

# 2

José Carlos Rosales  
Aramilena Prado  
María Isabel Camejo

## OOGÉNESIS Y FOLICULOGÉNESIS

	Pág.
ASPECTOS GENERALES .....	37
OOGÉNESIS.....	37
APARICIÓN Y MIGRACIÓN DE LAS CÉLULAS GERMINALES .....	37
DIFERENCIACIÓN Y DESARROLLO DE LAS CÉLULAS GERMINALES .....	39
MEIOSIS DEL OOCITO .....	39
Profase de la primera división meiótica .....	42
Segunda división meiótica .....	44
REGULACIÓN DE LA MEIOSIS EN EL OOCITO .....	44
CAMBIOS CITOLÓGICOS Y BIOQUÍMICOS DURANTE LA OOGÉNESIS .....	46
Crecimiento del óvulo .....	46
Zona pelúcida .....	47
Reducción del número de células germinales .....	47
FOLICULOGÉNESIS .....	48
ESTRUCTURA DE LOS FOLÍCULOS .....	48
FACTORES QUE CONTROLAN EL DESARROLLO FOLICULAR.....	50
Reclutamiento inicial .....	51
Reclutamiento cíclico .....	51
SELECCIÓN DEL FOLÍCULO DOMINANTE .....	52
Regulación endocrina .....	52
Regulación intraovárica .....	53
MADURACIÓN IN VITRO DE FOLÍCULOS OVÁRICOS .....	53
RESUMEN .....	54
REFERENCIAS .....	54





## ASPECTOS GENERALES

La oogénesis y la foliculogénesis son procesos que ocurren simultáneamente en el ovario, y la progresión de ambos eventos debe acontecer de forma coordinada para lograr el desarrollo de un oocito y su expulsión en el proceso de ovulación.

En este capítulo se analizarán estos dos procesos por separado, con fines didácticos, pero se debe tener siempre en cuenta que son procesos simultáneos, con características definidas, que ocurren en el ovario del mamífero durante la vida prenatal, niñez, edad reproductiva y postmenopausia.

## OOGÉNESIS

La oogénesis consiste en una complicada serie de cambios bioquímicos, genéticos y estructurales de la célula germinal, que se inician en estadios muy tempranos del desarrollo embrionario y pueden terminar años después, en hembras sexualmente maduras (Wassarman and Albertini, 1994).

La transformación de la célula germinal no sólo involucra la preparación del núcleo celular con el fin de contribuir a la conformación del genoma del embrión, sino también modificaciones en su citoplasma que permiten que el cigoto herede del oocito macromoléculas y organelos que soportan sus requerimientos energéticos y de regulación.

La oogénesis se puede dividir en las siguientes etapas (Vendrell and Tarín, 2001):

- La aparición y migración de las células germinales primordiales hacia el ovario en formación, durante el desarrollo embrionario.
- El crecimiento y diferenciación de las células germinales dentro del ovario.
- La meiosis y adquisición de la capacidad de ser fecundado.

## APARICIÓN Y MIGRACIÓN DE LAS CÉLULAS GERMINALES

En el embrión masculino o femenino, la aparición y migración de las células primordiales germinales es idéntica; asimismo, las gónadas en formación son indiferentes en embriones masculinos o femeninos desde la semana 5 hasta la semana 7 del desarrollo (tabla 2-1). Los oocitos y los espermatozoides se originan de un pequeño número de células madre o «stem cells»,

que son células primordiales germinales de origen extragonadal (Buccione et al., 1990; Clark and Eddy, 1975).

Las células germinales primordiales de mamíferos constituyen una masa de células diploides caracterizadas por su gran tamaño (aproximadamente 12µm), forma redondeada, núcleo esférico y la presencia de gránulos de glucógeno y numerosas gotas de lípidos; además presentan un elevado contenido de actividad de fosfatasa alcalina (Motta et al., 1997). Estas células aparecen en el ser humano durante los días 20 a 21 de gestación en el endodermo del saco vitelino, cerca del alantoides en desarrollo. Los detalles del mecanismo que rige esta migración no se conocen totalmente, pero se sabe que durante su recorrido existe una estrecha interacción entre las células germinales y las somáticas, que se manifiesta porque las señales de las células somáticas controlan la proliferación y desplazamiento de la célula germinal e impiden que sobreviva en lugares ectópicos.

Las células germinales se desplazan por el epitelio endodérmico del intestino posterior, que es el mesenterio dorsal, hacia las gónadas en formación (Witschi, 1948). En un principio, la migración es pasiva pues depende del movimiento de los tejidos adyacentes; pero luego las células germinales adquieren movimiento ameboide que responde a mecanismos modulados por la producción local de citoquinas. En este momento, el control de la proliferación celular parece estar regulado por el factor de crecimiento TGF-β y la activina (Schilling and Yeh, 1999; Richards et al., 1999). Otras moléculas involucradas en el fenómeno de migración son la interleucina 4, el factor de crecimiento de fibroblastos y el factor-α de necrosis tumoral (Morita and Tilly, 1999).

Un sistema ligando-receptor indispensable para la colonización completa del epitelio gonadal es el receptor c-kit, que se expresa en la membrana de las células germinales primordiales (Driancourt et al., 2000). Mientras que el ligando de este receptor, el factor de células madre, o «stem cell factor», se expresa en la cresta genital y en los tejidos por los que atraviesa la célula germinal en migración (Matsui et al., 1990).

Es muy interesante que tanto los mecanismos implicados en la migración de las células germinales hacia la gónada primitiva, como la relación de atracción y repulsión de las células germinales con las células somáticas de los tejidos por los que se desplazan y su



movimiento ameboide, están altamente conservados en la evolución, ya que presentan similitudes en especies tan divergentes filogenéticamente como *Xenopus* (rana), *Drosophila melanogaster* (mosca de la fruta), *Caenorhabditis elegans* (un nemátodo hermafrodita) (Ikenishi and Germ, 1998) o el ratón (*Mus musculus*) (Matova and Cooley, 2001). Sin embargo, a diferencia

de las especies animales inferiores, en mamíferos no se ha podido demostrar la presencia en el citoplasma del oocito de un determinante de la línea germinal, esto es, un área especializada del citoplasma del huevo que sea segregado exclusivamente a las blastómeras que darán origen a las células germinales primordiales del embrión (Matova and Cooley, 2001).

Tabla 2-1. Cronología de la diferenciación celular.

Edad de concepción	Evento
32 días	Se desarrolla la gónada primordial a los 32 días de la fertilización. Crecen los conductos femeninos de Wolf. Comienza la diferenciación de las células primordiales.
37 días	Las células primordiales alcanzan el canto gonadal. Diferenciación de los conductos masculinos de Müller.
42-50 días	Diferenciación del conducto seminífero.
55-60 días	Diferenciación de las células de Leydig. La parte craneal del conducto masculino de Müller comienza su regresión.
9 semanas	Las células de Leydig comienzan la producción de testosterona. Comienza la masculinización del seno urogenital y los genitales externos.
10 semanas	Comienza la degeneración de los conductos femeninos de Wolf. Los conductos masculinos de Müller desaparecen. Aparecen las estructuras que van a formar la próstata.
12 semanas	Se forma el cordón vaginal. Aparecen los folículos primordiales. Se desarrollan las vesículas seminales. Los testículos alcanzan el anillo inguinal.
14 semanas	Se completa la organogénesis uretral masculina.
16 semanas	Aparecen los folículos primordiales.
20 semanas	Formación del utrículo prostático.
22 semanas	La vagina alcanza el periné.
24 semanas	Aparecen los folículos de Graaf.
27-30 semanas	Descenso del testículo al saco escrotal.

La primera evidencia de la formación de las gónadas ocurre hacia la semana 5 del desarrollo, cuando aparece una ligera hipertrofia del epitelio celómico, que será el futuro peritoneo y que cubre el mesonefros. Estos engrosamientos bilaterales se llaman pliegues o crestas genitales y darán origen a las gónadas, aunque en su parte superior se condensarán para formar la corteza de las glándulas suprarrenales (Witschi et al., 1953). Las células germinales primordiales llegan a la cresta genital entre las semanas 5 y 6 de desarrollo del embrión; a partir de este momento se denominan oogonias, continúan su desarrollo simultáneamente con el ovario en formación y su supervivencia depen-

de de su interacción con las células somáticas de la cresta gonadal (Baker and Franchi, 1967). Por tanto, las oogonias, junto a células mesenquimáticas y peritoneales, formarán la futura gónada. En ausencia de células germinales no se formará el ovario.

El desarrollo testicular, a diferencia del ovárico, no depende de la presencia de células germinales, puesto que la destrucción selectiva de esas células primordiales en embriones de rata o de pollo, antes de alcanzar la cresta gonadal, no impide la diferenciación del tejido testicular (Merchant, 1975; McCarrey et al., 1978).



## DIFERENCIACIÓN Y DESARROLLO DE LAS CÉLULAS GERMINALES

A medida que las células germinales llegan a las crestas gonadales, se agrupan en el espesor del epitelio y el mesénquima, pierden su movilidad y adoptan una forma esférica para transformarse en oogonias. Estas células están unidas por puentes intercelulares debido a citocinesis incompleta durante la mitosis, es decir, debido a que la separación de la membrana celular de las células hijas no es completa. Su función parece ser la de coordinar la diferenciación celular (Sathananthan et al., 2000). Este fenómeno de agrupación de oogonias interconectadas por puentes intercelulares parece ser un evento universal en la oogénesis animal de vertebrados e invertebrados y cada especie tiene un número de mitosis específico antes de iniciar la meiosis (Pepling et al., 1999).

La gónada indiferenciada, entre las semanas 5 y 6, consta de una corteza en la superficie de la cavidad celómica y una médula, en el interior de la cresta genital. En el embrión masculino, la médula constituirá principalmente el testículo y la corteza se revierte a un simple epitelio. Por el contrario, en el embrión femenino, la corteza gonadal prolifera de forma determinante y la médula disminuye de tamaño.

El cromosoma Y en su brazo corto posee el gen de mayor importancia para la determinación de la gónada, llamado SRY, «sex-determining region of Y». Este gen transforma en testículo a la gónada indiferente bipotencial del embrión XY porque codifica para el factor determinante testicular una proteína de 223 aminoácidos que actúa, probablemente, como factor de transcripción del ADN (Sinclair et al., 1990; Brennan, 1998).

Los cordones sexuales primarios se originan en la gónada indiferenciada por el crecimiento del epitelio celómico hacia el mesénquima. Estos cordones se definen mejor hacia el final de la semana 6 y penetran en la médula gonadal para transformarse, en el embrión masculino, en cordones seminíferos o testiculares que son el origen de los túbulos seminíferos del testículo (Satoh, 1991).

En el embrión femenino, la ausencia del factor determinante testicular retarda un poco el desarrollo de la gónada, que se diferenciará en ovario hacia la semana 10 del desarrollo. Desaparecen entonces los cordones sexuales primarios y aparece una segunda oleada de cordones celulares, que son los cordones sexuales secundarios, en los cuales se incorporan las oogonias. Hacia la semana 16 de desarrollo, los cordones sexua-

les secundarios se rompen en grupos celulares aislados, cada uno de los cuales rodea a un oocito primario para constituir los folículos primordiales (Wassarman and Albertini, 1994).

## MEIOSIS DEL OOCITO

Al iniciar la meiosis, la oogonia se transforma en oocito y tanto las células germinales primordiales como las células somáticas contienen un número diploide ( $2n$ ) de 46 cromosomas (23 pares de cromosomas homólogos). Mediante la meiosis se producen gametos con una dotación haploide ( $n$ ) de 23 cromosomas, de forma que durante la reproducción sexual, los gametos se unen para reconstituir una dotación diploide de cromosomas en el embrión.

Por otro lado, la meiosis favorece la variación genética mediante el proceso de recombinación que conlleva al intercambio genético entre cada uno de los miembros homólogos de una pareja de cromosomas. Los miembros de cada pareja de cromosomas se denominan cromosomas homólogos, uno de origen paterno y el otro de origen materno. Esto explica la herencia biparental, pues cada organismo diploide tiene dos copias de cada uno de sus genes, una de origen materno y otra paternal (Klug and Cummings, 1999).

Mediante la recombinación genética de estos cromosomas homólogos en la meiosis, se producen gametos que poseen combinaciones únicas y diferentes de las de las células somáticas del organismo del cual provienen. Los cromosomas de estos gametos son un mosaico de los homólogos paterno y materno. Es claro, sin embargo, que cada gameto posee un solo cromosoma del par presente en la célula diploide que le dio origen; esto significa que un gameto contiene ya sea la copia maternal o paternal de cada gen y no ambas.

La meiosis consta de dos fases que se denominan primera división meiótica o meiosis I, y segunda división meiótica o meiosis II, respectivamente. En ambas fases se reconocen estadios similares a los de la mitosis: profase, metafase, anafase y telofase. Sólo la primera división meiótica está precedida por la replicación del ADN. Dicha replicación conllevará la duplicación de los cromosomas que se constituyen en dos cromátides hermanas unidas por el centrómero (fig. 2-1).

Como se mencionó anteriormente, las oogonias que inician la meiosis se denominan oocitos; cuando el oocito transcurre por la primera división meiótica se le denomina oocito primario, mientras que durante la meiosis II se le llama oocito secundario (fig. 2-2).

La meiosis que sufren las espermatogonias en el proceso de espermatogénesis es un proceso continuo; la primera y segunda división meiótica se suceden de forma inmediata. Por el contrario, la meiosis durante la ovogénesis se ve interrumpida por los llamados bloqueos meióticos o arrestos meióticos, que significan la detención fisiológica de la meiosis en un determinado estadio o etapa (Polanski and Kubiak, 1999).

Estos bloqueos durante la meiosis son comunes en muchas especies y en la mayoría de los casos se producen dos de ellos (Sagata, 1996). En todos los mamíferos, los oocitos detienen la meiosis en la profase I y una vez que han alcanzado su crecimiento completo, se reinicia la meiosis para lograr la madurez y la capacidad de ser fecundado (Masui, 2001).

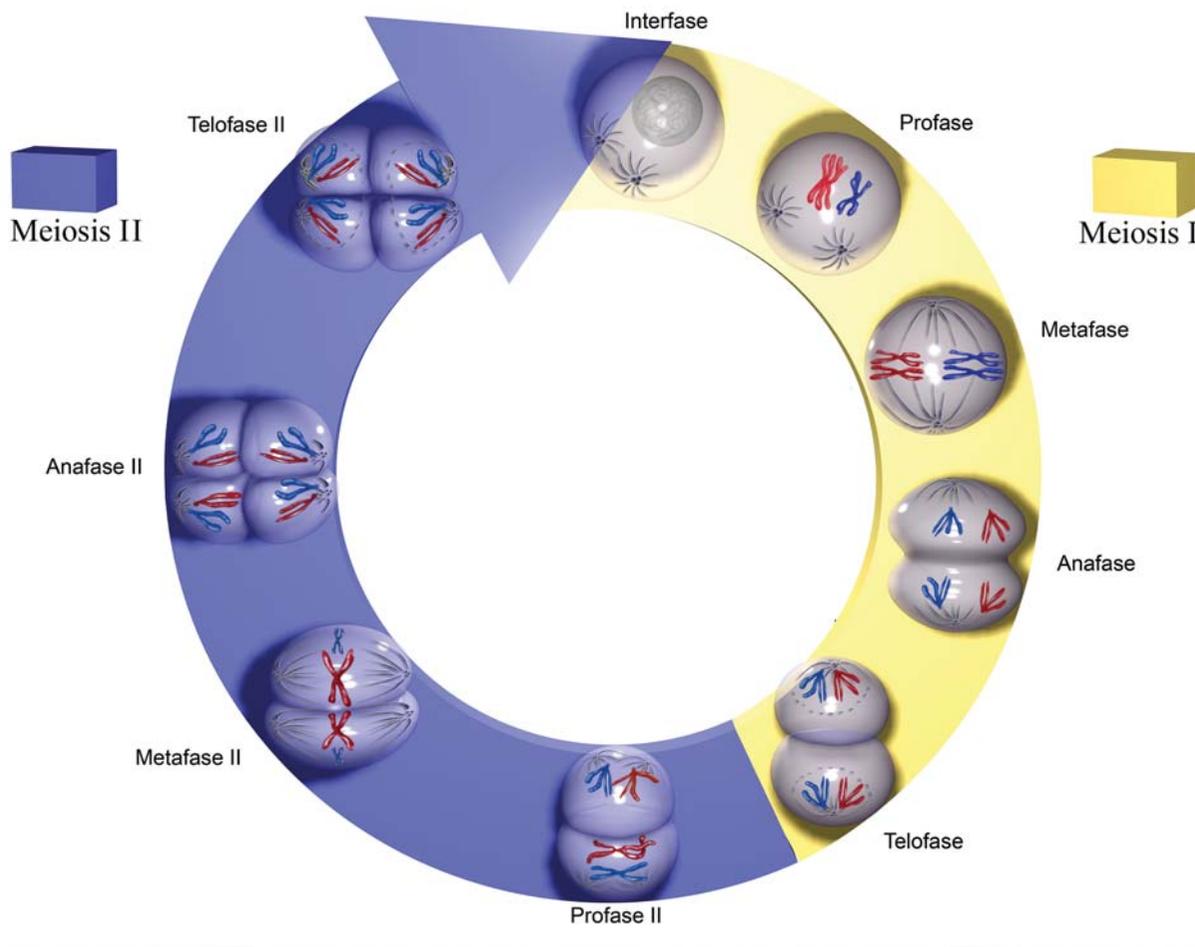


Figura 2-1.  
Fases de la meiosis.

Es importante destacar que un óvulo maduro es aquél capaz de ser fecundado, aun cuando no haya culminado la meiosis, como en el caso de los oocitos humanos.

Existen dos mecanismos para el reinicio de la meiosis, a fin de lograr la madurez del óvulo. En la mayoría de los animales, la maduración es inducida por las gonadotropinas secretadas por la hipófisis en los vertebrados, y por terminaciones nerviosas en los invertebrados. Sin embargo, en algunos invertebrados,

el reinicio de la meiosis y la maduración del oocito son inducidos por la penetración del espermatozoide; en este último caso, existe un solo momento de bloqueo de la meiosis y después de la fecundación, el oocito completa las dos divisiones meióticas sin interrupción.

Por el contrario, si la maduración del oocito es inducida por gonadotropinas, el oocito maduro, de acuerdo a la especie, se puede encontrar en cualquiera de los siguientes tres estadios al momento del encuentro con el espermatozoide:



- Metafase de la primera división meiótica (MI), como en los insectos.
- Metafase de la segunda división meiótica (MII), en los vertebrados.
- Después de la aparición del pronúcleo femenino, una vez concluida la meiosis, como en el caso de los erizos de mar y las medusas.

Clarke, 1979). En el humano, ocurren dos bloqueos de la meiosis, uno durante la meiosis I y el otro en la meiosis II. En la profase de la primera división meiótica, se produce el primer bloqueo meiótico; en ese momento, el oocito primario se encuentra en el estadio de vesícula germinal, término con el que se designa al núcleo que presenta dicha célula, el cual es esférico y tiene un nucléolo prominente. En efecto, las oogonias ingresan en meiosis de forma más o menos sincrónica durante la vida fetal dando origen a oocitos detenidos en profase I, fase en la que se encuentran al momento del nacimiento.

En todos estos casos, los oocitos maduros deben ser activados durante la fecundación (Masui and

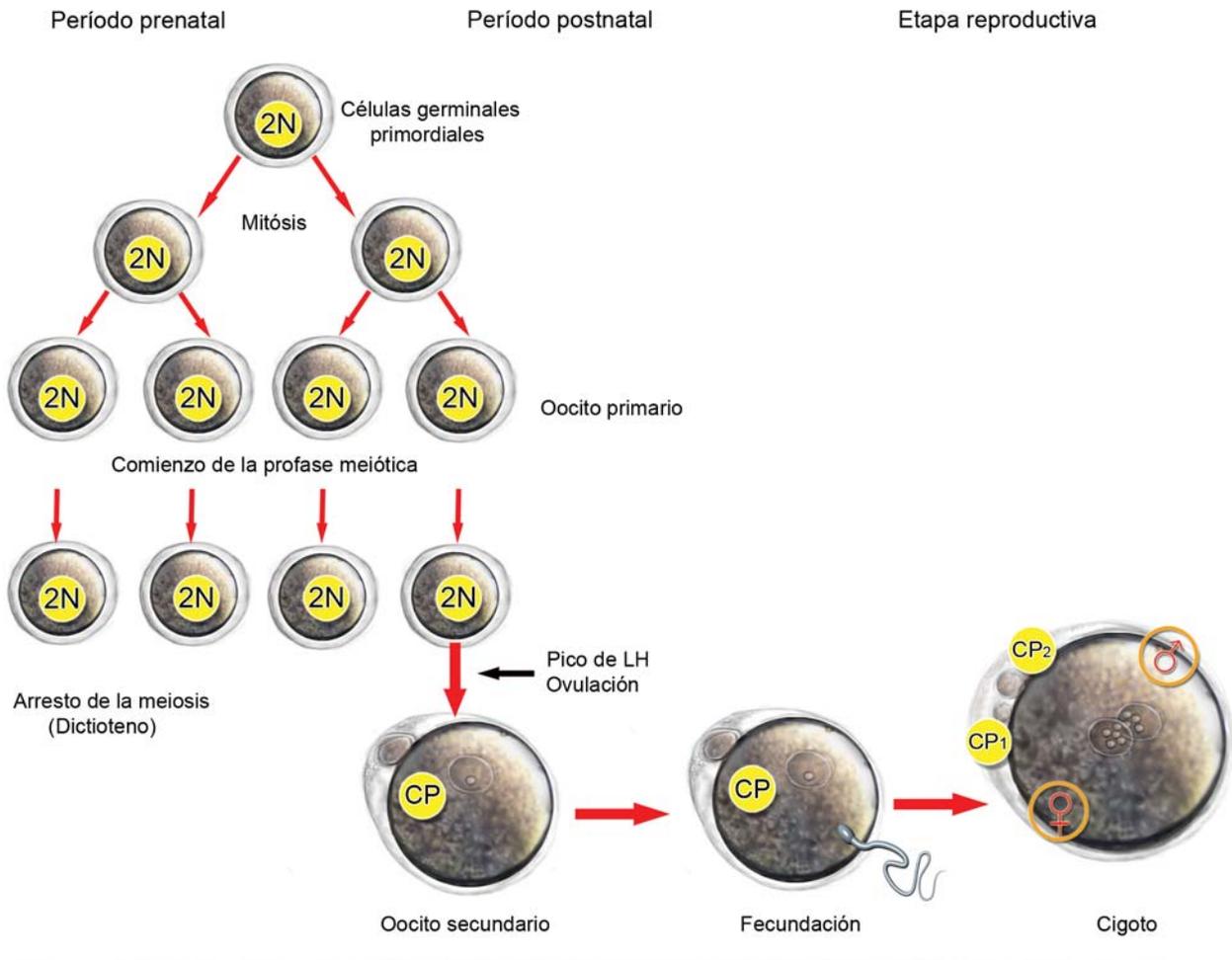


Figura 2-2. Esquema de la oogénesis.

Este primer bloqueo de la meiosis se libera varios años después, en el transcurso de la vida reproductiva de la mujer, porque en cada ciclo menstrual, gracias al pico de LH, los oocitos que son ovulados reinician y culminan la primera división meiótica, expulsando el primer corpúsculo polar y transformándose en oocitos secundarios.

El oocito secundario, que se encuentra en metafase de la segunda división meiótica, se considera maduro, es decir, capaz de ser fecundado y detiene la evolución de la meiosis hasta la penetración del espermatozoide. Esto significa que, a menos que se produzca la fecundación, la meiosis no se completará y el oocito se-

cundario o MII degenerará como una célula diploide al no culminar la segunda división meiótica. Todo esto hace que el promedio de duración de la meiosis humana sea de unas seis semanas en el hombre mientras que en la mujer puede durar desde 12 hasta 50 años.

A diferencia de la espermatogénesis, donde se producen cuatro gametos funcionales a partir de una célula germinal, durante la ovogénesis se observa una citoquinesis no equitativa, que da origen a una célula funcional de gran tamaño y tres células más pequeñas que se denominan corpúsculos polares. La principal función de éstos es permitir la remoción del exceso de material genético de la célula que se convertirá en óvulo, por tanto, son descartados. Este mecanismo de citoquinesis minimiza la pérdida de productos citoplasmáticos almacenados en el oocito, los cuales serán necesarios para el desarrollo temprano del embrión (Polanski and Kubiak, 1999).

### Profase de la primera división meiótica

El apareamiento de los cromosomas homólogos y la recombinación genética se llevan a cabo en la profase de la primera división meiótica, fase en la que transcurre el 90% del tiempo que dura la meiosis completa. La profase se divide en cinco estadios: leptoteno, zigoteno, paquiteno, diploteno y diacinesis (fig. 2-3). A diferencia de otras especies, la ovogénesis en humanos es un proceso asincrónico, en el que las células germinales pueden coexistir en varios estadios de la meiosis entre leptoteno y diploteno (Hartshorne et al., 1999).

*Leptoteno I.* Es el comienzo de la meiosis, en esta subfase los cromosomas se condensan lentamente y se hacen visibles. Aun cuando se han duplicado antes de esta fase, al microscopio de luz no se puede apreciar que cada cromosoma se compone realmente de dos cromátides hermanas. Durante esta fase se inicia el proceso de la búsqueda de cada homólogo para iniciar el apareamiento (Klug and Cummings, 1999).

*Zigoteno I.* Durante esta fase los cromosomas se continúan acortando, se hacen más gruesos y las cromátides homólogas están alineadas entre sí. Al microscopio electrónico, se observa una ultraestructura compleja que une a los cromosomas homólogos llamada complejo sinaptonémico. Los homólogos apareados de esta forma se denominan bivalentes, como en la fase anterior, y aunque los dos miembros de cada bivalente ya han duplicado su ADN, todavía no es aparente al microscopio óptico que cada miembro es una estructura doble.

*Paquiteno I.* Es la fase más prolongada de la profase I. Mientras el leptoteno y el zigoteno por lo general duran pocas horas, el paquiteno se extiende por un período de días o semanas. Se presenta un mayor desarrollo del complejo sinaptonémico, lo que conduce a un apareamiento más íntimo de los cromosomas que se denomina sinapsis. Ahora ya es evidente que cada homólogo es en realidad una estructura doble, lo que proporciona una prueba visual de la anterior replicación del ADN de cada cromosoma. De esta forma, cada bivalente tiene cuatro miembros que son dos cromátides de cada cromosoma y ahora se denomina tétrada. Es en este momento cuando se produce el intercambio de material genético entre las dos cromátides apareadas.

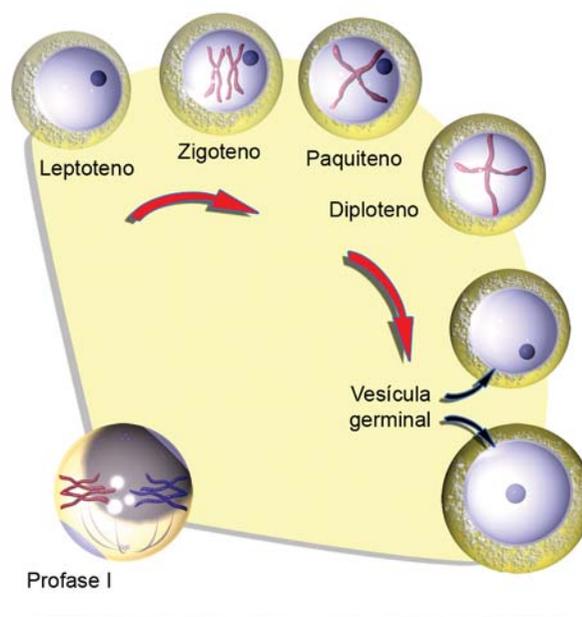


Figura 2-3.  
Profase primera división meiótica.

*Diploteno I.* En esta subfase de la profase I, cada par de cromátides hermanas se comienza a separar, pero permanecen unidas en uno o más puntos de contacto. Cada punto de contacto se denomina quiasma y se cree que representa el lugar en donde las cromátides han sufrido intercambio genético mediante el proceso de recombinación genética. En este momento, el oocito primario detiene la meiosis y se denomina estadio de dictiotene; toda la profase I transcurre con la membrana nuclear intacta por lo que es visible el núcleo que se denomina vesícula germinal, nombre que también se aplica al oocito mismo. En cada ciclo menstrual, después de la pubertad y durante toda la vida reproductiva, la meiosis se reiniciará en el momento del pico de secreción de la hormona luteinizante. El paso desde el



estadio de dictiotene hacia la metafase II se denomina maduración del oocito.

*Diacinesis I.* Es la subfase final de la profase I. En este momento, los cromosomas se comienzan a separar y los quiasmas que los unen se desplazan hacia los extremos de la tétrada en un proceso llamado terminalización. En esta última subfase, el nucléolo y la envoltura nuclear desaparecen y los dos centrómeros de cada tétrada se unen a las fibras del huso meiótico recién formado. Debido a que al núcleo del oocito en profase I se le denomina vesícula germinal, la desaparición de la envoltura nuclear durante la diacinesis se denomina ruptura de la vesícula germinal. El apareamiento previo de los cromosomas, además de explicar la recombinación genética, es un mecanismo que permite al huso meiótico identificar a los cromosomas homólogos para su correcta segregación en las células hijas.

*Metafase, anafase y telofase de la primera división meiótica.* Estas fases son similares a las de la mitosis, excepto por la forma en la que se segregan los cromoso-

mas. Durante la metafase I se forma el huso meiótico, en el que las tétradas se mantienen unidas por quiasmas terminales.

En la anafase I ocurre la disyunción, que es cuando la mitad de cada tétrada se separa hacia uno de los polos de la célula en división, debido a la separación de los quiasmas que unen las cromátides de los diferentes cromosomas homólogos y no a la división del centrómero que une a las cromátides hermanas de un mismo cromosoma, como sucede en la mitosis.

Como resultado, cada célula hija, al final de la primera división meiótica, posee el cromosoma de origen paterno o el de origen materno de cada uno de los 23 pares de cromosomas (esta distribución es aleatoria en distintos cromosomas), y no una cromátide paterna y una materna de cada cromosoma, como en el caso de la mitosis. Sin embargo, como en la mitosis, las células hijas que provienen de esta primera división meiótica son aún diploides (fig. 2-4).

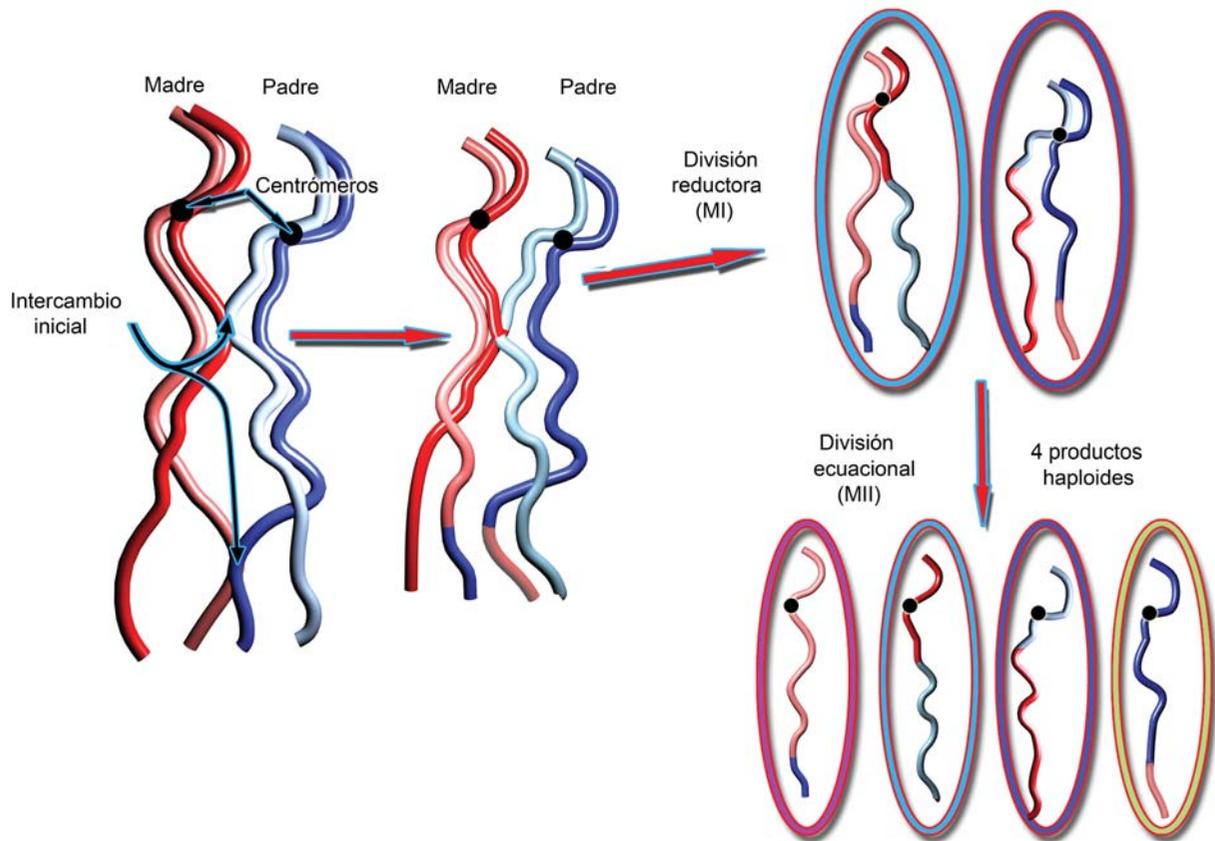


Figura 2-4. Intercambio cromosómico durante la meiosis.



Finalmente, se separan las células hijas y comienza la segunda división meiótica o meiosis II. Como se explicó antes, una de las células hijas recibe muy poco citoplasma y se le denomina primer corpúsculo polar o primer cuerpo residual. La otra célula es el gameto funcional que mantiene todo el citoplasma y se convierte en oocito secundario, el cual inicia entonces la meiosis II. La célula ingresa en la meiosis II sin haber reconstituido la envoltura nuclear.

Durante la meiosis I femenina es cuando se producen con mayor frecuencia los errores de disyunción que producen trisomías, como el síndrome de Down (Hassold, 1996).

La frecuencia de aparición de estos errores de disyunción es directamente proporcional a la edad de la mujer. No se conocen las razones precisas de esto, pero se sabe que el número de quiasmas que se establecen entre cromosomas homólogos, durante la profase I, se reduce en pacientes de mayor edad lo que pudiera explicar el aumento de los errores de disyunción (Polanski and Kubiak, 1999).

## Segunda división meiótica

La célula ingresa en la meiosis II sin previa replicación del ADN. De esta forma, durante la anafase II, se segregan las cromátides hermanas de cada cromosoma, al separarse el centrómero que las une, y cada una de ellas pasa a una célula hija haploide. La meiosis ha creado entonces, cuatro células haploides genéticamente diferentes a partir de un precursor diploide (fig. 2-4).

El segundo bloqueo de la meiosis se produce en la metafase II, momento en el cual se observa una célula esférica sin núcleo visible, con el corpúsculo polar en el espacio perivitelino, rodeado por la zona pelúcida. La reanudación de la meiosis, o activación, sólo se verifica cuando se produce la fecundación.

## REGULACIÓN DE LA MEIOSIS EN EL OOCITO

El estudio de los mecanismos genéticos y bioquímicos que regulan la meiosis ha sido de gran interés en los últimos años. El avance de las investigaciones en esta área lograrán mejorar en un futuro las técnicas de maduración de oocitos inmaduros in vitro, aun aquellos conservados por criopreservación, lo cual es una limitante en la actualidad. Estos logros permitirían prolongar el período reproductivo de la mujer o evitar la esterilidad en pacientes que van a ser sometidas a radioterapia o quimioterapia. Otro resultado de este conocimiento sería poder inducir meiosis en célu-

las somáticas, lo que permitiría transformarlas en pseudogametos útiles en la reproducción asistida.

Durante el proceso de meiosis se requiere de modificaciones importantes del control del ciclo celular. El bloqueo o detención temporal del ciclo celular, durante la profase I y la metafase II meióticas, depende de la activación de mecanismos moleculares específicos. Dichos mecanismos no están completamente dilucidados porque los datos son controversiales y dificultan su interpretación, esto se puede deber al conocimiento parcial que se tiene actualmente de la regulación del ciclo celular.

El primer aspecto que hay que considerar es el posible mecanismo mediante el cual el oocito en la vida fetal, es capaz de detener la progresión de la profase I y mantenerla durante años. Como se mencionó, la maduración in vivo es inducida por el pico preovulatorio de LH. Sin embargo, el oocito carece del receptor LH/HCG, el cual está presente en las células granulosas del *cumulus oophorus* (Lawrence et al., 1980). Hace varios años se demostró que el efecto de las gonadotropinas en la maduración del oocito es mediado por las células del folículo y no a través de una acción directa sobre el gameto (Masui, 1967). A continuación, se analizarán las posibles vías de este efecto indirecto.

El hallazgo de que el oocito de mamífero, detenido en profase I, reinicia espontáneamente la meiosis al ser retirado del folículo antral que lo contiene (Edwards, 1965), condujo a la hipótesis de que las células granulosas del folículo proporcionaban un factor inhibitor que mantiene dicho oocito en arresto meiótico. Se ha señalado que las células granulosas del *cumulus* emiten proyecciones citoplasmáticas largas, que atraviesan la zona pelúcida, contactan con la membrana celular del oocito, llamada oolema, y podrían servir como canales para el paso de alguna sustancia inhibitora de la meiosis (Dekel et al., 1978).

En otros estudios se ha encontrado que los niveles elevados de adenosinmonofosfato cíclico (AMPc) inhiben la maduración del oocito (Dekel and Beers, 1978; Homa, 1988) y que ésta podría ser la molécula responsable del arresto meiótico. Debido a que con el uso de estimuladores de la adenilato ciclasa no ha sido posible incrementar el AMPc citoplasmático en el oocito sin *cumulus*, hasta los niveles requeridos para inhibir la maduración espontánea del mismo; se ha planteado que el AMPc generado por las células del *cumulus* es transferido al oocito a través de las proyecciones citoplasmáticas para mantener el arresto meiótico (Dekel, 1996; Bornslaeger and Schultz, 1985).



Por otro lado, se ha demostrado que las comunicaciones entre el oocito y las células del *cumulus* se reducen con la administración de HCG, lo que se podría relacionar con la disminución del paso de AMPc desde las células granulosas al oocito, con el consecuente descenso de los niveles de este nucleótido y posterior reinicio de la meiosis (Moor et al., 1980). Experimentalmente, utilizando sustancias que bloquean la comunicación entre células, se ha obtenido una secuencia de eventos similar a la que se acaba de exponer; además, existen evidencias moleculares que indican que por acción de la LH, se produce la desconexión de las proyecciones que emiten las células del *cumulus* hacia el oocito. (Piontkewitz and Dekel, 1993; Granot and Dekel, 1994).

Paradójicamente, muchos de los agentes que inducen la reanudación de la meiosis in vitro en oocitos incluidos en sus folículos, también estimulan la producción de AMPc (Hillensjö et al., 1978; Dekel and Sherizly, 1983). Se ha sugerido además, que la acción de la LH en la reanudación de la meiosis es mediada por el AMPc (Tsafirri et al., 1972). Algunos estudios indican que la administración de sustancias estimuladoras de la adenilatoclasa en oocitos desnudos, que son los que no tienen las células del *cumulus oophorus*, inhiben la meiosis; mientras que en aquellos oocitos que están incluidos en sus folículos, estos inhibidores de la adenilatoclasa estimulan la maduración (Dekel and Sherizly, 1983; Yoshimura et al., 1992), esto sugiere que el AMPc tiene un doble papel en el control de la maduración del oocito.

Se sabe además que para estimular el reinicio de la meiosis, se requieren niveles de AMPc en el oocito cuatro veces superiores a los presentes durante el arresto meiótico (Dekel et al., 1988). También se ha tratado de explicar este efecto paradójico del AMPc, al señalar que éste varía según la célula que recibe la acción del mismo, porque el incremento de los niveles de AMPc en las células granulosas del *cumulus* induce la maduración del oocito, mientras que las elevaciones de AMPc en el oocito mismo inhiben el reinicio de la meiosis (Dekel et al., 1981).

Otros factores que inducen la madurez en los oocitos de rata, incluidos en sus folículos, son la GnRH o sus análogos y los activadores de la proteinquinasa C (PKC); esta acción aparentemente es independiente de la LH. Sin embargo, no se sabe si los mismos constituyen vías fisiológicas importantes en la maduración del oocito o, por el contrario, si evocan la aparición de segundos mensajeros por vías alternas diferentes de las fisiológicas, provocadas por las condiciones experimentales en el laboratorio (Ekholm et al., 1981; Dekel

et al., 1983; Aberdam and Dekel, 1985; Dekel and Sherizly, 1985; LaPolt et al., 1990).

La regulación del ciclo celular es similar en todas las células eucariotas y es mediada por la fosforilación y desfosforilación de residuos específicos de aminoácidos en quinasas y desfosforilasas, que las activan o inactivan y a su vez, ellas activan o inactivan a otras quinasas o desfosforilasas. Todavía no se conocen todos los sustratos de las enzimas que se están estudiando; sin embargo, en principio, uno de ellos podría corresponder a una proteinquinasa dependiente de AMPc (PKA) (Palmer and Nebreda, 2000), la cual se inactiva cuando descienden los niveles de este nucleótido cíclico, lo que se corresponde con el reinicio de la meiosis del oocito.

Estudios realizados a principios de 1970 señalan que la transferencia de una alícuota de citoplasma de un oocito de rana, en reinicio de meiosis, puede inducir, de forma dosis dependiente, la maduración de otro oocito, lo que sugiere la existencia de un componente intracelular presente en los oocitos que reiniciaron la meiosis y que sería capaz, por sí mismo, de inducir la maduración (Masui and Markert, 1971; Smith and Ecker, 1971). Esta sustancia putativa se denominó factor promotor de la maduración (MPF), «maturation promoting factor», la cual regula la transición hacia la fase de mitosis o meiosis en todas las células eucarióticas.

En 1988, se logró purificar el MPF del citosol de oocitos del sapo *Xenopus laevis* (Lohka et al., 1988) y se determinó que era una proteinquinasa compuesta por dos unidades, una de 32 kD y otra de 45 kD. Hoy día se sabe que las dos subunidades son la cdc2 y la ciclina B (Nurse, 1990). La cdc2, que fue descubierta inicialmente en la levadura *Schizosaccharomyces pombe* y está presente también en células animales, corresponde a la subunidad catalítica, la cual fosforila residuos de serina y treonina (serina/treonina-quinasa) de varias proteínas que son su sustrato (Simanis and Nurse, 1986), mientras que la ciclina ejerce de subunidad reguladora, para que la quinasa funcione con los sustratos apropiados; esto significa que la subunidad quinasa sola es inactiva y se activa al unirse a la ciclina (Gould and Nurse, 1989).

Ahora bien, las ciclinas son proteínas que regulan el ciclo celular y se acumulan porque se sintetizan continuamente durante la interfase, que es el tiempo que transcurre desde el final de una mitosis hasta el principio de la siguiente, y luego desaparecen durante la fase de mitosis (M). La degradación, por proteólisis, de la subunidad de ciclina durante la mitosis, es res-



ponsable de la inactivación de la quinasa cdc2, lo que permite que la célula abandone la mitosis. Así el MPF primero se activa para reiniciar la meiosis I, luego se inactiva de forma transitoria entre la meiosis I y II, y finalmente se reactiva en la meiosis II (Nebreda and Ferby, 2000).

Durante el estadio de dictiotene existe una forma inactiva del MPF llamada pre-MPF; esta inactivación se debe a que la subunidad cdc2 está fosforilada en la treonina 14 y en la tirosina 15 de su secuencia peptídica. Esta fosforilación inhibidora está catalizada por la proteínquinasa Myt1, mientras que la desfosforilación que activa al MPF está catalizada por la fosfatasa cdc25C. A su vez, la fosfatasa cdc25C es regulada por otra proteínquinasa denominada Chk1, la cual inhibe la fosfatasa, al fosforilarla en su serina 287 (Najako et al., 1999); de esta forma, se establece una cascada de quinasas y desfosforilasas, que establecen un control de la meiosis del oocito. En relación con la secuencia de los eventos, se cree que la PKA (proteínquinasa dependiente de AMPc) sería la responsable de potenciar la activación del pre-MPF (Nebreda and Ferby, 2000).

Otro factor que se encuentra en todos los oocitos de vertebrados es el MAPK, «mitogen-activated protein kinase», cuya activación es necesaria para evitar que haya una fase de síntesis de ADN antes de la segunda división meiótica y, de esta forma, permite que se produzca una célula haploide (Gross et al., 2000). Durante la maduración del oocito, el sistema MAPK es activado por fosforilación al mismo tiempo que se activa el MPF (Palmer and Nebreda, 2000). El activador del MAPK es una oncoproteína y proteínquinasa denominada MOS (Sagata, 1997) y esta vía MOS/MAPK es esencial para la supresión de la replicación de ADN entre la meiosis I y II, lo cual se ha relacionado con el segundo arresto meiótico (Nebreda and Ferby, 2000).

Ahora bien, faltaban por descubrir los factores involucrados en el segundo bloqueo meiótico durante la metafase II, los cuales deben impedir que el oocito inicie la mitosis, a menos que suceda la fecundación; es decir, es necesario evitar la división partenogenética. A dicho factor putativo se le denominó factor citostático (CSF), «cyto-static factor» (Masui and Markert, 1971). La actividad de este factor aparece después de la metafase I y se incrementa gradualmente permaneciendo alto en el oocito maduro, pero desciende abruptamente poco después de la fecundación (Masui, 2000; Masui, 2001).

En el transcurso de los estudios se describieron dos tipos de actividades del CSF: una de ellas era sensible

a la inhibición por calcio y se denominó 1° CSF, «primary CSF», mientras que la segunda actividad era insensible a los niveles de calcio intracelular y se denominó 2° CSF, «secondary CSF»; sin embargo, sus efectos eran citológicamente indistinguibles (Meyerhof and Masui, 1977). De lo anteriormente expuesto, se deduce que el aumento del calcio intracitoplasmático es uno de los mecanismos por los que el CSF se inactiva después de la fecundación y se activa el óvulo, iniciando la mitosis de las blastómeras.

No se ha logrado purificar el 1° CSF porque es muy inestable en los extractos de citoplasma; sin embargo, el comportamiento de este factor es muy similar a la proteínquinasa llamada MOS, (Sagata et al., 1989), por lo que se sospecha que son el mismo factor. De hecho, el sistema MOS/MAPK es esencial para la reactivación y estabilización del MPF en la meiosis II, lo cual es necesario para el arresto en metafase II (Sagata, 1997).

Tanto el MPF como el CSF tienen actividades que no son tejido-específicas y, por eso, la transferencia de citoplasma de un oocito a células de cualquier otro tejido puede inducir en ellas metafase (Ziegler and Masui, 1973). Dichas actividades tampoco son especie-específicas y se ha demostrado que el CSF de anfibios puede impedir el clivaje de blastómeras de otros animales (Meyerhof and Masui, 1979).

## CAMBIOS CITOLÓGICOS Y BIOQUÍMICOS DURANTE LA OOGÉNESIS

### Crecimiento del óvulo

En la mayoría de los animales los óvulos son células muy grandes que dan origen a muchas células más pequeñas. Mientras una célula somática típica mide de 10 a 12  $\mu\text{m}$ , el oocito maduro en MII mide de 120 a 160  $\mu\text{m}$  (Mandelbaum, 2000). Los óvulos de animales en las que el desarrollo embrionario se produce fuera del organismo materno, como aves o reptiles, son aún mayores y llegan a medir varios centímetros de diámetro. Las células somáticas pueden tardar hasta 24 horas en doblar su tamaño, en preparación para la división celular, por lo que se podría asumir que el tiempo requerido por la célula germinal primordial para incrementar varias veces su tamaño, hasta oocito maduro, sería extremadamente largo.

Este problema podría ser crítico en animales como los insectos, que viven pocos días pero que producen huevos de hasta 1.000  $\mu\text{m}$  de diámetro. La naturaleza ha propuesto una simple estrategia para el crecimiento rápido del óvulo, la cual consiste en disponer de



una copia extra del gen durante la profase I. Así, el retraso del oocito para completar la meiosis I no es casual, sino que permite disponer de un tiempo para la biosíntesis proteica necesaria para duplicar el ADN y tenerlo disponible para la síntesis de ARN (Metz and Monroy, 1985). Además, la citoquinesis asimétrica durante la meiosis, en la cual el oocito recibe casi todo el citoplasma mientras que los corpúsculos polares muy poco, permite proveer de una gran capacidad de síntesis a una sola célula, con lo que podrá responder a los requerimientos de la embriogénesis temprana.

Los óvulos humanos crecen durante meses y pasan de 35 a 120  $\mu\text{m}$  de diámetro, es decir, un incremento de 100 veces el volumen, hasta que logran abandonar el estadio de vesícula germinal (Picton et al., 1998). Este aumento de tamaño significa un período de intensa actividad metabólica y acumulación de agua, iones, lípidos y proteínas.

### Zona pelúcida

La existencia de una matriz extracelular que envuelve al oocito es un hecho común en todos los vertebrados. Esta cápsula adopta diferentes nombres: corion en los peces, capa vitelina en las ranas, capa perivitelina interna en las aves y zona pelúcida en los mamíferos. Además, la estructura filamentosa de estas envolturas se ha conservado a lo largo de la evolución (Rankin and Dean, 2000). La zona pelúcida del oocito humano tiene aproximadamente 15  $\mu\text{m}$  de espesor y está compuesta por tres glicoproteínas, cuya estructura primaria muestra secuencias conservadas entre los mamíferos euterianos, que son aquellos cuyos fetos poseen placenta (Zhu and Naz, 1999). Dichas glicoproteínas se denominan hZP1, hZP2 y hZP3 y sus pesos moleculares son 80-92 kD, 58-66 kD y 54-62 kD, respectivamente (Wassarman, 1988; Sinowatz et al., 2001). Estas glicoproteínas se organizan formando filamentos que se entrecruzan y que son polímeros constituidos por ZP2 y ZP3 que se repiten de forma alterna; la ZP1 se ubica entre los filamentos (Wassarman et al., 1996).

No se sabe a ciencia cierta cómo es ensamblada la zona pelúcida durante la oogénesis; aunque se ha demostrado que el oocito sintetiza las proteínas, probablemente las células granulosa ayudan en su formación. En el caso del ratón, que posee una zona pelúcida muy delgada, las glicoproteínas que la constituyen son sintetizadas en su totalidad por el oocito (Wassarman et al., 1998). Sin embargo, en humanos hay evidencias que demuestran que tanto el oocito como las células del folículo contribuyen a la formación de la zona (Grootenhuis et al., 1996).

Existen ejemplos en la naturaleza en los que la capa que rodea al oocito es sintetizada por las células del oviducto; por ejemplo, los huevos de rana al pasar por él adquieren varias capas gelatinosas secretadas por las células que lo tapizan, asimismo los huevos de aves adquieren la clara y la cáscara en el oviducto, después de ser fertilizados (Gilbert, 1991). En los mamíferos, pudiera estar contribuyendo con la elaboración final de la zona pelúcida, mediante la secreción de glicoproteínas que se unen a la zona y que se denominan colectivamente oviductinas, cuya función es desconocida (Malette et al., 1995; Buhi et al., 2000).

La zona pelúcida de los mamíferos es importante porque en ella se encuentran receptores espermáticos especie-específicos que impiden la unión de espermatozoides procedentes de especies heterólogas y, además, facilitan la penetración de los espermatozoides homólogos. La ZP3 constituye el receptor primario y la ZP2, el receptor secundario del espermatozoide (Prasad et al., 2000). Muchos oocitos, incluyendo los de mamíferos, contienen vesículas secretoras especializadas en la región periférica del citoplasma, próximas a la membrana celular, llamadas gránulos corticales, que liberan sus productos por exocitosis después de la fecundación y alteran la zona pelúcida para evitar que otros espermatozoides la penetren (Sinowatz et al., 2001).

Otra función de la zona pelúcida es evitar la disgregación de las blastómeras durante los estadios tempranos de división. La zona pelúcida permite la salida o eclosión del embrión al llegar al interior del útero para su implantación; las fallas en este mecanismo se han relacionado con la aparición de embarazos ectópicos. Por otra parte, la zona pelúcida protege al embrión temprano de moléculas tóxicas y del ataque de las células del sistema inmune.

### Reducción del número de células germinales

Las células germinales incrementan su número durante su migración desde el saco vitelino hasta la colonización de la gónada en desarrollo, desde unas 1.000 a 2.000 células, en el endodermo del saco vitelino, hasta alcanzar 5 a 7 millones en el quinto mes de vida intrauterina. Sin embargo, para el momento del nacimiento se cuenta sólo con unos 700.000 oocitos, estas células permanecen en reposo hasta que ocurre la primera menstruación, cuando se empiezan a liberar. En la pubertad el número de células se reduce a unas 250.000 por ovario (Baker, 1963).



Todos los meses se utilizan unas 1.000, de las cuales sólo una llega a la etapa final de maduración. Si se considera que la mujer tiene 13 ciclos menstruales anuales y más de 450 ciclos durante su vida reproductiva y en cada ciclo se gastan alrededor de 1.000 óvulos, es fácil comprender que cuando la mujer llega a los 48-50 años de edad, se han agotado los 500.000 oocitos que tenía al momento del nacimiento. Una vez que se agotan los folículos, se suspende la menstruación y comienza la menopausia. Por esto, la edad de la mujer desempeña un papel importante en el proceso reproductivo porque nace con el número total de óvulos que va a liberar a lo largo de su vida reproductiva, de tal manera que a los 20 años un óvulo tiene 20 años de edad y a los 40, tiene 40 años.

La desaparición de las células germinales durante la vida prenatal ocurre por un fenómeno diferente a la atresia folicular que ocurre después del nacimiento, cuando los folículos empiezan a crecer. Si bien la patología de ambos eventos es la apoptosis o muerte celular programada, los factores que la desencadenan son diferentes. Durante la ovogénesis, además de la proliferación celular, se produce constantemente apoptosis de las células germinales. Este proceso comienza cuando las oogonias están interconectadas por los puentes intercelulares y se presenta en las oogonias en mitosis, en oocitos en estado de paquíteno y en oocitos en estado de diploteno (DePol et al., 1997; Morita and Tilly, 1999).

Se han encontrado células germinales con cambios compatibles con apoptosis en ovarios de fetos humanos de 18 a 20 semanas y ovarios fetales de ratón de 13 a 17 días, los cuales se caracterizan por la presencia de protrusiones acentuadas del núcleo, condensación de la cromatina, alteraciones del citoplasma y presencia en el estroma de vesículas con fragmentos de citoplasma y núcleo (cuerpos apoptóticos). El alto porcentaje de pérdidas celulares durante la meiosis puede ser un sistema de selección para prevenir la formación de células aberrantes, especialmente en aquellas con defectos cromosómicos (DePol et al., 1997; Coucouvanis et al., 1993).

Tradicionalmente, se ha señalado que la hembra del mamífero pierde la capacidad de renovar las células germinales durante la vida fetal y por ese motivo, la mujer al nacer tiene un número definido y limitado de células germinales, lo que hace que tenga una vida reproductiva con un tiempo también limitado, pues al agotarse este grupo de células, se establece la menopausia (Zuckerman, 1951; Anderson and Hirshfield, 1992).

En investigaciones recientes se ha observado que los ovarios de ratones juveniles y adultos tienen la capacidad de dividir sus células germinales por mitosis, con lo que se determina la existencia de células germinales proliferativas que promueven la formación de oocitos en el ovario de mamífero (Johnson et al., 2004). Estos hallazgos, aunque deben ser confirmados, pueden cambiar la concepción actual de lo que se conoce como reserva folicular (Couzin, 2004).

## FOLICULOGÉNESIS

Los ovarios de mamíferos están constituidos por unidades funcionales básicas denominadas folículos. El folículo es la única estructura en la cual la célula germinal, el oocito, está en íntima asociación con células somáticas especializadas. Los folículos pasan por diferentes etapas de desarrollo, las cuales han sido clasificadas según su morfología y el tipo y número de células que los componen, en folículos primordiales, folículos primarios, folículos secundarios o preantrales (clase 1) y folículos antrales. Los folículos antrales son clasificados a su vez en clases desde el 2 al 8, este último corresponde al folículo preovulatorio (Gougeon, 1986). El desarrollo de los folículos primordiales hasta el estadio de folículos maduros se conoce como foliculogénesis (fig. 2-5).

Los folículos más inmaduros constan únicamente de una capa de células de la granulosa alrededor del oocito, pero a medida que van creciendo y madurando, promueven la diferenciación de las células del estroma ovárico que rodean al folículo, formándose así las capas de la teca, que se clasifican en teca interna y teca externa. Además, durante el desarrollo folicular, se puede apreciar claramente la aparición de una cavidad llena de líquido dentro del folículo, denominada antra (fig. 2-5). Así, se pueden distinguir los folículos preantrales de los antrales, los cuales presentan variaciones fisiológicas notables, en cuanto a la sensibilidad a las gonadotropinas hipofisarias.

## ESTRUCTURA DE LOS FOLÍCULOS

Los folículos en los estadios más tempranos y pequeños se denominan primordiales y son los más abundantes. Están compuestos por un oocito detenido en profase I, de la primera división meiótica, rodeado por una capa plana de células de la pregranulosa (figs. 2-5 y 2-6). Su diámetro es de aproximadamente 30-60  $\mu\text{m}$  y contienen un oocito diploide con un diámetro de 9-25  $\mu\text{m}$  (Hirshfield, 1991; Lintern-Moore et al., 1974).



Al continuar el desarrollo folicular, el oocito primordial pasa a folículo primario, etapa en la que aparece la zona pelúcida y se mantiene una sola capa de células que rodean al oocito, pero ahora con forma cuboidea (Wassarman et al., 1996). La transformación de un folículo primordial en primario está supeditada a que el núcleo del oocito, que se presenta como una vesícula germinal, haya alcanzado un diámetro mínimo de 20  $\mu\text{m}$ , momento en el cual el folículo entra en una etapa de crecimiento exponencial, con incremento de su diámetro y del número de células de la granulosa.

El crecimiento simultáneo del oocito y el folículo se da sólo hasta el estadio de folículo secundario, que es el momento en que el oocito alcanza un máximo de 80  $\mu\text{m}$  de diámetro; la vesícula germinal, de 26-27  $\mu\text{m}$ ; y el folículo de 110-120  $\mu\text{m}$ . De allí en adelante, el oocito no crece más y el aumento del diámetro folicular va a depender del crecimiento y proliferación de las células foliculares y de la aparición del antro. La teca interna temprana se forma hacia el final del estadio de folículo primordial, mientras que la teca externa aparece a medida que el folículo crece y comprime el estroma circundante (Erickson et al., 1985).

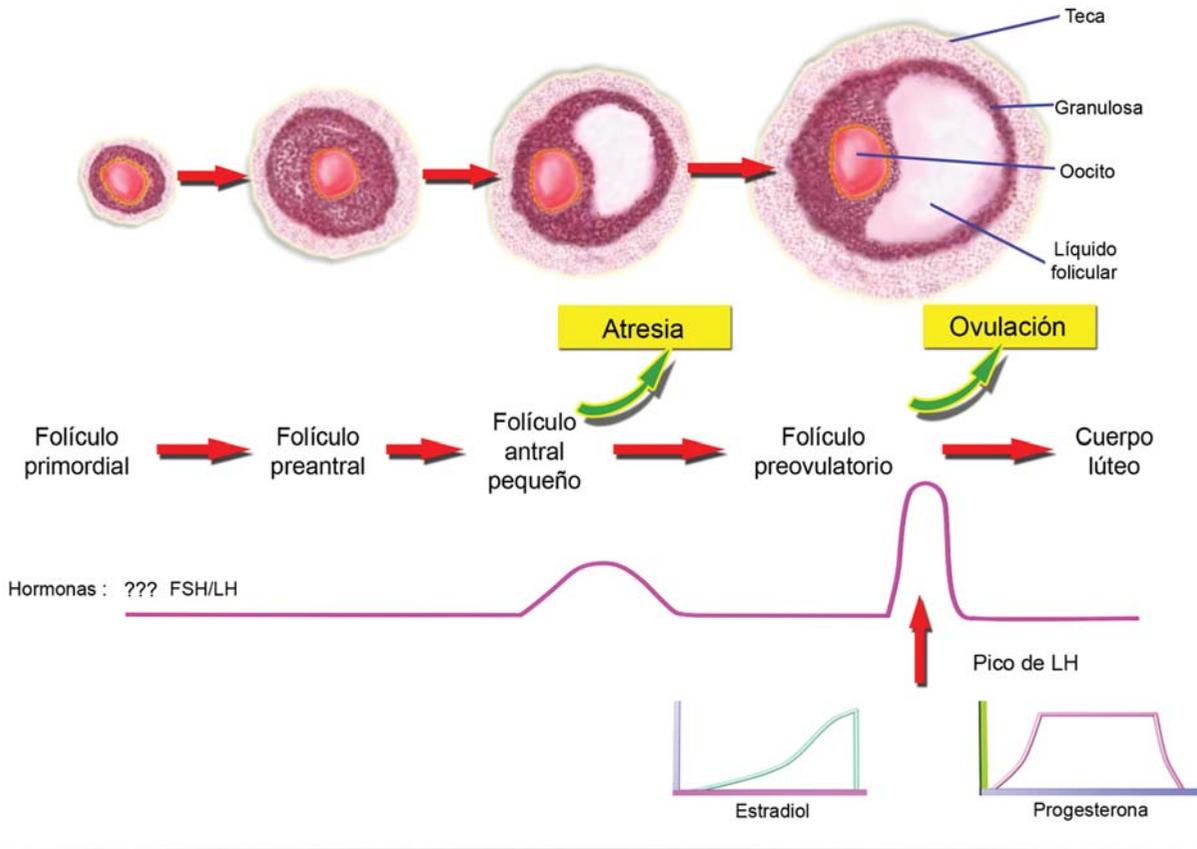


Figura 2-5. Clasificación morfológica de los folículos ováricos.

Con la aparición de la capa de la teca se adquiere la vascularización del folículo; así, estas células tendrán acceso a las gonadotropinas y al LDL colesterol, que son moléculas importantes para la esteroidogénesis. Por el contrario, las células de la granulosa no poseen irrigación y sólo acceden a ella luego de la ovulación, cuando el folículo se transforma en cuerpo lúteo. Las células de la granulosa y de la teca permanecen separadas por una lámina basal.

La proliferación y diferenciación de las células de la granulosa, la hipertrofia de las células de la teca y el crecimiento del oocito causan el agrandamiento folicular y transforman el folículo primario en folículo secundario, el cual alcanza un diámetro de 120  $\mu\text{m}$  (Lintern-Moore et al., 1974). Luego de la aparición del antro folicular, las células de la granulosa se comienzan a diferenciar funcionalmente, de acuerdo a su localización dentro del folículo. Las células más cercanas a la

membrana basal, denominadas murales, son las que tienen la mayor capacidad de síntesis de esteroides y el mayor número de receptores tempranos para LH (Zoller and Weisz, 1979); las células que dan hacia el antro reciben el nombre de antrales, mientras que las que rodean al oocito se califican como células del *cumulus oophorus* y son las que acompañan al oocito después de la ovulación, formando la corona radiata.

Las células del *cumulus* tienen una alta capacidad de división, poseen baja expresión de receptores de LH y carecen de actividad aromatasa, por lo que se cree que podrían ser una especie de células nodrizas para el oocito, más que una fuente de estrógenos para el folículo (Lawrence et al., 1980). Además, las células de la granulosa emiten proyecciones citoplasmáticas que atraviesan la zona pelúcida para hacer contacto con la membrana del oocito. Esta íntima relación parece regular el reinicio de la meiosis en el oocito, como se explicó en la sección dedicada a la oogénesis.

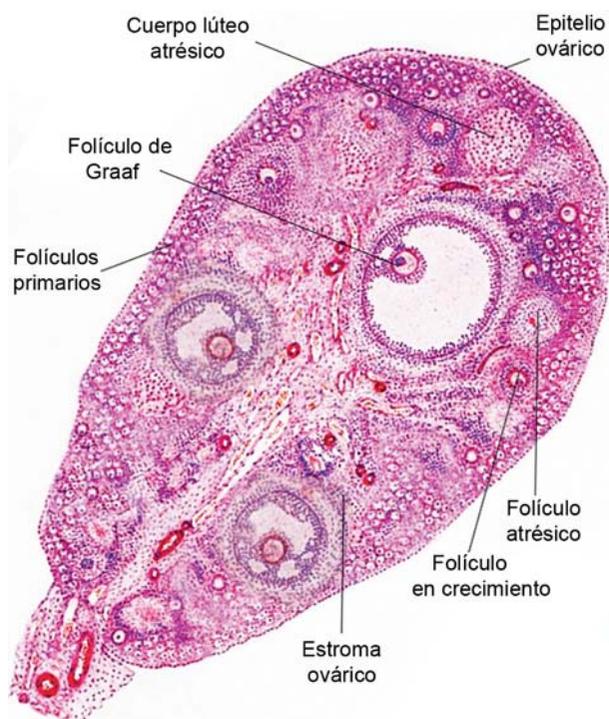


Figura 2-6.  
Estructura histológica del ovario.

Estudios realizados utilizando cultivo de folículos *in vitro* han demostrado que esta comunicación bidireccional, entre el oocito y las células somáticas, es esencial para el desarrollo folicular (Senbon et al., 2003). Se

ha señalado que la matriz extracelular podría actuar no sólo como soporte del folículo, sino también como un lugar de unión y almacenamiento de factores que regulan el crecimiento, desarrollo y función de las células foliculares (Armstrong and Webb, 1997).

## FACTORES QUE CONTROLAN EL DESARROLLO FOLICULAR

Para lograr la ovulación, al menos un folículo primordial debe alcanzar el estadio de folículo preovulatorio. Hasta hace pocos años, se creía que los factores endocrinos provenientes del eje hipotálamo-hipófisis dirigían completamente el proceso de reclutamiento y selección folicular; sin embargo, investigaciones recientes indican que factores locales producidos en el ovario, actuando de forma autocrina y paracrina, podrían tener una función importante en algunas de las etapas del crecimiento folicular (Peramo et al., 2002). Adicionalmente, se piensa que el oocito desempeña un papel activo en la iniciación y mantenimiento de la variabilidad cíclica de la reproducción, más que un papel pasivo como se creía anteriormente, sugiriéndose que el oocito orquesta la tasa ovárica de desarrollo folicular. Algunos estudios han demostrado que transferir un oocito de tamaño medio, proveniente de un folículo secundario, a un folículo primordial, provoca la duplicación de la tasa de desarrollo y diferenciación de las células de la granulosa (Eppig et al., 2002).

Existen varios criterios para denominar las diferentes etapas del desarrollo folicular, en este capítulo se adoptó la clasificación de reclutamiento folicular sugerida por McGee y Hsueh (McGee and Hsueh, 2000), en la que se diferencia el reclutamiento inicial del reclutamiento cíclico. Durante el reclutamiento inicial, la liberación de factores intraováricos y desconocidos o la liberación de señales inhibitorias estimulan a algunos folículos primordiales a iniciar su crecimiento, mientras que el resto permanece en estado latente por meses o años.

El reclutamiento inicial se cree que es un proceso continuo que comienza justo después de la formación de los folículos. En contraste, el reclutamiento cíclico comienza luego de la pubertad y es el resultado del incremento de los niveles circulantes de FSH dentro de cada ciclo reproductivo, lo cual propicia el rescate de una cohorte de folículos antrales de la atresia. Los oocitos en esta etapa ya han completado su crecimiento y son capaces de reanudar la meiosis (McGee and Hsueh, 2000).



## Reclutamiento inicial

Aún no se conocen los mecanismos que controlan el inicio del reclutamiento de los folículos desde el pool de reserva, debido a que éste es un proceso lento y que involucra un gran número de folículos (Hirshfield, 1989). Se cree que los folículos en reposo están bajo la continua influencia de factores inhibitorios, ya sea de origen local o sistémico, que hacen que permanezcan en descanso (Wandji, 1996). Una disminución de las influencias inhibitorias, o un incremento en los factores estimuladores, podrían provocar el inicio del crecimiento. Se ha asociado el aumento de FSH y LH en suero con la aceleración del reclutamiento folicular (Edwards et al., 1977; Flaws et al., 1997). Sin embargo, los folículos primordiales y los primarios carecen de receptores para LH y FSH; éstos aparecen en el folículo secundario, así que se piensa que estas hormonas deben actuar de una forma indirecta (Oktay et al., 1997).

Se ha propuesto que factores involucrados en la comunicación entre las células de la granulosa y el oocito cumplen un papel en el reclutamiento inicial. Uno de los sistemas observados en esta comunicación es el c-kit/kit ligando que es expresado por las células de la granulosa de folículos en crecimiento, mientras que el c-kit (un receptor tipo tirosina-quinasa) se localiza en el oocito y en las células de la teca. En ratones con mutaciones que previenen la formación de c-kit, no se logra el desarrollo folicular más allá del folículo primario (Huang et al., 1993); sin embargo, las mutaciones equivalentes en la mujer no parecen afectar la fertilidad (Ezoe et al., 1995).

Recientemente se ha aislado un factor producido por el oocito, que parece incidir en el desarrollo de los folículos tempranos. Esta molécula se conoce como factor de crecimiento y diferenciación-9 (GDF-9). Es producida por oocitos primarios y folículos grandes y está ausente en folículos primordiales (Dong et al., 1996). Luego del reclutamiento inicial, las células de la granulosa adquieren la forma cuboidea típica de los folículos secundarios, el oocito continúa creciendo, se forma la zona pelúcida y se condensan las células de la teca alrededor del folículo preantral. Durante este período, es muy importante la comunicación oocito-células de la granulosa, mediante uniones estrechas formadas por la proteína conexina 37 (Simon et al., 1997).

El papel de la activina en el desarrollo folicular no se ha precisado. Estudios realizados en bovinos indican que promueve el crecimiento de folículos preantrales y del oocito, pero no tiene influencia sobre la for-

mación del antro ni la sobrevivencia de los folículos (Thomas et al., 2003). Otra molécula implicada en el desarrollo folicular es el factor de crecimiento similar a la insulina tipo I (IGF-I), el cual se cree que promueve la expresión de receptores de FSH en las células de la granulosa, aumentando así la capacidad de respuesta a esta hormona (Zhou et al., 1997).

En animales y en humanos hipofisectomizados, donde se presentan concentraciones mínimas circulantes de FSH, o en aquellos casos donde existe un defecto en el receptor de FSH, se observa que los folículos pueden alcanzar los estadios secundario y antral temprano; por ese motivo, durante mucho tiempo se ha enfatizado que el desarrollo folicular temprano es independiente de las gonadotropinas (Hillier, 1994). Sin embargo, algunos estudios han demostrado que los folículos preantrales responden a gonadotropinas con división celular y diferenciación; por esto, se necesitan ensayos en modelos humanos para llegar a conocer exactamente la función de la FSH durante el crecimiento folicular temprano (Scaramuzzi et al., 1993).

## Reclutamiento cíclico

La atresia, o muerte celular programada, es el destino natural de los folículos en crecimiento durante la vida prenatal y la niñez, así como de la mayoría de ellos luego de la pubertad, con excepción de aquéllos que sobreviven y llegan a ser los folículos ovulatorios (Shikone et al., 1997; Fukaya et al., 1997). Aunque la apoptosis ocurre en cualquier estadio del desarrollo, en roedores se ha observado que los folículos más susceptibles a este proceso son aquéllos que pasan por la transición de preantral a antral temprano (Hirshfield, 1991).

Para el reclutamiento cíclico de los folículos antrales, así como para la supervivencia y multiplicación de las células somáticas del folículo, es de suma importancia la presencia de las hormonas hipofisarias, sobre todo de la FSH, la cual es un factor de supervivencia de folículos antrales tempranos en cultivo, al prevenir su atresia espontánea; acción que no puede ser lograda por la LH sola (Markstrom et al., 2002; Chun et al., 1996). El papel de la LH en la supervivencia de los folículos podría ser mediado por estrógenos, a través del mecanismo donde la LH provee la síntesis de androstenodiona en las células de la teca y ésta al pasar a las células de la granulosa, por acción de la aromatasa se transformaría en estradiol (Hsueh et al., 1984). Así que los estrógenos y, sobre todo, la FSH, serían los que actuarían directamente sobre el rescate de la apoptosis; sin embargo, el mecanismo de acción aún no se conoce.

Mientras que la FSH es el principal factor que promueve la supervivencia de los folículos antrales tempranos, en los folículos preovulatorios otros factores pueden contribuir al mantenimiento de la viabilidad celular al actuar de forma endocrina, paracrina, autocrina y juxtacrina y asegurar la ovulación (Hsueh et al., 1995). Se puede promover la supervivencia de los folículos preovulatorios mediante el tratamiento con factores endocrinos como la LH, la FSH y la hormona de crecimiento

(GH) (Spiliotis, 2003), así como factores de producción local como el factor de crecimiento epidérmico (EGF), el factor transformador del crecimiento-alfa (TGF- $\alpha$ ), el factor de crecimiento de fibroblastos (FGF) (Tilly et al., 1992) y el factor de crecimiento similar a la insulina-I (IGF-I) (Chun et al., 1994). La interleucina 1- $\alpha$  también es un factor de supervivencia para los folículos preovulatorios y su acción parece estar mediada por la liberación de óxido nítrico (Chun et al., 1995).

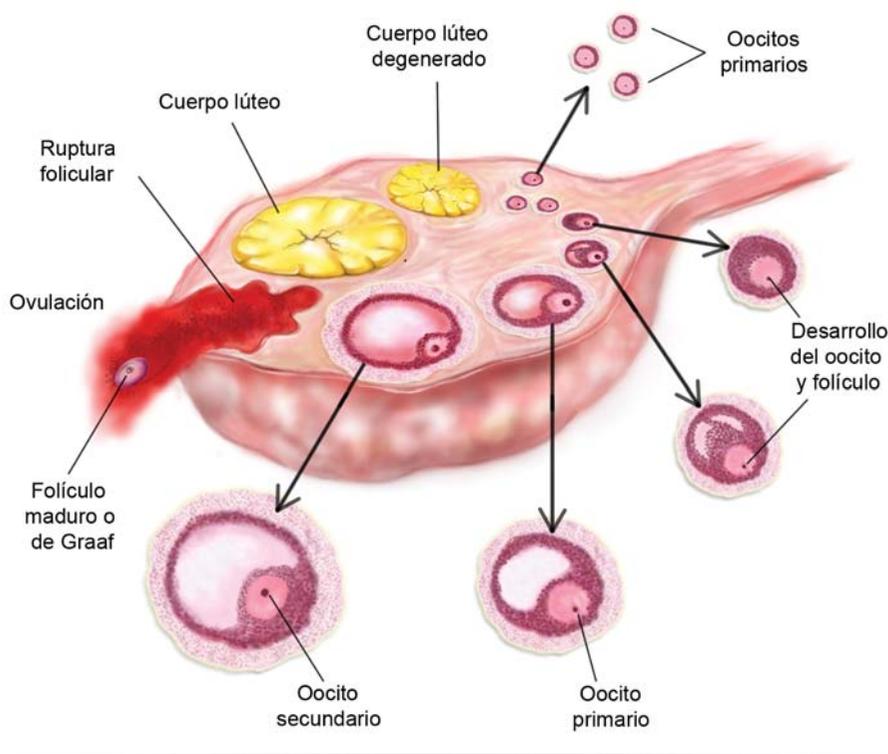


Figura 2-7.  
Ciclo ovulatorio normal.

## SELECCIÓN DEL FOLÍCULO DOMINANTE

### Regulación endocrina

Luego que los folículos son reclutados para empezar su crecimiento, viene el proceso de selección del folículo ovulatorio, durante el cual la cohorte de folículos en crecimiento es reducida al número equivalente a la cuota ovulatoria característica de la especie. La selección concluye cuando el número de folículos sanos en la cohorte, con potencial ovulatorio, es igual al de la cuota ovulatoria (Yeh and Adashi, 2001). Es posible que durante la fase folicular temprana no se pueda distinguir fácilmente al folículo dominante del resto de la cohorte en crecimiento; sin embargo, éste se puede diferenciar del resto por su tamaño, un alto índice mitótico de las células de la granulosa, la presencia de

cantidades detectables de FSH en el líquido folicular y la secreción de cantidades significativas de estradiol.

En el humano, el folículo seleccionado pasa a ser dominante una semana antes de la ovulación e inhibe el desarrollo de los otros folículos subordinados, al secretar cantidades importantes de estradiol e inhibina a la circulación sistémica que por retroalimentación negativa, en la hipófisis y el hipotálamo, genera la caída de los niveles séricos de FSH e impide el desarrollo de los otros folículos (Zeleznik and Hillier, 1984). Dado que el folículo dominante posee mayor cantidad de receptores de LH, una alta capacidad de aromatización



de andrógenos a estrógenos y una gran cantidad de receptores para FSH, es capaz de seguir creciendo en condiciones que para el resto de los folículos son adversas. Además, el folículo dominante posee niveles mayores de factor de crecimiento de fibroblastos básico (bFGF), el cual tiene capacidad angiogénica, que favorece un mayor acceso a las gonadotropinas séricas (Reynolds and Redmer, 1998). En cambio, los folículos subordinados son muy susceptibles a la disminución de los niveles séricos de FSH, lo que produce la apoptosis de las células de la granulosa y provoca la atresia folicular (Hsueh et al., 1994).

### Regulación intraovárica

El folículo dominante continúa su crecimiento y producción de estradiol gracias al incremento de la biodisponibilidad de factores de crecimiento similares a la insulina (IGF-I y 2) y al incremento de la degradación de las proteínas que unen al IGF (IGFBP), principalmente la IGFBP-4 y 5, que provoca el incremento de IGF libre y estimula la estereoidogénesis y la mitogénesis en el folículo dominante en desarrollo, preparándolo para la ovulación (Mazerbourg et al., 2003). Se ha implicado a la proteasa denominada PAPP-A, «pregnancy associated plasma protein-A», como la responsable de la degradación de IGFBP-4 en folículos preovulatorios humanos (Conover et al., 1999).

Se ha propuesto un mecanismo adicional de control intraovárico para la regulación del folículo dominante, el cual consiste en una interacción entre folículos. Estas interacciones pueden aumentar el efecto de regulación endocrina del folículo dominante, además factores producidos por el folículo dominante pueden afectar el desarrollo de los folículos subordinados (Baker and Spears, 1999).

### MADURACIÓN IN VITRO DE FOLÍCULOS OVÁRICOS

En el humano existen varias patologías que causan infertilidad de origen ovulatorio, por lo que se han desarrollado diferentes protocolos de inducción de la ovulación durante los programas de FIV-TE, para tratar de solventar este problema. Al aumentar el número de folículos desarrollados se incrementan además los niveles de hormonas esteroideas y, como consecuencia, se acrecienta el riesgo de desarrollar el síndrome de hiperestimulación ovárica, la más seria complicación que afecta la inducción de la ovulación (ver cap. 17). Debido a esto, la maduración in vitro de oocitos inmaduros de mujeres que no han sido estimuladas con hormonas, puede ser una alternativa a la estimulación in vivo (Canipari, 2000).

Estudios recientes han señalado que el desarrollo de técnicas de recolección de oocitos inmaduros, combinadas con nuevos medios de cultivo, representan una posibilidad para el tratamiento de parejas infértiles; sobre todo en dos grupos de pacientes: en las que sufren de síndrome de ovarios poliquísticos, que son muy sensibles a la estimulación con gonadotropinas y, por tanto, tienen mayor riesgo de desarrollar el síndrome de hiperestimulación ovárica; y el segundo grupo, que son mujeres con ovarios normales, referidas para un procedimiento de FIV-TE por presentar factor masculino severo. La tasa de embarazo clínico señalada es de 24% por aspiración y los niños nacidos hasta la fecha han sido totalmente sanos; por tanto, la recolección de oocitos inmaduros junto con la maduración in vitro podría representar, en el futuro, una técnica que reemplace a la FIV-TE convencional en determinadas pacientes (Mikkelsen, 2005; Papanikolaou et al., 2005).

Por otro lado, se presenta el dilema de la preservación de la capacidad fértil en pacientes jóvenes que sufren enfermedades como el cáncer o alteraciones autoinmunes, que requieran de esquemas de tratamiento con quimio o radioterapia, los cuales con mucha frecuencia generan falla ovárica prematura. En este grupo de pacientes, se ha realizado la congelación de su propio tejido ovárico para su posterior trasplante (trasplante ortotópico) o el trasplante de tejido ovárico de otra paciente (trasplante heterotópico). Luego se practica la estimulación folicular con gonadotropinas y la aspiración de oocitos, para realizar una FIV. Aunque se han señalado embarazos con ambos tipos de trasplante, esta técnica todavía se debe considerar como experimental, hasta que no se logre una adecuada tasa de éxitos y se estandaricen los protocolos de estudio.

Otra posibilidad es la criopreservación de oocitos, que representa una alternativa no quirúrgica para preservar la fertilidad, sobre todo en pacientes que no tienen pareja y, por tanto, no pueden congelar embriones. A pesar de que la técnica ha sido descrita desde hace mucho tiempo, con malas tasas de éxito, recientemente se han señalado mejores resultados relacionados con la sobrevida de oocitos luego de la descongelación, la fertilización y la tasa de embarazos. Los oocitos en metafase II son extremadamente frágiles debido a su gran tamaño, su alto contenido de agua y a la estructura de los cromosomas; por lo que se han usado las vesículas embrionarias, que tienen mejor sobrevida después de la descongelación, pero que requieran de la maduración in vitro. En la evaluación de los niños nacidos mediante esta técnica, no se han encontrado anomalías del cariotipo, del peso al na-



cer o en el desarrollo intelectual. Sin embargo, todavía se necesitan mayores estudios para que la congelación y descongelación de óvulos sea aplicada rutinariamente en la práctica clínica (ASRM, 2004).

## RESUMEN

La oogénesis y la foliculogénesis son procesos que ocurren simultáneamente y de forma coordinada para lograr el desarrollo de un oocito y su expulsión en el proceso de ovulación. La primera consiste en una complicada serie de cambios bioquímicos, genéticos y estructurales de la célula germinal, que se inician en estadios muy tempranos del desarrollo embrionario y pueden terminar años después; mientras que la segunda consiste en el crecimiento y desarrollo de las unidades funcionales del ovario que son los folículos.

La oogénesis se puede dividir en tres etapas: la aparición y migración de las células germinales primordiales hacia el ovario en formación, el crecimiento y diferenciación de las células germinales dentro del ovario y la meiosis y adquisición de la capacidad de ser fecundado.

En el humano, ocurren dos bloqueos de la meiosis, uno durante la meiosis I y el otro en la meiosis II. En la profase de la primera división meiótica, se produce el primer bloqueo cuando el oocito primario se encuentra en el estadio de vesícula germinal. Este bloqueo se libera varios años después, en el transcurso de la vida reproductiva de la mujer, porque en cada ciclo menstrual, gracias al pico de LH, los oocitos que son ovulados reinician y culminan la primera división meiótica, expulsando el primer corpúsculo polar y transformándose en oocitos secundarios

El oocito secundario, que se encuentra en metafase de la segunda división meiótica, se considera maduro, es decir, capaz de ser fecundado, y detiene la evolución de la meiosis hasta la penetración del espermatozoide, cuando se completa esta etapa. Los mecanismos que regulan estos procesos son complejos y se cree que están mediados por factores intrínsecos que favorecen o impiden el desarrollo del oocito.

Los ovarios de mamíferos están constituidos por unidades funcionales básicas denominadas folículos. El folículo es la única estructura en la cual la célula germinal, el oocito, está en íntima asocia-

ción con células somáticas especializadas. Los folículos pasan por diferentes etapas de desarrollo, las cuales han sido clasificadas según su morfología, y el tipo y número de células que los componen, en folículos primordiales, folículos primarios, folículos secundarios o preantrales y folículos antrales.

El reclutamiento folicular inicial se cree que es un proceso continuo que comienza justo después de la formación de los folículos. En contraste, el reclutamiento cíclico comienza luego de la pubertad y es el resultado del incremento de los niveles circulantes de FSH dentro de cada ciclo reproductivo, lo cual propicia el rescate de una cohorte de folículos antrales de la atresia. Los oocitos en esta etapa ya han completado su crecimiento y son capaces de reanudar la meiosis. El reclutamiento y diferenciación de un folículo dominante está mediado por la acción de factores hormonales como la FSH y la LH, y por factores intraováricos, que pueden aumentar el efecto de regulación endocrina del folículo dominante.

Estudios experimentales han demostrado que la maduración folicular *in vitro*, con o sin congelación de tejido ovárico u oocitos, puede representar una alternativa terapéutica para grupos de pacientes que requieran preservar su fertilidad o tengan riesgo de sufrir complicaciones por la estimulación ovárica.

## REFERENCIAS

- ABERDAM E, DEKEL N (1985). Activators of protein kinase C stimulate meiotic maturation of rat oocytes. *Biochem Biophys Res Commun*; 132:570-574.
- ANDERSON L, HIRSHFIELD A (1992). An overview of follicular development in the ovary: from embryo to the fertilized ovum *in vitro*. *Md Med J*; 41:614-620.
- ARMSTRONG D, WEBB R (1997). Ovarian follicle dominance: the role of intraovarian growth factors and novel proteins. *Rev Reprod*; 2:139-146.
- ASRM Practice Committee of the American Society for Reproductive Medicine (2004). Ovarian tissue and oocyte cryopreservation. *Fertil Steril*; 82(4):993-998.
- BAKER S, SPEARS N (1999). The role of intra-ovarian interactions in the regulation of follicle dominance. *Hum Reprod Update*; 5:153-165.
- BAKER T (1963). A quantitative and cytological study of germ cells in human ovaries. *Proc Roy Soc B*; 158:417-433.
- BAKER T, FRANCHI L (1967). The fine structure of oogonia and oocytes in human ovaries. *J Cell Sci*; 2:213-224.



- BORNSLAEGER E, SCHULTZ R (1985). Regulation of mouse oocyte maturation: effect of elevating cumulus cell cAMP on oocyte cAMP levels. *Biol Reprod*; 33:698-704.
- BRENNAN J, KARL J, MARTINEAU J, NORDQVIST K, SCHMAHL J, TILMANN C, UNG K, CAPEL B (1998). Sry and the testis: molecular pathways of organogenesis. *J Exp Zool*; 281:494-500.
- BUCCIONE R, SCHROEDER A, EPPIG J (1990). Interactions between somatic cells and germ cells throughout mammalian oogenesis. *Biol Reprod*; 43:543-547.
- BUHI W, ALVAREZ I, KOUBA A (2000). Secreted proteins of the oviduct. *Cells Tissues Organs*; 166:165-179.
- CANIPARI R (2000). Oocyte-granulosa cell interactions. *Hum Reprod Update*; 6:279-289.
- CHUN S, BILLIG H, TILLY J, FURUTA I, TSAFRIRI A, HSUEH A (1994). Gonadotropin suppression of apoptosis in cultured preovulatory follicles: mediatory role of endogenous insulin-like growth factor I. *Endocrinology*; 135:1845-1853.
- CHUN S, EISENHAEUER K, KUBO M, HSUEH A (1995). Interleukin-1 beta suppresses apoptosis in rat ovarian follicles by increasing nitric oxide production. *Biol Reprod*; 136:3120-3127.
- CHUN S, EISENHAEUER K, MINAMI S, BILLIG H, PERLAS E, HSUEH A (1996). Hormonal regulation of apoptosis in early antral follicles: follicle-stimulating hormone as a major survival factor. *Endocrinology*; 137:1447-1456.
- CLARK J, EDDY E (1975). Fine structural observations on the origin and associations of primordial germ cells of the mouse. *Dev Biol*; 47:136-155.
- CONOVER C, OXVIG C, OVERGAARD M, CHRISTIANSEN M, GIUDICE L (1999). Evidence that the insulin-like growth factor binding protein-4 protease in human ovarian follicular fluid is pregnancy associated plasma protein-A. *J Clin Endocrinol Metab*; 84:4742-4745.
- COUCOUVANIS E, SHERWOOD S, CARSWELL-CRUMPTON C, SPACK E, JONES P (1993). Evidence that the mechanism of prenatal germ cell death in the mouse is apoptosis. *Exp Cell Res*; 209:238-247.
- COUZIN J (2004). Reproductive biology. Textbook rewrite? Adult mammals may produce eggs after all. *Science*; 303:1593.
- DEKEL N, BEERS W (1978). Rat oocyte maturation in vitro: relief of cyclic AMP inhibition by gonadotropins. *Proc Natl Acad Sci USA*; 75:3469-3473.
- DEKEL N, GALIANI D, SHERIZLY I (1988). Dissociation between the inhibitory and the stimulatory action of cAMP on maturation of rat oocytes. *Mol Cell Endocrinol*; 56:115-121.
- DEKEL N, KRAICER P, PHILLIPS D, RAMON S, SEGAL S (1978). Cellular association in the rat oocyte-cumulus complex: morphology and ovulatory changes. *Gamete Res*; 1:47-57.
- DEKEL N, LAWRENCE T, GILULA N, BEERS W (1981). Modulation of cell-to-cell communication in the cumulus-oocyte complex and the regulation of oocyte maturation by LH. *Dev Biol*; 86:356-362.
- DEKEL N, SHERIZLY I, TSAFRIRI A, NAOR Z (1983). A comparative study of the mechanism of action of luteinizing hormone and a gonadotropin releasing hormone analog on the ovary. *Biol Reprod*; 28:161-166.
- DEKEL N, SHERIZLY I (1985). Epidermal growth factor induces maturation of rat follicle-enclosed oocytes. *Endocrinology*; 116:406-409.
- DEKEL N, SHERIZLY I (1983). Induction of maturation in rat follicle-enclosed oocyte by forskolin. *FEBS Lett*; 151:153-155.
- DEKEL N (1996). La maduración del oocito. En: REMOHÍ J, SIMÓN C, PELLICER A, BONILLA-MUSOLES F (eds.). *Reproducción humana*. Madrid: McGraw-Hill Interamericana.
- DE POL A, VACCINA F, FORABOSCO A, CAVAZZUTI E, MARZONA L (1997). Apoptosis of germ cells during prenatal oogenesis. *Hum Reprod*; 12:2235-2241.
- DONG J, ALBERTINI D, NISHIMORI K, KUMAR T, LU N, MATZUK M (1996). Growth differentiation factor-9 is required during early ovarian folliculogenesis. *Nature*; 383:531-535.
- DRIANCOURT M, REYNAUD K, CORTVRINDT R, SMITZ J (2000). Roles of kit and kit ligand in ovarian function. *Rev Reprod*; 5(3):143-152.
- EDWARDS R, FOWLER R, GORE-LANGTON R, GOSDEN R, JONES E, READHEAD C, STEPTOE P (1977). Normal and abnormal follicular growth in mouse, rat and human ovaries. *J Reprod Fertil*; 51:237-263.
- EDWARDS R (1965). Maturation in vitro of mouse, sheep, cow, pig, rhesus monkey and human ovarian oocytes. *Nature*; 208:349-351.
- EKHOLM C, HILLENSJO T, ISAKSSON O (1981). Gonadotropin releasing hormone agonists stimulate oocyte meiosis and ovulation in hypophysectomized rats. *Endocrinology*; 108:2022-2024.
- EPPIG J, WIGGLESWORTH K, PENDOLA F (2002). The mammalian oocyte orchestrates the rate of ovarian follicular development. *Proc Natl Acad Sci*; 99:2890-2894.
- ERICKSON G, MAGOFFIN D, DYER C, HOFEDITZ C (1985). The ovarian androgen producing cells: a review of structure/function relationships. *Endocrinol Rev*; 6:371-399.
- EZOE K, HOLMES SA, HO L, BENNETT C, BOLOGNIA J, BRUETON L, BURN J, FALABELLA R, GATTO E, ISHII N, MOSS C, PITTELKOW M (1995). Novel mutation and deletions of the KIT (steel factor receptor) gene in human piebaldism. *Am J Hum Genet*; 56:58-66.
- FLAWS J, ABBUD R, MANN R, NILSON J, HIRSHFIELD A (1997). Chronically elevated luteinizing hormone depletes primordial follicles in the mouse ovary. *Biol Reprod*; 57:1233-1237.



- FUKAYA T, FUNAYAMA Y, MUAKAMI T, SUGAWARA J, YAJIMA A (1997). Does apoptosis contribute follicular atresia and luteal regression in human ovary? *Horm Res*; 48:20-26.
- GILBERT S (1991). *Developmental biology*. Sunderland, MA: Sinauer Associates.
- GOUGEON A (1986). Dynamics of follicular growth in the human: a model from preliminary results. *Hum Reprod*; 1:81-87.
- GOULD K, NURSE P (1989). Tyrosine phosphorylation of the fission yeast *cdc2+* protein kinase regulates entry into mitosis. *Nature*; 342:39-45.
- GRANOT I, DEKEL N (1994). Phosphorylation and expression of connexin-43 ovarian gap junction protein are regulated by luteinizing hormone. *J Biol Chem*; 269:30502-30509.
- GROOTENHUIS A, PHILIPSEN H, DE BREET-GRIJSBACH J, VAN DUIN M (1996). Immunocytochemical localization of ZP3 in primordial follicles of rabbit, marmoset, rhesus monkey and human ovaries using antibodies against human ZP3. *J Reprod Fertil Suppl*; 50:43-54.
- GROSS S, SCHWAB M, TAIEB F, LEWELLYN A, QIAN Y, MALLER J (2000). The critical role of the MAP kinase pathway in meiosis II in *Xenopus* oocytes is mediated by p90(Rsk). *Curr Biol*; 10:430-438.
- HARTSHORNE G, BARLOW A, CHILD T, BARLOW D, HULTEN M (1999). Immunocytogenetic detection of normal and abnormal oocytes in human fetal ovarian tissue in culture. *Hum Reprod*; 14:172-182.
- HASSOLD T (1996). Mismatch repair goes meiotic. *Nat Genet*; 13:261-262.
- HILLENSJÖ T, EKHOLM C, AHREN K (1978). Role of cyclic AMP in oocyte maturation and glycolysis in the preovulatory rat follicle. *Acta Endocrinol*; 87:377-388.
- HILLIER S (1994). Current concepts of the roles of follicle stimulating hormone and luteinizing hormone in folliculogenesis. *Hum Reprod*; 9:188-191.
- HIRSHFIELD A (1991). Development of follicles in the mammalian ovary. *Int Rev Cytol*; 124:43-101.
- HIRSHFIELD A (1989). Granulosa cell proliferation in very small follicles of cycling rats studied by long-term continuous tritiated-thymidine infusion. *Biol Reprod*; 41:309-316.
- HOMA S (1988). Effects of cyclic AMP on the spontaneous meiotic maturation of cumulus-free bovine oocytes cultured in chemically defined medium. *J Exp Zool*; 248:222-231.
- HSUEH A, ADASHI E, JONES P, WELSH T JR (1984). Hormonal regulation of the differentiation of cultured ovarian granulosa cells. *Endocr Rev*; 5:76-125.
- HSUEH A, BILLIG H, TSAFRIRI A (1994). Ovarian follicle atresia: a hormonally controlled apoptotic process. *Endocr Rev*; 15:707-724.
- HSUEH A, EISENHAEUER K, CHUN S, HSU S, BILLIG H (1995). Gonadal cell apoptosis. *Recent Horm Res*; 136:3120-3127.
- HUANG E, MANOVA K, PACKER A, SÁNCHEZ S, BACHVAROVA R, BESMER P (1993). The murine steel panda mutation affects kit ligand expression and growth of early ovarian follicles. *Dev Biol*; 157:100-109.
- IKENISHI K (1998). Germ plasm in *Caenorhabditis elegans*, *Drosophila* and *Xenopus*. *Dev Growth Differ*; 40:1-10.
- JOHNSON J, CANNING J, KANEKO T, PRU J, TILLY J (2004). Germ-line stem cells and follicular renewal in the postnatal mammalian ovary. *Nature*; 428:145-50.
- KLUG W, CUMMINGS M (1999). División celular y cromosomas. En: KLUG W, CUMMINGS M (eds.). *Conceptos de genética*. Madrid: Prentice Hall. Iberia SRL.
- LAPOLT P, YAMOTO M, VELJKOVIC M, SINCICH C, TSAFRIRI A, HSUEH A (1990). Basic fibroblast growth factor induction of granulosa cell tissue-type plasminogen activator expression and oocyte maturation: potential role as a paracrine ovarian hormone. *Endocrinology*; 127:2351-2363.
- LAWRENCE T, DEKEL N, BEERS W (1980). Binding of human chorionic gonadotropin by rat cumuli, oophori and granulosa cells: a comparative study. *Endocrinology*; 106:1114-1118.
- LINTERN-MOORE S, PETERS H, MOORE G, FABER M (1974). Follicular development in the infant human ovary. *J Reprod Fertil*; 39:53-64.
- LOHKA M, HAYES M, MALLER J (1988). Purification of maturation-promoting factor, an intracellular regulator of early mitotic events. *Proc Natl Acad Sci USA*; 85:3009-3013.
- MALETTE B, PAQUETTE Y, MERLEN Y, BLEAU G (1995). Oviductins possess chitinase-and mucin-like domains: a lead in the search for the biological function of these oviduct-specific ZP-associating glycoproteins. *Mol Reprod Dev*; 41:384-397.
- MANDELBAUM J (2000). Oocytes. *Hum Reprod*; 15(4):11-18.
- MARKSTROM E, SVENSSON E, SHAO R, SVANBERG B, BILLIG H (2002). Survival factors regulating ovarian apoptosis dependence on follicle differentiation. *Reproduction*; 123:23-30.
- MASUI Y, CLARKE H (1979). Oocyte maturation. *Int Rev Cytol*; 57:185-282.
- MASUI Y, MARKERT C (1971). Cytoplasmic control of nuclear behavior during meiotic maturation of frog oocytes. *J Exp Zool*; 177:129-145.
- MASUI Y (2001). From oocyte maturation to the in vitro cell cycle: the history of discoveries of Maturation-Promoting Factor (MPF) and Cytostatic Factor (CSF). *Differentiation*; 69:1-17.



- MASUI Y (1967). Relative roles of the pituitary, follicle cells, and progesterone in the induction of oocyte maturation in *Rana pipiens*. *J Exp Zool*; 166:365-376.
- MASUI Y (2000). The elusive cytotostatic factor in the animal egg. *Nature Rev Mol Cell Biol*; 1:228-232.
- MATOVA N, COOLEY L (2001). Comparative aspects of animal oogenesis. *Dev Biol*; 231:291-320.
- MATSUI Y, ZSEBO K, HOGAN B (1990). Embryonic expression of a haematopoietic growth factor encoded by the *Sl* locus and the ligand for c-kit. *Nature*; 347:667-669.
- MAZERBOURG S, BONDY C, ZHOU J, MONGET P (2003). The insulin-like growth factor system: a key determinant role in the growth and selection of ovarian follicles? A comparative species study. *Reprod Dom Anim*; 38:247-258.
- MCCARREY J, ABBOTT U (1978). Chick gonad differentiation following excision of primordial germ cells. *Dev Biol*; 66:256-265.
- MCGEE E, HSUEH A (2000). Initial and cyclic recruitment of ovarian follicles. *Endocrinol Rev*; 21(2):200-214.
- MERCHANT H (1975). Rat gonadal and ovarian organogenesis with and without germ cells. An ultrastructural study. *Dev Biol*; 44:1-21.
- METZ C, MONROY A (eds.) (1985). *Model systems and oogenesis. Biology of fertilization*. Orlando: Academic Press.
- MEYERHOF P, MASUI Y (1977). Ca and Mg control of cytotostatic factors from *Rana pipiens* oocytes which cause metaphase and cleavage arrest. *Dev Biol*; 61:214-229.
- MEYERHOF P, MASUI Y (1979). Properties of a cytotostatic factor from *Xenopus laevis* eggs. *Dev Biol*; 72:182-187.
- MIKKELSEN A (2005). Strategies in human in-vitro maturation and their clinical outcome. *Reprod Biomed Online*; 10(5):593-599.
- MOOR R, SMITH M, DAWSON R (1980). Measurement of intercellular coupling between oocytes and cumulus cells using intracellular markers. *Exp Cell Res*; 126:15-30.
- MORITA Y, TILLY J (1999). Oocyte apoptosis: like sand through an hourglass. *Dev Biol*; 213:1-17.
- MOTTA P, MAKABE S, NOTTOLA S (1997). The ultrastructure of human reproduction. I. The natural history of the female germ cell: origin, migration and differentiation inside the developing ovary. *Hum Reprod Update*; 3(3):281-295.
- NAKAJO N, OE T, UTO K, SAGATA N (1999). Involvement of Chk1 kinase in prophase I arrest of *Xenopus* oocytes. *Dev Biol*; 207:432-444.
- NEBRED A, FERBY I (2000). Regulation of the meiotic cell cycle in oocytes. *Current Opinion in Cell Biology*; 12:666-675.
- NURSE P (1990). Universal control mechanism regulating onset of M-phase. *Nature*; 344:503-508.
- OKTAY K, BRIGGS D, GOSDEN R (1997). Ontogeny of follicle-stimulating hormone receptor gene expression in isolated human ovarian follicles. *J Clin Endocrinol Metab*; 82:3748-3751.
- PALMER A, NEBRED A (2000). The activation of MAP kinase and p34cdc2/cyclin B during the meiotic maturation of *Xenopus* oocytes. *Prog Cell Cycle Res*; 4:131-143.
- PAPANIKOLAOU E, PLATTEAU P, ALBANO C, NOGUEIRA D, CORTVRINDT R, DEVROEY P, SMITZ J (2005). Immature oocyte in-vitro maturation: clinical aspects. *Reprod Biomed Online*; 10(5):587-592.
- PEPLING M, DE CUEVAS M, SPRADLING A (1999). Germline cysts: a conserved phase of germ cell development? *Trends Cell Biol*; 9:257-262.
- PERAMO B, RICCIARELLI E, HERNÁNDEZ E (2002). Regulación intraovárica de la foliculogénesis. Factores de crecimiento. En: REMOHÍ J, PELLICER A, DSIMÓN C, NAVARRO J (eds.). *Reproducción Humana* (2<sup>da</sup> edición). Madrid: McGraw-Hill Interamericana.
- PICTON H, BRIGGS D, GOSDEN R (1998). The molecular basis of oocyte growth and development. *Mol Cell Endocrinology*; 145:27-37.
- PIONTKEWITZ Y, DEKEL N (1993). Heptanol, an alkanol that blocks gap junctions, induces oocyte maturation. *Endocr J*; 1:365-372.
- POLANSKI Z, KUBIAK J (1999). Meiosis. In: KNOBIL E, NEILL J (eds.). *Encyclopedia of Reproduction* (vol. 3). San Diego: Academic Press.
- PRASAD S, SKINNER S, CARINO C, WANG N, CARTWRIGHT J, DUNBAR B (2000). Structure and function of the proteins of the mammalian zona pellucida. *Cells Tissues Organs*; 166:184-164.
- RANKIN T, DEAN J (2000). The zona pellucida: using molecular genetics to study the mammalian egg coat. *Rev Reprod*; 5:114-121.
- REYNOLDS L, REDMER D (1998). Expression of the angiogenic factors, basic fibroblast growth factor and vascular endothelial growth factor, in the ovary. *J Anim Sci*; 76:1671-1681.
- RICHARDS A, ENDERS G, RESNICK J (1999). Activin and TGF $\beta$  limit murine primordial germ cell proliferation. *Dev Biol*; 207:470-475.
- SAGATA N, WATANABE N, VANDE WOUDE G, IKAWA Y (1989). The c-MOS proto-oncogene product is a cytotostatic factor responsible for meiotic arrest in vertebrate eggs. *Nature*; 42:512-517.
- SAGATA N (1996). Meiotic metaphase arrest in animal oocytes: its mechanisms and biological significance. *Trends Cell Biol*; 6:22-28.
- SAGATA N (1997). What does MOS do in oocytes and somatic cells? *Bioessays*; 19:13-21.



- SATHANANTHAN A, SELVARAJ K, TROUNSON A (2000). Fine structure of human oogonia in the foetal ovary. *Mol Cell Endocrinology*; 161:3-8.
- SATOH M (1991). Histogenesis and organogenesis of the gonad in human embryos. *J Anat*; 177:85-107.
- SCARAMUZZI R, ADAMS N, BAIRD D, CAMPBELL B, DOWNING J, FINDLAY J, HEMNDERSON K, MARTÍN G, MCNATTY K, MCNEILLY A, TSONIS C (1993). A model for follicle selection and the determination of ovulation rate in ewe. *Reprod Fertil Dev*; 5:459-478.
- SCHILLING B, YEH J (1999). Expression of transforming growth factor TGF-beta1, TGF-beta2 and TGF-beta3, and of type I and II TGF-beta receptors during the development of the human fetal ovary. *Fertil Steril*; 72:147-153.
- SENBON S, HIRAO Y, MIYANO T (2003). Interactions between the oocyte and surrounding somatic cells in follicular development: lessons from in vitro culture. *J Reprod Dev*; 49:259-269.
- SHIKONE T, KOKAWA K, YAMOTO M, NAKANO R (1997). Apoptosis of human ovary and uterine endometrium during the menstrual cycle. *Hormone Res*; 48:27-34.
- SIMANIS V, NURSE P (1986). The cell cycle control gene cdc2+ of fission yeast encodes a protein kinase potentially regulated by phosphorylation. *Cell*; 45:261-268.
- SIMON A, GOODENOUGH D, LI E, PAUL D (1997). Female infertility in mice lacking connexin 37. *Nature*; 385:525-529.
- SINCLAIR A, BERTA P, PALMER M, HAWKINS J, GRIFFITHS B, SMITH M, FOSTER J, FRISCHAUF A, LOVELL-BADGE R, GOODFELLOW P (1990). A gene from the human sex-determining region encodes a protein with homology to a conserved DNA-binding motif. *Nature*; 346:240-244.
- SINOWATZ F, KÖLLE S, TÖPFER-PETERSEN E (2001). Biosynthesis and expression of zona pellucida glycoproteins in mammals. *Cells Tissues Organs*; 168:24-35.
- SMITH L, ECKER R (1971). The interaction of steroids with *Rana pipiens* oocytes in the induction of maturation. *Dev Biol*; 25:232-247.
- SPILOTIS B (2003). Growth hormone insufficiency and its impact on ovarian function. *Ann NY Acad Sci*; 997:77-84.
- THOMAS F, ARMSTRONG D, TELFER E (2003). Activin promotes oocyte development in ovine preantral follicles in vitro. *Reprod Biol Endocrinol*; 1:76-80.
- TILLY J, BILLIG H, KOWALSKI K, HSUEH A (1992). Epidermal growth factor and basic fibroblast growth factor suppress the spontaneous onset of apoptosis in cultured rat ovarian granulosa cells and follicles by a tyrosine kinase-dependent mechanism. *Mol Endocrinol*; 6:1942-1950.
- TSAFIRI A, LINDNER H, ZOR U, LAMPRECHT S (1972). In-vitro induction of meiotic division in follicle-enclosed rat oocytes by LH, cyclic AMP and prostaglandin E2. *J Reprod Fertil*; 31:39-50.
- VENDRELL F, TARÍN J (2001). Oogénesis (I): origen y crecimiento ovocitario. *Revista Asebir*; 6:44-53.
- WANDJI S, SRSEN V, VOSS A, EPPIG J, FORTUNE J (1996). Initiation in vitro of growth of bovine primordial follicles. *Biol Reprod*; 55:942-948.
- WASSARMAN P, ALBERTINI D (1994). The mammalian ovum. In: KNOBIL E, NEILL J (eds.). *The physiology of reproduction*. New York: Raven Press, Ltd.
- WASSARMAN P, LIU C, CHEN J, QI H, LITSCHER E (1998). Ovarian development in mice bearing homozygous or heterozygous null mutations in zona pellucida glycoprotein gene mZP3. *Histol Histopathol*; 13:293-300.
- WASSARMAN P, LIU C, LITSCHER E (1996). Constructing the mammalian egg zona pellucida: some new pieces of an old puzzle. *J Cell Sci*; 109:2001-2004.
- WASSARMAN P (1988). Zona pellucida glycoproteins. *Ann Rev Biochem*; 57:415-442.
- WITSCHI E, BRUNER J, SEGAL S (1953). The pluripotentiality of the mesonephric blastema. *Anat Rec*; 115:381-384.
- WITSCHI E (1948). Migration of the germ cells of human embryos from the yolk sac to the primitive gonadal folds. *Contrib Embryol*; 32:67-73.
- YEH J, ADASHI E (2001). El ciclo ovárico. En: BARBIERI R, JAFFE R, YEN S (eds.). *Endocrinología de la Reproducción*. Buenos Aires: Editorial Panamericana.
- YOSHIMURA Y, NAKAMURA Y, ODA T, ANDO M, UBUKATA Y, KARUBE M, KOYAMA N, YAMADA H (1992). Induction of meiotic maturation of follicle-enclosed oocytes of rabbits by a transient increase followed by an abrupt decrease in cyclic AMP concentration. *J Reprod Fertil*; 95:803-812.
- ZELEZNIK A, HILLIER S (1984). The role of gonadotropins in the selection of preovulatory follicle. *Clin Obstet Gynecol*; 27:927-940.
- ZHOU J, KUMAR T, MATZUK M, BONDY C (1997). Insulin-like growth factor I regulates gonadotropin responsiveness in the murine ovary. *Mol Endocrinol*; 11:1924-1933.
- ZHU X, NAZ R (1999). Comparison of ZP3 protein sequences among vertebrate species: to obtain a consensus sequence for immunocontraception. *Front Biosci*; 1(4):D212-D215.
- ZIEGLER D, MASUI Y (1973). Control of chromosome behavior in amphibian oocytes. I. The activity of maturing oocytes inducing chromosome condensation in transplanted brain nuclei. *Dev Biol*; 35:283-292.
- ZOLLER L, WEISZ J (1978). Identification of cytochrome P-450, and its distribution in the membrana granulosa of preovulatory follicle using quantitative cytochemistry. *Endocrinology*; 103:310-313.
- ZUCKERMAN S (1951). The number of oocytes in the mature ovary. *Recent Prog Horm Res*; 6:63-108.