizó por un aumento súbito en la actividad gelatinolítica y, como en el caso de las células de la teca, por la aparición de algunas bandas hidrolíticas en las regiones de alto peso molecular (Figura 4b carril 4, Figura 6). La figura 6 representa el análisis densitométrico de un zimograma típico de la actividad enzimática de las células de la granulosa obtenidas de folículos >6 mm pertenecientes al grupo IIIb.

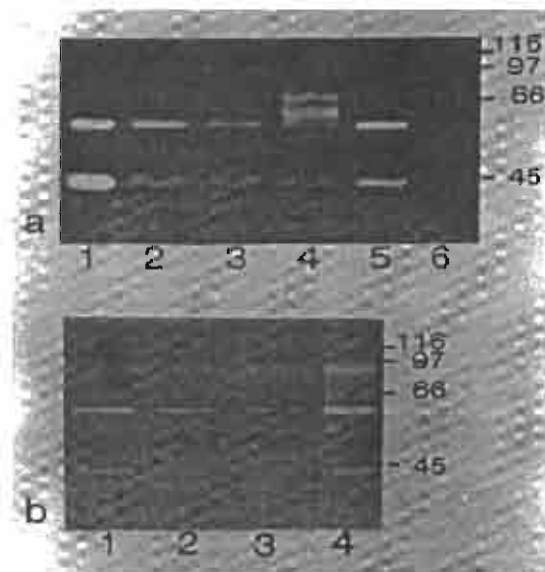


Figura 4. Zimograma representativo de la actividad de gelatinasa de los extractos de las células de la granulosa obtenidas de folículos normales y atrésicos (condiciones experimentales ver figura 1). Folículos < 3 mm figura a, carril 1. Folículos de 3-6 mm no atrésicos carriles 2 y 3. Folículos de 3-6 mm inicialmente atrésicos figura a carril 4, moderadamente atrésicos carril 5, y francamente atrésicos, carril 6. Folículos mayores de 6 mm no atrésicos figura b carril 1, con atresia inicial, carril 2, moderadamente atrésicos, carril 3 y con atresia avanzada carril 4. Los números a la derecha corresponden al tamaño molecular (en kDa) de la zona hidrolizada.

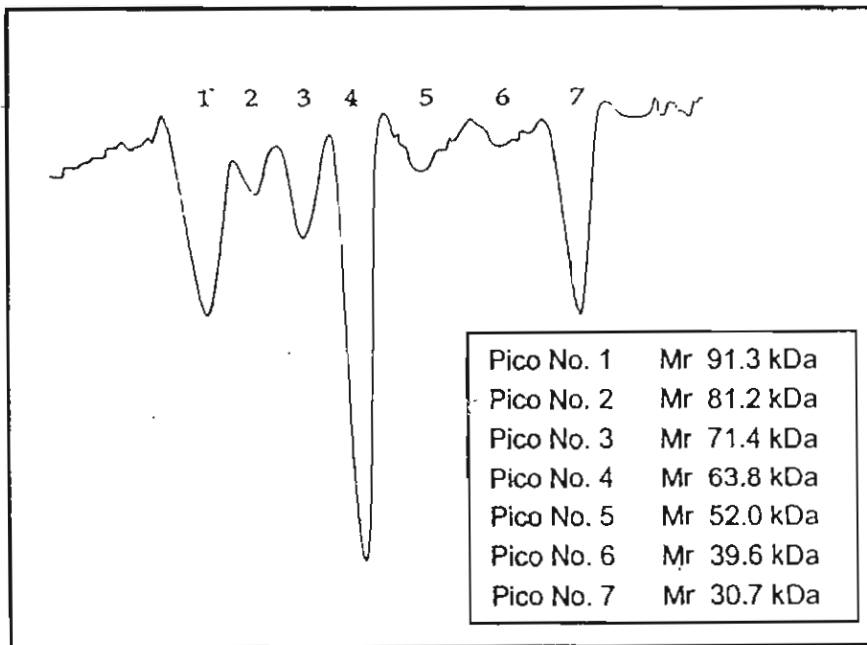


Figura 6. Medición de la actividad gelatinolítica en un zimograma por análisis de imagen computarizado usando un densitómetro bidimensional (Gel Scan XL, LKB Pharmacia). La imagen representa el análisis densitométrico de un zimograma típico de la actividad enzimática de las células de la granulosa obtenidas de folículos >6 mm pertenecientes al grupo IIb (figura 4b carril 4). Los pesos moleculares de las proteinasas se valoró comparando sus movilidades electroforéticas con las de proteínas estándares y corresponden a las mencionadas en la figura 5.

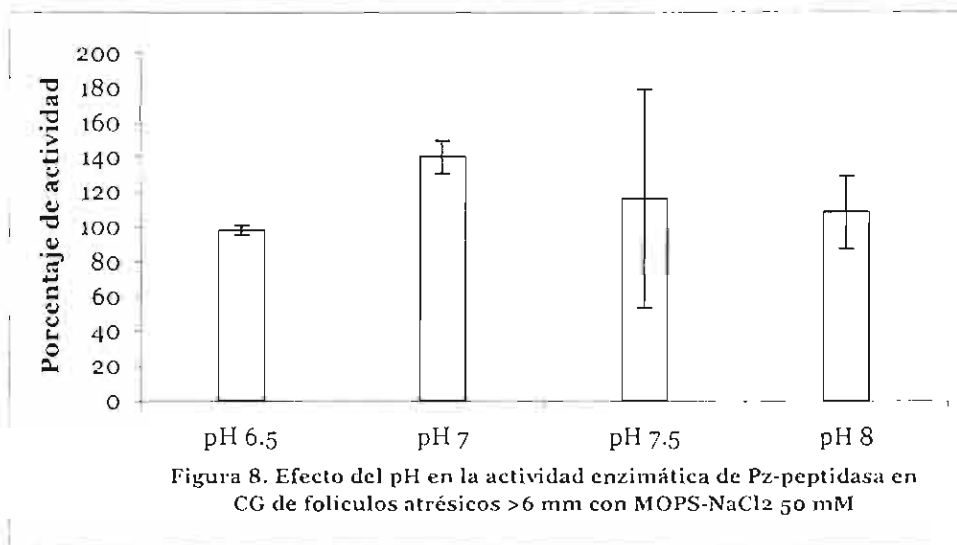
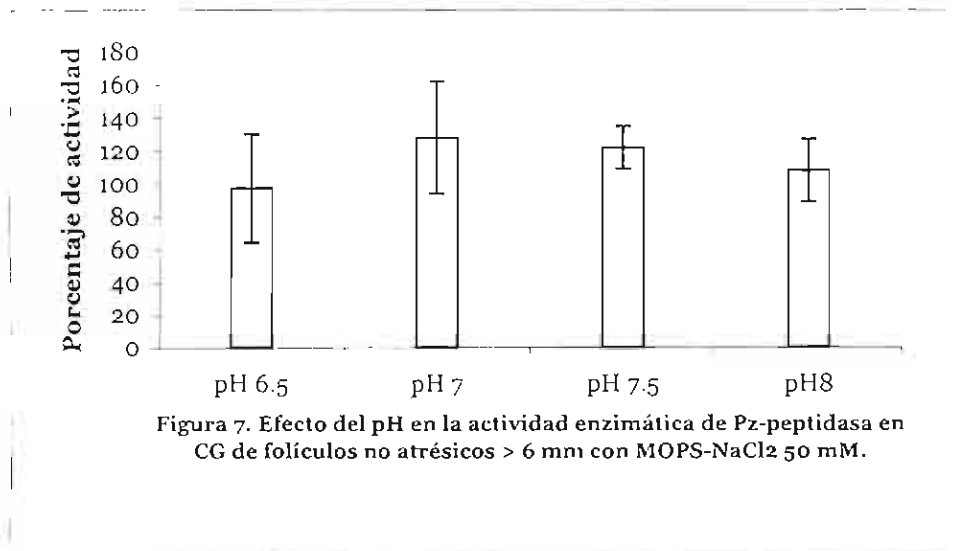
RESULTADOS DE LA CARACTERIZACIÓN DE LA PZ-PEPTIDASA:

Dependencia del pH.

La dependencia del pH en la actividad de Pz-peptidasa fue determinada entre límites de pH de 6.5-8.0 con amortiguador MOPS-NaCl 50 mM (Lessley y Garner, 1983). Los resultados muestran, que el máximo de la actividad de Pz-peptidasa se presenta en células de la granulosa de folículos atrésicos y no atrésicos >6 mm a un pH 7.0 (Figuras 7 y 8 respectivamente). Por lo que respecta a células de la granulosa de folículos no atrésicos de 3-6 mm, la actividad enzimática presenta igualmente el máximo de su actividad en el pH 7. Sin embargo, esto no ocurre en las células de la granulosa de folículos atrésicos de 3-6 mm debido a que el máximo de actividad de la

Pz-peptidasa se presenta en el pH 6.5 y la actividad disminuye conforme aumenta el pH.

En las figuras 7, 8, 9 y 10 se presentan los resultados obtenidos en células de la granulosa. Los resultados representan el porcentaje de actividad enzimática de Pz-peptidasa con respecto al control.



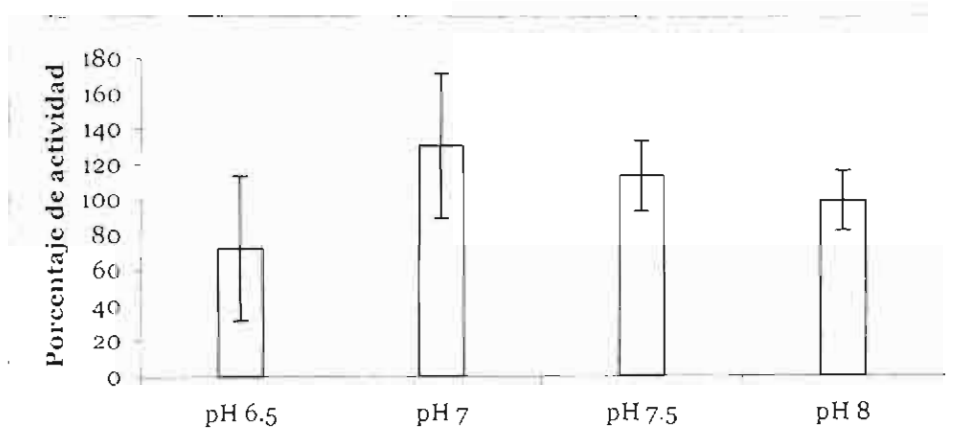


Figura 9. Efecto del pH en la actividad enzimática de Pz-peptidasa en CG de folículos no atrésicos de 3-6 mm con MOPS-NaCl2 50 mM

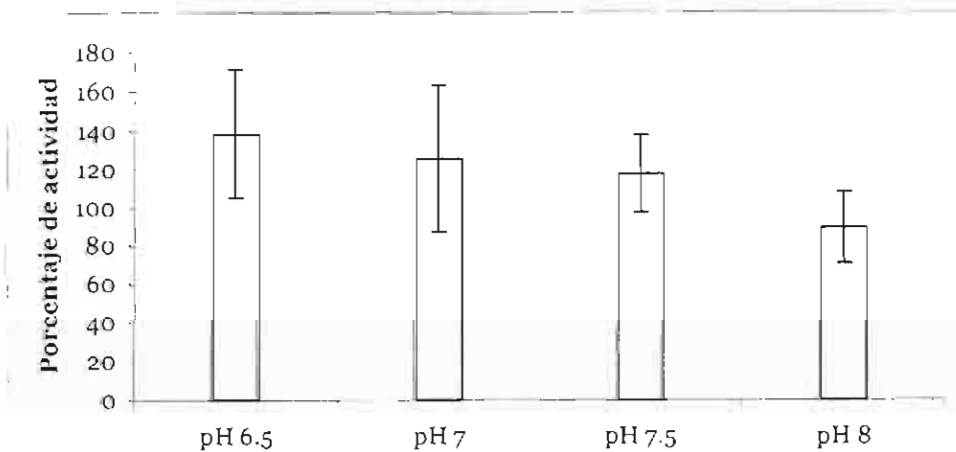


Figura 10. Efecto del pH en la actividad enzimática de Pz-peptidasa en CG de folículos atrésicos de 3-6 mm con MOPS-NaCl2 50 mM

INHIBIDORES

En las tablas 5, 6, 7 y 8 se presentan los porcentajes de inhibición y activación obtenidos en células de la granulosa y líquido folicular en los diferentes tamaños y grados de atresia con algunos inhibidores específicos (iodoacetamida, $MnCl_2$, ortofenantrolina, $CuCl_2$, *p*-hidroximercuribenzoato y $CoCl_2$). Los resultados representan el porcentaje de actividad enzimática de Pz-peptidasa con respecto al control.

Los resultados muestran que únicamente existe diferencia significativa en células de la granulosa de folículos de 3 a 6 mm cuando se hace la interacción inhibidor por grado de atresia (Tabla 5). Por lo que respecta a los demás parámetros estudiados: células de la granulosa >6 mm, líquido folicular de 3 a 6 mm, y líquido folicular >6 mm no existen diferencia significativa cuando se prueba mediante el análisis de varianza.

Los resultados obtenidos en las células de la granulosa de folículos de 3 a 6 mm no atrésicos no muestran claramente qué tipo de Pz-peptidasa está presente en los folículos ováricos. Sin embargo, en nuestros resultados se observa estimulación de la actividad con algunos compuestos que se han reportado en la literatura como inhibidores como lo es el $CuCl_2$ y el $MnCl_2$ que activan 5 y 10 % respectivamente. Mientras que para los otros inhibidores disminuye la actividad hasta un 33 % como es el caso de la Iodoacetamida. No obstante, la actividad de Pz-peptidasa se estimula cuando es utilizado el $CoCl_2$ en los atrésicos además de una baja en la actividad con iodoacetamida.

Por lo que toca a las células de la granulosa de folículos atrésicos >6 mm se observa el mismo efecto con respecto a los folículos de 3 a 6 mm, el mayor porcentaje de actividad lo tiene la iodoacetamida. Mientras que, la segunda mayor actividad corresponde al $CoCl_2$ que estimula la actividad de Pz-peptidasa B

La actividad de la Pz-peptidasa en el líquido folicular de folículos de 3-6 mm muestra un aumento considerable con $CoCl_2$ en los folículos atrésicos, mientras que para los otros inhibidores el comportamiento es parecido al de las células de la granulosa.

Para el caso del líquido folicular de folículos >6 mm el comportamiento fue contrario a lo encontrado para el CoCl_2 en el líquido folicular de folículos 3-6 mm, debido a que en los >6 mm disminuye la actividad hasta un 33%.

TABLA 5. Porcentaje de actividad y efecto de algunos inhibidores de la Pz-peptidasa en CG de folículos ovinos de 3 a 6 mm de diámetro.

Inhibidor	No Atrésicos		Atrésicos	
	I y II	n	IIIa y IIIb	n
Iodoacetamida	77.28±6.8d	11	157.9±13.2a	3
MnCl_2	109.5±6.8a	11	100.14±10.2d	5
Ortofenantrolina	92.38±6.3b	13	108.14±11.4c	4
CuCl_2	105.56±5.2a	19	86.47±9.3e	6
Parahidroximercuribenzoato	92.14±5.9c	15	79.93±10.2f	5
CoCl_2	99.98±6.6a	12	108.16±7.2b	10

Letras diferentes en las columnas indican diferencia significativa.
Cada valor representa el promedio±se

TABLA 6. Porcentaje de actividad y efecto de algunos inhibidores de la Pz-peptidasa en CG de folículos ovinos >6 mm de diámetro.

Inhibidor	No Atrésicos		Atrésicos	
	I y II	n	IIIa y IIIb	n
Iodoacetamida	93.1±18.05	16	121.17±38.9	8
MnCl_2	100.74±10.9	17	96.61±33.17	5
Ortofenantrolina	93.71±32.86	29	131.72±10.71	3
CuCl_2	111.95±24.9	20	120.8±19.25	2
Parahidroximercuribenzoato	89.48±20.3	18	95.56±9.27	2
CoCl_2	97.15±15.5	25	113.43±10.97	6

Cada valor representa el promedio±se

TABLA 7. Porcentaje de actividad y efecto de algunos inhibidores de la Pz-peptidasa en LF de folículos ovinos de 3 a 6 mm de diámetro.

Inhibidor	No Atrésicos		Atrésicos	
	I y II	n	IIIa y IIIb	n
Iodoacetamida	112.9±40.17	13	99.96±16.63	5
MnCl ₂	84.81±21.19	7	103.13±36.62	5
Ortofenantrolina	91.52±29.43	10	89.05±47.82	7
CuCl ₂	94.93±14.72	11	129.2±45.62	7
Parahidroximercuribenzoato	91.37±25.01	10	132.58±36.64	4
CoCl ₂	102.05±12.5	7	130.58±36.48	8

Cada valor representa el promedio±se

TABLA 8. Porcentaje de actividad y efecto de algunos inhibidores de la Pz-peptidasa en LF de folículos ovinos >6 mm de diámetro.

Inhibidor	No Atrésicos		Atrésicos	
	I y II	n	IIIa y IIIb	n
Iodoacetamida	98.27±21.81	20	100.76±20.84	9
MnCl ₂	106.23±26.65	17	92.06±48.65	3
Ortofenantrolina	83.69±41.0	20	99.06±25.75	2
CuCl ₂	99.61±11.57	13	122.14±5.09	4
Parahidroximercuribenzoato	100.8±46.7	17	96.03±27.06	2
CoCl ₂	96.1±13.42	15	87.58±20.4	5

Cada valor representa el promedio±se

SEPARACIÓN DE Pz-PEPTIDASA A Y B

La distribución de Pz-peptidasa A y B (Tabla 9) en la fracción de peso molecular >20000 presente en células de la granulosa y líquido folicular indican una actividad enzimática de Pz-peptidasa 7-1.54 y de 0.73-1.38 μg de sustrato hidrolizado/mg de proteína respectivamente, lo que parecería indicar que se trata de Pz-peptidasa A.

TABLA 9. Actividad enzimática de Pz-peptidasa a diferente peso molecular

Folículos	P.M. >20 000		P.M. >20 000		P.M. <20 000		P.M. <20 000	
	>6 mm	n	3-6 mm	n	>6 mm	n	3-6 mm	n
Atrésicos								
L.F.	0.73 \pm 0.09	5	1.26 \pm 0.59	5	58.0 \pm 18.7	6	38.21 \pm 13.06	5
C.G.	7.0 \pm 0.8	4	6.63 \pm 1.0	4	91.16 \pm 8.2	4	57.26 \pm 14.3	5
No atrésicos								
L.F.	1.38 \pm 0.2	4	1.34 \pm 0.62	4	6.04 \pm 0.7	4	38.5 \pm 8.41	4
C.G.	1.54 \pm 0.4	4	2.47 \pm 1.3	4	41.3 \pm 9.6	4	51.5 \pm 2.7	4

(μg de sustrato hidrolizado/mg de proteína)

En el caso del peso molecular <20000 la actividad enzimática de Pz-peptidasa es hasta ocho veces mayor para los líquidos de folículos atrésicos >6 mm con respecto a los (LF atrésicos) >6 mm de mayor peso molecular.

En las células de la granulosa de la fracción <20000 la actividad enzimática llega a ser hasta de 10 veces más con respecto a las células de la granulosa de los folículos atrésicos de peso molecular >20000.

DISCUSIÓN

La ovulación es un proceso complejo y dinámico que, en la mujer, es iniciado por un pico de secreción de LH a la mitad del ciclo estral (Espey y Lipner, 1994). La LH inicia y sincroniza una serie de eventos bioquímicos que culminan con el adelgazamiento de la pared apical y la disociación y fragmentación de las fibrillas de colágena de la teca, de la túnica albugínea y del ápice folicular, y finalmente por el rompimiento de la pared folicular y la expulsión del ovocito (Fukumoto *et al.*, 1981; Murdoch y McCormick, 1992; Curry y Osteen, 2003). Estos eventos bioquímicos incluyen un sistemático complejo de actividades endocrino-bioquímicas entre las cuales han sido de nuestro particular interés la síntesis y secreción de enzimas proteolíticas, como el sistema plasmina/ plasminógeno y particularmente las matriz metalo-proteinasas (MMPs) (García *et al.*, 1997; Gougeon, 1998).

Los cambios estructurales que se llevan a cabo en los folículos preovulatorios han llevado a los investigadores a proponer que las MMPs juegan un papel fundamental en la ruptura folicular (García *et al.*, 1997; Häggglund *et al.*, 1999; Curry *et al.*, 2001a). Sin embargo, cuando se trata de demostrar cambios claros en la actividad de las MMPs en los tejidos ováricos que se pudieran relacionar con el progreso de la maduración folicular (Morales *et al.*, 1983; LeMaire, 1989; Kennedy *et al.*, 1996), es necesario considerar concomitantemente la presencia de los inhibidores de las metaloproteinasas (TIMPs) tanto de los presentes directamente en los tejidos como de los transportados por el suero, los cuales, o bien están presentes o pueden ser artificialmente liberados en el momento de la homogeneización del tejido, previa a la medición de las enzimas (Butler *et al.*, 1991; Gomez *et al.*, 1997; Brew *et al.*, 2000; Baker *et al.*, 2002).

En los extractos de ovarios de rata durante el período preovulatorio, la actividad inhibitoria contra las MMPs aumenta de manera paralela a los cambios preovulatorios en la actividad de las MMPs (Inderdeo *et al.*, 1996; Driancourt *et al.*, 1999). Este hecho ha llevado a proponer a los investigadores que durante los estadios anteriores al proceso de ovulación existe un delicado equilibrio entre estos dos tipos

de actividades que ha sido llamado homeostasis proteolítica lo cual proporcionan el necesario control localizado de la degradación de los tejido peri-foliculares tanto durante el crecimiento del folículo, como durante la ovulación (Otsuka *et al.*, 1984; Nagase y Woessner, 1999).

Los mecanismos de hidrólisis de proteínas que deben acompañar a los procesos de remodelación tisular son extraordinariamente complejos. La degradación de la colágena requiere la acción de varias metaloproteinasas que antes eran englobadas dentro del grupo de las colagenasas y ahora quedan colocadas dentro de las llamadas MMP-1. Entre ellas las más importantes podrían ser la colagenasa tipo IV, que degrada la colágena de la membrana basal, y la colagenasa llamada intersticial, que degradaría las fibras reticulares de colágena tipo I y III (Curry y Ostten, 2001b).

Curry *et al.*, (1985), mostraron la presencia de colagenasa intersticial en el ovario de la rata inmediatamente antes de la ovulación y Palotie *et al.*, (1987) observaron la producción de colagenasa tipo IV por folículos de rata en cultivo, cuando fueron estimulados con hCG. La colágena tipo IV es degradada por la colagenasa tipo IV o gelatinasa de 72 kDa, pero también es digerida por la colagenasa tipo V (gelatinasa de 92 kDa) y por la estromelisina (Matrisian, 1992; Curry y Ostten, 2003).

La hidrólisis de la molécula helicoidal de colágeno producida por las MMPs mencionadas arriba, modifica sus propiedades de estabilidad y solubilidad provocando su conversión a la forma llamada gelatina. El colágeno convertido en gelatina es ahora mucho más susceptible a la acción de otras proteinasas, como son las gelatinasas y las estromelisin. Es sabido que las estromelisin (MMP-3, -7, -10 y -11) actúan en una amplia variedad de sustratos de la matriz extracelular (MEC). Por su parte, la molécula de las gelatinasas (MMP-2 y MMP-9) contiene un dominio con una secuencia de aminoácidos semejante a la fibronectina, el cual seguramente es utilizado para unirse y degradar a la gelatina. Estas enzimas proteolíticas, gelatinasas y estromelisin son además capaces de degradar otros constituyentes esenciales de la membrana basal, incluyendo el colágeno tipo IV, la laminina, y la fibronectina (Curry y Osteen, 2003).

Se sabe que la actividad de colagenasa tipo IV se eleva significativamente un poco después de que la LH presenta su pico máximo de actividad; y que la actividad de la enzima continúa aumentando hasta por lo menos 6 horas después de la estimulación con LH (Palotie *et al.*, 1987; Vu y Werb, 2000). Podría entonces considerarse que el incremento en la actividad de las MMPs es uno de los eventos bioquímicos más importantes en el proceso de crecimiento y maduración de los folículos y que su presencia continúa siendo importante hasta el momento de la ovulación, ya que se ha reportado que estas enzimas proteolíticas se elevan justo antes de la liberación del ovocito (Butler *et al.*, 1991; Hägglund y Leonardsson, 1999).

En este estudio se encontró la presencia de actividad de metaloproteinasas (gelatinasas) en el líquido folicular, en las células de la teca y en las células de la granulosa de los folículos de la cabra. La actividad proteolítica disminuyó marcadamente por la adición de la pestatina y prácticamente se inhibió totalmente por la presencia de EDTA, DTT y/o ortofenantrolina, lo cual indica que la actividad enzimática detectada se debe realmente a las metaloproteinasas. Debemos mencionar que en este estudio, el procedimiento que se usó para la zimografía en poliacrilamida, utilizando necesariamente la presencia de marcadores de peso molecular en cada zimograma, permitió discriminar diferentes tipos de metaloproteinasas con un error de solo el 5% (Heussen y Dowdle, 1980; García *et al.*, 1997).

De las bandas detectadas, las que se observan más frecuentemente tienen masas moleculares de 63.8 ± 2.4 y 30.7 ± 1.8 kDa. Estos valores de masa molecular se pueden considerar como evidencia de que las enzimas pertinentes corresponden a una gelatinasa tipo IV activada (MMP-2) y a una de las formas activas de estromelisinina (MMP-3) respectivamente (Emonard y Grimaud, 1990; Matrisian, 1992). Las otras bandas se encontraron en las regiones que corresponden a la colagenasa tipo IV latente ($M_r = 71.4 \pm 2.1$ kDa), a la colagenasa activada tipo I ($M_r = 39.6 \pm 2.2$ kDa) y quizá a la metaloproteína intersticial, recientemente descrita MMP-7 ($M_r = 22.1 \pm 0.8$ kDa). Las dos regiones de actividad proteolítica de alto peso molecular que se observaron ocasionalmente pueden estar relacionadas con las formas latente y activada de la colagenasa tipo V MMP-9 ($M_r = 91.3$ y 81.2 kDa respectivamente).

El hecho de que se pudieran demostrar por su actividad gelatinolítica varias formas de MMP de las consideradas inactivas o “latentes”, se debe probablemente a la presencia de SDS en dichos geles (Hurwitz *et al.*, 1993; Nagase y Woessner, 1999). En este estudio, los resultados del tratamiento del líquido folicular con APMA muestran que la actividad gelatinolítica de 72 kDa es una proenzima que se puede convertir a una forma activa más pequeña de 64 kDa (figura 3a,b). Igualmente, en el caso de las células de la granulosa y de la teca obtenidas durante los estados avanzados de atresia, la forma latente de 92 kDa se convirtió parcialmente a su posible forma activa de 81.2 kDa. Hurwitz *et al.*, (1993) han mostrado que cuando se cultivan ovarios disgregados provenientes de ratas inmaduras sin tratamiento, estos sintetizan constitutivamente varias enzimas colagenolíticas y en especial una especie de 72 kDa. Como ya mencionamos en un párrafo anterior la degradación de la colágena tipo IV de la membrana basal requiere una colagenasa diferente de la colagenasa intersticial que digiere la colágena tipo I y III. Entre el ovocito y el exterior del ovario, existen dos membranas basales una subyacente a la teca interna y otra subyacente al epitelio germinal. Por lo tanto, es probable que se requiera que tanto la colagenasa intersticial como la colágena tipo IV actúen sobre las membranas basales para la remodelación folicular y del tejido ovárico. También es importante la degradación de otros componentes de la matriz extracelular por otras metaloproteinasas, tales como la metaloproteína-3. Todas estas metaloproteinasas se secretan en forma latente y requieren ser activadas dentro de la misma matriz.

Heussen y Dowdle (1980) observaron que las células de melanoma tienen una actividad colagenolítica relacionada con la presencia del activador del plasminógeno, la cual apareció como una doble banda que migró hacia la posición catódica de la albúmina con un peso molecular calculado entre 69 y 71 kDa y una tercera banda más tenue la cual migró a una posición equivalente a 62 kDa. La uroquinasa y las enzimas liberadas por las células de prepucio en cultivo mostraron tres bandas principales de actividad proteolítica dependientes de plasminógeno (Gilabert-Estelles *et al.*, 2003). Las dos bandas más prominentes se observaron como bandas dobles con masas moleculares aparentes de 62 y 56 kDa. La tercera banda mostró una movilidad

electroforética intermedia entre la de albúmina y la anhidrasa carbónica correspondiente a una enzima con peso molecular aproximado de 35 kDa. En relación a estos resultados es importante señalar que se ha propuesto que el activador del plasminógeno ovárico juega un papel importante en la ovulación (Murphy *et al.*, 1999). Una posible explicación para esta participación es que, la conversión del plasminógeno a plasmina iniciaría una cascada de activación de metaloproteinasas que pueden intervenir en la degradación de la matriz extracelular.

Liu *et al.*, (1998) midieron la actividad proteolítica en el ovario de la rata y sugirieron que la mayor cantidad de colagenasa que se sintetiza en las células de la granulosa ocurre justo en el momento previo a la ovulación y que esta actividad proteolítica puede ser inmediatamente secretada al espacio extracelular y se utiliza en los sitios de degradación de la colágena. En este trabajo, la actividad de colagenasa intersticial en los folículos normales siempre fue menor en las células de la granulosa que en las células de la teca. Así mismo, la actividad de gelatinasa fue notablemente más alta en las células de la teca que en las células de la granulosa obtenidas de folículos >6 mm. Encontramos también aumentos moderados de actividad colagenasa en las células de la teca en los folículos sanos durante su crecimiento, así como en la actividad de colagenasa intersticial en las células de la granulosa de los folículos >6 mm fue más baja que en los folículos pequeños y de tamaño intermedio, lo que podría indicar que la expresión de MMP-2 es inducida por las gonadotropinas.

Recientemente se ha mostrado que el receptor para LH de las células de la granulosa (LH/CG) es sensible a la degradación por preparaciones de MMPs (Ascoli y Segaloff, 1986; Peng *et al.*, 1991; Ohnishi *et al.*, 2001). De los resultados presentados aquí parece ser que la(s) enzima(s) responsable(s) de la degradación de dicho receptor no es propiamente la colagenasa intersticial. Es posible proponer que algunas de las gelatinasas, que aparecen casi selectivamente en las células de la granulosa y la teca de los folículos > de 6 mm y con atresia inicial (grupo II), podrían estar relacionadas con la degradación de los receptores a LH/CG y de esta manera disminuir la capacidad de las células para fijar esta gonadotropina.

Normalmente la estromelisinina 1 (MMP-3) no se expresa ampliamente, pero la actividad se puede inducir por factores de crecimiento, citocinas, promotores tumorales y oncogenes en algunos tipos de células mesenquimatosas cultivadas, como fibroblastos y los condrocitos (Hägglund *et al.*, 2001; Visse y Nagase, 2003). Muchos de los agentes que inducen la expresión de las MMPs en los fibroblastos, también inducen su crecimiento; estos agentes incluyen al factor de crecimiento epidérmico, a los ésteres de forbol que son promotores tumorales y a algunos oncógenes (Matrisian, 1992; Singer *et al.*, 1997; Ohnishi *et al.*, 2001). La presencia constante de estas metaloproteinasas puede indicar la necesidad de un balance delicado entre los requerimientos para la remodelación tisular y la presencia y concentración apropiada de factores de crecimiento específicos en los folículos en crecimiento normales. La alteración de este equilibrio puede ser importante en la iniciación y desarrollo de la atresia.

Las células de la granulosa de folículos no atrésicos mayores de 6 mm tienen actividad de gelatinasa muy baja. Estos resultados concuerdan con los de Palotie *et al.*, (1987), Curry *et al.*, (1992) y Curry *et al.*, (2001b). Se ha propuesto que esta falta de actividad de gelatinasa en las células de la granulosa de folículos grandes (preovulatorios) se puede deber a bajas concentraciones de enzima o a la presencia de concentraciones altas de los inhibidores enzimáticos correspondientes (Palotie *et al.*, 1987; Nothnick, 2000). Nuestras observaciones al igual que las de Curry *et al.*, (1992); Curry *et al.*, (2001a) no apoyan la idea de que la baja actividad enzimática se deba a la presencia de inhibidores. Más bien, parece que la actividad de gelatinasa proveniente de las células de la granulosa en los folículos grandes normales o preovulatorios es mínima. Sin embargo, de interés particular es la observación de que la actividad de gelatinasa en las células de la granulosa obtenidas de folículos <3 mm y de 3-6 mm no solamente es importante sino que tiene una distribución muy particular de actividades de colagenasa. Es importante mencionar que este comportamiento se presentó también en folículos con atresia avanzada (Grupo IIIb). De estos resultados, es posible concluir que la producción de gelatinasa por las células de la granulosa puede requerir de un sistema complejo de señales celulares que serían de gran importancia en la regulación

tanto del crecimiento celular, como de la remodelación tisular que debe participar en crecimiento folicular (Curry *et al.*, 1992; García *et al.*, 1997; Curry *et al.*, 2001a).

Puesto que se ha descrito que el sistema activador del plasminógeno (importante en el proceso ovulatorio) no activa a la gelatinasa de 92 kDa, la presencia de esta metaloproteínasa durante la atresia avanzada podría ser un índice importante de la complejidad del proceso involucrado en la atresia folicular. Hasta ahora se desconoce el mecanismo de activación *in vivo* de esta pro-enzima (Hurwitz *et al.*, 1993). Se ha propuesto que los macrófagos del ovario podría realizar la activación de esta enzima, como se ha demostrado en el trofoblasto (Werb *et al.*, 1980; Athanassiades y Lala, 1998) pero no existe ninguna evidencia directa de este proceso. Probablemente la degradación de la matriz y la remodelación tisular pueden facilitar la migración de los leucocitos y fibroblastos así como del desarrollo de los mecanismos de la angiogénesis para la producción de nuevos capilares (Hurwitz *et al.*, 1993; Webb *et al.*, 1999). Estos procesos promueven no sólo la ruptura folicular sino que también podrían estar involucrados en el inicio de la formación del cuerpo lúteo, tiempo durante el cual la remodelación tisular y la angiogénesis masiva son muy importantes (Abulafia y Sherer, 2000; Espinosa y Rosado, 2002).

Existe una gran cantidad de información sobre la Pz-peptidasa, que enfatiza la correlación biológica de esta actividad con el recambio de los componentes del tejido conectivo actuando en la degradación de los fragmentos de colágena resultantes de la actividad de otras MMPs (Rajabi *et al.*, 1984; Curry y Osteen, 2003). Frecuentemente se ha encontrado un aumento en la concentración de la actividad de la Pz-peptidasa en asociación con los procesos de recambio activo del tejido conectivo (Shirmpson *et al.*, 2002). En general, la Pz-peptidasa se encuentra en tejidos con una actividad de remodelación alta (Tisljar y Barret, 1989; Tisljar, 1993; García *et al.*, 1997; Nakagawa *et al.*, 1997). También se ha asociado a la Pz-peptidasa con la degradación de péptidos bioactivos entre los que se encuentran la bradicinina, GnRH, la somatostatina, la neurotensina la sustancia P, y parece participar en la generación de encefalinas a partir de sus precursores (Shirmpson *et al.*, 2002), así como posteriormente en su destrucción (Gougeon, 1996). Es importante mencionar que la Pz-peptidasa rompe

uniones peptídicas tanto en la Angiotensina I como en la II aunque no en la forma por la cual la Angiotensina I se convierte en Angiotensina II (Kotani *et al.*, 1999).

Se han descrito dos isozimas de la Pz-peptidasa presentes en diferentes compartimientos celulares, una de ellas se encuentra principalmente en la fracción soluble de los homogeneizados de varios tejidos, mientras que la otra está asociada a la membrana (Jacchieri *et al.*, 1998).

Estudios recientes proponen que varios péptidos reguladores intraóvaricos incluyendo la inhibina, la activina, el factor de crecimiento epidérmico, la bradicinina, la Angiotensina II (Ang II) (Kotani *et al.*, 1999), la sustancia P, el péptido vasoactivo intestinal (Gougeon, 1996), juegan un papel importante en la regulación integral del desarrollo folicular, por lo cual la presencia de esta enzima en los componentes del folículo podría desempeñar un papel de gran importancia en los procesos de maduración y atresia.

Es posible, por lo tanto, proponer que la actividad creciente de esta enzima (Pz-peptidasa) encontrada por nosotros en las células de la granulosa de folículos en desarrollo (no atrésicos) podría participar de alguna manera en la regulación de las concentraciones de esos péptidos y contribuir al desarrollo sano de esos folículos.

Puesto que la iniciación y el progreso de la atresia está acompañado por una disminución significativa de la actividad de Pz-peptidasa en las células de la granulosa de los folículos >6 mm, la alta actividad de esta enzima sería importante en los folículos que se acercan a la ovulación.

Para tratar de caracterizar el tipo de isozima presente en los homogeneizados de las células que componen el folículo, se usaron agentes quelantes, iones metálicos y agentes efectores sobre enlaces ditiol. Nuestros resultados no demostraron claramente qué tipo de Pz-peptidasa está presente (Cummins *et al.*, 1999; Oliveira *et al.*, 2002). Los efectos bifásicos encontrados con diversos iones metálicos en la actividad de Pz-peptidasa, nos orientan a pensar en la presencia de una isozima de la Pz-peptidasa específica del folículo, así como la de alguna de las isozimas previamente descritas, sin embargo, es necesario llevar a cabo más experimentos para poder asegurarlo con certeza.

Es posible que la presencia de una o dos Pz-peptidasas en las CGs de los folículos atrésicos de 3-6 mm con actividad óptima a pH ligeramente ácido (pH de 6.5), sea debida a los factores iniciales de la atresia folicular, donde las CGs sufren hipoxia a causa de un inadecuado aumento en los requerimientos del flujo sanguíneo folicular y de la deficiente difusión de oxígeno en el interior de las capas de CGs, como una consecuencia de anoxia disminuye el pH y permite la activación de las enzimas lisosomales (Alonso-Pozos *et al.*, 2003).

En el desarrollo de la atresia folicular parece haber una participación importante de varios componentes del sistema renina-angiotensina, incluyendo a los receptores para la Ang II (Prepin, 1991) y para la renina (Schmaier, 2003). Se ha descrito que los receptores tipo 2 de la Ang II (AT₂), están presentes casi exclusivamente en las células de la granulosa y de la teca interna de los folículos atrésicos (Kotani *et al.*, 1999). Por otro lado, se han encontrado altas concentraciones de la enzima convertidora de angiotensina I (ACE) en las células de la granulosa, solamente en los folículos en desarrollo o en folículos atrésicos; mientras que en folículos preovulatorios no atrésicos ACE no presentó altas concentraciones (Prepin, 1991; Deddish *et al.*, 1998). En este contexto nos parece valioso mencionar que los hallazgos donde se demuestra que la Pz-peptidasa rompe uniones peptídicas en las angiotensinas I y II siendo capaz entonces de eliminar ambos componentes del sistema renina-angiotensina (Shirmpson *et al.*, 2002; Costa *et al.*, 2003).

La importancia de la actividad hidrolítica de la Pz-peptidasa presente en los diferentes compartimientos que componen el folículo sobre pequeños péptidos activos podría extenderse a su capacidad de destruir a la bradicinina y a la sustancia P, aparentemente importantes en la producción de hiperemia de la pared del folículo y en la formación del líquido folicular alterando así el aumento de los componentes foliculares provenientes de la circulación sanguínea y por lo tanto prevenir la acción de otros factores de regulación del desarrollo folicular, entre ellos los inhibidores de las MMPs transportadas por el suero sanguíneo, tales como la α_2 macroglobulina, α_1 -macroglobulina, α_1 -inhibidor3 (Giudice, 1992; Dajee *et al.*, 1997), y quizás el de algunos estimuladores como el activador del plasminógeno o aún la plasmina.

Se ha demostrado que el contenido de colágeno en el folículo ovárico disminuye, mientras que la actividad de colagenasa aumenta hasta dos veces en comparación con las áreas del ovario desprovistas de folículos (Bogusiewicz *et al.*, 2000). En contraste, los niveles de MMPs disminuyen en la pared apical de los folículos atrésicos comparado con las áreas desprovistas de folículos (Hägglund *et al.*, 2001), esto sugiere que las MMPs regulan la remodelación de la MEC cuando esta asociada con el crecimiento folicular. Los resultados de este trabajo dejan claro que un gran número de MMPs están presentes en el folículo ovárico y estas MMPs son estimuladas por los eventos asociados con el desarrollo folicular y su localización y patrones de expresión coinciden con los cambios en las células de la granulosa y de la teca que ocurren durante la remodelación folicular.

En otros tejidos, los aumentos tanto en la actividad de colagenasas como en la actividad de los inhibidores de colagenasa concomitantes con los procesos de remodelación tisular mantienen la homeostasis proteolítica y proporcionan un control localizado de la degradación extracelular. Esto mismo puede ocurrir en el ovario durante el crecimiento de los folículos (García *et al.*, 1997; Vu y Werb, 2000; Xu *et al.*, 2002; Curry y Osteen, 2003). Sin embargo, de acuerdo a los resultados presentados en este estudio parecería que la regulación de la degradación de la matriz durante el crecimiento y la maduración folicular, es un proceso más complejo que el propuesto hasta ahora.

Teóricamente, los factores que estimulan el desarrollo folicular, como es la FSH, actúa en las células de la granulosa y de la teca para aumentar las MMPs y regular la expresión de los TIMP. Las MMPs podrían facilitar la remodelación de la capa basal que separa a las células de la granulosa, así como también de la MEC de las células de la teca y permitir la expansión folicular. Las MMPs pueden actuar directamente en el control y remodelación de la MEC y con ello tener una acción indirecta en la estimulación del crecimiento folicular. Además las MMPs, particularmente la Pz-peptidasa, pueden participar en la regulación y disponibilidad de los factores de crecimiento y citocinas e impactar de manera importante el crecimiento folicular.

Por ello, concluimos que la actividad remodeladora del tejido conectivo ovárico consiste de un complejo de enzimas ováricas y foliculares y de sus modificadores. Este sistema está regulado cuidadosamente desde el inicio de la maduración folicular hasta el momento del rompimiento de la pared folicular durante la ovulación. Modificaciones en la regulación dinámica de este sistema deben de tener un impacto importante en la determinación de la maduración normal del folículo o, como un proceso necesario de regulación determinar (o por lo menos participar en la determinación), del número apropiado de folículos ovulatorios en cada especie animal.

Es necesario continuar investigando el sistema de las MMPs en la fisiología ovárica, para entender el papel de las MMPs y los TIMPs como reguladores del crecimiento, la diferenciación celular y la función específica del tejido ovárico.

LITERATURA CITADA

Abulafia, O. and Sherer, D.M. (2000). Angiogenesis of the ovary. *Am J Obstet Gynecol.* 182: 240-246

Ascoli, M. and Segaloff, D.L. (1986). Effects of collagenase on the structure of the Lutropin/Choriogonadotropin receptor. *J Biol Chem.* 261: 3807-3815.

Alexander, C.M. Hansell, E.J. Behrendtsen, O. Flannery, M.L. Kishnani, N.S. Hawkes, S.P. and Werb, Z. (1996) Expression and function of matrix metalloproteinases and their inhibitors at the maternal embryonic boundary during mouse embryo implantation. *Development.* 122: 1723-1736

Alonso-Pozos, I. Rosales-Torres, A.M. Avalos Rodríguez, A. Vergara-Onofre, M. and Rosado-García, A. (2003). Mechanism of granulosa cell death during follicular atresia depends on follicular size. *Theriogenology.* 60: 1071-1081.

Athanassiades, A. and Lala, P.K. (1998) Role of placenta growth factor (PlGF) in human extravillous trophoblast proliferation, migration and invasiveness. *Placenta.* 19 (7): 465-473.

Baker, A.H. Edwards, D.R. and Murphy, G. (2002). Metalloproteinase inhibitors: biological actions and therapeutic opportunities. *J Cell Sci.* 115: 3719-3727.

Ballesteros, L.M. Rosales, A.M. Rosado, A. and Hernández-Pérez, O. (1992). Activity, compartamentation and subcellular distribution of lysosomal enzymes during follicular maturation in the goat. *Animal Reprod Science.* 27: 129-139.

Barret, A. and Tisljar, (1989). The activity of "Pz-peptidase" and "endopeptidase 24.15" are due a single enzyme. *Biochem J.* 261: 1047-1050

Billig, H. Chun, S. Y. Eisenhauer, K. and Hsueh, A. J. (1996). Gonadal cell apoptosis: hormone-regulated cell demise. *Hum Reprod Update*. 2: 103-117.

Bogusiewicz, M. Rechberger, T. Jakimiuk, A.J. Skorupski, P. Jakowicki, J.A. (2000). Evaluation of matrix metalloproteinases-1 and -3 concentrations in the tunic albuginea, the apical wall of atretic follicles and the corpus luteum of normal human ovaries. *Gynecol Endocrinol*. 14: 25-31

Brew, K. Dinakarbandian, D. and Nagase, H. (2000). Tissue inhibitors of metalloproteinases: evolution, structure and function. *Biochim Biophys Acta*. 1477: 267-283.

Butler, T.A. Zhu, C. Mueller, R.A. Fuller, G.C. LeMaire, W.J. and Woessner, Jr. J.F. (1991). Inhibition of ovulation in the perfused rat ovary by the synthetic collagenase inhibitor SC 44463. *Biol of Reprod*. 44: 1183-1188.

Carson, R.S. Findlay, J.K. Clarke, I.J. Burger, H.G. (1981). Estradiol, testosterone, and androstenedione in ovine follicular fluid during growth and atresia of ovarian follicles. *Biol of Reprod*. 24: 105-113.

Cawston, T.E. Galloway, W.A. Mercer, E. Murphy, G. and Reynolds, J.J. (1981). Purification of rabbit bone inhibitor of collagenase. *Biochem J*. 195: 159-165.

Chaffin, C.L. and Stouffer, R.L. (1999). Expression of matrix metalloproteinases and their tissue inhibitor messenger ribonucleic acids in Macaque periovulatory granulosa cells: time course and steroid regulation. *Biol of Reprod*. 61: 14-21.

Chang, C. and Werb, Z. (2001). The many faces of metalloproteases: cell growth, invasion, angiogenesis and metastasis. *Trends Cell Biol*. 11: 37-43

Chun, S.Y. and Hsueh, A. J. (1998). Paracrine mechanisms of ovarian follicle apoptosis. *J Reprod Immunol.* 39: 63-75.

Costa, A.P.R. Fagundes-Moura, C.R. Pereira, V.M. Silva, L.F. M. Vieira, A.R. Santos, R.A.S. and Dos Reis, A.M. (2003). Angiotensin-(1-7): A Novel Peptide in the Ovary. *Endocrinology.* 144: 1942-1948.

Cummins, P.H. Pabon, A. Margulies, E.H. and Glucksman, M.J. (1999). Zinc Coordination and Substrate Catalysis within the Neuropeptide Processing Enzyme Endopeptidase EC 3.4.24.15. Identification of active site histidine and glutamate residues. *J Biol Chem.* 274: 16003-16009.

Curry, Jr. T.E. Dean, D.D. Woessner, J.F. Jr, and LeMaire, W.J. (1985). The extraction of a tissue collagenase associated with ovulation in the rat. *Biol of Reprod.* 33: 981-991.

Curry, Jr. T.E. Dean, D.D. Sanders, S.L; Pedigo, N.G. and Jones, P.B.C. (1989). The role of ovarian proteases and their inhibitors in ovulation. *Steroids.* 54: 501-521.

Curry, Jr. T.E. Mann JS, Huang MH, Keeble SC. (1992). Gelatinase and proteoglycanase activity during the periovulatory period in the rat. *Biol of Reprod.* 46: 256-264

Curry, Jr. T.E. and Osteen, K.G. (2001a). Cyclic Changes in the Matrix Metalloproteinase System in the Ovary and Uterus. *Biol of Reprod.* 64: 1285-1286.

Curry, Jr. T.E. Song, L. and Wheeler, S.E. (2001b). Cellular Localization of Gelatinases and Tissue Inhibitors of Metalloproteinases During Follicular Growth, Ovulation, and Early Luteal Formation in the Rat. *Biol of Reprod.* 65: 855-865.

Curry, Jr. T.E. and Osteen, K.G. (2003). The Matrix Metalloproteinase System: Changes, Regulation, and Impact throughout the Ovarian and Uterine Reproductive Cycle. *Endocrine Reviews*. 24: 428-465.

Dajee, M. Kazansky, A.V. Raught, B. Hocke, G.M. Fey, G.H. Richards, J.S. (1997). Prolactin induction of the α 2-macroglobulin gene in rat ovarian granulosa cells: stat 5 activation and binding to the interleukin-6 response element. *Mol Endocrinol*. 10: 171-184.

Deddish, P.A. Marcic, B. Jackman, H.L. Wang, H.-Z. Skidgel, R.A. and Erdos, E.G. (1998). N-Domain-Specific Substrate and C-Domain Inhibitors of Angiotensin-Converting Enzyme: Angiotensin-(1-7) and Keto-ACE. *Hypertension*. 31: 912-918.

Driancourt, M.A. Quesnel, H. Meduri, G. Prunier, A. Hermier, D. (1999). Luteinization and proteolysis in ovarian follicles of Meishan and Large White gilts during the preovulatory period. *J Reprod Fertil*. 14: 287-297.

Emonard, H. and Grimaud, J.A. (1990). Metalloproteinases. A review. *Cell Mol Biol*. 36: 131-153

Endo, T. Henmi, H. Nagasawa, K. Hayashi, T. Chida, M. Akutagawa, N. Iwasaki, M. Kitajima, Y. Kiya, T. Nishikawa, A. Manase, K. and Kudo, R. (2001). Lysyl Oxidase and MMP-2 Expression in Dehydroepiandrosterone-Induced Polycystic Ovary in Rats. *Biol of Reprod*. 64: 157-732.

Espey, L.L. and Lipner, H. (1994). Ovulation, In: Knobil E, ed. *The Physiology of Reproduction*, Vol. 2nd Edition, New York: Raven Press. p. 725-780

Espey, L.L. and Richards, J.S. (2002). Temporal and Spatial Patterns of Ovarian Gene Transcription Following an Ovulatory Dose of Gonadotropin in the Rat. *Biol of Reprod.* 67: 1662-1670.

Espinosa, C.R. y Rosado, G.A. (2002). Angiogénesis en la fisiología de la reproductiva. Desarrollo folicular, formación, y mantenimiento del cuerpo luteo. *Ginecología y Obstetricia de México.* 70: 17-27

Fukumoto, M. Yajima, Y. Okamura, H. and Midorikawa, O. (1981). Collagenolytic enzyme activity in human ovary: an ovulatory enzyme system. *Fertil Steril.* 36: 746-750.

Gacko, M. and Glowinski, S. (1998). Activities of proteases in parietal thrombus of aortic aneurysm. *Clin Chim Acta.* 271: 171-177.

García, R. Ballesteros, L.M. Hernandez-Perez, O. Rosales, A. Espinosa, R. Soto, R. Diaz de Leon, L. and Rosado, A. (1997). Metalloproteinase activity during growth, maturation and atresia in the ovarian follicles of the goat. *Anim Reprod Sci.* 47: 211-28.

Gilabert-Estelles, J. Estelles, A. Gilabert, J. Castello, R. Espana, F. Falco, C. Romeu, A. Chirivella, M. Zorio, E. and Aznar, J. (2003). Expression of several components of the plasminogen activator and matrix metalloproteinase systems in endometriosis. *Hum. Reprod.* 18: 1516-1522.

Giudice, L.C. (1992). Insulin-like growth factors and ovarian follicular development. *Endocrine Rev.* 13: 641-669.

Goffin, F. Munaut, C. Frankenne, F. Perrier-d'Hauterive, S. Beliard, A. Fridman, V. Nervo, P. Colige, A. and Foidart, J.-M. (2003). Expression Pattern of

Metalloproteinases and Tissue Inhibitors of Matrix-Metalloproteinases. *Biol of Reprod.* 69: 976-984.

Gomez, D.E. Alonso, D.F. Yoshiji, H. Thorgeirsson, U.P. (1997). Tissue inhibitors of metalloproteinases: structure, regulation and biological functions. *Eur J Cell Biol.* 74:111-122.

Gougeon, A. (1996). Regulation of Ovarian follicular development in Primates: facts and Hypotheses. *Endocrine Reviews.* 17: 121-155.

Gougeon, A. (1998). Ovarian follicular growth: ovarian ageing and population of growing follicles. *Maturitas.* 30: 137-142

Hägglund, A.C. Ny, A. Leonardsson, G. Ny, T. (1999). Regulation and localization of matrix metalloproteinases and tissue inhibitors of metalloproteinases in the mouse ovary during gonadotropin-induced ovulation. *Endocrinology.* 140: 4351-4358.

Hägglund, A.C. Basset, P. and Ny, T. (2001). Stromelysin-3 Is Induced in Mouse Ovarian Follicles Undergoing Hormonally Controlled Apoptosis, but This Metalloproteinase Is Not Required for Follicular Atresia. *Biol of Reprod.* 64: 457-463.

Heussen, C. and Dowdle, E.B. (1980). Electrophoretic analysis of plasminogen activators in polyacrilamide gels containing sodium dodecyl sulfate and copolymerized substrates. *Anal Biochem.* 102: 196-202.

Hirata, M. Sato, T. Tsumagari, M. Shimada, A. Nakano, H. Hashizume, K. and Ito, A. (2003). Differential Regulation of the Expression of Matrix Metalloproteinases and Tissue Inhibitors of Metalloproteinases by Cytokines and Growth Factors in Bovine Endometrial Stromal Cells and Trophoblast Cell Line BT-1 In Vitro. *Biol of Reprod.* 68: 1276-1281.

Hsu, S.Y. and Hsueh, A. J. (1998). Intracellular mechanisms of ovarian cell apoptosis. *Mol Cell Endocrinol.* 145: 21-25.

Hsu, S.Y. and Hsueh, A.J.W. (2000). Tissue-Specific Bcl-2 Protein Partners in Apoptosis: An Ovarian Paradigm. *Physiol Rev.* 80: 593-582.

Hsueh, A.J. Eisenhauer, K. Chun, S.Y Hsu, S.Y. and Billing B. H. (1996). Gonadal cell apoptosis. *Recent Prog Horm Res.* 51: 433-455

Hurwitz, A. Dushnik, M. Salomon, H. Ben-Chetrit, A. Finci-Yeheskel, Z. Mildwidsky, A. Mayer, M. Adashi, E.Y. and Yagel, S. (1993). Cytokine-mediated regulation of rat ovarian function: Interleukin-1 stimulates the accumulation of a 92-kilodalton gelatinase. *Endocrinology.* 132: 2709-2713.

Inderdeo, D.S. Edwards., D.R. Han, V.K.M. Khokha, R. (1996). Temporal and spatial expression of tissue inhibitors of metalloproteinases during the natural ovulatory cycle of the mouse. *Biol of Reprod.* 55: 498-508.

Jacchieri, S.G. Gomes, M.D. Juliano, L. And Camargo, C.M. (1998). A comparative conformational of thimet oligopeptidase (EC 3.4.24.15) substrates. *J Peptides Research.* 51: 452-459.

Johnson-Wint, B. and Gross, J. (1980). A quantitative film collagenase assay for large number of samples. *Anal Biochem.* 104: 175-184.

Kaipia, A. and Hsueh, A.J.W. (1997). Regulation of ovarian follicle atresia. *Annu Rev Physiol.* 59: 346-363

Kennedy, III.J.L., Muse, K.N. Keeble, S.C. and Curry, T.E.J. Jr. (1996). Hormonal regulation of tissue inhibitors of metalloproteinases during follicular development in the rat ovary. *Endocrine*. 5: 299-305.

Khandoker, M.A.M. Imai, K. Takahashi, T. and Hashizume, K.H. (2001). Role of Gelatinase on Follicular Atresia in the Bovine Ovary. *Biol of Reprod*. 65: 726-732

Kimura, A. Kihara, T. Ohkura, R. Ogiwara, R. and Takahashi, T. (2001). Localization of Bradykinin B2 Receptor in the Follicles of Porcine Ovary and Increased Expression of Matrix Metalloproteinase-3 and -20 in Cultured Granulosa Cells by Bradykinin Treatment¹. *Biol of Reprod*. 65: 1462-1470.

Kotani, E. Sugimoto, M. Kamata, H. Fujii, N. Saitoh, M. Usuki, S. Kubo, T. Song, K. Miyazaki, M. Murakami, K. and Miyazak, H. (1999). Biological roles of angiotensin II via its type 2 receptor during rat follicle atresia *Am J Physiol Endocrinol Metab*. 276: E25-E33.

Lamont, R.J. and Jenkinson, H.F. (1998). Life Below the Gum Line: Pathogenic Mechanisms of *Porphyromonas gingivalis*. *Microbiol Mol Biol Rev*. 62: 1244-1263.

LeMaire, W.J. (1989). Mechanism of mammalian ovulation. *Steroids*. 54: 455-469.

Lessley, B.A. and Garner, D.L. (1983). Distribution of Pz-peptidase in bovine epididymal and ejaculated semen. *Biol of Reprod*. 28: 447-459.

Lessley, B.A. and Garner, D.L. (1984). Identification and preliminary characterization of two distinct bovine seminal Pz-peptidases. *Biol of Reprod*. 31: 353-459.

Lessley, B.A. and Garner, D.L. (1985). Identification and distribution of Pz-peptidases A and B in human semen. *J Androl*. 6: 372-378.

Lessley, B.A. and Garner, D.L. (1990). Purification and characterization of Pz-peptidase B, a neutral metalloendopeptidase from bovine spermatozoa. *Biol of Reprod.* 43: 643-658.

Liu, K. Wahlberg, P. and Ny, T. (1998). Coordinated and Cell-Specific Regulation of Membrane Type Matrix Metalloproteinase 1 (MT1-MMP) and Its Substrate Matrix Metalloproteinase 2 (MMP-2) by Physiological Signals during Follicular Development and Ovulation. *Endocrinology.* 139: 4735.

Lowry, O.H., Rosenbrough, N.J. and Rondel, R.J. (1951). Protein measurement with the folinphenol reagent. *J Biol Chem.* 193: 265-275.

McCawley, L.J. and Matrisian, L.M. (2000). Matrix metalloproteinases: multifunctional contributors to tumor progression. *Mol Med Today.* 6: 149-56.

Mackay, A.R. Hartzler, J.L. Pelina, M.D. and Thorgeirsson, U.P. (1990). Studies on the ability of 65-kDa and 92-kDa tumor cell gelatinases to degrade type IV collagen *J Biol Chem.* 265: 21929-21934.

Matrisian, L.M. (1990). Metalloproteinases and their inhibitors in matrix remodelling. *Trends Genet.* 6: 121-125.

Matrisian, L.M. (1992). The matrix degrading Metalloproteinases. *Bio-Essays.* 14: 455-463

Molineaux, C.J. and Ayala, J. M. (1990). An inhibitor of endopeptidase-24.15 blocks the degradation of intraventricularly administered dynorphins. *J Neurochem.* 55: 611-618.

Monniaux, D. Huet, C. Besnard, N. Clement, F. Bosc, M. Pisselet, C. Monget, P. Mariana, J.C. (1997). Follicular growth and ovarian dynamics in mammals. *J Reprod Fertil Suppl.* 51: 3-23.

Morales, T.I. Woessner. J.F. Jr. Marsh, J.M. LeMaire, W.J. (1983). Collagen, collagenase and collagenolytic activity in rat graafian follicles during follicular growth and ovulation. *Biochim Biophys Acta.* 756: 119-122.

Murdoch, W.J. McCormick, R.J. (1992). Enhanced degradation of collagen within apical vs. basal wall of ovulatory ovine follicle. *Am J Physiol Endocrinol Metab.* 263: E221-E225.

Murphy, G.S.H. Cowell, S. Butler, G. Knäuper, V. Atkinson, S. Gavrilovic, J. (1999). Mechanisms for pro matrix metalloproteinase activation. *APMIS.* 107: 38-44.

Murphy, G. Knäuper, V. Atkinson, A. Gavrilovic, J. and Edwards, D. (2000). Cellular mechanisms for focal proteolysis and the regulation of the microenvironment. *Fibrinolysis Proteolysis.* 14: 165-174.

Nagase, H. and Woessner, J.F. Jr. (1999). Matrix Metalloproteinases. *J Biol Chem.* 274: 21491-21494.

Nakagawa, K. Kawabata, S. Nakashima, Y. Iwanaga, S. Sueishi, K. (1997). Tissue Distribution and Subcellular Localization of Rabbit Liver Metalloendopeptidase. *J. Histochem. Cytochem.* 45: 41-47

Nothnick, W. B. (2000). Disruption of the tissue inhibitor of metalloproteinase-1 gene results in altered reproductive cyclicity and uterine morphology in reproductive-age female mice. *Biol of Reprod.* 63: 905-12

Nothnick, W.B. (2003). Tissue Inhibitor of Metalloproteinase-1 (TIMP-1) Deficient Mice Display Reduced Serum Progesterone Levels during Corpus Luteum Development. *Endocrinology*. 144: 5-8.

Ohnishi, J. E. Ohnishi, M. Jin, W. Hirano, D. Nakane, H. Matsui, A. Kimura, H. Sawa, K. Nakayama, H. Shibuya, K. Nagashima, and T. Takahashi. (2001). Cloning and Characterization of a Rat Ortholog of MMP-23 (Matrix Metalloproteinase-23), a Unique Type of Membrane-Anchored Matrix Metalloproteinase and Conditioned Switching of Its Expression during the Ovarian Follicular Development *Mol Endocrinol*. 15: 747-764.

Oliveira, V. Gatti, R. Rioli, V. Ferro, E. Spisni, A. Camargo, A. C. M. Juliano, M.A. and Juliano, L. (2002). Temperature and salts effects on the peptidase activities of the recombinant metallooligopeptidases neurolysin and thimet oligopeptidase. *Eur J Biochem*. 269: 4326-4334

Otsuka, K. Sodek, J. and Limeback, H. (1984). Synthesis of collagenase and collagenase inhibitors by osteoblast-like cells in culture. *Eur J Biochem*. 145: 123-129.

Palotie, A. Salo, T. Vihko, K.K. Peltonen, L. and Rajaniemi, H. (1987). Types I and IV collagenolytic and plasminogen activator activities in preovulatory ovarian follicles. *J Cell Biochem*. 34: 101-112.

Peng, X.R. Huseh, A.J.W. LaPolt, P.S. Bjersing, L. and Ny, T. (1991). Localization of luteinizing hormone receptor messenger ribonucleic acid expression in ovarian cell type during follicles development and ovulation. *Endocrinology*. 129: 3200-3207.

Powell, D.W. Mifflin, D. A. Valentich, J.D. Crowè, S.E. Saada, S.E. and West, A.B. (1999). Myofibroblasts. I. Paracrine cells important in health and disease. *Am J Physiol Cell Physiol*. 277: C1-19.

Prepin, J. (1991). Le thymus foetal et la thymuline stimulent la prolifération des ovogonies dans l'ovaire foetal de rat in vitro. C.R. Acad Sci Paris. 313: 407-411.

Quirk, S.M. Porter, D.A. Huber, S.C. AND Cowan, R. G. (1998). Potentiation of Fas-mediated apoptosis of murine granulosa cells by interferon-gamma, tumor necrosis factor-alpha, and cycloheximide. Endocrinology. 139: 4860-4869.

Rajabi, M. and Woessner, J.F. J.r. (1984). Rise in serum levels of Pz-peptidase, an enzyme involved in collagen breakdown, in human pregnancy and labor. Am J Obstet Gynecol. 150: 821-826.

Rajakoski, E. (1996). The ovarian follicular system in sexually mature heifers with special reference to season, cyclical and left-right variation. Acta Endocrinol. 52: 1-68.

Richards, J.S. Russell, D.L. Ochsner, S. Hsieh, M. Doyle, K.H. Falender, A.E. Lo, Y.K. and Sharma, S.C. (2002). Novel Signaling Pathways That Control Ovarian Follicular Development, Ovulation, and Luteinization. Recent Progress in Hormone Research. 57: 195-220.

Robker, R.L. Russel, D.L. Espey, L.L. Lydon, J.P. O'Malley, B.W. Richards, J.S. (2000). Progesterone-regulated genes in the ovulation process: ADAMTS-1 and cathepsin L proteases. Proc Natl Acad Sci USA. 97: 4689-4694.

Rosales, A.M. Hernández-Pérez, O. Domínguez, R. Mercado, E. and Rosado, A. (1990). Proteolytic and antiproteolytic activities in goat antral follicles. Animal Reprod Science. 23: 213-222.

Rudolph-Owen, L.A. Slayden, O.D. Matrisian, L.M. and Brenner, R.M. (1998). Matrix Metalloproteinase Expression in Macaca mulatta Endometrium: Evidence for Zone-Specific Regulatory Tissue Gradients. Biol of Reprod. 59: 1349-1359.

Schmaier, A.H. (2003). The kallikrein-kinin and the renin-angiotensin systems have a multilayered interaction. *Am J Physiol Regulatory Integrative Comp Physiol.* 285: R1-R3.

Shimokawa, K.-i. Katayama, M. Matsuda, Y. Takahashi, H. Hara, I. Sato, H. and Kaneko, S. (2002). Matrix metalloproteinase (MMP)-2 and MMP-9 activities in human seminal plasma. *Mol. Hum Reprod.* 8: 32-36.

Shrimpton, C.N. Smith, A.I. and Lew, R.A. (2002). Soluble Metalloendopeptidases and Neuroendocrine Signaling. *Endocr Rev.* 23: 647-664.

Singer, C.F. Marbaix, E. Kokorine, I. Lemoine, I. Donnez, J. Eeckhout, Y. and Courtoy, P.J. (1997). Paracrine stimulation of interstitial collagenase (MMP-1) in the human endometrium by interleukin 1 α and its dual block by ovarian steroids. *PNAS.* 94: 10341-10345.

Smith, G.W. Juengel, J.L. McIntush, E.W. Youngquist, R.S. Garverick, H.A. Smith, M.F. (1996). Ontogenies of messenger RNA encoding tissue inhibitor of metalloproteinases 1 and 2 within bovine periovulatory follicles and luteal tissue. *Domest Anim Endocrinol.* 13: 151-160.

Smith, A.I. Lew, R.A. Shrimpton, C.N. Evans, R.G. and Abbenante, R.G. (2000). A Novel Stable Inhibitor of Endopeptidases EC 3.4.24.15 and 3.4.24.16 Potentiates Bradykinin-Induced Hypotension. *Hypertension.* 35: 626-648.

Sternlicht, M.D., and Werb, Z. (2001). How matrix metalloproteinases regulate cell behavior. *Annu Rev Cell Dev Biol.* 17: 463-516.

Tisljar, U. and Barrett, A. (1989). Purification and characterization of Pz-peptidase from rabbit muscle. *Arch Biochem Biophys.* 274: 138-144.

Tisljar, U. de Camargo, A.C. da Costa, C.A. and Barrett, A. (1989). Activity of Pz-peptidase and endo-oligopeptidase are due to the same enzyme. *Biochem Biophys Res Commun.* 162: 1460-1464.

Tisljar, U. (1993). Thimet oligopeptidase-a review of a thiol dependent metallo-endopeptidase also known as Pz-peptidase endopeptidase 24.15 and endo-oligopeptidase. *Biol Chem Hoppe Seyler.* 374: 91-100.

Visse, R. and Nagase, H. (2003). Matrix Metalloproteinases and Tissue Inhibitors of Metalloproteinases: Structure, Function, and Biochemistry. *Circ Res.* 92: 827-839.

Vu, T.H. and Werb, Z. 2000. Matrix metalloproteinases: effectors of development and normal physiology. *Genes & Dev.* 14: 2123-2133.

Walter, I. and Boos, A. (2001). Matrix metalloproteinases (MMP-2 and MMP-9) and tissue inhibitor-2 of matrix metalloproteinases (TIMP-2) in the placenta and interplacental uterine wall in normal cows and in cattle with retention of fetal membranes. *Placenta.* 22 (5) 473-83.

Webb, R. Gosden, R.G. Telfer, E.E. and Moor, R.M. (1999). Factors affecting folliculogenesis in ruminants. *Animal Science.* 68: 257-284

Weeks, J.G. Halmie, J. and Woessner, Jr. J.F. (1976). Extraction of collagenase from the involuting rat uterus. *Biochem Biophys Acta.* 445: 205-214.

Werb, Z. Banda, M.J. and Jones, P.A. (1980). Degradation of connective tissue matrices by macrophages. I. Proteolysis of elastin, glycoproteins, and collagen by isolated from macrophages. *J Exp Med.* 152: 1340-1357.

Xu, P. Alfaidy, N. and Challis, J.R.G. (2002). Expression of Matrix Metalloproteinase (MMP)-2 and MMP-9 in Human Placenta and Fetal Membranes in Relation to Preterm and Term Labor. *J Clin Endocrinol Metab.* 87: 1353-1361.

Yurchenco, P.D. and Schittny, J.C. (1990). Molecular architecture of basement membranes. *FASEB J.* 4: 1577-1590.

ANIMAL REPRODUCTION SCIENCE

An International Journal

Animal Reproduction Science 47 (1997) 21

Metalloproteinase activity during maturation and atresia in the ova of goat

Rebeca García ^{a,*}, Luz Ma. Ballesteros ^a,
Ana M. Rosales ^b, Román Espinosa ^c,
Lino Díaz de León ^c, Adolfo

^a *Laboratorio de Bioquímica Molecular, Unidad de Investigación Médica de Investigación Médica, Instituto Mexicano del Seguro Social, Apdo. Postal 7-123, México DF, México*

^b *Departamento de Producción Agrícola y Animal Universidad Autónoma de México DF, México*

^c *Laboratorio de Biología del Desarrollo Instituto de Investigación Científica y Tecnológica, Universidad Autónoma de México, México DF, México*

^d *Departamento de Biología de la Reproducción Animal, División de Biología, Universidad Autónoma de Metropolitana, México DF, México*



ELSEVIER

ANIMAL REPRODUCTION SCIENCE

An International Journal



Animal Reproduction Science 47 (1997)

Aims and scope. The journal publishes scientific papers dealing with the study of reproduction in all animals which could be regarded as being useful to man. It aims to bridge the gap between fundamental research and management aspects. The scope includes the following topics: oestrous cycle research in domesticated animals, cytogenetics and genetic selection in relation to reproductive capacity; reproductive physiology, endocrine and artificial control in reproduction; preservation of gametes and embryos; disease and nutrition in relation to reproductive performance; diagnostic and therapeutic techniques; pregnancy characteristics; fetal characteristics; sterility; intersexuality; reproduction problems in tropical and underdeveloped countries; control of vertebrate animal pests; fertility problems of interest to gynaecologists.

Editor-in-Chief

K.L. Macmillan, Dalrymple Research Corporation Ltd., c/o Ruakura Agricultural Centre, Private Bag, Hamilton, New Zealand

Editorial Advisory Board:

R.J. Aitken, Edinburgh, UK
L.L. Anderson, Ames, IA, USA
D.T. Armstrong, London, Ont., Canada
M.P. Boland, Dublin, Ireland
J.H. Britt, Raleigh, NC, USA
P.J. Broadbent, Aberdeen, UK
J.L. Brown, Front Royal, VA, USA
P. Dziuk, Urbana, IL, USA
T. Greve, Frederiksherg, Denmark
W.V. Holt, London, UK
J.S.M. Hutchinson, Aberdeen, UK
W. Jöchle, Denville, NJ, USA
J.E. Kinder, Lincoln, NE, USA

R.J. Mapletoft, Saskatchewan, Sask., Canada
H. Mohri, Okazaki, Japan
T. Nett, Fort Collins, CO, USA
N. Parvizi, Neustadt, Germany
J. J. Raeside, Guelph, Ont., Canada
G.C.D. Randall, Nepean, Ont., Canada
J.F. Roche, Dublin, Ireland
R.J. Scaramuzzi, London, UK
J.P. Signoret, Nouzilly, France
W.W. Thatcher, Gainesville, FL, USA
J.G. Thompson, Hamilton, New Zealand
R. Vishwanath, Hamilton, New Zealand
S.W. Walkden-Brown, Armidale, N.S.W., Australia

Book Review Editor

J.S. Hutchinson, School of Agriculture, University of Aberdeen, 581 King Street, Aberdeen AB9 1UD, UK

Publication Information. *Animal Reproduction Science* (ISSN 0378-4320). For 1997 volumes 45-49 are scheduled for publication. Subscription prices are available upon request from the Publisher. Subscriptions are accepted on a prepaid basis only, and are entered on a calendar year basis. Issues are sent by surface mail except to the following countries where air delivery by SAL mail is ensured: Argentina, Australia, Brazil, Canada, Hong Kong, India, Israel, Japan, Malaysia, Mexico, New Zealand, Pakistan, PR China, Singapore, South Africa, South Korea, Taiwan, Thailand, USA. For all other countries airmail rates are available upon request. Claims for missing issues should be made within six months of our publication (mailing) date.

Orders, claims, and product enquiries: please contact the Customer Support Department at the Regional Sales Office nearest you:

New York: Elsevier Science, P.O. Box 945, New York, NY 10159-0945, USA. Tel: (+1) 212-633-3730, [Toll free number for North American customers: 1-888-4ES-INFO (437-4636)]. Fax: (+1) 212-633-3680, E-mail: usinfo-1@elsevier.com

Amsterdam: Elsevier Science, P.O. Box 211, 1000 AE Amsterdam, The Netherlands. Tel: (+31) 20-485-3757, Fax: (+31) 20-485-3432, E-mail: nlinfo-1@elsevier.nl

Tokyo: Elsevier Science, 9-15, Higashi Azabu 1-chome, Minato-ku, Tokyo 106, Japan. Tel: (+81) 3-5561-5033, Fax: (+81) 3-5561-5047, E-mail: ky04035@niftyserve.jp

Singapore: Elsevier Science, No. 1 Temasek Avenue, #17-01 Millenia Tower, Singapore 039192. Tel: (+65) 434-3727, Fax: (+65) 337-2230, E-mail: asiainfo@elsevier.com.sg

Metalloproteinase activity during follicular maturation and atresia in the ovary of the goat

Rebecca García ^{a, *}, Luz Ma. Ballesteros ^b, Ana Ma Rosales ^b, Román Espinoza ^c, Lino Díaz de León ^c, Adolfo Díaz ^c

^a Laboratorio de Bioquímica Molecular, Unidad de Investigación de Investigación Médica, Instituto Mexicano del Seguro Social, México

^b Departamento de Producción Agrícola y Animal Universidad Autónoma de México DF, México

^c Laboratorio de Biología del Desarrollo Instituto de Investigación Científica y Tecnológica, Universidad Autónoma de México, México

^d Departamento de Biología de la Reproducción Animal, Universidad Autónoma de Metropolitana, México

Abstract

Metalloproteinases are an important group of hydrolytic enzymes that participate in the degradation of the extracellular matrix during tissue remodelling processes such as follicular growth and maturation. The activity of metalloproteinase (Pz-peptidase), was measured during growth, maturation and atresia of follicles ($n = 67$) were separated by size and also classified into: early atretic (Stage I) (Group I); moderately atretic (Stage II) (Group II); and late atretic (Stage III) (Group III). Pz-peptidase was greater in granulosa cells and absent in follicular fluid in non-atretic follicles, act-

* Corresponding author. Tel: (52) 6276914; fax: (52) 6276915.

increasing follicle size, whereas activity peaked in 3–6 mm follicles in thecal cells. Atresia was associated with declining activity in thecal cells from follicles in the 3–6 mm range and in granulosa cells from the > 6 mm range. Interstitial collagenase activity was significant and similar in granulosa and thecal cell extracts and low in follicular fluid from non-atretic follicles. Activity increased significantly in thecal cells, but decreased significantly in granulosa cells from large (> 6 mm) non-atretic follicles. Atresia was associated with declining activity in both types of cells and increasing activity in follicular fluid. Gelatinase activity was some times associated with five regions corresponding to molecular weights of 22.1, 30.7, 39.6, 63.8 and 71.4 kDa, and rarely at 91.3 and 81.2 kDa. Overall activity declined with atresia in thecal cells from follicles in the 3–6 mm range, but not in those > 6 mm. In granulosa cells from follicles 3–6 mm, activity varied widely with stage of atresia, while in cells from follicles > 6 mm, activity was greatly increased in atretic follicles. © 1997 Elsevier Science B.V.

Keywords: Metalloproteinases; Follicular growth; Follicular atresia; Goat ovarian follicles

1. Introduction

Antral follicles grow and regress continuously throughout the oestrous cycle in mammals (Lipner, 1988). The number of non-atretic follicles bigger than 5 mm in diameter is low (≤ 3 healthy follicles per day of cycle in the cow) due to a high incidence of atresia in follicles enlarging from 2 to 5 mm in diameter (McNatty et al., 1984). The essential role of proteolytic enzymes in follicular rupture, and hence ovulation, has been clearly shown (Fukumoto et al., 1981; Woessner et al., 1989; Curry et al., 1990). However, few studies have been orientated to study the role of these enzymes in the normal growth, development and maturation of the follicle (McNatty et al., 1984; Morales et al., 1983; Reich et al., 1991), and none to the possible participation of metalloproteinases in the genesis and progress of follicular atresia.

The principal component of the ovarian extracellular matrix is collagen, although the ovary is rich in connective tissue, including elastin, glycosaminoglycans, proteoglycans and glycoproteins (Otsuka et al., 1987). Growth of the maturing follicle may require remodelling of the collagenous structure of the follicle wall and of the surrounding ovarian stroma. Woessner et al. (1989) remarked that, important processes of tissue remodeling may occur during all the phases of follicle growth and maturation, in addition to the collagenolysis observed immediately before ovulation, and including necessary modifications of the surrounding ovarian tissues that permit the growing follicle to reach a place on the ovarian surface from which the mature oocyte will be extruded (Lipner, 1988).

Matrix metalloproteinases are an important group of hydrolytic enzymes (Otsuka et al., 1987; Emonard and Grimaud, 1990; Matrisian, 1992) which participate in remodelling the extracellular matrix by solubilizing the complex network of collagens, laminins, proteoglycans, and entactin. Since the experiments of Fukumoto et al. (1981) and of Morales et al. (1983), metalloproteinases have been shown to play an important role in the mechanism of tissue degradation that precedes follicular rupture. Morales et al. (1983) showed that the collagen content of follicles increased 3-fold from 35 to 56 h

after treatment of immature rats with equine chorionic gonadotropin, and subsequently (25%) from 61 to 66 h after gonadotropin release. A study by a group found that collagenolytic enzyme(s) were present in theca and granulosa cells. Growth and at the time of ovulation, they were inactive. Collagenolytic activity between 38 and 66 h after treatment.

It has recently become clear that several enzymes degrading the matrix in specific fashion are present in theca and granulosa cells. Activities around the time of ovulation (Curry et al., 1985; Murdoch and McCormick, 1992). The structure of the matrix depends on the presence of a meshwork of collagen. The activity of the theca layers (Woessner et al., 1989) therefore be preceded by hydrolytic changes with theca and granulosa cells, particularly in the apical region of the follicle (Murdoch and McCormick, 1992). It may finally lead to the rupture of the follicular wall. It has also been shown that the presence of collagenase is essential for ovulation (Curry et al., 1985; Brännström et al., 1988; Butcher et al., 1990).

Mammalian Type I collagenase cleaves collagen into small fragments that denature into nonhelical gelatin. The mechanism of degradation by various proteinases including gelatinase (Mackay et al., 1990). Pz-peptidase or collagenase is a major enzyme in mammalian tissues that cleaves a synthetic substrate (Pz)-Pro-Leu-Gly-Pro-D-Arg (Pz-peptide) which is a substrate for *Clostridium histolyticum* collagenase. Since Pz-peptidase is a type of collagenases, enzymes in mammalian tissues were called Pz-peptidases, or, more recently, Thimet oligopeptidase. These enzymes have been described also as 'tissue endopeptidase' (EC 3.4.99.31). It has been shown that the endopeptidase EC 3.4.24.15 (Barret and Barret, 1989), an enzyme previously considered as a type of Pz-peptidase.

Pz-peptidase has no effect on casein, serum albumin, and various collagen peptides (Tisljar, 1993). Under biological situations in which collagen degradation is occurring, the suggestion that Pz-peptidase plays a part in tissue remodeling (Tisljar, 1993). Pz-peptidase is not inhibited by EDTA (Barret and Barret, 1989). This neutral metalloproteinase cleaves the α amino side of hydrophobic amino acids. The enzyme hydrolyzes a wide range of neuropeptides. Bradykinin, neurotensin, URRH and cholecystokinin. Substance P are the most efficiently hydrolyzed.

The purposes of the present study were: (1) to determine if the follicle contains collagenases, including gelatinase, and (2) to examine the changes in activities of these enzymes in theca, granulosa, and follicular fluid, and granulosa, and theca, and atresia.

2. Materials and methods

2.1 Reagents

Rainbow molecular size markers (Amersham, Arlington Heights, IL) were used to allow final molecular size estimation of the bands resolved by gel zymography. Pz-Pro-Leu was from Fluka. Ethyl acetate, butyl acetate and acetonitrile were from Merck (México). Dithiothreitol (DTT), iodoacetamide, 3-(N-Morpholino) ethanesulfonic acids (MOPS), N-tris-(hydroxy-methyl) methyl-2-aminoethanesulfonic acid (TES), 4-aminophenyl mercuric acetate (APMA) and Pz-Pro-Leu-Gly-Pro-D-Arg (Pz-Peptide) were from Sigma Chemical Co. (St. Louis, MO). All other reagents and chemicals were of the best quality available, usually reagent grade, and were generally obtained from Sigma Chemical Co. (St. Louis, MO). High resistance, deionized water obtained by passing distilled water through a Millipore Milli R-020 system was used throughout. Microbial contamination may be an important source of bacterial proteases; therefore, all buffers and other solutions were autoclaved or sterilized by filtration and stored under conditions that minimized contamination.

2.2. Experimental outline

Ovaries of non pregnant goats were obtained from a local slaughterhouse and transported to the laboratory (transport time never exceeded 30 min) in ice cold 0.15 M NaCl. Antral follicles ($n = 67$) were dissected and separated by the size of their larger diameter, into three groups: less than 3 mm; 3–6 mm, and greater than 6 mm. Follicles less than 3 mm in diameter were used without further characterization. Follicles 3–6 mm and more than 6 mm were carefully dissected free of stromal tissue and separately classified under a stereoscopic microscope (magnification $\times 120$), according to their structural characteristics (Moor et al., 1978; Rosales et al., 1990; Ballesteros et al., 1992), into one of four groups: non-atretic (Group I), early atretic (Group II), moderately atretic (Group IIIa) and late atretic (Group IIIb). To further show the applicability of this system of classification in the goat, 180 randomly selected follicles were initially classified by stereoscopic microscopy observation and then studied and classified histologically following previously established criteria (Hay et al., 1976; Moor et al., 1978).

Fluid from each follicle was collected by flushing as described by Ballesteros et al. (1992) and centrifuged at 3500 g for 10 min to separate the granulosa cells. Care was taken to avoid contaminating the follicular fluid with blood. This procedure insured a consistent recovery of more than 85% granulosa cells in the aspirated follicular fluid (Rosales et al., 1990; Ballesteros et al., 1992). The supernatant fluids were recentrifuged at 12,000 g for 20 min and the precipitated granulosa cells were washed free of residual follicular fluid by recentrifugation after resuspension in cold 0.25 M sucrose, taken to pH 7.4 by the addition of a small amount of triethanolamine.

The empty follicular sacs were excised, washed with saline solution to separate all remaining granulosa cells, and dissected as free of fibrous tissue as possible. Cell-free follicular fluids, clean follicular sacs and resuspended granulosa cells were stored until

used at -60°C (Reveo deep freeze) in 300 μl consisting of 50 mM tris buffer pH 7.5 prepared with NaN_3 and 0.05% Brig 35 detergent. The empty granulosa cells were homogenized in T-B solution using a homogenizer fitted to an electrical motor. The empty follicular sacs were considered to represent whole follicles and were centrifuged at 4°C in Beckman refrigerated centrifuge.

2.3. Pz-peptidase determination

Pz-peptidase activity was determined in the homogenates of theca and granulosa cells and in the follicular fluid using a simplified variation of the rate assay described by Garner (1990). Briefly, 0.25 ml of suitably diluted homogenate was preincubated with a substrate solution containing 2.5 mM Pz-Pro-Leu-Gly-Pro-D-Arg in 50 mM 3-(N-morpholino) ethanesulfonic acid and 50 mM NaCl, all adjusted to pH 7.4. Incubation was started by the addition of 0.20 ml 200 mM H_3PO_4 . The homogenate was then acidified with 2.5 ml butyl acetate. The absorbance at 322 nm. The total Pz-peptidase activity was calculated from the results obtained at each of the incubation times. Activity is expressed as mg of hydrolyzed substrate per mg of protein per min.

Determination of optimum pH for the enzyme was done following the method proposed by Garner (1990) since it has been shown that this enzyme is inhibited by high concentrations of salts was carefully adjusted by the addition of NaCl.

2.4. Collagenase determination

Follicular metalloproteinase activity was determined using the method described by Weeks et al. (Weeks et al., 1976). Briefly, theca and granulosa cells were centrifuged at 27,000 g for 20 min. The precipitated cells were resuspended in 100 mM Tris buffer pH 7.4 containing 100 mM CaCl₂ to dissociate collagenase bound to collagen, and the supernatant was dialyzed over the conditions mentioned above. The combined supernatants from theca and granulosa cells were dialyzed over the conditions mentioned above. The follicular fluid was also heated at 100°C for 10 min enough CaCl_2 to make it 100 mM final concentration.

To inactivate metalloproteinase inhibitors in the supernatants (from thecas and granulosa cells) and follicular fluids were treated with 2 mM dithiothreitol (DTT) and iodoacetamide at the same temperature during the

dialyzed overnight against T-B solution under the conditions previously described. The treated and dialyzed samples were activated by incubation in the presence of 1 mM *p*-amino-phenyl-mercuric acetate (APMA) for 4 h, and then redialyzed overnight against T-B solution (Matrisian, 1992).

Collagenolytic activity was determined by the enzymatic release of ^3H -labelled collagen fragments, following the methodology described by Johnson-Wint and Gross (1980), with some modifications. Telopeptide free, Propionylated- ^3H -collagen Type I (N-[propionate-2,3- ^3H]-rat Type I collagen, NET 660, 0.26 mCi mg^{-1} specific activity), diluted 1:20 with 5 mM acetic acid was used as substrate. To each well of an ELISA plate the following solutions were added: 10 ml (0.025 mCi) of ^3H -propionylated-Type I collagen and 50 ml of 0.1 M NaHCO_3 buffer, pH 9.0 To fix the collagen to the well wall, the liquid was allowed to evaporate for 24 h at room temperature in a desiccator connected to a vacuum pump and each independent well was then washed three times with distilled water. Then the following reaction mixture was added to each well: 3.3 mM Tris-HCl pH 7.8, 7.5 mM N-ethyl-maleimide, 10 mM CaCl_2 and 10 mg equivalent protein of the test homogenates, all in enough volume to have 150 ml final reaction volume. Blanks without enzyme, and controls with 20 mM ethylenediaminetetra-acetate (EDTA) in place of calcium were included and reactions with 2 mg bacterial collagenase (as 100% activity) were also included. Each sample was run in duplicate.

The plate was incubated at 35°C for 48 h in a humidified incubator and then centrifuged in an ICM refrigerated centrifuge at 1500 rpm for 10 min. The supernatant of each well was recovered and counted in a Beckman LS 6000-SE liquid scintillation spectrometer. The enzymatic activity was calculated as dpm released per mg protein per 24 h. All values were corrected by the amount of activity found in blanks (without enzyme) and controls (without calcium, plus EDTA).

2.5. Gelatinase determination

Gelatinase determinations were done by zymography of the alkylated and activated enzymic fraction of ovarian homogenates following the method described by Heussen and Dowdle (1980). For this, the final tissue fractions obtained as described above, were adjusted to a final protein concentration of 0.5 mg ml^{-1} (1.0 mg ml^{-1} in the case of follicular fluid) using Tris buffer, pH 7.4, containing 5 mM CaCl_2 , 2% (w/v) sodium dodecyl sulfate (SDS) and 20% glycerol. Aliquots ($20 \mu\text{l}$) of each sample were applied to minigels of 10% (w/v) polyacrylamide copolymerized with 0.1% (w/v) gelatin. Electrophoresis was carried out in a cold room (4°C) at a constant current of 25 mA/gel under nonreducing conditions until the tracking dye front had reached the bottom of the resolving gel. Afterwards the gels were washed for 2 h in 2.5% Triton X-100 in water to eliminate the SDS, washed three times with distilled water and incubated overnight in a wet atmosphere at 37°C in substrate buffer: Tris 0.1 M pH 7.4 containing 0.01 M CaCl_2 . The gels were fixed and stained by 1 h incubation with 0.05% Coomassie brilliant blue in a mixture of water, methanol and acetic acid (6:3:1) and subsequently destained by 1 h incubation in the same mixture without Coomassie. Gelatin-degrading enzymes were identified by their ability to digest the gel. Rainbow molecular size markers (Amersham,

Arlington Heights, IL) were used to allow final resolved by gel zymography.

Gelatinolytic activity was characterized by incubating into the incubation buffer and comparing against known inhibitors were: ethylenediamine tetraacetate (EDTA) (5 mM), O-phenyl-methyl-sulfonyl fluoride (1 mM), Pepstatin A (1 ml ml^{-1}), and N-ethyl-maleimide.

Non-specific proteolytic activity was measured by zymography into the gels following the procedure described by Heussen et al. (1987). In this case, after electrophoresis, the gels were washed three times with distilled water, incubated for 2 h in a buffer containing 0.01 M CaCl_2 and immediately put on a zymogram gels, containing casein as substrate. The substrate was released by boiling of a solution of 1 g casein in 20 ml of 1 M NaCl solution, pH 8.0 The solubilized casein was then centrifuged at 12000 g for 30 min and filtered through Whatman paper. Once in contact the gels were put between two sheets of Whatman paper and incubated at 37°C for 24 h in a wet atmosphere. The gels were fixed, stained and destained in the same manner as described above.

Quantifications of gelatinase activity was performed by using two dimensional scanning densitometry (LKB 2000). The proteinases was estimated by comparing their activity with protein standards.

2.6. Protein determination

Protein concentrations were determined by the method of Bradford (1976) using bovine serum albumin as a standard.

2.7. Data analyses

All experimental data represent the results of three independent experiments presented as the mean \pm the standard deviation. Statistical differences were tested with one-way analyses of variance. When differences was obtained with this analyses ($P < 0.05$), the Student's *t* test was used to analyze group comparisons (Sokal and Rohlf, 1995). Statistical analysis of follicles of different sizes, Student's *t* test was used. All statistical analyses were performed using a computerized package (Micro

3. Results

Comparison of the visual and histological studies of the follicles and the histological validation of the classification of the follicles by microscope observation is indicated in Fig. 1. Ear

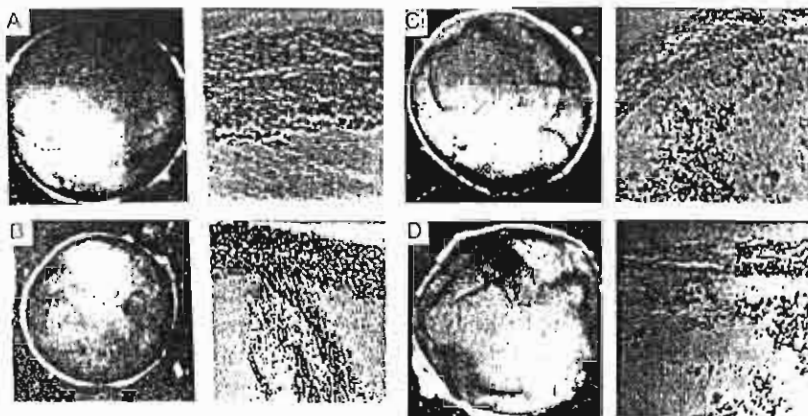


Fig. 1. Comparison of the visual and histological study of typical follicles. Follicles 3–6 mm and more than 6 mm were carefully dissected free of stromal tissue and individually classified under a stereoscopic microscope (magnification $\times 120$), according to their morphological characteristics in one of four groups. Non-atretic (Group I), initially atretic (Group II), moderately atretic (Group IIIa) and atretic (Group IIIb). Subsequently the follicles were fixed, stained and observed histologically. Typical results obtained in follicles > 6 mm are expressed in this figure. In each case the letters indicate the stereoscopic microscopic appearance of the different groups in which the follicles were classified, with the respective histological image at its right. A, Group I; B, Group II; C, Group IIIa; D, Group IIIb.

microscopy and assigned to one of four groups of follicular atresia according to its general appearance, continuity and detachment of the granulosa layer and the degree of thecal vascularization. Follicles with a uniformly bright, translucent appearance, extensive vascularization and a regular, continuous, granulosa layer were classified as non-atretic (Group I). Follicles characterized by a loss of translucency, observable discontinuities in the granulosa layer, but acceptable vascularization, were considered Stage I early atretic (Group II). Follicles with dull, grayish appearance, clear interruptions of the granulosa layer and poor vascularization of the theca were considered Stage II moderately atretic (Group IIIa). Finally, follicles with gray dull opaque aspect, none or few empty blood vessels, extensive detachments of the granulosa layer and the presence of free globules (large atretic bodies), were classified as Stage III late atretic (Group IIIb). The theca interna and theca externa layers were histologically evident and in close contact in non atretic follicles, the granulosa membrane was continuous and formed by uniformly arranged granulosa cells with few pyknotic nuclei ($\leq 5\%$). Stage I, early atretic follicles (Group II), were characterized by a small, but significant number ($< 10\%$) of granulosa cells with pyknotic nuclei, usually close to the follicular antrum. Some discontinuities of the granulosa layer were observed. The oocyte/cumulus unit remained fixed to the follicular wall. In moderately atretic, Stage II follicles (Group IIIa), there were local perforations of the granulosa associated with areas of extensive and partial separation from the theca. Pyknotic nuclei were present in theca and granulosa cells with more than 15% of pyknotic nuclei in the granulosa layer. The

basement lamina lost its integrity and leucocytes were present in theca fluid. The oocyte, which was partially denuded of cytoplasm, was detached from the follicular wall. Stage III late atretic follicles were characterized by a reduction in the number of granulosa cells and the granulosa layer were entirely separated from the theca. The thecal layer was hypertrophied. Usually the oocyte was detached from the follicular wall.

Fig. 2 shows the quantitative relationships between the visual and histological classification of the 180 follicles included in this study. There was a good agreement between our visual classification of follicles, particularly in non atretic (Group I) and in atretic (Group II and Group IIIa) were actually a mixture of non-atretic or early atretic. Group 3a was considered as early atretic because at least 50% of the follicles in this group with a significant presence ($\sim 50\%$) of moderately atretic follicles.

Pz-peptidase was particularly active in granulosa cells of atretic follicles. Sometimes more activity than that found in theca cells was observed. Pz-peptidase was completely inhibited, in follicular fluid (Table 1).

The activity of Pz-peptidase (Table 1) in granulosa cells of growing follicles showed a significant increase in the

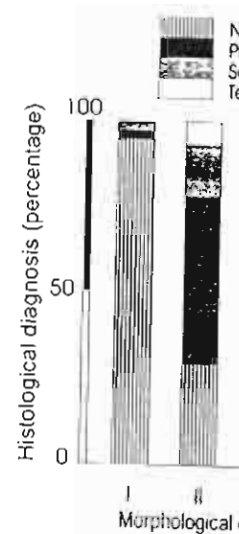


Fig. 2. Quantitative comparison between the results obtained by the visual and histological diagnosis of follicles. The results obtained by the visual diagnosis of follicles according to our classification in four groups, are indicated in the ordinate. The degree of atresia diagnosed by the histological study of each follicle (according to morphological criteria) are indicated in the ordinate.

Table 1
Pz-peptidase activity in different compartments of the goat follicle during normal follicular growth and in different stages of atresia (μg hydrolyzed substrate/mg protein/h)

Size	Group	n	Granulosa cells	Theca cells	Follicular fluid
< 3	I	5	40.45 \pm 4.05*	24.25 \pm 4.10*	1.92 \pm 0.18*
3–6	I	7	107.06 \pm 20.08* * * a	51.93 \pm 7.11* * * a	1.51 \pm 0.13* * * a
	II	6	106.35 \pm 21.94a	33.92 \pm 5.70b	1.11 \pm 0.14b
	IIIa	8	93.70 \pm 12.90a	22.44 \pm 5.04c	1.02 \pm 0.16b
	IIIb	9	113.24 \pm 14.08a	13.41 \pm 4.04d	1.05 \pm 0.13b
> 6	I	8	146.28 \pm 18.71* * * a	22.34 \pm 4.29* * * a	0.94 \pm 0.13* * * a
	II	10	95.64 \pm 14.74b	19.33 \pm 3.67a	1.06 \pm 0.09a
	IIIa	8	91.80 \pm 11.12b	20.18 \pm 5.45a	0.71 \pm 0.09b
	IIIb	6	68.3 \pm 9.15c	24.43 \pm 4.74a	0.95 \pm 0.14a

Values indicate the mean of the number of cases indicated as $n \pm$ the standard deviation * Different number of asterisks indicate significant statistical differences, $P < 0.05$, between non-atretic follicles of different size. Different letters following values, indicate the existence of significant differences, $P < 0.05$, between different groups of same size follicles.

follicles. In late stages of growth, Pz activity increased in granulosa cells while showing a significant decrease in follicular fluid and in theca cells. No significant changes in enzyme activity were found during atresia in granulosa cells of 3–6 mm follicles. In this same group of follicles, Pz-peptidase of theca cells showed a highly significant decrease in activity which was correlated with the progression of the atretic process. An inverse relationship was observed in follicles > 6 mm. In this case, granulosa cells showed a steady decrease in activity with the progress of atresia, while in theca cells Pz-peptidase activity showed no significant modifications.

Interstitial collagenase of granulosa cells in non-atretic follicles, was always smaller than the activity in theca cells, and showed a significant decrease in large > 6 mm follicles (Table 2). Theca cell collagenase was significantly higher in normal follicles bigger than 6 mm in diameter (Table 2). In granulosa cells of 3–6 mm follicles, collagenase activity during the initial stages of atresia (Groups II and IIIa) was similar to the activity found in normal follicles. In late atretic follicles (IIIb) it showed a highly significant ($P < 0.005$) decrease (Table 2). In large, > 6 mm follicles, interstitial collagenase of this same type of cells, showed an increase in Group IIIa follicles followed by a sharp decrease when the atresia reached the characteristics of Group IIIb (Table 2).

Zymographic identification of follicular gelatinolytic activity revealed the presence of several gelatin deficient areas (Fig. 3). The gelatin digested regions were somewhat different, depending on the tissue extract studied (Tables 3 and 4). In general, five zones were frequently identifiable by computerized image analyses using two dimensional scanning densitometry. Of these, two, with molecular masses of 63.8 ± 2.4 and 30.7 ± 1.8 kDa, were almost always predominant. The other observed bands were found in regions corresponding to molecular masses of 71.4 ± 2.1 , 39.6 ± 2.2 , and 22.1 ± 0.8 kDa. Two exceptionally heavy regions of hydrolytic activity were observed in areas

Table 2
Interstitial (Type I) Collagenase activity in different compartments of the goat follicle during normal follicular growth and in different stages of atresia (dpm/24 h/mg protein/h)

Size	Group	n	Granulosa cells
< 3	I	5	23.0 \pm 3.7*
3–6	I	7	25.9 \pm 3.4* a
	II	5	23.3 \pm 3.7a
	IIIa	6	24.6 \pm 7.9a
	IIIb	9	14.4 \pm 1.1b
> 6	I	8	15.9 \pm 2.5* * a
	II	8	12.7 \pm 1.3a
	IIIa	7	23.8 \pm 3.5b
	IIIb	6	6.7 \pm 1.3c

Values represent the mean of the number of cases indicated as $n \pm$ the standard deviation * Different number of asterisks indicate significant statistical differences, $P < 0.05$, between non-atretic follicles of different size. Different letters following values indicate the existence of significant differences, $P < 0.05$, between different groups of same size follicles. No enzymatic activity detected.

representing molecular weights of 91.3 and 81.3 kDa. These bands were shown to represent true metalloproteinase activity in the presence of metal chelating agents



Fig. 3. Representative gel zymogram of gelatinase activity in normally growing and atretic follicles of different sizes (for follicles < 3 mm, Lanes 2 and 3 non-atretic follicles (Group I) and follicles 3–6 mm in diameter, initially atretic (Group II), and IIIb), respectively (b) Follicles > 6 mm in diameter. Lane 1 normal follicles with atresia, Groups II, IIIa and IIIb, respectively. Na₂S₂O₄ (in kDa) of the degraded region.

Table 3
Densitometric quantification of zymographic gelatinolytic activity in theca cells during normal follicular growth and in different stages of atresia

Size	< 3		3–6		> 6			
	I	II	IIIa	IIIb	I	II	IIIa	IIIb
Mr								
91.3	28	32	95					67
81.2	90	154	182					97
71.4	235	220	265	180		110	95	112
63.8	749	509	480	615	115	360	348	312
52.0				130		128		
39.6	110		110	64	12			
30.7	694	410	394	494	87	320	295	282
22.1							115	95

Numbers indicate representative values of densitometric determinations. Quantifications of gelatinolytic activity was performed by computerized image analyses using two dimensional scanning densitometry. The Mr of the proteinases was estimated by comparing their electrophoretic mobilities with that of protein standards.

by their behaviour against other inhibitory compounds (DTT, N-ethyl maleimide, pepstatin).

In the case of normal follicular growth, theca cells from follicles < 3 mm were characterized by the presence of small amounts of high molecular weight 92, 81.2 and 71.4 kDa, gelatinases, and by the elevated activities of 64 and 31 kDa gelatinases (Table 3). This pattern was preserved in non-atretic follicles 3–6 mm in diameter, but with considerably less activity. Gelatinolysis produced by extracts of theca cells obtained from normal follicles > 6 mm was especially characterized by high activity of stromelysin-like activity, but also of Type IV collagenase. Granulosa cells from follicles

Table 4
Densitometric quantification of zymographic gelatinolytic activity in granulosa cells during normal follicular growth and in different stages of atresia

Size	< 3		3–6		> 6			
	I	II	IIIa	IIIb	I	II	IIIa	IIIb
Mr								
91.3			105					305
81.2			225					47
71.4	93	63	490	150		39	38	14
63.8	325	152	140	508	83	133	90	74
52.0				63		13		60
39.6				60		7		12
30.7	405	70	185	340	25	14	31	6
22.1								190

Numbers indicate representative values of densitometric determinations. Quantifications of gelatinolytic activity was performed by computerized image analyses using two dimensional scanning densitometry. The Mr of the proteinases was estimated by comparing their electrophoretic mobilities with that of protein standards.

< 3 mm showed high activity of 64 and 31 kDa region of 72 kDa (Fig. 3a, Lane 1, Table 4). The follicles 3–6 mm in diameter (Fig. 3a, Lanes 2 and 3) but with considerable less stromelysin-like activity (Lane 1).

Progression of the atretic process in theca cells of small size follicles was accompanied by the appearance of some hydrolytic bands in regions of high molecular weight. Gelatinolytic activity in theca cells in 3–6 mm follicles was characterized by high activity of stromelysin-like activity, particularly of active Type IV (71.4 kDa) which showed the same pattern as in theca cells of non-atretic follicles > 6 mm was preserved during the atretic process. A progressive decrease in stromelysin-like activity and a sudden increase in gelatinolytic activity and appearance of some hydrolytic bands in regions of high molecular weight (Fig. 3a, Lane 4).

4. Discussion

Degradation of collagen would require the action of Type IV collagenase to degrade the basement membrane and Type V collagenase to degrade the meshwork fibers of the extracellular matrix. Matrisian et al. (1985) demonstrated the presence of Type IV collagenase in granulosa cells immediately prior to ovulation, and Palotie et al. (1990) demonstrated the presence of Type IV collagenase by cultured rat follicles stimulated by LH. Type IV collagenase degraded by Type IV collagenase or 72 kDa gelatinase (Type V collagenase (92 kDa gelatinase) and by stromelysin-like activity. The activity of Type IV collagenase-degrading activity continues to increase for at least 6 h after the LH surge. The increase in collagenase action is one of the late biochemical events that occur just shortly before the release of the ova (Butler et al., 1990). The protocol was not designed to detect preovulatory LH surge. We were unable to show any more than a moderate increase in Type IV collagenase activity in theca cells of growing non-atretic follicles. The activity of Type IV collagenase in granulosa cells from follicles > 6 mm was especially characterized by high activity of stromelysin-like activity in intermediate size follicles.

Collagenases are secreted as proenzymes and require activation to become active. This appears to involve plasmin, and likely plasminogen activator (Palotie et al., 1990; Matrisian, 1992). This activation can also be induced by chemical reagents such as p-amino phenyl mercaptide (Palotie et al., 1990; Werb, 1991). In addition, for the full expression

nases must be liberated of bound inhibitors, including the so called tissue inhibitor of metalloproteinases (TIMP) and, perhaps, α 2-macroglobulin (α 2M). In fact, the presence of specific inhibitors whose concentration increases simultaneously to the increase in enzyme activity, indicates that careful regulation of these enzymes must be of great importance (Otsuka et al., 1987; Emonard and Grimaud, 1990). Adequate determination of collagenase activity in tissue extracts requires elimination of inhibitors by reduction with dithiothreitol and alkylation with iodoacetamide, as has been described in recent works (Emonard and Grimaud, 1990; Alexander and Werb, 1991; Matrisian, 1992).

In the present work we have shown the presence of metalloproteinase activity (gelatinase) in follicular fluid and in theca and granulosa cells of the goat follicle. Proteolytic activity was practically abolished by EDTA, DTT and *o*-Phenanthroline, indicating that the detected enzymatic activity is really due to metalloproteinases. Although the procedure used for zymography has proved its utility for discriminating between metalloproteinases of different types, owing to the anomalous behavior in gels of different total polyacrylamide concentrations, it has been of less value for assigning precise molecular weights to the enzymes. However, the introduced error may be considered to be less than 5% (Heussen and Dowdle, 1980) of the expected molecular weight, which is further reduced by the constant inclusion of standard molecular weight markers, and therefore permits an adequate approximation to this parameter. However, since no authentic enzymes were used for comparison, it is necessary to emphasize that the mentioned identifications must be considered tentative; this is particularly true for stromelysin, not yet shown in follicles.

Of the observed bands, the more frequently noticed have molecular masses of 63.8 ± 2.4 and 30.7 ± 1.8 kDa. These molecular weights may be taken as evidence that the pertinent enzymes correspond to activated Type IV gelatinase (MMP-2) and to one of the reported active forms of the stromelysins (MMP-3 and MMP-10), respectively (Emonard and Grimaud, 1990; Matrisian, 1992). The other observed bands were found in regions corresponding to latent Type IV collagenase ($M_r = 71.4 \pm 2.1$ kDa), activated Type I collagenase ($M_r = 39.6 \pm 2.2$ kDa), and perhaps to the recently described uterine metalloproteinase MMP-7 ($M_r = 22.1 \pm 0.8$ kDa). The two heavy molecular weight regions of hydrolytic activity observed occasionally may be related to the latent and activated forms of Type V collagenase (MMP-9) (M_r of 91.3 and 81.2 kDa respectively).

The fact that several 'latent' MMP forms were demonstrable on the gelatin gel is probably due to activation by the SDS present in the gel (Nagase, 1991; Hurwitz et al., 1993). In our results, the APMA treatment of follicular fluid clearly established the 72 kDa gelatinolytic activity as a proenzyme that can be converted to a smaller and active 64 kDa form. Similarly, the 92 kDa 'latent' form was partially converted to its presumptive activated 81.2 kDa version in the case of granulosa and theca cells obtained during advanced stages of atresia. Hurwitz et al. (1993) have shown that untreated cultured whole ovarian dispersates from immature rats, constitutively elaborated several gelatinolytic enzymes, of which a 72 kDa species was particularly apparent.

Fukumoto et al. (1981), investigating proteolytic activity in the human ovary throughout the ovarian cycle, suggested that collagenase is synthesized in the granulosa cells maximally at preovulation and immediately transported extracellularly, where it is consumed at the site of collagen degradation. In our results, interstitial collagenase

activity of normal follicles was always lower in theca cells. Gelatinase activity was notably higher in theca cells from follicles bigger than 6 mm in diameter, a fact that may be related to the progress of atresia.

Granulosa cells obtained from > 6 mm non-atretic follicles showed low gelatinase activity. This result agrees with those recently reported by Curry et al. (1992). This lack of gelatinase activity in granulosa cells of atretic (or atretic) follicles was proposed to be due either to the presence of high concentrations of enzyme inhibitors or to the absence of enzyme. Our observations, like that of Curry et al. (1992), do not support the latter hypothesis. If low activity is due to the presence of inhibitors, the activity seems to be minimal in normal big oocytes. Of particular interest, however, is the observation that gelatinase activity in granulosa cells from small, < 3 , and 3–6 mm follicles is not uniform. This particular distribution of gelatinase activities, and the behavior is also present in late atretic follicles, may be due to the possible to conclude that granulosa cell production of enzyme is under a complex system of cellular signals to induce enzyme activity. It is convenient to comment that follicles < 3 mm were obtained from follicles in atresia; thus low Pz-peptidase in this group might be due to their atresia and not only to their development stage.

A large literature exists on Pz-peptidase, with numerous reports on the correlations of activity with turnover of connective tissue. An increased Pz-peptidase activity has been reported in granulosa cells of theca activity such as bovine dental follicle, rat granulosa cells of the human cervix in very late pregnancy (Tishler et al., 1993). However Pz-peptidase is not able to activate pro-collagenase. It lacks the ability to digest gelatin (Tishler, 1993). This observation signals towards a primary role of the enzyme in biological processes such as generation and catabolism of enkephalins (Ackerly et al., 1993). This enzyme, repeatedly found to be present in high activity in the tissue matrix turnover, is one that degrades so many other proteins, others, may be of interest.

Endopeptidase 24.15 has been described previously in the homogenates of various tissues, although a minor activity (Barret and Tishler, 1989). It cleaves a number of peptide bonds in bradykinin, luteinizing hormone-releasing hormone, substance P, and generates enkephalins from their precursors. This peptidase cleaves peptide bonds in Angiotensin I and Angiotensin II. Angiotensin I is converted to Angiotensin II (Tishler, 1993).

Recent studies suggest that several intraovarian enzymes, such as activin, epidermal growth factor (Tonetta and Luetjens, 1988), Angiotensin II (Ang II) (Husain et al., 1987), and vasoactive intestinal peptide (Ojeda et al., 1985) are involved in the regulation of follicular development. Many of these

peptidase (Tisljar, 1993), and some other may also function as substrates for this enzyme, but have not been tested, including inhibin, activin and perhaps, epidermal growth factor. It is possible then to propose that the presence of Pz-peptidase in different follicular compartments, implicate an important role for this enzyme in the early stages of follicular growth and differentiation.

In conclusion, ovarian connective tissue remodelling activity consists of a multi-enzyme complex of follicular enzymes and their modifiers. This system must be carefully regulated from the initiation of follicular maturation to the time of the disruption of the follicular wall at ovulation. Modifications on the steady state of this system must participate in the regulation of the processes by which normal maturation and atresia finally conduct to the appropriate number of ovulatory follicles in each animal species.

Acknowledgements

This work was supported in part by Grant # 1474-N 9207 from CONACYT and Grant # 910109002683 from SEP.

References

- Acker, G.R., Molincaux, C. and Orlowski, M., 1987. Synaptosomal membrane-bound form of endopeptidase 24.15 generates Leu-enkephalin from dynorphin 1–8, alpha- and beta-neoendorphin, and Met-enkephalin from Met-enkephalin-Arg6-Gly7-Leu8. *J. Neurochem.*, 48: 284–292.
- Alexander, C.M. and Werb, Z., 1991. Extracellular matrix degradation. In: E.D. Hay (Editor). *Cell Biology of Extracellular Matrix*, Plenum Press, NY, pp. 255–302.
- Ballesteros, L.M., Rosales, A.M., Rusado, A. and Hernández-Pérez, O., 1992. Activity, compartmentation and subcellular distribution of lysosomal enzymes during follicular maturation in the goat. *Anim. Reprod. Sci.*, 27: 129–139.
- Barret, A.J. and Tisljar, U., 1989. The activities of PZ-peptidase and endopeptidase 24.15 are due to a single enzyme. *Biochem. J.*, 261: 1047–1050.
- Brännström, M., Woessner, Jr., J.F., Koos, R.D., Sear, C.H.J. and LeMaire, W.J., 1988. Inhibitors of mammalian tissue collagenase and metalloproteinases suppress ovulation in the perfused rat ovary. *Endocrinology*, 122: 1715–1721.
- Butler, T.A., Zhu, Ch., Mueller, R.A., Mueller, G.C., LeMaire, W.J. and Woessner, Jr., J.F., 1991. Inhibition of ovulation in the perfused rat ovary by the synthetic collagenase inhibitor SC 44463. *Biol. Reprod.*, 44: 1183–1188.
- Curry, Jr., T.E., Dean, D.D., Sanders, S.L., Pedigo, N.G. and Jones, P.B.C., 1989. The role of ovarian proteases and their inhibitors in ovulation. *Steroids*, 54: 501–521.
- Curry, Jr., T.E., Dean, D.D., Woessner, Jr., J.F. and LeMaire, W.J., 1985. The extraction of a tissue collagenase associated with ovulation in the rat. *Biol. Reprod.*, 33: 981–991.
- Curry, Jr., T.E., Mann, J.S., Huang, M.H. and Keeble, S.C., 1992. Gelatinase and proteoglycanase activity during the preovulatory period in the rat. *Biol. Reprod.*, 46: 256–264.
- Curry, Jr., T.E., Mann, J.S., Estes, R.S. and Jones, P.B.C., 1990. 2-Macroglobulin and tissue inhibitor of metalloproteinases: Collagenase inhibitors in human preovulatory ovaries. *Endocrinology*, 127: 63–68.
- Daud, A.I., Bumpus, F.M. and Husain, A., 1993. Characterization of Angiotensin I-Converting enzyme (ACE)-containing follicles in the rat ovary during the estrous cycle and effect of ACE inhibitor on ovulation. *Endocrinology*, 126: 2927–2935.
- Emonard, H. and Grimaud, J.A., 1990. Metalloproteinases. A review. *Cell Tissue Res.*, 169: 515–529.
- Fukunoto, M., Yamada, Y., Okamura, H. and Midorikawa, O., 1976. An ovulatory enzyme system. *Fertil. Steril.*, 26: 7–14.
- Hay, M.E., Giau, D.G. and Moore, R.M., 1976. Structural changes in the follicles. *Cell Tissue Res.*, 169: 515–529.
- Heussen, C. and Dowdle, F.B., 1980. Electrophoretic analysis of matrix metalloproteinases. *J. Biol. Chem.*, 255: 2703–2706.
- Hurwitz, A., Dushnik, M., Salomon, H., Ben-Chetrit, A., Frenkel, E.Y. and Yagel, S., 1993. Cytokine-mediated regulation of matrix metalloproteinases: Interleukin-1 α stimulates the accumulation of a 92-kilodalton gelatinase in rat ovary. *J. Biol. Chem.*, 268: 10000–10004.
- Husain, A., Bumpus, F.M., DeSilva, P. and Speth, R.C., 1990. Identification of Ang II in rat ovaries. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 87: 10000–10004.
- Johnson-Wint, B. and Gross, J., 1980. A quantitative film method for the assay of collagenase. *Anal. Biochem.*, 104: 175–184.
- Lessley, B.A. and Garner, D.L., 1990. Purification and characterization of a metalloproteinase from bovine spermatozoa. *Biol. Reprod.*, 42: 147–151.
- Lipner, H., 1988. Mechanism of mammalian ovulation. In: E. E. Snieszko (Editor). *Ovulation and Fertilization*, Raven Press, NY, pp. 447–487.
- Lowry, O.H., Rosebrough, N.J., Farr, A.L. and Rondel, R.J., 1956. Protein measurement with Folin-Ciocalteu reagent. *J. Biol. Chem.*, 193: 265–275.
- Maekay, A.R., Hartzler, J.L., Pelina, M.D. and Thorgeirsson, S.S., 1992. The matrix metalloproteinases: A review. *J. Cell Physiol.*, 153: 1–10.
- Matrisian, L.M., 1992. The matrix degrading metalloproteinases. *Biochim. Biophys. Acta*, 1064: 97–113.
- Matsas, R., Kenny, A.J. and Turner, A.J., 1984. The metabolism of collagenase. *J. Biol. Chem.*, 259: 10000–10004.
- McNatty, K.P., Henderson, H.K.M., Lun, S., Hurst, P.R., Ellington, D.C., 1984. Some aspects of thecal and granulosa cell function in the ovary. *J. Reprod. Fertil.*, 77: 39–53.
- Moor, R.M., Mary, F.H., Dorr, H.M. and Cran, D.J., 1978. The function of atretic follicles in sheep. *J. Endocrinol.*, 77: 363–370.
- Morales, T.L., Woessner, Jr., J.F., Marsh, J.M. and LeMaire, W.J., 1988. The role of matrix metalloproteinases in the regulation of follicular growth. *Acta. Obstet. Gynecol. Scand.*, 176: 119–122.
- Murdoch, W.J. and McCormick, R.J., 1992. Enhanced degradation of ovulatory follicles. *Am. J. Physiol. (Endocrinol. Metab.)*, 263: E1000–E1004.
- Nagase, H., 1991. Matrix metalloproteinases 1, 2, and 3 substrates. In: Woessner, Jr., J.F. and LeMaire, W.J. (Editors). *The Extracellular Matrix: Biochemistry and Biophysics*, Plenum Press, NY, pp. 28–45.
- Ojeda, S.R., Costa, M.E., Katz, K.H. and Hersh, L.B., 1985. The role of matrix metalloproteinases in the prepubertal rat ovary. I. Biochemical and physiological studies. *J. Biol. Chem.*, 260: 10000–10004.
- Otsuka, K., Sodek, J. and Linnback, H., 1984. Synthesis and function of osteoblast-like cells in culture. *Eur. J. Biochem.*, 145: 123–128.
- Palotie, A., Salo, T., Vihko, K.K., Peltonen, L. and Rajaniemi, J., 1992. Plasminogen activator activities in preovulatory ovarian follicles. *J. Biol. Chem.*, 267: 10000–10004.
- Reich, R., Daphna-Iken, D., Chun, S.Y., Popliker, M., Slager, M., 1992. Preovulatory changes in ovarian expression of collagenase and stromelysin. Role of eicosanoids. *Endocrinology*, 131: 10000–10004.
- Rosales, A.M., Hernández-Pérez, O., Domínguez, R., Mercaderes, M., 1993. Antiproteolytic activities in goat antral follicles. *Anim. Reprod. Sci.*, 27: 129–139.
- Sokal, R.R. and Rohlf, F.J., 1969. *Biometry: The principles and practice of statistics in biological research*. Freeman, San Francisco, CA.
- Tisljar, U. and Barret, A.J., 1989. Purification and characterization of a novel metalloproteinase from the rat ovary. *Biochem. Biophys. Res. Commun.*, 164: 1338–1344.
- Tisljar, U., 1993. Tissue metalloproteinases—A review of a third type of metalloproteinase: Pz-peptidase, endopeptidase 24.15 and endo-oligopeptidase.

- Tonetto, S.A. and DiZerega, G.S., 1989. Intraovarian regulation of follicular maturation. *Endocrin. Rev.*, 10: 205–229.
- Weeks, J.G., Balmé, J. and Woessner, Jr., J.F., 1976. Extraction of collagenase from the involuting rat uterus. *Biochim. Biophys. Acta*, 445: 205–214.
- Woessner, Jr., J.F., Morioka, N., Zhu, Ch., Mukaida, T., Butler, T. and LeMare, W.J., 1989. Connective tissue breakdown in ovulation. *Steroids*, 54, 491–499.

Submission of manuscripts: Manuscripts should be submitted to: *Animal Reproduction Science*, P.O. Box 181, 1000 AD Amsterdam, The Netherlands.

Electronic manuscripts: Electronic manuscripts have the advantage of saving time by rekeying of text, thereby avoiding the possibility of introduction of errors during the delivery of proofs.

For the initial submission of manuscripts for consideration, authors should submit a final and exactly matching printed version. For the production of *accepted papers*, electronic versions are preferred. High density (HD) diskettes (3.5 or 5.25 inch) are acceptable. The native format of the wordprocessor program used should be specified. Further information may be obtained from the Publisher.

Advertising information: Advertising orders and enquiries should be sent to: Elsevier Science Advertising Department, P.O. Box 992, 1000 AA Amsterdam, The Netherlands. **International:** Elsevier Science Advertising Department, Oxford OX5 1GB, UK; Tel. (+44) (0) 1865 843565, Fax (+44) (0) 1865 853333. **USA and Canada:** Weston Media Associates, Danvers, MA 01923, USA; Tel. (+1) (203) 261 2500, Fax (+1) (203) 261 2501. **Japan:** Elsevier Science Japan, Marketing Services, 3-1-1 Higashi-Shinjyuku, Nishi-Shinjyuku-ku, Tokyo 162, Japan; Tel. (+81) 3 5561-5033, Fax (+81) 3 5561-5047.

Enquiries concerning manuscripts and proofs: Enquiries concerning manuscripts and proofs, especially those relating to proofs, should be sent to: Elsevier Science, Mayfield House, 256 Banbury Road, Oxford OX2 0PH, UK; Tel. (+44)(0)1865 3149 90.

Authors in Japan please note: Upon request, Elsevier Science Japan will provide the names of people who can check and improve the English of their manuscripts. For more information, contact our Tokyo office: Elsevier Science Japan, 1-9-15 Higashi-Shinjyuku, Nishi-Shinjyuku-ku, Tokyo 162, Japan; Tel. (+81) 3 5561-5032, Fax (+81) 3 5561-5045.

US mailing info: *Animal Reproduction Science* (0378-4320) is published by Elsevier Science B.V., (Molenwerf 1, Postbus 211, 1000 AE Amsterdam, The Netherlands). **USA POSTMASTER:** Send address changes to: Elsevier Science Inc., 200 Meacham Avenue, Elmont, NY 11003, USA; Tel. (+1) 516 571 1000, Fax (+1) 516 571 1001. Postage paid at Jamaica, NY 11431. **USA POSTMASTER:** Send address changes to: Publications Expediting Inc., 200 Meacham Avenue, Elmont, NY 11003, USA; Tel. (+1) 516 571 1000, Fax (+1) 516 571 1001.

Animal Reproduction Science

For a full and complete Guide for Authors please refer to the *Journal of Animal Reproduction*, Vol. 45, Nos. 1–2, pp. 149–154. The instructions are also available on the World Wide Web: access under <http://www.elsevier.com>.

Copyright © 1997, Elsevier Science B.V. All rights reserved.

The paper used in this publication meets the requirements of the American National Standard for Information Sciences—Permanence of Paper.

Printed in The Netherlands

VOLUMEN 70, ENERO 2002
ISSN-0300-9041

GINECOLOGÍA Y OBSTETRICIA DE MÉXICO

EDITADA POR LA FEDERACIÓN MEXICANA DE GINECOLOGÍA Y OBSTETRICIA

FUNDADA POR LA ASOCIACIÓN MEXICANA DE GINECOLOGÍA Y OBSTETRICIA EN 1945



Contenido

Vol. 70, Enero 2002

1 CARTA A LOS EDITORES

TRABAJOS ORIGINALES

3 Evaluación del Programa de Detección Oportuna del Cáncer Cervicouterino (DOC) en Durango, México

Dra. Esperanza Rosalba Rodríguez-Reyes, Dr. Ricardo M. Cerda-Flores, Dr. Juan M. Quiñones-Pérez, Dra. Elva I. Cortés-Gutiérrez

Se evaluó la cobertura, asiduidad, diagnóstico y seguimiento en el programa de DOC en el estado de Durango, y se encontró que el que se lleva a cabo en Gómez Palacio, Durango presenta una deficiencia de cobertura de 72.04% y una pérdida de seguimiento de 78.84%. Esto sugiere la necesidad de reforzar las actividades de prevención del CaCu a nivel institucional, con el fin de elevar su eficiencia.

7 Cirugía estadificadora con mínima invasión axilar en cáncer de mama El valor del ganglio centinela

Dr. José Francisco Gallegos Hernández

El estudio tuvo como objetivo conocer el valor del GC como predictor de metástasis ganglionares axilares. De 62 pacientes, en 93.5% fue localizado el GC, en 31% hubo metástasis ganglionares, sólo una paciente tuvo GC falsamente negativo, se concluye que el GC predice con alta sensibilidad el estado histológico de los demás ganglios, estadifica adecuadamente a las pacientes y podría evitar más de la mitad de las disecciones de axila.

11 Infección por virus del papiloma humano de alto y bajo riesgo en mujeres con NIC. Características diferenciales

Dr. José Luis González Sánchez, Dr. Jesús Chávez Brambila, Dra. Dulce María Hernández Hernández, Dr. Saúl Martínez Sánchez, Dr. Alejandro García Carranza

El objetivo del presente estudio fue determinar la asociación del virus del papiloma humano de alto riesgo (VPH-AR), y otros factores conocidos con la presencia de neoplasia intraepitelial cervical en dos hospitales del Instituto Mexicano del Seguro Social. Se analizaron 102 casos y 192 controles. La frecuencia de infección por VPH-AR en los casos de NIC I en los controles fue mayor a la informada en otros estudios. El VPH se identificó como el mayor agente asociado a NIC entre otros factores que estuvieron presentes y la edad se presentó como un modificador importante en la asociación de VPH-AR y NIC.

17 Angiogénesis en la fisiología reproductiva. Desarrollo folicular, formación y mantenimiento del cuerpo lúteo

M. en C. Román Espinosa Cervantes, Dr. Adolfo Rosado García

La formación de capilares nuevos, se conoce como angiogénesis la cual está relacionada con reguladores endógenos que la

estimulan e inhiben. En años recientes, la angiogénesis en el ovario que conduce al crecimiento y desarrollo del folículo y el cuerpo lúteo ha sido ampliamente estudiada. Últimamente se han identificado estimuladores e inhibidores endógenos, la liga molecular entre el sistema endocrino y vascular no está completamente entendida. Por esto, es importante la realización de esfuerzos para formular preguntas que necesitan solución.

28 Necesidades educativas en salud perinatal en madres de adolescentes embarazadas

Dr. Eduardo Orígosa Corona, Lic. Ped. Patricia Yolanda Padilla Jasso, Lic. Enf. Rocío López Ortiz

Se presentan los resultados de un estudio transversal, descriptivo de 95 madres de adolescentes embarazadas usuarias del Instituto Nacional de Perinatología a quienes se aplicó una entrevista para conocer formalmente sus necesidades educativas en esta situación, ya que, a pesar de su buena fe o intención, sus consejos, acciones o la información necesaria pueden ser insuficientes o inadecuadas. Se documentó que la edad promedio cuando las madres tuvieron su primer embarazo fue 20 años, la mayoría aceptó no contar con información para brindar apoyo adecuado diversos en la dinámica familiar y mostró buena disposición para asistir a cursos educativos.

36 HACE 55 AÑOS

Fisiopatología del embarazo ectópico

Dr. Genaro Zenteno

Se presenta la transcripción del artículo publicado en el volumen 3 de Ginecología y Obstetricia de México.

48 MENSAJE DE LOS EDITORES

Angiogénesis en la fisiología reproductiva. Desarrollo folicular, formación y mantenimiento del cuerpo lúteo

■ M. en C. Román Espinosa Cervantes,¹ Dr. Adolfo Rosado García,²

■ RESUMEN

El proceso de formación de nuevos capilares sanguíneos a partir de los preexistentes en individuos sanos ha sido estudiado principalmente en el órgano reproductor de las hembras. Esta formación de capilares nuevos, se conoce como angiogénesis, la cual está relacionada con reguladores endógenos que la estimulan e inhiben. El conocimiento del papel de estos estimuladores e inhibidores en condiciones fisiológicas y patológicas acentúan principalmente el papel de VEGF, FGF, angiogenina y angiopoietina; así como de angiostatina y endostatina. En años recientes, ha sido ampliamente estudiada la angiogénesis en el ovario que conduce al crecimiento y desarrollo del folículo y el cuerpo lúteo. Últimamente se han identificado estimuladores e inhibidores endógenos, la liga molecular entre el sistema endocrino y vascular no está completamente entendida. Por esto, es importante la realización de esfuerzos para formular preguntas que necesitan solución.

Palabras clave: angiogénesis, desarrollo folicular, ovario, folículos ováricos, atresia, cuerpo lúteo.

(Espinosa Cervantes, et al. Angiogénesis en la fisiología reproductiva. Desarrollo folicular, formación y mantenimiento del cuerpo lúteo. Ginec Obstet Méx 2002; 70: 17).

■ ABSTRACT

The process of new capillary formations from previously existing mature vessels in healthy individuals has been mainly studied during cycles of the female reproductive tract. This new capillary formation, known as angiogenesis is related to endogenous regulators that both stimulates or inhibits it. Knowledge on the role of both stimulators and inhibitors under physiological and pathological conditions accentuates a main role of VEGF, FGF, angiogenin and angiopoietins among the formers, and main role of angiostatin and endostatin among the later. In recent years, angiogenesis in the ovaries that leads to follicular and luteal growth and development has been extensi-

vely studied. Whether a number of endogenous stimulators and inhibitors have been identified, the molecular link between the endocrine and vascular system is not fully understood. Therefore, efforts to formulate questions that need answers must be made.

Key words: angiogenesis, follicular development, ovary, ovulatory follicles, atresia, corpus luteum.

(Espinosa Cervantes, et al. Reproductive physiology angiogenesis. Follicular development and luteal growth. Ginec Obstet Mex 2002; 70: 17).

■ INTRODUCCIÓN

El término angiogénesis fue propuesto en 1935 para describir la formación de nuevos vasos sanguíneos en la placenta.¹ La formación de nuevos vasos sanguíneos ocurre mediante dos procesos: vasculogénesis y angiogénesis. La vasculogénesis es la diferenciación *in situ* de plexos capilares primarios a partir de células precursoras, conocidas como angioblastos y ocurre primordialmente durante el desarrollo em-

¹Alumno del Doctorado en Ciencias Biológicas. Profesor Titular del Departamento de Producción Agrícola y Animal. Universidad Autónoma Metropolitana Xochimilco. ²Profesor Distinguido. Universidad Autónoma Metropolitana Iztapalapa. Investigador Emérito de Sistema Nacional de Investigadores.

brionario. Este proceso es distinto de la angiogénesis, la cual está caracterizada por el crecimiento capilar de nuevos vasos sanguíneos a partir de los ya existentes.²

El requisito para el crecimiento de nuevos vasos sanguíneos es esencial en todos los órganos en crecimiento y refleja el hecho de que el aporte adecuado de nutrientes y oxígeno sólo puede proporcionarse a los tejidos a una magnitud muy limitada a través de difusión (v. gr. el tejido cartilaginoso). Por consiguiente cada aumento en la masa de los órganos o tejidos debe ser acompañado por un crecimiento adecuado de los vasos sanguíneos. Este hecho implica que en el animal adulto, debido a la escasez de procesos de crecimiento fisiológico y remodelación tisular que se requieren en condiciones normales, la angiogénesis es un proceso excepcional. En efecto, en los tejidos del mamífero adulto la vasculogénesis es un mecanismo excepcional, y la formación y el crecimiento de nuevos capilares a partir de capilares preexistentes (angiogénesis) se realizan normalmente sólo durante la cicatrización de los tejidos, como en heridas y fracturas, y en el órgano reproductor de las hembras, específicamente en el ovario y útero, así como en la placenta durante la gestación y en el tejido mamario durante la lactancia.^{3,4}

Los órganos reproductivos de las hembras adultas exhiben ciclos de crecimiento y regresión periódicos que requieren ser acompañados por cambios cualitativos y cuantitativos en la intensidad del flujo sanguíneo, lo cual justifica que la angiogénesis ocurra durante estos procesos como un fenómeno normal.⁵ Debe tenerse pre-

sente que en el adulto, el crecimiento vascular inapropiado está asociado con varios estados patológicos, tales como el crecimiento de tumores, algunas retinopatías, endometriosis, hemangiomas, fibrosis y artritis reumatoide.⁴

Es importante hacer notar que nuestro conocimiento acerca del proceso de la angiogénesis ha estado desde el principio íntimamente ligado con la fisiología reproductora de las hembras adultas, el primer factor angiogénico fue identificado en el ovario,⁶ el ovario fue uno de los primeros órganos en donde se detectó la presencia del factor de crecimiento del endotelio vascular (VEGF)⁷ y finalmente, ha sido durante la luteólisis en el ovario donde se identificó al primer regulador endógeno del crecimiento vascular, la angiopoietina-2.⁸ Por estos hechos consideramos que la elucidación del papel fisiológico específico que estos procesos desempeñan durante el crecimiento, desarrollo y función del endometrio, del folículo y del cuerpo lúteo llevará finalmente a mejorar el diagnóstico y el tratamiento de algunos procesos patológicos de la mujer adulta y a mejorar los métodos para regular la fertilidad en los mamíferos.

Fisiología de la angiogénesis

El proceso de angiogénesis inicia con la degradación de la membrana basal que rodea los vasos capilares. A través de la discontinuidad generada se produce la migración de células endoteliales que forman una yema vascular que posteriormente se organiza para formar un túbulo cuya maduración histológica termina por constituir un nuevo capilar. La proliferación e interconexión de

los nuevos capilares sanguíneos culmina con la formación de una microcirculación compuesta de arteriolas, venas y capilares.¹ En los casos de angiogénesis normal, los factores de estímulo parecen ser la hipoxia y/o la acidosis tisular que inducen la liberación de factores estimuladores de la angiogénesis. Los tejidos enfermos o dañados producen y liberan factores de crecimiento angiogénicos que se difunden hasta los tejidos cercanos (efecto paracrino).

El proceso de angiogénesis ocurre como una serie de eventos perfectamente regulados:

1. Los factores de crecimiento angiogénico se fijan a receptores específicos localizados en las células del endotelio vascular de vasos sanguíneos preexistentes.
2. La fijación de los factores de crecimiento activa las células endoteliales (CE). Se envían señales desde la superficie celular hasta el núcleo. Las CE producen nuevas moléculas incluyendo enzimas.
3. Las enzimas metaloproteasas disocian la matriz extracelular y la membrana basal que rodea a todos los vasos sanguíneos.² La fragmentación de la lámina basal es mediada por dos grupos de proteasas, las metaloproteasas de la matriz (MMP) y las serinoproteasas. Las MMP degradan al colágeno y otros componentes de la matriz extracelular, el rompimiento del basamento de la membrana,⁹ facilita que las células endoteliales migren de los vasos preexistentes hacia el origen del estímulo angiogénico y proliferen.¹⁰
4. Las células endoteliales se multiplican y emigran hacia los tejidos dañados o enfermos a tra-

- vés de los poros formados en la MEC de los vasos sanguíneos.
5. Moléculas especializadas de la familia de moléculas de adhesión, integrinas ($\alpha\beta3$, $\alpha\beta5$) sirven como anclaje para las CE que forman nuevos vasos (gemación).²
 6. La matriz de metaloproteínas continúa activa remodelando la MEC por donde deben crecer los nuevos vasos, permitiendo su crecimiento y dándole el soporte adecuado.
 7. Las gemas de CE se enrollan para formar nuevos túbulos vasculares.¹ Los capilares recién formados se comunican unos con otros para formar asas por donde pueda circular la sangre.
 8. Finalmente, los capilares neoformados son estabilizados al ser soportados por pericitos (células de tejido muscular liso) que les proporcionan apoyo estructural. La sangre comienza a circular. Los vasos neoformados que no se rodean de pericitos son rápidamente destruidos.
 9. La neovascularización es completada por la formación de capilares y diferenciación de éstos en arteriolas y venas.¹¹
- La angiogénesis es un proceso complejo donde existe un delicado balance entre promotores (factores angiogénicos) e inhibidores (factores antiangiogénicos). La perturbación de este equilibrio puede resultar en una falla del estado fisiológico y conducir a diferentes patologías.¹² Dentro de los promotores primarios de la angiogénesis encontramos los señalados en el cuadro I.¹ Los factores angiogénicos más importantes parecen estar ligados a dos familias de proteínas caracterizadas por su capacidad

Cuadro I

Lista de los factores de crecimiento angiogénicos conocidos

- Angiogenina
- Angiopoietina-1
- Del-1
- Factores de crecimiento fibroblástico: ácido (aFGF) y básico (bFGF)
- Factor estimulador del crecimiento de colonias de granulocitos (G-CSF)
- Factor de crecimiento de los fibroblastos (HGF)
- Factor de crecimiento placentario
- Factor de crecimiento de CE derivado de las plaquetas (PD-ECGF)
- Factor de crecimiento derivado de las plaquetas-BB (PDGF-BB)
- Folistalina
- Interleucina-8 (IL-8)
- Leptina
- Mipona
- Pleiotrofina (PTN)
- Proliferina
- TGF- α
- TGF- β TNF- α
- VEGF/(VPF) factor de crecimiento del endotelio vascular o factor de permeabilidad vascular

de fijar la heparina, éstas son la familia del factor de crecimiento fibroblástico (FGF) y la familia del factor de crecimiento del endotelio vascular (VEGF). Además, los factores que regulan la comunicación intercelular, pueden jugar un papel importante en la coordinación de la interacción entre la vasculatura y el tejido no vascular.⁶

Aunque hasta el momento actual no es posible precisar cuáles de estos factores son específicamente determinantes del funcionamiento del aparato reproductor femenino durante el ciclo reproductor, en un trabajo reciente¹³ se demostró que la inhibición selectiva del VEGF bloquea por completo el proceso de angiogénesis que acompaña a la formación del cuerpo lúteo y sugiere que es este factor de crecimiento el de mayor importancia durante la regulación de estas funciones. El VEGF, también conocido como factor de la permeabilidad vascular (VPF), fue originalmente aislado por su capacidad de estimular la proliferación y migración de células endoteliales microvasculares, así como

por su actividad estimulante de la permeabilidad vascular.⁷

El VEGF tiene tres receptores del tipo de tirosina cinasa que se localizan en las células endoteliales (Flt-1, KDR/Flk-1, y Flt-4), es un potente mitógeno, morfógeno, y quimioatrayente para las células endoteliales. La síntesis y liberación de este factor es estimulado por la hipoxia, por algunas citocinas y por varias hormonas. También parece ser importante la participación de la angiogenina durante la remodelación del tejido ovárico que acompaña al desarrollo folicular.²

Los factores antiangiogénicos específicos (Cuadro II) incluyen a la angiostatina (un fragmento interno del plasminógeno) y a la endostatina (un fragmento de colágeno 18 derivado de una línea celular de tumor humano).¹⁴ Existen también inhibidores no específicos de la angiogénesis. Entre ellos es conveniente mencionar particularmente a los interferones y al factor plaquetario α .³

La angiopoietina-1 (Ang-1),¹⁵ es un factor angiogénico que inter-

Cuadro II

Inhibidores fisiológicos de la angiogénesis

- Angiostatina (fragmento del plasminógeno)
- Antitrombina III antiangiogénica
- Inhibidor derivado del colágeno (CD1)
- Fragmento del factor CD59 del complemento
- Endostatina (fragmento del colágeno XVIII)
- Fragmento de la fibronectina
- Gro-beta
- Heparinasas
- Hexasacárido derivado de la heparina
- hCG
- Interferón α /beta/gamma
- Proteína inducible por el interferón (IP-10)
- Interleucina-12
- Kringle 5 (fragmento del plasminógeno)
- TIMP
- 2-Metoxiestradio
- Inhibidor placentario de la ribonucleasa
- Inhibidor del activador del plasminógeno
- Factor-4 plaquetario (PF4)
- Fragmento 18x0 de la Prolactina
- Proteína relacionada con la proliferina (PRP)
- Retinoides
- Tetrahidrocortisol
- Trombospondina-1 (TSP-1)
- TGF- α
- Vasculostatina
- Vasostatina (fragmento de la calreticulina)

racciona, a semejanza del VEGF, específicamente con las células endoteliales a través del receptor TIE-2. Como el VEGF se ha demostrado que la Ang-1 es esencial para el desarrollo normal de nueva vasculatura. Estudiando los factores que participan en la regulación de la angiogénesis y la vasculogénesis en el desarrollo embrionario,⁸ identificaron la presencia de un factor muy semejante a la Ang-1, que denominaron Ang-2, el cual, sorprendentemente, se comporta como un antagonista natural, tanto de la Ang-1 como del receptor TIE-2. La sobreexpresión transgénica de la Ang-2 produjo la inhibición casi completa de la formación de nuevos vasos sanguíneos en el embrión del ratón. Estudios posteriores han llevado a identificar, hasta este momento, tres diferen-

tes angiopoyetinas en el ratón: Ang-1, -2 y -3 y una más en el humano, la Ang-4. Todas las angiopoyetinas se unen al mismo receptor TIE-2 como un agonista natural (Ang-1 y Ang-4) o como un antagonista natural (Ang-2 y Ang-3).⁸ Otros autores¹⁵ mostraron que la Ang-1 funciona como un factor antiapoptótico en los cultivos de células endoteliales, mientras que su antagonista, la Ang-2, aumenta su actividad durante las fases de regresión de los cultivos.

A diferencia del VEGF, las angiopoyetinas no son mitogénicas, sin embargo, son factores críticos para la angiogénesis tanto durante la etapa embrionaria como durante las etapas de angiogénesis normal, o patológica, en el adulto. Fue propuesto un modelo para describir la interacción de Ang-1, -2

y VEGF durante el desarrollo vascular embrionario.¹⁶ Este autor propone que el VEGF estimula la iniciación de la proliferación y migración de las células endoteliales, además de la formación de tubos capilares. Posteriormente, las Ang-1 y -2 son involucradas en el mantenimiento, renovación y regresión de los vasos. Esto ha sugerido que la Ang-1 induce la formación de nuevos capilares y promueve la supervivencia de las células endoteliales, mientras que la Ang-2 es responsable de la desestructuración de la matriz celular e inhibe la etapa de maduración vascular de la angiogénesis. La Ang-1 parece ser indispensable, junto con el VEGF para la estimulación y migración de células endoteliales.¹⁶

La rapidez con la que el crecimiento y regresión de los tejidos del aparato reproductor en la hembra debe realizarse es extremadamente grande. Por ejemplo, en la vaca el folículo ovulatorio representa menos de 200 mg de tejido y debe formar un cuerpo lúteo maduro con un peso aproximado de 5-6 g en un periodo de 10 días.¹¹ De la misma manera un crecimiento rápido se observa durante el ciclo estral en el tejido endometrial y, sobre todo, durante el desarrollo de la placenta. El rápido crecimiento y regresión del tejido reproductivo de la hembra debe ser acompañado por cambios igualmente rápidos en la tasa de flujo sanguíneo.¹¹ Es conveniente además mencionar que las modificaciones del aparato reproductor de la hembra: crecimiento, diferenciación y regresión, son procesos muy dinámicos que nos ofrecen un modelo único para estudiar la regulación de la angio-



génesis en el animal adulto bajo condiciones normales.

La angiogénesis en los procesos patológicos

En un gran número de enfermedades importantes el organismo parece perder su capacidad de regular el proceso de angiogénesis. Durante estas enfermedades el desarrollo y la formación de nuevos vasos sanguíneos se convierte en un proceso excesivo o insuficiente separado de la cuidadosa supervisión que el organismo ha desarrollado para mantener su homeostasis.

En 1994, la Angiogenesis Foundation decidió considerar a las alteraciones en el proceso de angiogénesis como un factor común en la patogenia de las enfermedades más importantes de la actualidad e identificó al desarrollo de las terapias relacionadas con este proceso como uno de los aspectos más revolucionarios en el esfuerzo médico para la erradicación de algunos de los procesos patológicos más dramáticos e incapacitantes.

Angiogénesis excesiva

Se ha descrito su participación en más de 70 condiciones patológicas, aunque fundamentalmente se menciona su importancia en enfermedades como la ceguera debida a la presencia de diabetes o a la degeneración senil de la retina, el cáncer, la artritis reumatoide y la psoriasis.

- En estas enfermedades la neovascularización no sólo sirve para nutrir los tejidos neoformados, también induce la muerte celular y la degeneración tisular y, en el caso del cáncer, favorece la producción de metástasis debida a la disemi-

nación de células tumorales por vía sanguínea.

- La angiogénesis excesiva se debe habitualmente a la autoestimulación producida por la producción anormal de factores de crecimiento angiogénico por el tejido enfermo mismo. Esta hiperproducción de estimulantes sobrepasa con mucho la presencia de factores inhibidores de la angiogénesis.
- Estos mecanismos de regulación han estimulado el desarrollo, con miras terapéuticas, de factores antiangiogénicos, enfocados a detener el crecimiento vascular anómalo y modificar el desarrollo patológico en estas enfermedades.

Angiogénesis insuficiente

- Se observa sobre todo en las enfermedades de las arterias coronarias, el infarto y el retraso en la cicatrización. Fundamentalmente es debida a una respuesta insuficiente en la producción de factores de crecimiento del endotelio vascular cuando la neovascularización es requerida para la nutrición de los tejidos isquémicos.
- También existe en este momento la tendencia a sustituir terapéuticamente esta deficiencia, mediante el desarrollo de factores angiogénicos que sustituyan o refuercen a los factores angiogénicos fisiológicos.

Angiogénesis y fisiología del ovario

En los primates, durante el ciclo estral, el ovario presenta periodos dinámicos cíclicos de crecimiento y regresión que acompañan los procesos de desarrollo folicular: crecimiento, maduración, ovula-

ción (o atresia) y de crecimiento, mantenimiento y regresión del cuerpo amarillo. Acompañando a estos procesos de crecimiento y remodelación tisular durante el ciclo estral, la angiogénesis y la regresión vascular ocurren también cíclicamente.¹¹

El control preciso de la angiogénesis durante el desarrollo del folículo ovárico y del cuerpo lúteo (CL) es crítico para la función reproductiva normal. Durante el crecimiento, el folículo dominante desarrolla una compleja red vascular en las capas de células de la teca. Estudios *in vivo* e *in vitro* sugieren que, durante la luteinización, las capas de células de la teca y de la granulosa son el sitio predominante de la actividad angiogénica dentro del folículo. Esta localización característica de la actividad angiogénica es consistente con la arquitectura vascular del ovario en donde la capa de células de la teca es abundantemente vascularizada, mientras que la capa de células de la granulosa se mantiene avascular durante la mayor parte del desarrollo folicular, hasta un poco antes de que ocurra la ovulación y la luteinización del folículo. Similarmente, explantes de cuerpo lúteo de diversas especies inducen angiogénesis en una variedad de bioensayos, indicando que el cuerpo lúteo es también un sitio de actividad angiogénica, y la necesidad de VEGF en la angiogénesis del cuerpo lúteo ha sido mostrada.¹³ De hecho, cuantitativamente, la angiogénesis durante el crecimiento del cuerpo lúteo sólo es comparable a la que se observa durante el crecimiento neoplásico.

Fase folicular

Angiogénesis en el desarrollo folicular Los folículos primordiales no

poseen una red vascular propia, la cual puede observarse más tarde en los folículos en desarrollo. En estos últimos, que se presentan después de la pubertad, el desarrollo de una red vascular incipiente puede ser observado en la teca de los folículos preantrales.¹⁷ La densidad de esta red vascular crece con la formación del antro folicular pero se mantiene exclusivamente en la teca, la cual por este motivo ha sido llamada cubierta vascular del folículo.⁴ Esta cubierta vascular está constituida por dos redes vasculares concéntricas en las tecas externa e interna. Los vasos no penetran la membrana basal que separa la teca de la capa de células de la granulosa que permanece avascular. Particularmente el crecimiento de la red de capilares en la teca interna coincide con el periodo de crecimiento rápido y la diferenciación del folículo.¹⁸ Esta observación ha llevado a especular que el establecimiento de una red vascular adecuada en la parte más próxima a la membrana basal que permita la rápida difusión de oxígeno y nutrientes hacia la capa de células de la granulosa es indispensable para el desarrollo folicular normal y puede estar relacionado con el mecanismo de selección del (de los) folículo(s) dominante(s), (p.ej; los folículos que son destinados a ovular). A su vez, el insuficiente desarrollo de esta red vascular interna, sin modificación notable del resto de la circulación tecal, parece actuar como disparador de la atresia de los demás folículos en desarrollo.⁴

La regulación hormonal del desarrollo y la maduración folicular debe estar relacionada con los

procesos angiogénicos. De los factores endocrinos presentes durante estos procesos, los estrógenos parecen tener una acción determinante.⁴ Los estrógenos inducen activamente la angiogénesis *in vivo*. El 17β -estradiol estimula la proliferación y migración de las células endoteliales y promueve, *in vitro*, la formación de tubos capilares no sólo en el tejido ovárico sino en varios otros tipos de tejidos. Por el contrario los antiestrógenos, tanto *in vivo* como *in vitro*, inhiben específicamente la movilidad endotelial inducida por el VEGF y por el FGF-2.⁴

La expresión del VEGF durante el ciclo estral sugiere un papel importante de este factor en el crecimiento y maduración de los folículos antrales y en el desarrollo, mantenimiento y regresión del cuerpo lúteo. En el ovario de los primates, el RNAm del VEGF, y por lo tanto la proteína misma, están ausentes en las células de la granulosa de los folículos primordiales y primarios y presentes en las células de la teca y, ocasionalmente, en las células del *cumulus* que rodean a los ovocitos en los folículos preovulatorios. Durante la foliculogénesis, fundamentalmente durante los estadios preantrales se ha determinado la presencia del VEGF por técnicas de tinción inmunohistoquímica en las tecas.^{7,17} Las células de la teca interna del folículo en desarrollo, se tiñen intensamente con anticuerpos contra el factor de crecimiento del endotelio vascular. Esta tinción es particularmente notable en el folículo dominante. En contraste, la tinción inmunohistoquímica de las células de la granulosa es débil en los folículos pequeños, y se hace notable sólo

en los preovulatorios. Esto sugiere que la secreción paracrina del factor de crecimiento del endotelio vascular por las células de la teca interna y de la granulosa puede ser esencial para la angiogénesis durante las fases finales del desarrollo folicular y necesario probablemente en preparación para la luteogénesis.³

En folículos atrésicos el factor de crecimiento del endotelio vascular no es observable ni en las células de la granulosa ni en las células de la teca. Durante el crecimiento folicular, el folículo dominante desarrolla un complejo vascular de redes infiltrado en la capa de la teca.¹³

Debe señalarse que en los últimos años se ha demostrado que las células de la granulosa son las que activamente producen VEGF durante el desarrollo folicular inducido por la aplicación de gonadotropinas,¹⁹ mientras que la producción de este factor de crecimiento por las células de la teca no se modifica por el estímulo de estas hormonas. Estos autores han demostrado que, durante el desarrollo folicular, las células de la granulosa son los mayores productores de VEGF lo cual puede demostrarse tanto por la determinación del RNAm encargado de codificar su producción, como por la determinación directa de la síntesis *in vitro* de este factor. Es posible que la síntesis de VEGF en las células de la teca parezca inferior debido a que es fácilmente arrastrado por la circulación, mientras que el producido por las células de la granulosa tiende a acumularse en el líquido folicular. También es posible aceptar que el VEGF producido en el interior del folículo bajo la acción de las gonadotropinas sea utilizado, sobre todo en las fases finales

del crecimiento folicular, como un factor paracrino que difunde a través de la membrana basal del folículo para estimular, en las tecas, la formación de las capas vasculares internas, próximas a la membrana basal, que parecen ser determinantes en la fisiología folicular.¹⁸⁻²⁰ Un hecho que apoya esta última posibilidad es que la presencia de receptores a FSH es particularmente notable en las células de la granulosa en este tipo de folículos.

En apoyo a estas especulaciones se ha observado que los folículos preovulatorios en los monos parecen tener concentraciones similares de sitios de unión-gonadotropina en las células de la granulosa, sin embargo, sólo los folículos destinados para ovular se marcaron después de la inyección intravenosa de gonadotropina marcada.²¹ Estos hallazgos son consistentes con la observación de que en el folículo dominante se produce un incremento importante en la red vascular más próxima a la membrana basal que parecería depender de la difusión de VEGF a partir de la granulosa. La escasa formación, o la desaparición de esta red vascular interna es uno de los signos más tempranos de atresia folicular.¹⁹ Estos informes nos permitirían concluir que el suministro vascular tiene un papel crítico no sólo en la selección del folículo dominante destinado a la ovulación, sino también de los folículos que deberán terminar su desarrollo en la atresia. Debe dejarse bien claro que en el momento actual ninguno de los cambios vasculares y/o endocrinológicos conocidos puede considerarse, todavía, como el mecanismo molecular preciso que conduce a la selección del folículo dominante.⁴ Todos es-

tos hallazgos pueden correlacionarse con los resultados recientemente publicados,²⁰ sugiriendo que el VEGF tiene un papel importante en la regulación del pO₂ intrafolicular y a través de este parámetro en la determinación del desarrollo folicular y, tal vez, en el establecimiento del (de los) folículo(s) dominante(s).

Fase lútea

Se ha estimado que más de 85% de las células proliferativas presentes durante el desarrollo del cuerpo lúteo son células endoteliales.¹¹ Estudios morfométricos han confirmado que las células endoteliales constituyen aproximadamente 50% de las células en el cuerpo lúteo maduro.²² En varias especies de mamíferos, entre ellas el humano, se ha demostrado que la formación del cuerpo lúteo, después de la ovulación, está acompañada de un incremento notable del número de células endoteliales del folículo roto.²³ También se ha encontrado que la mayoría de células parenquimatosas (esteroidogénicas) están adyacentes a uno o más vasos capilares.²⁴ El cuerpo lúteo maduro requiere recibir, para su funcionamiento normal, un aporte creciente de sangre ovárica y se ha propuesto que la secreción de progesterona está altamente correlacionada con el flujo sanguíneo del ovario.¹¹ Por otro lado, una inadecuada función lútea ha sido asociada con un decremento de la vascularización.²⁵ Diversos investigadores han sugerido que la regulación del flujo sanguíneo del ovario tiene un papel de mayor importancia en la regresión o, en su caso, del mantenimiento del cuerpo lúteo durante el embarazo.¹¹ En el cuerpo lúteo, se ha demostrado que el factor de creci-

miento del endotelio vascular es esencial para inducir la angiogénesis requerida para su desarrollo.²⁶

Se ha identificado una correlación positiva entre el factor de crecimiento del endotelio vascular folicular y la progesterona folicular, así como también de los niveles de la hormona luteinizante (LH). Estos hallazgos sugieren que la concentración del factor de crecimiento del endotelio vascular en el líquido folicular del ovario humano está correlacionado con la luteinización durante el desarrollo del folículo.²⁷

Durante la ovulación se produce el rompimiento de la membrana basal que separa las capas de células de la teca y de la granulosa. Esto coincide con un marcado incremento de la angiogénesis que ocurre de una forma centripeta desde la teca hacia el interior del folículo roto. Esta etapa predominante de actividad angiogénica que comprende, tanto la capa de células de la teca como la capa de células de la granulosa luteinizadas, inicia y mantiene la luteinización folicular.³

En contraste, el factor de crecimiento del endotelio vascular que está presente en la capa de células de granulosa es mínimo. Utilizando la determinación de la densidad vascular con tinciones inmunohistoquímicas para CD34,¹⁷ concluyen que la angiogénesis en el ovario es un requisito para los estados tempranos de la foliculogénesis y el crecimiento lúteo y que la disminución de la concentración del VEGF tiene una función importante en la atresia folicular y la regresión del cuerpo lúteo.

Existen dos formas del factor de crecimiento fibroblástico (FGF): el (FGF) ácido y el (FGF) básico. Am-

bos son promotores angiogénicos y podrían ser importantes en el desarrollo folicular y la formación del cuerpo lúteo.⁶ Sin embargo, no se ha confirmado una correlación entre la proliferación de células del endotelio vascular y la inmunolocalización del factor de crecimiento fibroblástico básico. De mayor importancia es el hecho de que el factor de crecimiento fibroblástico básico es fuertemente expresado en células de la teca luteinizadas de folículos atrésicos en donde la angiogénesis es mínima.¹¹

Es posible que la acción de bFGF sea controlada por el número de células endoteliales y en consecuencia por la expresión de los receptores al FGF en general.²⁸ Los receptores al FGF-2 parecen expresarse en los capilares largos del tejido lúteo de los ovinos durante la fase lútea tardía, mientras que los receptores al FGF-1 están presentes en la microvasculatura lútea a todo lo largo del ciclo lútea.²⁹ Así, se ha hipotetizado que el FGF podría mantener la red vascular, para evitar la reabsorción demasiado rápida del cuerpo lúteo en regresión.

Es importante considerar que un balance entre (VEGF) y el factor estabilizador (Ang-1) contra el desestabilizador (Ang-2) podría tener un papel importante en la formación y/o regresión de los capilares durante el desarrollo, mantenimiento y regresión del cuerpo lúteo durante el ciclo ovárico.¹⁶ Recientemente, se han determinado las modificaciones del RNAm de las Ang-1 y -2 en el ovario de primates y no primates.⁵ En el ratón, y en el humano adulto, la Ang-2 se expresa únicamente en sitios en que se realiza remodelación vascular. Según algunos au-

tores,⁵ el hecho de que se expresen al mismo tiempo agonistas y antagonistas del receptor TIE-2 es difícil de justificar y enfatizan la necesidad de un sistema exquisito de regulación del sistema de equilibrio angiogénico durante el funcionamiento del esquema reproductor en la hembra. Los resultados encontrados acerca de la expresión temporal de los mensajeros encargados de la síntesis del VEGF contra las Ang-1 y -2 durante la fisiología del cuerpo lúteo son consistentes con el modelo propuesto en el párrafo anterior. Sin embargo, estudios adicionales son necesarios para definir con precisión la importancia del sistema receptor-Ang en el control de la función-estructura del folículo ovárico y del cuerpo lúteo. También es necesario precisar el papel de otros factores angiogénicos endógenos (p.ej; angiogenina)²² y de factores antiangiogénicos (p.ej; angiostatina y endostatina) en estos procesos.¹

Hipoxia

Generalmente se piensa que la disminución de la concentración de oxígeno local (hipoxia) es una causa principal de angiogénesis en los tejidos en estado normal o patológicos. El VEGF es un factor inducido por la hipoxia, la cual provoca un incremento en la expresión del RNAm de este factor en regiones hipóxicas de tumores. Evidencias recientes sugieren que la expresión de Angiopietina-2 también es inducida por la hipoxia. En cambio la regulación y expresión de Angiopietina-1 es inhibida por la hipoxia en pequeños sistemas de cultivo celular.³⁰

En la actualidad la investigación está dirigida a los efectos del

estrés hipóxico en la regulación de los factores angiogénicos en folículos preovulatorios, con un enfoque específico en el desarrollo potencial de los ovocitos.^{20,31} Se ha señalado que folículos con un alto contenido de oxígeno disuelto también contienen baja concentración de VEGF en el líquido folicular. Los ovocitos obtenidos de estos folículos bien oxigenados exhiben mejores tasas de fertilización y desarrollo embrionario que los ovocitos de folículos severamente hipóxicos.³⁰ En contraste, la presencia de niveles elevados de VEGF en líquido folicular son asociados con hipoxia y se acompañan de una pobre respuesta ovárica y bajas tasas de gestación.^{19,32} Estos estudios que relacionan la tensión de oxígeno con la expresión de VEGF presentan una posibilidad de que los niveles de VEGF en el líquido folicular puedan ser usados como un marcador de hipoxia folicular para predecir la calidad de los ovocitos y por consecuencia las posibilidades de éxito en los procedimientos de reproducción animal asistida.³¹ Se ha propuesto también que la hipoxia folicular puede tener una influencia adversa en la organización del huso y la normalidad de la segregación cromosómica durante la segmentación del ovocito fertilizado.²⁰

Factores locales y endocrinos

Diferente a lo que ocurre en muchos otros tejidos, las hormonas gonadotrópicas, sobre todo la hormona luteinizante (LH), parecer ser los reguladores más importantes de la angiogénesis en el ovario. En la actualidad muchas investigaciones se han enfocado a eventos asociados con la ovulación.¹⁷ Especialmente sobre la neovascu-

vascularización de la capa de células de la granulosa que ocurre durante la luteinización en respuesta al pico de secreción de la LH. Se ha observado que la LH/hCG estimula la producción de bFGF y de Ang-1, y la expresión del RNAm de la Ang-2 y del VEGF en células de la granulosa de varias especies de animales. Además, se ha demostrado una correlación positiva entre los niveles de LH en el suero y la concentración de VEGF folicular en folículos humanos en desarrollo.

La luteinización de las células de la granulosa por el estímulo LH al momento de la ovulación incrementa la producción de VEGF, lo cual es consistente con el papel del VEGF en los procesos angiogénicos dentro del cuerpo lúteo de los primates. Es importante, mencionar que la regulación de LH en la producción de VEGF, no finaliza con la ovulación. Un grupo de investigadores⁷ administraron antagonistas de GnRH a monos en la mitad de la fase lútea y observaron que la supresión del pico de LH reduce la expresión de VEGF en el cuerpo lúteo. Es necesario también determinar si la acción de LH es crítica para la vascularización de la teca en el desarrollo del folículo antral y si el rescate del cuerpo lúteo por la gonadotropina coriónica (GC) al inicio de la gestación involucra acción de la vasculatura lútea. Con esto, se podría especular que el descenso en la expresión de VEGF en la fase lútea tardía del ciclo menstrual es debido a la reducción la sensibilidad del cuerpo lúteo a la LH, por lo que se piensa que sea un factor crítico en la luteólisis.⁷

La propuesta de que la LH funciona a través de la inducción de

la síntesis de factores angiogénicos en los tejidos luteales ha sido sustentada⁷ en sus estudios sobre la participación de la angiogenina como un factor de la mayor importancia en la fisiología ovárica particularmente durante la formación y el desarrollo del cuerpo lúteo. La angiogenina es un factor angiogénico potente que fue aislado originalmente de células de adenocarcinoma humano mantenidas en cultivo. La determinación del RNAm de esta proteína en las células ováricas ha demostrado que su síntesis se incrementa notablemente en las últimas fases del desarrollo folicular y se hace particularmente intensa en las fases tempranas de la formación del cuerpo lúteo, aparentemente bajo la estimulación de la LH. La disminución de la concentración del RNAm de la angiogenina es una de las evidencias más tempranas de la regresión del cuerpo amarillo.⁷

Patología

Alteraciones en la regulación de la angiogénesis ovárica han sido específicamente relacionadas con varios procesos patológicos que afectan a la hembra en general y a la mujer en lo particular. Estos aspectos fisiopatológicos acompañados de las implicaciones terapéuticas que originan, constituyen una de las orientaciones más fascinantes de la investigación acerca de la importancia de los procesos angiogénicos en la función reproductiva.¹⁵

Una de las causas más frecuentes de esterilidad anovulatoria es el síndrome de ovario poliquístico (SOP) el cual se caracteriza morfológicamente por el aumento en el tamaño del ovario producido por

la presencia en la periferia del ovario de numerosos folículos antrales (< 10 mm de diámetro en la mujer) que no llegan a la ovulación y cuya apariencia le da el nombre a la enfermedad. Recientemente algunos hallazgos experimentales han permitido relacionar este síndrome con alteraciones en el proceso de la angiogénesis: a) la concentración del RNAm del VEGF, así como la actividad de este factor de crecimiento, se encuentran extraordinariamente elevadas en la zona de las tecas, en el líquido folicular y frecuentemente también en las células de la granulosa de los folículos antrales, b) la concentración sérica de este mismo factor se elevó anormalmente durante la estimulación con gonadotropinas, c) la utilización de agentes antiangiogénesis contribuye significativamente al tratamiento de este padecimiento.¹²

La participación del VEGF en el desarrollo de ovario poliquístico ha llevado a los investigadores a considerar que el VEGF participa de una manera muy importante en el llamado síndrome de hiperestimulación ovárica, el cual se manifiesta sobre todo en las mujeres bajo tratamiento hormonal para inducir la ovulación y se caracteriza por una acumulación masiva de trasudado extravascular, acompañado de disminución del volumen vascular y hemoconcentración. En efecto, se ha encontrado que la actividad de VEGF se encuentra muy elevada en el suero y en el líquido folicular de estas pacientes y que el tratamiento con anticuerpos anti-VEGF revierte la acumulación de trasudado y la hemoconcentración.¹³

La presencia de cantidades importantes de VEGF en las células

epiteliales de cistoadenomas serosos, encontrados frecuentemente en los ovarios de mujeres posmenopáusicas, y en los pericitos hiliares del ovario en los quistes de células epiteliales de estas mismas pacientes, ha sugerido a los investigadores la posibilidad de que la actividad estimuladora de la permeabilidad vascular del VEGF sea la causante de la acumulación de líquido en estas pacientes.³

El cáncer del ovario se acompaña frecuentemente de la formación de ascitis. Como sabemos que el VEGF juega un papel primordial en la regulación de la permeabilidad vascular y que la concentración de VEGF se encuentra aumentada durante el crecimiento del tejido neoplásico, la producción de ascitis se ha relacionado con la actividad estimuladora de la permeabilidad capilar del VEGF producido primordialmente en las células epiteliales del tejido neoplásico. Basados en estos hechos,³⁴ encontraron que la utilización combinada de anticuerpos anti-VEGF con un medicamento

antiangiogénico produjo la regresión completa del estado ascítico y una mejoría notable en la sintomatología de las pacientes.

El funcionamiento inadecuado del cuerpo lúteo, acompañado de insuficiente producción de progesterona o regresión prematura del cuerpo amarillo, constituye una causa importante de infertilidad en la mujer que puede acompañarse frecuentemente de embarazos ectópicos o abortos espontáneos. Este síndrome de insuficiencia luteal ha sido relacionado con defectos en la angiogénesis necesaria para el desarrollo y mantenimiento del cuerpo amarillo normal.⁴ Sin embargo, hasta ahora no se han realizado los experimentos clínicos necesarios para sostener esta hipótesis.

■ CONCLUSIONES

Es claro que por el momento ninguno de los cambios vasculares y/o endocrinológicos conocidos puede considerarse todavía como el mecanismo molecular preciso que conduce a la selección del folículo

dominante. Todos estos hallazgos pueden correlacionarse con los resultados publicados, sugiriendo que el VEGF tiene un papel importante en la regulación del pO₂ intrafolicular y, a través de este parámetro, en la determinación del desarrollo folicular y tal vez, en el establecimiento del (de los) folículo(s) dominante(s). El hecho de que se expresen al mismo tiempo agonistas y antagonistas del receptor TIE-2 es difícil de justificar y enfatiza la necesidad de un sistema exquisito de regulación del sistema de equilibrio angiogénico durante el funcionamiento del esquema reproductor en la hembra. Sin embargo, estudios adicionales son necesarios para definir con precisión la importancia del sistema receptor-Ang en el control de la función estructural del folículo ovárico y del cuerpo lúteo. También es necesario precisar el papel de otros factores angiogénicos endógenos (e.g. angiogenina) y de factores antiangiogénicos (e.g. angiostatina y endostatina) en estos procesos. ■

■ REFERENCIAS

1. Folkman J, Klagsbrun M. Angiogenic factors. *Science* 1987; 235: 442-7.
2. Klagsbrun M, Moses MA. Molecular angiogenesis. *Chem Biol* 1999; 6(8): 217-24.
3. Gordon JD, Mesiano S, Zaloudek CJ. Vascular endothelial factor localization in human ovary and fallopian tubes: possible role in reproductive function and ovary cyst formation. *J Endocrin Metabol* 1996; 51: 333-9.
4. Augustin HG. Vascular morphogenesis in the ovary. *Bailliere's Clin Obstet Gynecol* 2000; 14: 867-82.
5. Hazzard TM, Christenson LK, Stauffer RL. Changes in expression of vascular endothelial growth factor (VEGF) and angiopoietin-1 (Ang-1) in the primate corpus luteum (CL) during the menstrual cycle. *Biol Reprod* 1999; 60(supplement 1): 279.
6. Gospodarowicz D, Cheng J, Lui G.M, Bohlen P. Corpus luteum angiogenic factor is related to fibroblast growth factor. *Endocrinology* 1985; 117: 2283-91.
7. Ravindranath N, Little-Ihrig L, Phillips HS. Vascular endothelial factor messenger ribonucleic acid expression in the primate ovary. *Endocrinology* 1992; 131: 254-60.
8. Maisonpierre PC, Suri C, Jones PF, Barankova S, Wiegand SJ, Radziejewski C, Compton D, McClain J, Aldrich T H, Papadopoulos N, Daly TJ, Davis S, Sato TN, Yancopoulos GD. Angiopoietin-2, a natural antagonist for Tie2 that disrupts in vivo angiogenesis. *Science* 1997; 277: 55-60.
9. García R, Ballesteros LM, Hernández-Pérez O, Rosales AM, Espinosa CR, Soto H, Díaz de León L, Rosado A. Metalloproteinase activity during growth, maturation and atresia in the ovarian follicles of the goats. *Animal Reproduction Science* 1997; 47: 211-28.

10. Moses MA. The regulation of neovascularization by matrix metalloproteinases and their inhibitors. *Stem Cells* 1997; 15: 180-9.
11. Reynolds LP, Killilea SD, Grazul-Bilska AT, Redmer DA. Mitogenic factors of corpora lútea. *Prog Growth Factor Res* 1994; 5: 159-75.
12. Abulafia O, Sherer DM. Angiogenesis of the ovary. *Am J Obstet Gynecol* 2000; 182: 240-6.
13. Ferrara N, Chen H, Davis-Smyth T. Vascular endothelial growth factor is essential for corpus luteum angiogenesis. *Nature Med* 1998; 4: 336-40.
14. O'Reilly MS, Boehm T, Shing Y, Fukai N, Vasios G, Lane WS. Endostatin: An Endogenous Inhibitor of Angiogenesis and Tumor Growth. *Cell* 1997; 88: 277-85.
15. Holash J, Maisonpierre PC, Compton D, Boland P, Alexander CR, Zagzag D, Yancopoulos G, D, Wiegand SJ. Vessel cooption, regression, and growth in tumors mediated by angiopoietins and VEGF. *Science* 1999; 284: 1994-8.
16. Hanahan D. Signaling vascular morphogenesis and maintenance. *Science* 1997; 277: 48-50.
17. Suzuki T, Sasano H, Takaya R, Fukaya T, Yajima A, Nagura H. Cyclic changes of vasculature and vascular phenotypes in normal human ovaries. *Hum Reprod* 1998; 13: 953-9.
18. Richards JS. Maturation of ovarian follicles: actions and interactions of pituitary and ovarian hormones on follicular cell differentiation. *Physiol Rev* 1980; 60: 51-89.
19. Barboni B, Turriani M, Galeati G, Spinaci M, Baci ML, Formi M, Matnoli M. Vascular endothelial growth factor production in growing pig antral follicles. *Biol Reprod* 2000; 63: 858-64.
20. Van Blerkom J, Antczak M, Schrader R. The developmental potential of human oocyte is related to the dissolved oxygen content of follicular fluid: association with vascular endothelial growth factor levels and perifollicular blood flow characteristics. *Human Reprod* 1997; 12: 1047-55.
21. Zeleznik AJ, Schuler HM, Reichert LE. Gonadotropin-binding sites in the rhesus monkey ovary: role of the vasculature in the selective distribution of human chorionic gonadotropin to the preovulatory follicle. *Endocrinology* 1981; 109: 356-62.
22. Lee HS, Kang TC. Angiogenin is involved in morphological changes and angiogenesis in the ovary. *Biochem Biophys Res Comm* 1999; 257: 182-6.
23. Wulff C, Wilson H, Lague P, Colin-Duncan W, Armstrong DG, Fraser HM. Angiogenesis in the human corpus luteum: Localization and changes in angiopoietins, Tie-2, and VEGF messenger RNA. *J Clin Endocrinology* 2000; 85: 4302-9.
24. Dharmarajan AM, Bruce NW, Mayer GT. Quantitative ultrastructural characteristic relating to transport between luteal cell cytoplasm and blood in the corpus luteum of the pregnant rat. *Am J Anat* 1985; 172: 87-9.
25. Jones GS, Mattezzoli RD, Strott CA, Ross GT, Kaplan C. Pathophysiology of reproductive after clomiphene-induced ovulation. *Am J Obstet Gynecol* 1970; 105: 847-67.
26. Phillips HS, Hains J, Leung DW, Ferrara N. Vascular endothelial growth factors is expressed in rat corpus luteum. *Endocrinology* 1990; 127: 965-7.
27. Anasti JN, Kalantaridou SN, Kimzey LM, George M, Nelson LM. Human follicle fluid vascular endothelial growth factor concentrations are correlated with luteinization in spontaneously developing follicles. *Hum Reprod* 1996; 13: 1144-7.
28. Christenson LK, Stouffer RL. Follicle-stimulating hormone and luteinizing hormone/chorionic gonadotropin stimulation of vascular endothelial factor production by macaque granulosa cells from pre and perovulatory follicles. *J Clin Endocrinol Metab* 1997; 82: 2135-42.
29. Doriaswamy V, Knutson DL, Grazul-Bilska AT. Fibroblast growth factor receptor (FGFR)-1 and -2 in the ovine corpus luteum throughout the estrous cycle. *Growth Factors* 1998; 16: 125-35.
30. Enholm B, Paavonen K, Ristimäki A. Comparison of VEGF, VEGF-B, VEGF-C and Ang-1 RNAm regulation by serum, growth factors, oncoproteins and hypoxia. *Oncogene* 1997; 14: 2475-85.
31. Barroso G, Barrionuevo M, Rao P. Vascular endothelial growth factor, nitric oxide and leptin follicular fluid levels correlate negatively with embryo quality in IVF patients. *Fertil Steril* 1999; 72: 1024-26.
32. Battaglia C, Genazzani AD, Regnani G, Primavera MR, Petraglia F, Volpe A. Perifollicular Doppler flow and follicular fluid vascular endothelial growth factor concentrations in poor responders. *Fertil Steril* 2000; 74(4): 809-12.
33. Levin ER, Rosen GF, Cassidenti DL, Yee B, Meldrum D, Wisot A. Role of vascular endothelial cell growth factor in ovarian hyperstimulation syndrome. *J Clin Invest* 1998; 102: 1978-85.
34. Brown MR, Blanchette JO, Kohn EC. Angiogenesis in ovarian cancer. *Bailliere's Clin Obstet Gynecol* 2000; 14: 901-18.