

Barrera hemo-folicular del vampiro
Desmodus rotundus
(Chiroptera, Desmodontidae) ¹

Lilliam Chuairé Noack, Biol. M. Sc.²,
 Martha Isabel Escobar, Biol. M. Sc.³,
 Hernán Pimienta, Biol. M.Sc.³.
 Margarita de Mejía, Lic. L. Clínico²
 y Jorge A. Aragón M.D., D.Sc.⁴

EXTRACTO

Se utilizó la peroxidasa, trazador enzimático de peso molecular relativamente bajo (40,000), para calcular la permeabilidad a ella por parte de los folículos en desarrollo en ovarios del vampiro *Desmodus rotundus*. El trazador se inyectó intravascularmente y se extrajeron los ovarios a distintos intervalos después del tratamiento.

Los resultados indican que la peroxidasa abandonó el lecho capilar 30 segundos después de la inyección, atravesó el endotelio y la lámina basal perivascular, pasó entre las células tecales e infiltró en la lámina basal que rodea los folículos en maduración, rodeó las células foliculares, saturando los espacios intercelulares, y apareció en la zona pelúcida de los folículos secundarios, terciarios y preovulatorios.

Bajo las condiciones del experimento, no se encontró el producto de reacción en los oocitos de los folículos preovulatorios. Este dato confirma la importancia definitiva del oolemma en el control de la permeabilidad y su papel estructural como componente de la barrera hemo-folicular. Los controles no presentaron actividad peroxidásica endógena.

INTRODUCCION

Durante mucho tiempo, las investigaciones realizadas en ovario se dirigieron de manera preferencial hacia el estudio de su estructura y función, quizás sin conceder importancia al tema de la permeabilidad de su aparato folicular. A este respecto es de interés anotar que, además de las sustancias normales que participan en los procesos fisiológicos y metabólicos, v.gr. hormonas y metabolitos¹, dentro del folículo ovárico pueden aparecer también otras como colorantes², trazadores³⁻⁷, antígenos séricos⁸⁻¹⁰, anticuerpos¹¹, agentes terapéuticos y tranquilizantes¹², que posiblemente afectan al desarrollo normal del oocito.

Por esta razón es necesario dilucidar los patrones de permeabilidad de las diversas estructuras intrafoliculares y, verificar si, como la postularon Zacharie¹³ en 1957 y posteriormente Shalgi *et al.*¹⁴ en 1973, a este nivel existe una barrera semipermeable que pueda controlar, mediante algún mecanismo, el transporte de sustancias extrañas al interior del oocito.

Por estos motivos y con base en investigaciones previas^{1,7,8,13-18} sobre el tema, se quiso estudiar la conducta permeable del folículo ovárico en el vampiro *Desmodus rotundus*, para aportar en lo posible, nuevos datos que clarifiquen la fisiología y los mecanismos de transporte de la barrera hemo-folicular^{13,14}. Este conjunto de estructuras que se relacionan entre sí física y funcionalmente, se ha explorado en forma parcial en algunas especies como rata, ratón, conejo y hamster^{1,7,8,10,15,16,18}, mas no así en otras, p.e. el vampiro, donde representaba una verdadera incógnita, razón por la cual se utilizó como sujeto experimental para esta investigación.

MATERIALES Y METODOS

1. Procedimientos de inyección

En el presente estudio se emplearon 10 hembras adultas (peso promedio 34 g), no embarazadas de *Desmodus rotundus*, de las cuales 2 se tomaron como controles. Bajo anestesia con

1. Trabajo auspiciado en parte por la División de Salud, Universidad del Valle, Cali y por el Programa Latinoamericano de Investigación en Reproducción Humana PLAMIRH.
 2. Auxiliar de Cátedra, Departamento de Morfología, División de Salud, Universidad del Valle, Cali, Colombia.
 3. Profesor Auxiliar, Departamento de Morfología, División de Salud, Universidad del Valle, Cali, Colombia.
 4. Profesor, Departamento de Morfología, División de Salud, Universidad del Valle, Cali, Colombia.

éter, los especímenes se inyectaron directamente en la vena superior del ala con una sola dosis de peroxidasa (Horseradish peroxidase, type II, Sigma Chemical) consistente en 2-3 mg por 10 g de peso corporal, disueltos en 0.1 ml de solución salina.

Después de la inyección, los ovarios se extrajeron a intervalos de 30 seg, 1 min, 2 min, 5 min, 15 min, 30 min, 60 min, y 120 min. Para eliminar variaciones intraespecíficas, se procuró obtener ovarios de individuos diferentes para un mismo intervalo.

2. Procedimientos citoquímicos y de microscopio de luz

Los ovarios se despojaron de los tejidos adiposo y conectivo y para fijarlos se sumergieron en una solución de glutaraldehído (Ladd Research Industries, Burlington-Vermont) al 2.5% en amortiguador fosfatado 0.1 M pH 7.5 durante 4 horas a 4°C.

Posteriormente se pasaron a solución de sacarosa (Sucrose grade I crystalline, Sigma Chemical) al 5% en amortiguador fosfatado 0.1 M pH 7.5, donde permanecieron durante 12 horas, al cabo de las cuales se cambiaron a amortiguador fosfatado 0.1 M pH 7.5.

Utilizando un criótomo (Lipshaw Manufacturing, Detroit, Mich.) los ovarios se seccionaron por congelación, en cortes, de 6 micras de espesor.

Para demostrar la actividad de peroxidasa, las secciones se incubaron por 20-30 minutos a 37°C en el medio DAB-H₂O₂ de Graham-Karnovsky¹⁹ que consiste de una solución preparada con 6 a 9 mg de 3,3 -diaminobencidina (Sigma Chemical) en 30 ml de amortiguador tris-HCL 0.05 M pH 7.5 a la que se añade 0.1 ml de H₂O₂ (Acqua ossigenata 120 vl x H₂O₂, Carlo Erba-Milán) al 31.5% hasta obtener una concentración final de 0.001%, de acuerdo con la modificación de Nakane y Pierce²⁰.

Para verificar si la coloración resultante no provenía de la actividad de la peroxidasa endógena ovárica, los ovarios de control, o sea los de los animales que no recibieron inyección de peroxidasa, se incubaron en un medio completo de DAB-H₂O₂. Todos los cortes se lavaron en tres cambios de agua destilada, luego se contrastaron con verde luz al 1% y se deshidrataron en alcoholes de grado creciente, en xilol-alcohol y en xilol.

Por último, todas las secciones se montaron para su estudio y observación con el microscopio de luz.

RESULTADOS

Al microscopio de luz, la peroxidasa aparece como un producto de color marrón que se localiza tanto en el lumen de los vasos sanguíneos como en el espacio extravascular del ovario (Figura 1). En los primeros intervalos después del tratamiento con peroxidasa (30 seg, 1 min, 2 min, 5 min, 15 min, y 30 min), la distribución de la enzima es idéntica, mas no su intensidad que aumenta gradualmente. En los intervalos tardíos (60 min, 120 min), se nota una marcada disminución y hasta ausencia del producto de reacción.

Sin embargo, dentro de una misma sección de tejido, la intensidad varía desde la periferia hacia la porción central del órgano, pues es mayor en el epitelio superficial y decrece a

nivel de la corteza, donde se encuentran los folículos en diferentes estados de maduración y el cuerpo lúteo, y en la medula, que contiene vasos sanguíneos y tejido intersticial (Figura 1).

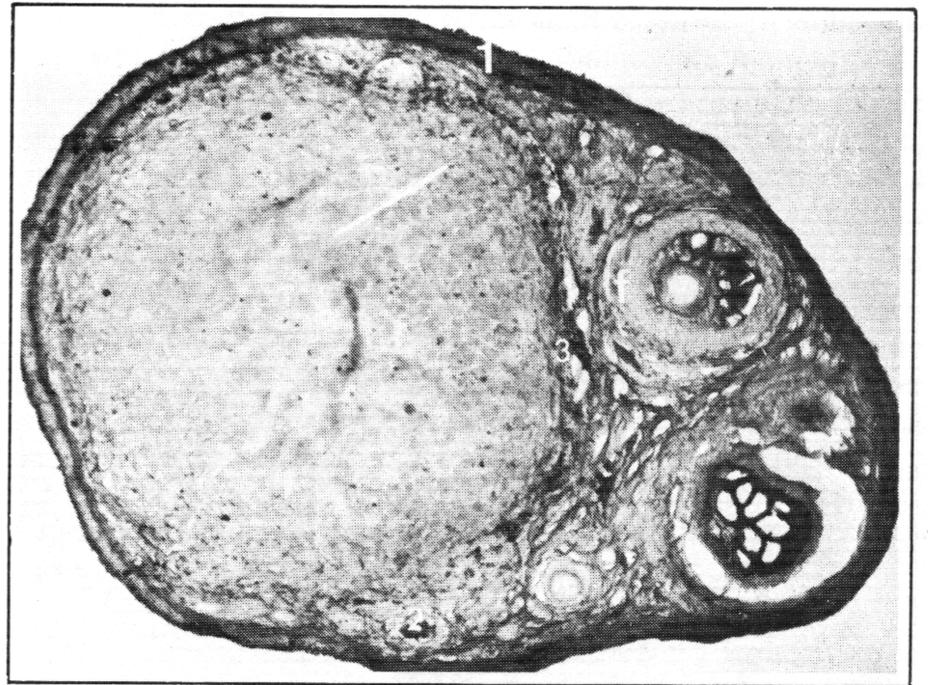


Figura 1. microfotografía de luz de un corte de ovario, 1 minuto después de la inyección de peroxidasa. En este corte aparecen las tres zonas de distribución del producto de reacción: La primera, más coloreada, en el epitelio germinal del ovario (1). La segunda, de coloración menos intensa, donde la peroxidasa se localiza en los folículos y en el cuerpo lúteo (2). La tercera, en la medula del ovario, donde el trazador aparece dentro de los vasos sanguíneos (3). Se aprecia un folículo en fase preovulatoria (f) invadido por la peroxidasa, especialmente a nivel del antro. Sin embargo el oocito se encuentra libre por completo de la proteína. X 140.

Al examinar en detalle los capilares sanguíneos, se observa que la peroxidasa forma conglomerados que se adhieren a su endotelio (Figura 2). Una vez que la proteína abandona esta estructura, ninguna región del aparato folicular impide su paso hacia la membrana plasmática del oocito. Así, en los folículos primordiales o unilaminares se sitúa sobre la lámina basal perifolicular, entre las células foliculares y sobre la superficie del oocito (Figura 2) y, con algunas excepciones, en el ooplasma.



Figura 2. Microfotografía de luz de un corte de ovario, 15 minutos después de la inyección de peroxidasa. En los folículos primarios (p), el producto de reacción ocupa la lámina basal perifolicular, y en el interior del oocito se observa como pequeños puntos. Aparece también un folículo secundario (s), donde la peroxidasa se localiza en la teca, en los intersticios entre las células foliculares, en la zona pelúcida y en el ooplasma. En el endotelio capilar (c), la peroxidasa forma conglomerados pequeños. X 600.

En los folículos secundarios o preantrales, se distribuye entre las fibras colágenas y elásticas del tejido conectivo de la teca, forma depósitos entre las células foliculares, y aparece como una placa densa en la zona pelúcida (Figura 3). Mientras que los oocitos de algunos folículos secundarios incorporaron el trazador, otros no lo hicieron (Figura 2).

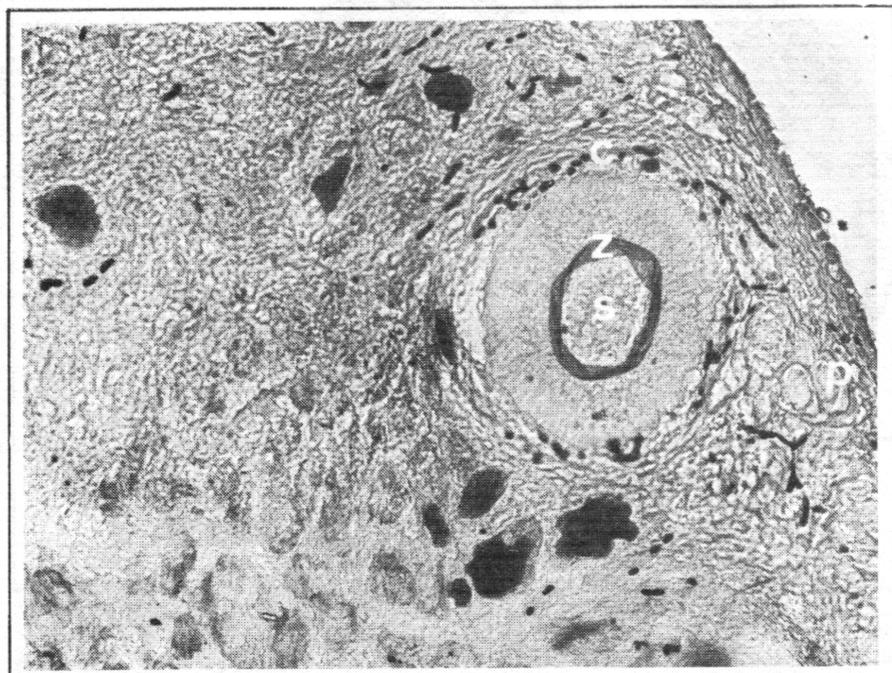


Figura 3. Microfotografía de luz de un corte de ovario, 5 minutos después de la inyección de peroxidasa. En esta sección de corteza, se aprecian algunos folículos primarios (p) donde el trazador ocupa la lámina basal perifolicular, notándose una coloración débil en el interior del oocito. El folículo de mayor tamaño (s), que corresponde a un folículo secundario o preantral, está rodeado por capilares múltiples (c) saturados de peroxidasa. La zona pelúcida (z), es accesible a la proteína. X 300.

En los folículos terciarios o antrales se repite la misma distribución que ocupa además los límites del antro y el ooplasma. Los folículos preovulatorios son también permeables a la peroxidasa, que se localiza principalmente en la cavidad antral y en la zona pelúcida, sin penetrar al interior del oocito (Figura 1). No fue posible determinar claramente al microscopio de luz si las células de tejido conectivo y las células intersticiales incorporaron peroxidasa por medio de vesículas o vacuolas. En contraste, la proteína es perfectamente visible en el espacio intercelular (Figura 4). En los ovarios de control la peroxidasa no mostró actividad endógena alguna.

DISCUSION

Se ha utilizado el vampiro **Desmodus rotundus** como sujeto experimental, por la relativa facilidad para adaptarse a la vida de laboratorio²¹ y por la necesidad de explorar algunos aspectos de su morfofisiología reproductiva, desconocidos hasta ahora, que pueden ser útiles en su posible control biológico. Esta última anotación es de importancia especial pues el vampiro **Desmodus rotundus** es un vector de varias enfermedades que como la rabia provoca pérdidas considerables de ganado vacuno en Latinoamérica, donde se ha constituido en una verdadera plaga²².

Por otra parte, en esta especie hay ciertas peculiaridades que permiten establecer algún paralelismo con la fisiología reproductiva de la mujer, como la aparición de procesos

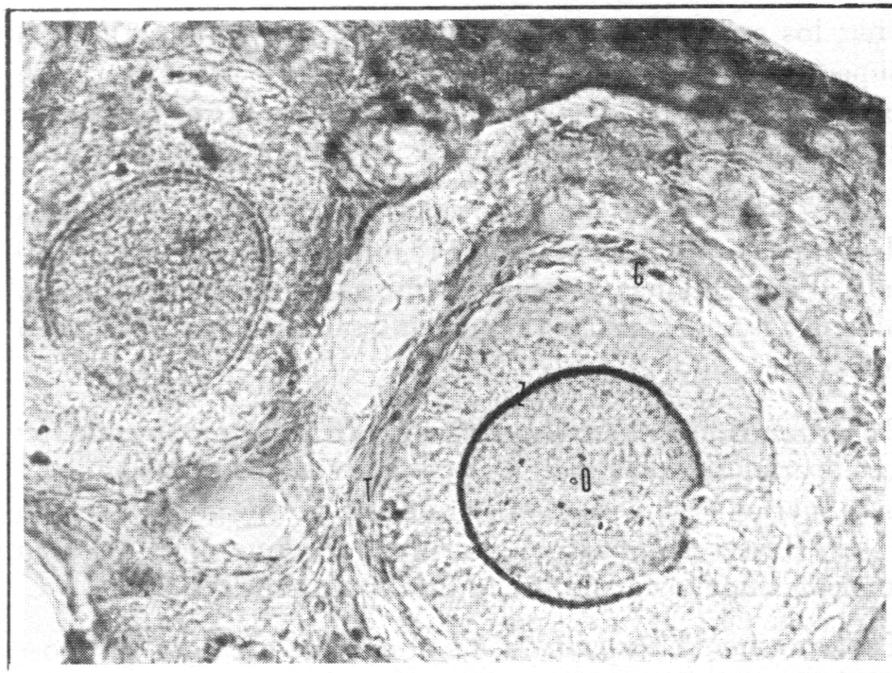


Figura 4. Microfotografía de luz de un corte de ovario, 2 minutos después de la inyección de peroxidasa. El trazador es claramente visible en los capilares perifoliculares (c), en la teca (t) en forma de líneas finas, y en las células foliculares. La reacción es fuerte a nivel de la zona pelúcida (z) y débil en el ooplasma (o) de este folículo secundario o preantral. X 800.

degenerativos en la capa funcional del endometrio, fenómeno que podría asimilarse a una menstruación²³; la funcionalidad de ambos ovarios y la liberación de solamente un oocito en cada ovulación²⁴, lo cual conduce, si hay fecundación, al nacimiento de una cría por año. El período de gestación en la hembra del **Desmodus rotundus** tiene una duración aproximada de siete meses²¹.

En el presente estudio se utilizó como trazador la peroxidasa, proteína de bajo peso molecular (40,000) y de poco tamaño (30-40 Å de diámetro)¹⁹.

Las preparaciones comerciales de peroxidasa contienen múltiples componentes que se pueden separar por electroforesis y que no difieren en tamaño, peso molecular, actividad enzimática, espectro de absorción o composición de aminoácidos²⁵. La alta actividad enzimática tiene un efecto amplificador, de tal manera que su localización en un determinado sitio se puede descubrir si se le permite actuar sobre un sustrato apropiado, como la 3,3 -diaminobencidina, en presencia de peróxido de hidrógeno (H₂O₂), lo cual conduce a la formación de un producto reactivo de color marrón, fácilmente observable al microscopio de luz²⁵.

Estas características indican que la técnica empleada provee una alta sensibilidad y es además ventajosa porque solamente los leucocitos y eritrocitos presentan una actividad peroxidásica significativa²⁰, de tal forma que la casi totalidad del marcador descubierto dentro de las diversas estructuras estudiadas no corresponden a peroxidasa endógena, pues ésta se halla confinada, por así decirlo, a estos corpúsculos sanguíneos, por lo cual no se puede evidenciar dentro de otro tipo de células.

Debido a estas razones la peroxidasa se usa ampliamente como trazador para estimar la permeabilidad tubular del riñón²⁶, de los capilares²⁵, de la barrera hematoencefálica^{27,28}, de la

barrera hematotesticular²⁹⁻³¹, y de los capilares y folículos ováricos^{1,16,18} en mamíferos.

Se ha observado que la peroxidasa puede inducir aumento en la permeabilidad vascular y daño similar al producido por las aminas vasoactivas^{1,32,33}. Sin embargo, estos efectos dependen de las dosis y especies utilizadas¹. Así, las cifras altas de peroxidasa por gramo de peso corporal, pueden causar ruptura de los complejos celulares de unión en el endotelio capilar y permitir una pérdida excesiva del trazador hacia el espacio extravascular^{1,32,33}. En el presente estudio, las cantidades que se usaron (2 a 3 mg/10 g de peso corporal) están por debajo de los niveles tóxicos.

Mientras los ratones y las ratas Wistar-Furth son resistentes a la acción liberadora de histamina y serotonina de la peroxidasa^{25,34}, los conejillos de Indias y las ratas Sprague-Dawley no lo son^{1,32}. Se ha determinado que las pérdidas extravasculares del trazador ocurren principalmente en las vénulas, dentro de los 5 minutos siguientes a la inyección y, que se pueden detener con el tratamiento previo de una combinación de antagonistas de la histamina y de la serotonina (metisérgido y tripolidina)^{1,25}. Cuando esto ocurre, disminuye la intensidad de la coloración del producto de reacción, efecto que se puede atribuir a un descenso del flujo sanguíneo ovárico o a un retardo en el movimiento del trazador a través de los complejos de unión interendoteliales¹. Aún no se ha establecido si en el vampiro ocurren cambios en la permeabilidad vascular inducidos por la peroxidasa, hipótesis que se confirmaría fácilmente si se observa con el microscopio electrónico una ruptura de los complejos de unión.

Por otra parte, se ha determinado que el transporte a través del endotelio capilar no se afecta ni por la pureza ni por el volumen de dilución del trazador¹.

Durante el proceso de los tejidos, es frecuente hallar artefactos de difusión creados por una absorción inespecífica de la peroxidasa en los núcleos y membranas celulares. Este efecto se puede contrarrestar si se proporciona al tejido una protección osmótica, por intermedio de una solución hipertónica de sacarosa añadida a los medios de fijación y lavado.

Los tejidos seccionados por congelación en cortes de 6 micras de espesor, se incubaron posteriormente en el medio Graham-Karnovsky¹⁹ por un período de 20 a 30 minutos, permitiendo así una mayor superficie de exposición al medio. Este procedimiento, empleado con éxito en otras oportunidades^{1,16,18}, mostró resultados satisfactorios porque no se presentaron artefactos de difusión susceptibles de interpretaciones erróneas.

Debido a la íntima relación que existe entre las composiciones químicas del líquido intersticial y del plasma sanguíneo, cualquier cambio en la concentración de un determinado ion o molécula en la sangre que irriga los tejidos, se refleja inmediatamente en variaciones de su concentración en el líquido intersticial. Los iones y las moléculas pequeñas como sodio, potasio, cloruro, bicarbonato, úrea, glucosa y agua, pasan sin ningún problema a través de la pared capilar, mientras que las moléculas grandes como las proteínas, lo hacen con dificultad bajo condiciones normales, y en el líquido tisular tienen

concentraciones bajas. Sin embargo, a causa de la vasta área de intercambio y del flujo de sangre que lo irriga, la cantidad de proteínas intercambiadas por día alcanza una magnitud apreciable³⁵. Si se inyecta una sustancia exógena capaz de difundirse en un tejido, la corriente sanguínea la lleva hasta el espacio intersticial, disminuyendo la cantidad o concentración de la sustancia a un ritmo que cambia a cada momento, de acuerdo con la concentración restante³⁶. Esto se puede aplicar al caso de la peroxidasa, teniendo presente que, además de tratarse de una sustancia exógena en estos experimentos, debe atravesar con algún grado de dificultad la pared capilar, debido a su estructura proteica. Los resultados indican que, a un intervalo tan corto como 30 segundos después de la inyección, la peroxidasa se ha difundido a través del endotelio capilar y de su lámina basal, para situarse en el espacio extravascular del ovario. La enzima se agrupa en pequeños conglomerados que se adhieren a la pared capilar, por lo cual es difícil discernir a nivel de microscopía óptica, si el transporte se efectúa a través de los espacios intercelulares del endotelio capilar o por intermedio de vacuolas o vesículas pinocitóticas.

Se puede definir la permeabilidad capilar como el grado en que el capilar permite el paso de una molécula determinada de acuerdo con su solubilidad en los lípidos y con su tamaño y su forma. La pared capilar actúa como una barrera pasiva, libremente permeable en toda su extensión a las moléculas liposolubles. Las que no son liposolubles, como la peroxidasa, no disponen para su intercambio de toda la superficie endotelial, y deben limitar su transporte a través de canales acuosos intracelulares o intercelulares, para llegar al espacio extravascular. Por consiguiente, el área real para la difusión de las moléculas insolubles en lípidos es menor que el área total de la membrana, y la velocidad de penetración capilar es menor que la de difusión libre³⁷.

Estos hechos llevan a pensar que el capilar sanguíneo restringe en algún grado el transporte de la peroxidasa desde el lumen hasta el espacio intersticial del ovario, y que la vía a seguir está constituida por los canales acuosos intra o intercelulares. De otro lado, en estudios con trazadores enzimáticos y proteicos, se ha establecido que los espacios y las uniones intercelulares del endotelio de los capilares de tipo continuo, son permeables a la peroxidasa^{25,38}, mientras que solamente las fenestras de los capilares discontinuos son permeables a este trazador³⁹. Otros cuerpos mayores como ferritina, dióxido de torio, oro coloidal, sulfito mercúrico y carbonato, son obstruidos por las fenestras y uniones, pero pueden ser transportados dentro de vesículas⁴⁰⁻⁴³, o en vacuolas fagocíticas⁴⁴, o vía "gap-junctions" en vasos normales⁴⁵, y en vasos tratados con histamina⁴⁶. Las uniones y las fenestras se pueden considerar como las manifestaciones físicas del sistema de "poros" pequeños³⁸, mientras que los sistemas de transporte por vesículas o vacuolas pueden representar los "poros" grandes que han propuesto algunos fisiólogos³⁵.

Aunque los capilares ováricos del vampiro no se han descrito ultraestructuralmente, se supone que son semejantes a los de otras especies de mamíferos, como el ratón hembra, donde Payer¹⁸ observó un endotelio de tipo continuo similar al

descrito por Bruns y Palade^{42, 47} y Karnovsky²⁵ en el lecho capilar del músculo esquelético; o como las ratas de las cepas Wistar-Furth y Sprague-Dawley, donde Anderson¹ demostró la presencia de un endotelio continuo con numerosas vacuolas o vesículas.

Este investigador observó uniones aparentes de la membrana celular, en los sitios donde se presentaban hendiduras o fisuras intercelulares estrechas (200 Å²), resultados que concuerdan con los obtenidos por Byskov⁴⁸ y Morris y Sass⁴⁵ en los capilares de los folículos preovulatorios de ratón hembra y en los del cuerpo lúteo de la rata, respectivamente.

Si los capilares del ovario del vampiro exhiben un endotelio de tipo continuo, su permeabilidad al paso de proteínas debe ser inferior a la de los capilares de hígado e intestino, donde hay un endotelio fenestrado y una permeabilidad alta a las proteínas, y similar a la de los capilares de músculo, piel, corazón y pulmones, que presentan un endotelio continuo y restringen el paso de proteínas en forma significativa³⁶.

Una vez que la peroxidasa se ha difundido a través del endotelio capilar y de su lámina basal, se sitúa en el espacio extravascular del ovario, bien sea para alcanzar las células y los elementos de tejido conectivo de la teca de los folículos en diferentes estados de desarrollo, o para penetrar al interior del cuerpo lúteo.

El folículo ovárico, encerrado por su lámina basal, es una estructura avascular^{45, 49}, afirmación válida para cualquier tamaño o estado de maduración folicular. El significado de esta disposición morfológica es que cada molécula destinada a entrar al folículo, debe abandonar el lecho capilar de la región perifolicular, atravesar la capa tecal y la lámina basal antes que ocurra una posible incorporación por parte de las células foliculares¹⁸.

En este recorrido que debe efectuar la peroxidasa, se encuentran las células intersticiales de la teca, que están separadas de los capilares por un espacio perivascular subendotelial similar al descrito en otros órganos endocrinos⁵⁰. No se sabe con exactitud qué función desempeñen estas células en relación con el transporte de sustancias extrañas al interior del folículo. Al respecto, E. Anderson¹⁶ observó una incorporación activa de la proteína por micropinocitosis, pero W. Anderson¹ opina que esas células actúan en procesos de fagocitosis, que pueden ocurrir en el caso de la peroxidasa, pero en una proporción limitada, pues el trazador es visible en el interior de los folículos. Aunque no existe una consideración definitiva sobre este punto, se puede afirmar que las células intersticiales y los elementos de tejido conectivo de la teca no actúan eficientemente en el control de la penetración de la proteína al interior del folículo.

Merk y col.⁵¹ definen la teca y la lámina basal perifolicular como barreras reguladas por hormonas al paso de determinadas sustancias; sin embargo, en los hallazgos del presente estudio no se han visto variaciones en la permeabilidad de estas estructuras a la peroxidasa, en relación con la fase del ciclo reproductivo en que se hallaban los especímenes en el momento de extraer los ovarios.

En este trabajo se observó que la lámina basal perifolicular no impide el paso del trazador al interior del folículo. Estos resultados concuerdan con los obtenidos por Anderson y Spielman¹⁷, quienes encontraron que la lámina basal era permeable libremente a partículas con pesos moleculares entre 12,000 y 500,000 (citocromo C, peroxidasa, hemoglobina, ferritina, catalasa, IgG-peroxidasa, complejo dextran-hierro y dióxido de torio) y dimensiones menores de 110 Å², mientras que moléculas mayores como el carbono (300-500 Å²) se excluían por completo. En apariencia la lámina basal no ejerce una selectividad de tipo químico, pues permite indistintamente el transporte de trazadores proteicos y polisacáridos¹⁷. Resultados similares obtuvo W. Anderson¹, quien considera dicha estructura como un filtro físico libremente permeable al paso de moléculas proteicas del tamaño de la peroxidasa (30-40 Å² de diámetro) y menos permeable a moléculas mayores (70-110 Å² de diámetro). Shalgi y col.¹⁴ mediante electroforesis de disco, técnicas inmunológicas y análisis químicos cuantitativos, compararon las proteínas del suero y del fluido folicular. Sus resultados demostraron que la barrera sangre-folículo actúa como un filtro molecular que permite el paso de proteína en proporción inversa a su peso molecular: bloquea el 50% de proteína con peso molecular de 250,000 y es impermeable a moléculas de peso molecular mayor a 850,000.

Según los resultados del presente estudio se considera que la lámina basal perifolicular permite la difusión libre de la peroxidasa, pues además de observar el trazador en el interior de los folículos, su peso molecular y su tamaño se encuentran dentro del rango de permeabilidad que se atribuye a esta estructura.

La peroxidasa permanece en el espacio intersticial del ovario por un corto período, y se distribuye entonces en diferentes regiones del ovario. Por una parte, penetra tanto al interior de los folículos en estados variables de maduración, como dentro del cuerpo lúteo. Por otra, una cantidad no determinada aún de la proteína, puede ser fagocitada por las células intersticiales de la teca^{1, 17}, o puede ser transportada por una vía linfática de drenaje¹, fenómeno que casi siempre ocurre con el fin de llevar de nuevo a la circulación sanguínea constituyentes del plasma y materiales extraños que se depositan en los espacios extravasculares³⁶, o se puede acumular en el epitelio superficial del ovario, como lo confirman los datos de la presente investigación. Cuando esto ocurre W. Anderson¹ opina que las células epiteliales fagocitan activamente las partículas y las transportan por medio de vesículas o vacuolas a la cavidad peritoneal. Sin embargo, Symons y Herbert¹¹ trabajando con IgG fluorescente, descubrieron este trazador solamente en los espacios intercelulares del epitelio, razón por la cual proponen que esta estructura representa una barrera para la difusión libre de la proteína hacia el fluido folicular, donde se hallaron en concentraciones menores (Figura 5).

Como en este trabajo se ha visto a la peroxidasa tanto en el espacio intercelular como en vacuolas intracelulares, es posible apoyar la hipótesis de W. Anderson¹ según la cual las células epiteliales son potencialmente fagocíticas, fenómeno que tiene por objeto llevar partículas extrañas desde el interior del ovario hasta la cavidad peritoneal, hecho que se confirma

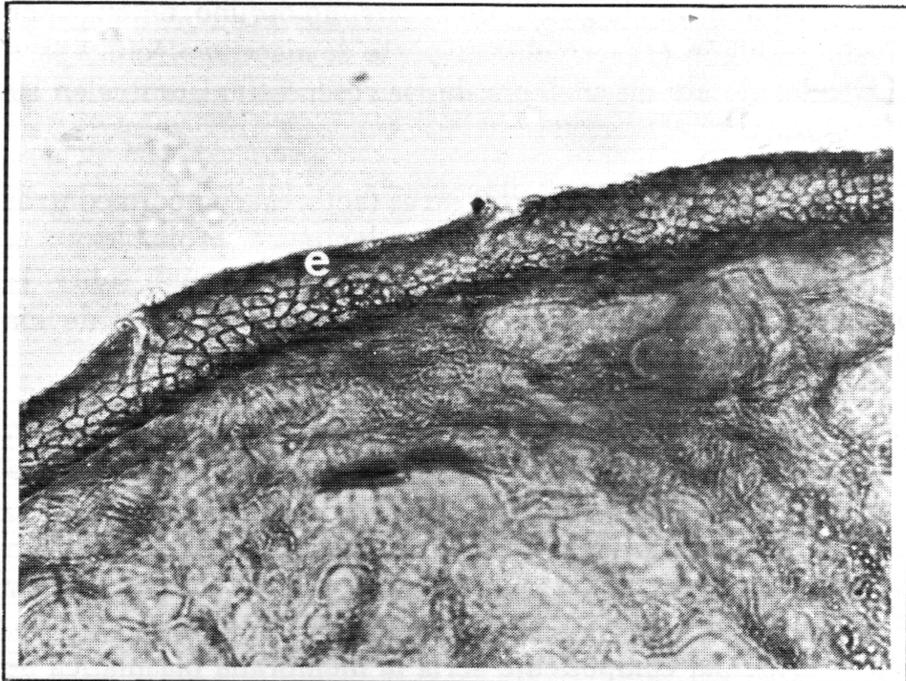


Figura 5. Microfotografía de luz de un corte de ovario, 1 minuto después de la inyección de peroxidasa. En esta sección de ovario, se aprecia la distribución del producto de reacción en el epitelio germinal (e) que ocupa los espacios intercelulares y la lámina basal. Hacia afuera, la peroxidasa rodea la superficie de la capa epitelial y aparece como una línea fina. X 600.

además en los resultados de este estudio por la presencia del producto de reacción sobre la superficie externa del epitelio.

El mecanismo de transferencia y absorción de vitelo desde la sangre hasta el oocito se ha examinado a nivel ultraestructural en ovarios de insectos^{17,52}, peces⁵³, anfibios⁵⁴, reptiles⁵⁵ y aves⁵⁶. Estos estudios han establecido claramente que las sustancias del plasma (proteínas y polisacáridos) se transfieren al oocito en forma relativamente intacta. Ellas atraviesan de manera preferencial los intersticios entre los tejidos perioocíticos para acumularse entre las células foliculares¹, o en el espacio perioocítico¹⁷. La hipótesis corriente supone que, durante la vitelogénesis, la mayoría de los precursores del vitelo se sintetiza fuera del ovario y se transporta vía espacios intercelulares entre las células foliculares, hasta la superficie del oocito, donde es tomada por pinocitosis y se almacena como vitelo. Además, en algunos insectos, las células foliculares sintetizan un producto que el oocito incorpora dentro del vitelo¹⁷.

En los mamíferos, las células foliculares y la zona pelúcida que rodean al oocito de los folículos terciarios y preovulatorios, están idealmente localizadas para formar una barrera al paso de proteínas desde el plasma hasta el oocito. Hope y col.⁵⁷, Hertig y Adams⁴⁹ y Neaves⁵⁵, suponen que los espacios entre las células foliculares representan la vía principal para la migración de materiales desde el plasma hasta el oocito.

Aunque algunos estudios inmunocitoquímicos sugieren también una vía extracelular en los folículos ováricos de mamíferos⁸, sin embargo, no es posible postular con toda certeza una vía intracelular concomitante. En el citoplasma de las células foliculares granulosa se han hallado ciertos antígenos séricos transferidos. E. Anderson¹⁶, observó que la peroxidasa cubría la superficie de las células foliculares y una ínfima cantidad de ella dentro del citoplasma. Según W. Anderson¹, los intersticios entre las células foliculares constituyen la vía principal por medio de la cual varios trazadores como peroxidasa y citocromo C abandonan el

plasma para difundirse entre las células foliculares, incorporarse al líquido folicular y saturar la zona pelúcida. El mismo investigador observó la presencia de pequeñas cantidades de estas proteínas en el citoplasma de las células foliculares. Estos resultados están acordes con los obtenidos por Payer¹⁸, quien indicó que las posibles uniones intercelulares entre las células foliculares no presentaban ningún tipo de restricción a la peroxidasa y a la ferritina, en oposición a la hipótesis sugerida por Espey y Stutts⁵⁸ y Merk y col.⁵¹, según la cual las células foliculares pueden actuar como una barrera para impedir que ciertas macromoléculas alcancen el oocito. Espey y Stutts⁵⁸ observaron la existencia de numerosas zónulas ocludentes entre las células foliculares, mientras que Merk y col.⁵¹ describieron un aumento en el número de "gap-junctions" o "nexos" entre células foliculares adyacentes, como respuesta a estrógeno exógeno en ratas hipofisectomizadas, y sugirieron un posible control hormonal de la permeabilidad de estas células. De otro lado, hay diversas hipótesis que apoyan la existencia de una vía intracelular a través de las células foliculares para el transporte de sustancias desde la sangre hasta el oocito. También se ha pensado que las protrusiones de las células foliculares, que atraviesan la zona pelúcida para hacer contacto con el oocito, pueden representar sitios de intercambio. Chiquoine⁵⁹ sugirió un movimiento de microvesículas a través de las protrusiones, o fagocitosis de las mismas protrusiones por el oocito. Anderson y Albertini⁶⁰ informan evidencia estructural de vías de comunicación, tipo "gap-junction" entre las proyecciones de las células foliculares y las microvellosidades del oolemma o la superficie libre de ellas, que pueden ser esenciales para la regulación de la función oocito-célula folicular, durante la foliculogénesis y la ovulación.

Sobre el interrogante de la vía que toman las sustancias endógenas o exógenas aún no hay una respuesta definida. Sin embargo, los resultados que aquí se informan indican claramente que la peroxidasa se sitúa entre las células foliculares, en ocasiones formando depósitos, y si bien no fue posible determinar a nivel de microscopía óptica si las células foliculares incorporaban la proteína por pinocitosis u otro proceso similar, es de esperar que esta cuestión sea resuelta posteriormente a nivel de microscopía electrónica. Por el momento, estos datos concuerdan con los obtenidos por E. Anderson¹⁶, W. Anderson¹ y Payer¹⁸ en el sentido que las células foliculares, a pesar de la posible presencia de zónulas ocludentes o de "gap-junctions" no constituyen *per se* una barrera a la difusión libre de peroxidasa desde la lámina basal perifolicular hasta la zona pelúcida.

De la misma manera, y aunque no hay observaciones preliminares al respecto es posible decir que el líquido folicular, además de contener sus componentes usuales, probablemente constituye un reservorio dinámico de sustancias extrañas capaces de penetrar al interior del folículo, como la peroxidasa, la cual según se aprecia satura en forma rápida el líquido que ocupa la cavidad antral. Por otra parte, y de acuerdo con lo observado, la zona pelúcida es libremente permeable al trazador que cubre toda su extensión, sin tener en cuenta el estado de madurez del folículo. Aunque hay algunos estudios que tienden a determinar los rangos de permeabilidad de la zona pelúcida^{1,7,9,15,16,18}, no ha sido posible, hasta el

momento, llegar a una conclusión definitiva. Sin embargo, el hallazgo de peroxidasa dentro de esta estructura --según los artículos de W. Anderson¹, Hastings y col.¹⁵, E. Anderson¹⁶, y Payer¹⁸ confirma la hipótesis que la zona no opondría restricción alguna a moléculas del mismo o menor peso molecular que la peroxidasa.

Se ha propuesto que el oocito incorpora macromoléculas por medio de procesos como difusión, pinocitosis activa, o fagocitosis^{1,61,62}. Presumiblemente el medio de transporte utilizado por la peroxidasa a través del oolemma corresponde a un proceso de pinocitosis, pues se hallaron en el ooplasma microvesículas que contenían la proteína, resultados acordes con los obtenidos por otros investigadores^{1,16-18}. En este punto se debe anotar que la incorporación de peroxidasa ocurrió muy lentamente y en consecuencia, la intensidad del producto de reacción no fue significativa. Por estas razones es lícito sugerir cómo lo hizo W. Anderson¹ que el oolemma opone algún grado, aún no definido, de rechazo hacia trazadores exógenos como la peroxidasa; de esta manera es válido postular que en el aparato folicular el oolemma es la estructura más efectiva para restringir el paso de sustancias hacia el ooplasma.

Según se observó en el presente estudio, la peroxidasa se localizaba de modo variable en el citoplasma del oocito: estuvo presente en la mayoría de los oocitos de los folículos primarios y secundarios, en los oocitos de todos los folículos terciarios pero en ninguno de los oocitos de los folículos preovulatorios.

Aún no es posible asegurar qué mecanismos fisicoquímicos o fisiológicos son los responsables de esta falta de uniformidad en la captación de peroxidasa. Quizás estas variaciones obedezcan a diferencias en el riego sanguíneo, de tal manera que mientras algunos folículos reciben un aporte abundante otros están pobremente irrigados y así aumenta o disminuye la oferta de peroxidasa.

Esta afirmación es válida para los folículos terciarios, en cuyos oocitos se encontró en forma invariable el producto de reacción pues el riego sanguíneo aumenta a un ritmo progresivamente mayor a medida que aumenta el tamaño del folículo y explica por qué los oocitos de algunos folículos primarios y secundarios no presentan peroxidasa, mientras sí se observa en los oocitos de los folículos terciarios.

Estos hechos también se pueden explicar por el hallazgo de concentraciones crecientes de estrógeno tisular en los folículos en crecimiento, que aumentarían la densidad, el tamaño y la permeabilidad de los capilares perifoliculares⁶³.

Cualquiera que sea el mecanismo, es claro que un aumento en el flujo sanguíneo concomitante con un incremento en la permeabilidad de los capilares, facilita la transferencia de sustancias desde el plasma hacia el interior del folículo. Así se explicaría la captación diferencial de peroxidasa. Sin embargo, esta hipótesis no es satisfactoria para comprender por qué en los oocitos de los folículos preovulatorios no apareció el trazador. Aquí cabe anotar que cuando el oocito se acerca a su desarrollo máximo sintetiza una cantidad cada vez menor de glicógeno, lípidos y proteínas a partir de las sustancias que le suministra el medio circundante. De esta manera es posible

que cuando haya alcanzado un desarrollo óptimo, detenga por medio de algún proceso el transporte de macromoléculas para depender de allí en adelante de las reservas existentes en su citoplasma⁶⁴.

Aunque no se deben descartar otros factores, como un control hormonal de la permeabilidad del oolemma, es probable que la anterior puede ser una explicación provisional sobre la ausencia de peroxidasa en el citoplasma del oocito de los folículos preovulatorios.

Para finalizar, los resultados de esta investigación pueden constituir un aporte útil al desarrollo de conceptos sobre la permeabilidad folicular del ovario, especialmente en lo relacionado con las distintas captaciones de peroxidasa, según el estado de madurez de los folículos. Todo esto viene a reforzar las evidencias sobre la realidad de una barrera sangre-folículo, cuyo principal componente sería la membrana plasmática de oocito (oolemma).

SUMMARY

To examine the permeability of developing follicles in vampire bat *Desmodus rotundus* ovaries, an intercellular tracer with enzymatic characteristics, horseradish peroxidase was used. At different intervals after intravenous tracer injection the ovaries were removed.

Results indicate that peroxidase readily passes across the blood capillaries endothelial wall and its basement lamina from which it moves through connective tissue cells forming the theca. The tracer permeates the perifollicular basement lamina and accumulates among follicle cells for saturating the zona pellucida of secondary, tertiary and preovulatory follicles; however, it is not incorporated by the latter oocyte. This is in contrast with the follicles oocytes in other maturational stages. Therefore, it is suggested that in the preovulatory stage, the barrier to the peroxidase free uptake is primarily located in the oolemma of oocytes.

REFERENCIAS

1. Anderson, W.A.: Permeability of ovarian blood vessels and follicles of juvenile rats. *Microvasc Res* 4: 348-373, 1972.
2. Burr, J.H. y Davis, J.I. 1951. Citado por 12. von Kaula, K.N., Aidawa, J.K. y Pettigrew, J.D.: Concentration in the human follicular fluid of radioactive tracers and drugs circulating in the blood. *Nature* 182: 1238-1239, 1958.
3. Böstrom, H. y Odeblad, E.: Autoradiographic observations on the uptake of S35 in the genital organs of the female rat and rabbit after injection of labelled sodium sulphate. *Acta Endocrinol* 10: 89-96, 1952.
4. Odeblad, E. 1952. Citado por 5. Odeblad, E. y Bostrom, H.A.: A time-picture relation study with autoradiography on the uptake of labelled sulphate in the Graafian follicles of the rabbit. *Acta Radiol* 39: 137-140 1953.
5. Odeblad, E. y Böstrom H.: A time picture relation study with autoradiography on the uptake of labelled sulphate in the Graafian follicles of the rabbit. *Acta Radiol* 39: 137-140, 1953.
6. Gothié, S. 1954. Citado por 12. von Kaula, K.N., Aidawa, J.K. y Pettigrew, J.D.: Concentration in the human follicular fluid of radioactive tracers and drugs circulating in the blood. *Nature* 182: 1238-1239, 1958.
7. Austin, C.R. y Lovelock, J.: Permeability of rabbit, rat and hamster egg membranes. *Exp Cell Res* 15: 260-261, 1958.
8. Mancini, R.E., Villar, O., Heinrich, J.J., Davidson, O.W. y Alvarez, B.: Transference of circulating labelled serum proteins to the follicle of the rat ovary. *J Histochem Cytochem* 11: 80-88, 1962.
9. Glass, L.E.: Serum antigen transfer in the mouse ovary: Dissimilar localization of bovine albumin and globulin. *Fertil Steril* 17: 226-233, 1966.

10. Glass, L.E. y Cons, J.M.: Stage dependent transfer of systemically injected foreign protein antigen and radiolabel into mouse ovarian follicles. **Anat Rec** 162: 139-155, 1968.
11. Symons, D.B.A. y Herbert, J.: Incidence of immunoglobulins in fluid of the rabbit genital tracts and the distribution of IgG-globulin in the tissues of the female tract. **J Reprod Fertil** 24: 55-62, 1971.
12. von Kaula, K.N., Aidawa, J.K. y Pettigrew, J.D.: Concentration in the human follicular fluid of radioactive tracers and drugs circulating in the blood. **Nature** 182: 1238-1239, 1958.
13. Zacharie, F.: Studies on the mechanism of ovulation: Autoradiographic investigations on the uptake radioactive sulfate (S35) into the ovarian follicular mucopolysaccharides. **Acta Endocrinol** 26: 215-223, 1957.
14. Shalgi, R., Kraicer, P., Rimon, A., Pinto, M. y Soferman, N.: Proteins of human follicular fluid: The blood-follicle barrier. **Fertil Steril** 24: 429-434, 1973.
15. Hastings II, R.A., Enders, A.C. y Schlafke, S.: Permeability of the zona pellucida to protein tracers. **Biol Reprod** 7: 288-296, 1972.
16. Anderson, E.: Observations on the uptake of horseradish peroxidase by developing oocytes of the rabbit. **J Cell Biol** 35: 160a, 1967.
17. Anderson, W.A. y Spielman, A.: Permeability of the ovarian follicle of *Aedes aegypti* mosquitoes. **J Cell Biol** 50: 201-221, 1971.
18. Payer, A.F.: Permeability of ovarian follicle and capillaries in mice. **Am J Anat** 142: 295-318, 1975.
19. Graham, R.C. y Karnovsky, M.J.: The early stages of absorption of injected horseradish peroxidase in the proximal tubules of mouse kidney. Ultrastructural cytochemistry by a new technique. **J Histochem Cytochem** 14: 291-302, 1966.
20. Nakane, P.K. y Pierce, G.B.: Enzyme-labeled antibodies for the light and electron microscopic localization of tissue antigens. **J Cell Biol** 33: 307-318, 1967.
21. Dickson, J.M. y Green, D.G.: The vampire bat (*Desmodus rotundus*) improved methods of laboratory care and handling. **Lab Anim** 4: 37-48, 1970.
22. Quintero, F. y Rasweiler, IV, J.J.: Ovulation and early embryonic development in the captive vampire bat, *Desmodus rotundus*. **J Reprod Fertil** 41: 265-273, 1974.
23. Quintero, F. y Rasweiler IV, J.J.: The reproductive biology of the female vampire bat *Desmodus rotundus*. **Am Zoo** 13: 1284, 1973.
24. Quintero, F.: Histoquímica del oviducto en el vampiro *Desmodus rotundus* durante el desarrollo de preimplantación. VII Reunión de la Asociación Latinoamericana de Investigaciones en Reproducción Humana (ALIRH) p. 70, 1977.
25. Karnovsky, M.J.: The ultrastructural basis of capillary permeability studied with peroxidase as a tracer. **J Cell Biol** 35: 213-236, 1967.
26. Straus, W.: Segregation of an intravenously injected protein by "droplets" of the cells of rat kidney. **J Biophys Biochem Cytol** 3: 1037-1039, 1957.
27. Reese T.S. y Karnovsky, M.J.: Fine structural localization of a blood-brain barrier to exogenous peroxidase. **J Cell Biol** 34: 207-217, 1967.
28. Díazgranados, S.J.: **Permeabilidad de la barrera hematoencefálica del ratón a la peroxidasa. Estudio comparativo a través de diferentes edades de desarrollo prenatal.** Tesis para Magister en Ciencias Morfológicas. Departamento de Morfología. Universidad del Valle, Cali, 1975.
29. Aragón, J.A. y Lustig, L.: Uptake of horseradish peroxidase by the testis and epididymis of mice. **J Reprod Fertil** 33: 189-195, 1973.
30. Vitale, R., Fawcett, D.W. y Dym, M.: The normal development of the blood-testis barrier and the effects of clomiphene and estrogen treatment. **Anat Rec** 176: 333-344, 1973.
31. Peña, C.E.: **Permeabilidad de la barrera hemato-testicular en el vampiro *Desmodus rotundus* a la peroxidasa.** Tesis para Magister en Ciencias Morfológicas. Departamento de Morfología. Universidad del Valle, Cali, 1978.
32. Cotran, R.S. y Karnovsky, M.J.: Vascular leakage induced by horseradish peroxidase in the rat. **Proc Soc Exp Biol Med** 126: 557-561, 1967.
33. Clementi, F.: Effect of horseradish peroxidase on mice lung capillaries permeability. **J Histochem Cytochem** 18: 887-892, 1970.
34. Cotran, R.S., Karnovsky, M.J. y Goth, A.: Resistance of Wistar-Furth rats to the mast cell-damaging effect of horseradish peroxidase. **J Histochem Cytochem** 16: 382-383, 1968.
35. Landis, E.M. y Pappenheimer, J.R.: Exchange of substances through the capillary walls. Circulation pp. 961-1034. En **Handbook of Physiology**. Ed. W.F. Hamilton y P. Dow, Vol II. Am Physiol Soc Washington, 1963.
36. Friedman, J.J.: Microcirculación. pp. 241-254. En **Fisiología**, 2a. edición pp. 1-790, Ed. E.D. Selkurt "El Ateneo", Buenos Aires, 1975.
37. Pappenheimer, J.R.: Passage of molecules through capillary walls. **Physiol Rev** 33: 387-423, 1953.
38. Karnovsky, M.J. 1970. Morphology of capillaries with special reference to muscle capillaries. Citado por I. Anderson, W.A. Permeability of ovarian blood vessels and follicles of juvenile rats. **Microvasc Res** 4: 348-373, 1972.
39. Clementi, F. y Palade, G.E.: Intestinal capillaries. I. Permeability to peroxidase and ferritin. **J Cell Biol** 41: 33-58, 1969.
40. Wissig, S.L.: An electron microscope study of the permeability of capillaries in muscle. **Anat Rec** 130: 467-468, 1958.
41. Jennings, M.A. y Florey, I.T.: An investigation of some properties of endothelium related to capillary permeability. **Proc R Soc Lond Ser. B** 167: 39-63, 1967.
42. Bruns, R.R. y Palade, G.E.: Studies on blood capillaries. II. Transport of ferritin molecules across the wall of muscle capillaries. **J Cell Biol** 37: 277-299, 1968.
43. Karnovsky, M.J. y Shea, S.M.: Transcapillary transport by pinocytosis. **Microvasc Res** 2: 253-360, 1970.
44. Cotran, R.S., 1967. The fine structure of the microvasculature in relation to normal and altered permeability. Citado por I. Anderson, W.A., 1972. Permeability of ovarian blood vessels and follicles of juvenile rats. **Microvasc Res** 4: 348-373, 1972.
45. Morris, B. y Sass, M.B.: The formation of lymph in the ovary. **Proc R Soc Lond, Ser. B** 164: 577-591, 1966.
46. Majno, G., Shea, S.M. y Leventhal, M.: Endothelial contraction induced by histaminergic mediators. An electron microscopic study. **J Cell Biol** 42: 647-672, 1969.
47. Bruns, R.R. y Palade, G.E.: Studies on blood capillaries I. General organization of blood capillaries in muscle. **J Cell Biol** 37: 244-276, 1968.
48. Byskov, A.G.S. 1969. Ultrastructural studies on the preovulatory follicle in the mouse ovary. Citado por 18. Payer, A.F. Permeability of ovarian follicles and capillaries in mice. **Am J Anat** 142: 295-318, 1975.
49. Hertig, A.T. y Adams, E.C.: Studies on the human oocyte and its follicle. I. Ultrastructural and histochemical observations on the primordial follicle stage. **J Cell Biol** 34: 647-675, 1967.
50. Harrison, R.J.: The structure of the ovary in mammals. pp. 143-187. En **The Ovary**, ed. S. Zuckerman, pp. 1-619, Vol. I Academic Press Inc. New York, 1963.
51. Merk, F.B., Boticelli, C.R. y Albright, J.T.: An intercellular response to estrogen by granulosa cells in the rat ovary: An electron microscopic study. **Endocrinology** 90: 992-1007, 1972.
52. Telfer, W.H.: The route of entry and localization of blood proteins in the oocytes of saturniid moths. **J Biophys Biochem Cytol** 9: 747-759, 1961.
53. Droller, M.J. y Roth, T.F.: An electron microscope study of yolk formation during oogenesis in *Lebistes reticulatus* guppy. **J Cell Biol** 28: 209-232, 1966.
54. Hann, W.E. 1967. Estradiol-induced vitellogenesis and concomitant fat mobilization in the lizard *Uta stansburiana*. Citado por I. Anderson, W.A. Permeability of ovarian blood vessels and follicles of juvenile rats. **Microvasc Res** 4: 348-373, 1972.
55. Neaves, W. 1970. The passage of extracellular tracers through the follicular epithelium of lizard ovaries. Citado por I. Anderson W.A. Permeability of ovarian blood vessels and follicles of juvenile rats. **Microvasc Res** 4: 348-373, 1972.
56. Knight, P.F. y Schechtman, A.M.: The passage of heterologous serum proteins from the circulation into the ovum of the fowl. **J Exp Zool** 127: 271-304, 1954.
57. Hope, J., Humphries, Jr. A.A. y Bourne, G.H.: Ultrastructural studies on developing oocytes of the salamander *Triturus viridescens*. I. The relationship between follicle cells and developing oocytes. **J Ultrastruct Res** 9: 302-324, 1963.
58. Espey, L.L. y Stutts, R.H.: Exchange of cytoplasm between cells of the membrane granulosa in rabbit ovarian follicles. **Biol Reprod** 6: 168-175, 1972.
59. Chiquoine, A.D.: The development of the zona pellucida of the mammalian ovum. **Am J Anat** 106: 149-169, 1960.
60. Anderson, E. y Albertini, D.F.: Gap junctions between the oocyte and companion follicle cells in the mammalian ovary. **J Cell Biol** 71: 680-686, 1976.
61. Anderson, E. y Brems, H.W.: Cytological observations on the fine structure of the Guinea pig ovary with special reference to the oogonium, primary oocyte and associated follicle cells. **J Ultrastruct Res** 3: 432-446, 1960.
62. Zamboni, L.: Ultrastructure of mammalian oocytes and ova. **Biol Reprod Suppl** 2: 44-63, 1970.
63. McNatty, K.: Follicular fluid, pp. 215-259. En **The Vertebrate Ovary. Comparative Biology and Evolution** pp. 1-853, Ed. R.E. Jones, Plenum Press, New York, 1978.
64. Brachet, J.: **Introducción a la Embriología Molecular**. 1a. edición p. 51 H. Blume Ediciones, Madrid, 1975.