

COLEGIO DE POSTGRADUADOS

INSTITUCIÓN DE ENSEÑANZA E INVESTIGACIÓN EN CIENCIAS AGRÍCOLAS

CAMPUS MONTECILLO

POSTGRADO DE RECURSOS GENÉTICOS Y PRODUCTIVIDAD

GANADERÍA

**SELENIO ORGÁNICO Y EXPRESIÓN FOLICULAR
DE LDLr Y SR-B1 *IN VITRO***

RIGOBERTO VÁZQUEZ DÍAZ

T E S I S

PRESENTADA COMO REQUISITO PARCIAL

PARA OBTENER EL GRADO DE:

MAESTRO EN CIENCIAS

MONTECILLO, TEXCOCO, EDO. DE MÉXICO

2018

CARTA DE CONSENTIMIENTO DE USO DE LOS DERECHOS DE AUTOR Y DE LAS REGALIAS COMERCIALES DE PRODUCTOS DE INVESTIGACION

En adición al beneficio ético, moral y académico que he obtenido durante mis estudios en el Colegio de Postgraduados, el que suscribe **Rigoberto Vázquez Díaz** Alumno de esta Institución, estoy de acuerdo en ser partícipe de las regalías económicas y/o académicas, de procedencia nacional e internacional, que se deriven del trabajo de investigación que realicé en esta institución, bajo la dirección del Profesor **Dra. Leonor Miranda Jiménez**, por lo que otorgo los derechos de autor de mi tesis **SELENIO ORGÁNICO Y EXPRESIÓN FOLICULAR DE LDLr Y SR-B1 IN VITRO**

y de los productos de dicha investigación al Colegio de Postgraduados. Las patentes y secretos industriales que se puedan derivar serán registrados a nombre del Colegio de Postgraduados y las regalías económicas que se deriven serán distribuidas entre la Institución, el Consejero o Director de Tesis y el que suscribe, de acuerdo a las negociaciones entre las tres partes, por ello me comprometo a no realizar ninguna acción que dañe el proceso de explotación comercial de dichos productos a favor de esta Institución.

Montecillo, Mpio. de Texcoco, Edo. de México, a 11 de Septiembre de 2018

Firma

Rigoberto Vázquez Díaz

Vo. Bo.

Dra. Leonor Miranda Jiménez
Consejera

La presente tesis titulada: **“SELENIO ORGÁNICO Y EXPRESIÓN FOLICULAR DE LDLr Y SR-B1 *IN VITRO*”** realizada por el alumno **“Rigoberto Vázquez Díaz”** bajo la dirección del Consejo Particular indicado, ha sido aprobada por el mismo y aceptada como requisito parcial para obtener el grado de:

MAESTRO EN CIENCIAS
RECURSOS GENÉTICOS Y PRODUCTIVIDAD
GANADERÍA

CONSEJO PARTICULAR

CONSEJERA



Dra. Leonor Miranda Jiménez

ASESOR (A)



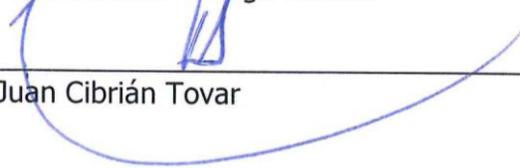
Dr. Adrián Raymundo Quero Carrillo

ASESOR (A)



Dra. María Esther Ortega Cerrilla

ASESOR (A)



Dr. Juan Cibrián Tovar

Montecillo, Texcoco, Estado de México, septiembre de 2018

SELENIO ORGÁNICO Y EXPRESIÓN FOLICULAR DE LDLr Y SR-BI *IN VITRO*

Rigoberto Vázquez Díaz, M. en C.

Colegio de Postgraduados, 2018

RESUMEN

El selenio es mineral esencial para los animales, influye en la actividad reproductiva provocando mejoras en los gametos, así como, aumento en la síntesis de hormonas esteroideas, para lo cual, el colesterol es molécula base. Existe información suficiente sobre la importancia del colesterol en la síntesis hormonal; sin embargo, es poca o nula la información existente sobre el efecto que la selenometionina puede desencadenar sobre la expresión de receptores para colesterol en células foliculares. Por lo que esta investigación partió de la hipótesis que, la exposición de folículos a selenometionina en dosis y tiempos diferentes determina la expresión de LDLr y SR-B1; receptores para lipoproteínas de baja (LDL) y alta densidad (HDL), respectivamente. El objetivo planteado fue: identificar si la exposición *in vitro* de folículos ováricos a selenometionina en dosis y tiempos diferentes afecta la expresión de LDLr y SR-B1, receptores que transportan colesterol a células esteroideogénicas. Se obtuvieron ovarios de ovejas, para extraer folículos entre 2 y 3 mm de diámetro, los cuales, fueron cultivados en medio enriquecido con selenometionina, a dosis de 0, 5, 10, 20 ng mL⁻¹ y tiempos de 24, 72 y 96 h. Después de suspender el cultivo, los folículos se fijaron con formol al 36% y embebieron en parafina, se realizaron cortes histológicos e inmunohistoquímica para determinar la expresión de receptores LDLr y SR-B1. Se usó un diseño completamente al azar con arreglo factorial 4 x 3 con submuestreo. Para analizar los datos se empleó el procedimiento PROC MIXED y la prueba de Tukey ($p < 0.05$) para la comparación de medias. Los resultados no mostraron diferencias debido al tratamiento y tiempo ($p > 0.05$) para ninguno de los receptores, solo para SR-B1 en la interacción tratamiento tiempo mostró diferencia ($p < 0.05$). La exposición de folículos ováricos a selenio orgánico en diferentes dosis y tiempo no influyó en la expresión y localización de receptores para lipoproteínas de baja densidad (LDLr); por otra parte a 5 ng mL⁻¹ por 72 h influyó en la cantidad de intensidad luminosa emitida por la expresión de receptores para lipoproteínas de alta densidad (SR-B1). La localización de receptores se observó en teca y granulosa de

forma uniforme y punteada en membrana celular, citoplasma, y área perinuclear de células foliculares. El selenio no fue determinante en la expresión y localización de los receptores a nivel de folículos los cuales pueden ser expuesto a dosis de 20 ng mL^{-1} de selenio hasta 96 h sin afectar su integridad, y mantiene actividad esteroideogénica.

Palabras clave: Selenio, ovario, lipoproteínas, colesterol, esteroideogénesis

SELENIUM ORGANIC AND EXPRESSION FOLLICULAR OF LDLR AND SR-B1 *IN VITRO*.

Rigoberto Vázquez Díaz, M. en C.
Colegio de Postgraduados, 2018

ABSTRACT

Selenium is essential for animals mineral, it influences in the reproductive activity leading improvements in the gametes, as well as, increase in the synthesis of hormones steroid, for which, the cholesterol is molecule it basis. There is sufficient information on the importance of cholesterol in the hormonal synthesis; however, is little or null information existent on the effect that the selenomethionine can unchain on the expression of receptors for cholesterol in follicular cells. So this research came from the hypothesis that, the exposure of follicles to selenomethionine in doses and different times determines the expression of LDLr and SR-B1; lower lipoprotein receptors (LDL) and high density (HDL), respectively. The stated objective was: to identify if *in vitro* exposure of ovarian follicles to doses selenomethionine and different times affects the expression of LDLr and SR-B1, receptors carrying cholesterol ins steroidogenic cells. Ovaries in sheep, were obtained to extract follicles between 2 and 3 mm in diameter, which, were cultivated between supplemented with selenomethionine, at doses of 0, 5, 10, 20 ng mL⁻¹ and times of 24, 72 and 96 h. after suspending the cultivation, the follicles were fixed with paraformaldehyde to 36% and that stepped on paraffin, histological and inmunohistochemical were carried out courts to determine the expression of LDLr and SR-B1 receptors. Completelly at random in arrangement with design was factorial 4 x 3 with subsampling. The PROC MIXED procedure and Tukey test was used to analyze the data ($p < 0.05$) for the comparison of means. The results showed no difference due to treatment and time ($p > 0.05$) for any of the receptors, only to SR-B1 in the interaction treatment time showed differences ($p < 0.05$). The exposure of ovarian follicles to organic selenium in different dose and time didn't influence in the expression and localization of receptors (LDLr); low density lipoprotein; In addition to 5 ng mL⁻¹ for 72 h influenced the amount of luminous intensity emitted by the expression of receptors for (SR-B1) high density lipoprotein.

Localization of receptors was observed in theca and granulosa of uniform dotted form in cell membrane, cytoplasm, and perinuclear area of follicular cells. Selenium was not decisive in the expression and localization of receptors at level of follicles which can be exposed to doses of 20 ng mL⁻¹ of selenium up to 96 h without affecting their integrity, and it maintains steroidogenic activity.

Keywords: selenium, ovary, lipoproteins, cholesterol, steroidogenesis

AGRADECIMIENTOS

A CONACyT (Consejo Nacional de Ciencia y Tecnología) por el apoyo económico que permitió pudiera continuar con mis estudios y lograr aportar en el área de la investigación.

A Colegio de Postgraduados por permitirme la oportunidad de realizar mis estudios de maestría.

A dios gracias por existir, por mi familia y amigos.

A mi madre y hermanos quienes me han apoyado durante el transcurso de mi vida.

A los doctores que formaron parte del consejo particular, por su paciencia, consejos y tiempo que me brindaron durante mi paso por esta institución. Excelentes profesionales y mejores personas. Mi mayor admiración y respeto para ellos.

Consejera:

Dra. Leonor Miranda Jiménez, por el tiempo, palabras y enseñanzas dentro y fuera de las aulas.

Asesores y sinodal:

Dr. Adrián Raymundo Quero Carrillo.

Dra. María Esther Ortega Cerrilla.

Dr. Juan Cibrián Tovar.

Dr. Glafiro Torres Hernández.

Por brindarme el tiempo, sugerencias, y sus palabras.

A mis amigos y compañeros a los cuales aprecio enormemente, por las buenas experiencias vividas en estos dos años.

CONTENIDO

RESUMEN.....	iv
ABSTRACT	vi
LISTA DE FIGURAS.....	x
1. INTRODUCCIÓN	1
2. HIPÓTESIS.....	2
3. OBJETIVO GENERAL	2
3.1. OBJETIVOS ESPECÍFICOS	2
4. REVISIÓN DE LITERATURA	3
4.1. SELENIO EN ALIMENTACIÓN ANIMAL	4
4.2. SELENIO EN LA REPRODUCCIÓN.....	5
4.3. SELENOPROTEINAS.....	6
4.4. OVARIOS.....	8
4.5. DESARROLLO FOLICULAR Y OVULACIÓN	8
4.6. COLESTEROL.....	10
4.7. TRANSPORTE DE COLESTEROL.....	12
4.8. CÉLULAS ESTEROIDOGÉNICAS	13
4.9. LIPOPROTEÍNAS	15
4.10. RECEPTORES PARA LIPOPROTEINAS DE BAJA DENSIDAD (LDLr)	16
4.11. RECEPTORES SR-B1 PARA LIPOPROTEÍNAS DE ALTA DENSIDAD.....	17
5. MATERIALES Y MÉTODOS	20
5.1. MANEJO DE OVARIOS.....	20
5.2. TRATAMIENTO	20
5.3. INMUNOHISTOQUÍMICA.....	21
5.4. VARIABLES EVALUADAS.....	22
5.5. DISEÑO EXPERIMENTAL Y ANÁLISIS ESTADÍSTICO	22
5.6. MODELO ESTADÍSTICO.....	23
6. RESULTADOS Y DISCUSIÓN	24
6.1. EXPRESIÓN DE RECEPTORES PARA LIPOPROTEÍNAS DE BAJA DENSIDAD (LDLr) 24	
6.2. EXPRESIÓN DE RECEPTORES SCARVENGER CLASE B TIPO I PARA LIPOPROTEINAS DE ALTA DENSIDAD (SR-B1).....	27
7. CONCLUSIONES	31
8. LITERATURA CITADA.....	32

LISTA DE FIGURAS

Figura 1. Representación esquemática de un folículo antral (Hennet y Combelles, 2012).....	9
Figura 2. Estructura de la lipoproteína de plasma LDL y sus componentes de colesterol y esteres de colesterol (Brown y Goldstein, 1986).....	11
Figura 3. Transformación de HDL a LDL, colesterol libre (FC), esteres de colesterol (EC), lipoproteínas de alta densidad (HDL), lipoproteínas de baja densidad (LDL), lipoproteínas de muy baja densidad (VLDL), lecitina colesterol acil transferasa (LCAT), triacil gliceroles (TG) (Myant, 1973).....	13
Figura 4. Proceso de esteroidogénesis en folículo, célula de teca y de la granulosa. (Botella, 1995).....	15
Figura 5. Mecanismo de acción de las partículas de LDL (Yen et al., 2001).	17
Figura 6. Distribución de tratamientos de selenometionina a folículos ováricos de ovejas <i>in vitro</i>	21
Figura 7. Expresión de LDLr en folículos <i>in vitro</i> tratados con selenometionina a diferentes tiempos (24, 72 y 96 h), intensidad luminosa en unidades candela (cd).....	25
Figura 8. Expresión y localización de LDLr folicular por exposición <i>in vitro</i> de selenometionina., LDLr se localizó de forma uniforme (doble flecha), o de forma irregular (gránulos; flecha simple) dentro de las células foliculares (A, B) o en las células del hígado (C) utilizadas como positivas para la expresión de estos receptores; D, control negativo. .	27
Figura 9. Expresión de SR-B1 en folículos <i>in vitro</i> tratados con selenometionina a diferentes tiempos (24, 72 y 96 h), intensidad luminosa (cd).....	29
Figura 10. Expresión y localización de SR-B1 folicular con exposición <i>in vitro</i> de selenometionina. SR-B1 se localizó de forma uniforme (A), o de forma irregular (gránulos; B) dentro de las células foliculares. El panel C, muestra las dos formas de localización de SR-B1 en tejido positivo a la expresión de este receptor (hígado), D; control negativo.	30

1. INTRODUCCIÓN

La inclusión de minerales en la dieta es esencial para las diversas actividades del organismo animal (Pieczyńska y Grajeta, 2015); de manera general, los minerales; están clasificados como esenciales y no esenciales, estructurales, electrolíticos y traza, refiriendo a la clasificación para uso en animales de interés zootécnico. Dentro de este último grupo se encuentra el selenio, que desempeña acciones importantes en defensa contra la acumulación de radicales libres como productos del metabolismo celular (Sordillo, 2016). Los animales pueden presentar problemas de salud por deficiencia de selenio, estos tienen impacto económico significativo al reducir la fertilidad y reducir las defensas contra afecciones como: retención de placenta e incidencia de mastitis y metritis (Spears y Weiss, 2008); lo anterior resulta en alteraciones que producen problemas de rentabilidad en sistemas de producción animal generando pérdidas tanto de animales como monetarias (Kumar *et al.*, 2011). La fertilidad puede incrementarse al agregar selenio y esta puede ser trastocada a nivel de muerte embrionaria durante el primer mes de gestación (Mehdi y Dufrasne, 2016), esto hace necesario mantener un nivel mínimo de este mineral y la administración del mismo puede hacerse de diferentes maneras, como, selenometionina, selenocisteína, selenito y selenato de sodio (Yue *et al.*, 2009). La respuesta a la adición de selenio depende de factores como: estado fisiológico, niveles corporales del mineral, tipo y vía de selenio utilizado (Mehdi y Dufrasne, 2016). La actividad ovárica en rumiantes es otra función reproductiva influenciada por los minerales, éstos están involucrados en la síntesis de hormonas importantes en reproducción. Basini y Tamanini (2000), reportan que el selenio actúa directamente sobre la proliferación de células de granulosa y síntesis de estradiol (E₂); en parte este efecto está mediado por la inhibición del óxido nítrico. También, a nivel de ovario Vázquez Hernández (2014), reportó que el selenio administrado a cabras, de manera temprana, disminuye inmediatamente la población de folículos pequeños y aumenta el número de folículos grandes; mientras que el efecto tardío es incrementar tanto la población de folículos pequeños como la de preovulatorios. En otro trabajo similar, con cultivo de ovarios de ratón en medio enriquecido con selenio se observó mayor número de folículos; acción atribuida a la disminución de sustancias reactivas al

oxígeno (Abdelahi *et al.*, 2010). En el proceso de desarrollo folicular el selenio está presente en la síntesis de hormonas esteroideas sintetizadas a partir de colesterol, por lo que, el aumento en síntesis o aporte de colesterol a nivel de ovario puede resultar en mayor concentración de estas hormonas y por consiguiente producir aumento en el número de folículos disponibles para ser fertilizados y asegurar la gestación. El presente trabajo se realizó para observar el efecto de las dosis y el tiempo de exposición folicular a selenometionina en la expresión y localización de LDLr y SR-B1, lo cual por consecuencia asegura la presencia de colesterol, molécula necesaria para la síntesis de hormonas esteroides.

2. HIPÓTESIS

- La exposición del folículo ovárico a selenio orgánico determina la expresión y localización de receptores para lipoproteínas de baja (LDL).y alta densidad (HDL).

3. OBJETIVO GENERAL

- Identificar si la dosis o el tiempo de exposición a selenio orgánico afecta la expresión y localización de receptores para lipoproteínas de baja (LDL) y alta densidad (HDL) las cuales intervienen en la captación de colesterol en el folículo ovárico.

3.1. OBJETIVOS ESPECÍFICOS

- Identificar la expresión y localización de receptores LDLr en folículos expuestos a selenio orgánico en diferentes dosis y tiempo.
- Identificar la expresión y localización de receptores SR-B1 en folículos expuestos a selenio orgánico en diferentes dosis y tiempo.

4. REVISIÓN DE LITERATURA

La inclusión de minerales en la dieta es esencial para que el organismo animal desempeñe sus funciones de manera correcta (Pieczyńska y Grajeta, 2015). Los micro minerales como; selenio, cobre, azufre, hierro, zinc, etc. están involucrados en diversos procesos biológicos al ser componentes de metalo-enzimas y co-factores de enzimas, también, trabajan como activadores de enzimas involucradas en mecanismos de desintoxicación celular por radicales libres y en la estabilización de moléculas secundarias. Algunos son componentes de hormonas involucradas directamente en la regulación de actividades endocrinas (Kumar *et al.*, 2011). Dentro de este grupo se encuentra el selenio, ampliamente distribuido en el ambiente, sus disponibilidad está limitada por factores geológicos y climáticos; mientras que en el organismo animal esta depende de prácticas de manejo en las unidades de producción (Basini y Tamanini, 2000).

El selenio es considerado como oligoelemento esencial para mamíferos (Schweizer y Schomburg, 2005) e importante en el desempeño adecuado del organismo (Mehdi *et al.*, 2013); el cual, se absorbe a nivel intestinal para ser llevado a hígado y vertido a circulación sanguínea, por donde se redistribuye a diferentes órganos del cuerpo para ser utilizado o almacenado en tejidos que contienen proteínas (Fernández Abella *et al.*, 2013), del aporte total de selenio se absorbe 70% a 95% en todas sus formas, esto varía según la fuente de consumo, forma química, concentraciones sanguíneas y tisular preexistentes (Finley, 2006), especie animal, presencia de otros minerales, variación genética entre individuos, mecanismos de transporte, distribución, excreción de selenio (Ceballos y Witter, 1996), rutas bioquímicas utilizadas (Behne y Kyriakopoulos, 2001) y actividad fisiológica del organismo.

4.1. SELENIO EN ALIMENTACIÓN ANIMAL

La tolerancia de los rumiantes (ganado lechero, bovinos, terneros y corderos) a dosis altas de levadura enriquecida con selenio es al menos 20 veces mayor a la permitida en Estados Unidos (0.30 mg kg^{-1} de MS; Juniper *et al.*, 2008). En producción animal, la deficiencia produce directa e indirectamente efectos negativos en crecimiento y desempeño del ganado (Mehdi y Dufrasne, 2016). Para el caso de nutrición animal, los elementos, se clasifican en tres grupos principales; estructurales, electrolíticos y traza. En el último grupo se encuentra el selenio, que tienen influencia en la mayoría de los procesos metabólicos, es importante como defensa contra la acumulación de radicales libres que son producto del metabolismo celular (Sordillo, 2016).

Los requerimientos diarios de selenio por el organismo animal se alcanzan con 0.3 ppm en la ración (Ceballos y Wittwer, 1996) y se puede administrar en diferentes formas: dietas, piensos o incluido en premezclas minerales. La disponibilidad de selenio va a depender de la fuente (Finley, 2006), puede ser incorporado de manera inorgánica u “orgánica”, esta última como selenometionina, forma en la que se encuentra de manera natural en ciertas: plantas, bacterias (ruminales) y algas marinas (Schrauzer, 2000), esta resulta mejor aprovechada por el organismo, además de evitar toxicidad al impedir o retrasar las acciones oxidativas (Martínez-Gómez *et al.*, 2012), también, se puede incorporar como selenocisteína o cualquier otra selenoproteína.

En los animales la adición de selenio debe realizarse en cantidades específicas para asegurar el funcionamiento apropiado del sistema inmune (Mehdi y Dufrasne, 2016) y reproductivo (Maiorino *et al.*, 1999; Rabiee *et al.*, 2010; Kumar *et al.*, 2011; Pieczyńska y Grajeta, 2015; Yattoo *et al.*, 2013), así como prevenir procesos inflamatorios, enfermedades autoinmunes, inmunodeficiencias, enfermedades cardiovasculares y neurálgicas (Schweizer y Schomburg, 2005), e infertilidad en vacas (Harrison *et al.*, 1984).

El exceso de selenio puede causar toxicidad (Mehdi y Dufrasne, 2016); sobre todo, cuando es adicionado en forma inorgánica: principal forma en que se utiliza en las dietas (selenito de sodio y selenato; Yue *et al.*, 2009). Algunos estudios indican que el selenio en forma orgánica (selenometionina o levadura enriquecida con selenio) resulta

un aditivo ideal, porque los animales lo absorben y retienen mejor que al selenio inorgánico (Ammerman y Miller, 1975). Finley (2006), menciona que la absorción de selenio orgánico alcanza 90-95 %; mientras que, la forma inorgánica solo el 10 %.

4.2. SELENIO EN LA REPRODUCCIÓN

El sistema reproductor tanto de hembras como de machos se expone a diferentes condiciones que afectan su funcionamiento: estrés calórico, problemas metabólicos y de defensa, en los cuales se generan radicales libres que afectan la capacidad reproductiva; a nivel de gónadas y útero, esto afecta la fertilidad, gestación y parto. El selenio, al formar parte de la enzima glutatión peróxidasa, evita el efecto negativo de los radicales libres. La adición de 0.3 y 0.5 mg kg⁻¹ de materia seca (MS) de selenio o selenometionina eleva la actividad de glutatión peróxidasa y otras enzimas antioxidantes y la concentración de selenio en sangre (Harrison *et al.*, 1984; Paszkowski *et al.*, 1995).

El aporte inadecuado de selenio causa diversos problemas de salud. En humanos con deficiencia de este mineral se puede presentar interrupción de la gestación, abortos, afecciones en el sistema nervioso e inmunológico del feto (Pieczyńska y Grajeta, 2015). Cuando se encuentra en cantidades óptimas aumenta la calidad del blastocito y la implantación (Mamon y Ramos, 2017) y se mejora la condición general del feto, dado que, parte del selenio es transmitido al feto a través de placenta (Kumar *et al.*, 2011), este evento puede presentarse en hembras de cualquier especie animal dado que la reproducción es un proceso con grandes similitudes en mamíferos.

La actividad ovárica en rumiantes está regulada por múltiples factores, entre los que se encuentra el efecto ejercido por los minerales. Para dar más claridad sobre la acción del selenio en aspectos reproductivos Vázquez *et al.* (2014), evaluaron cortes histológicos de ovarios de cabras tratadas con selenio; los diferentes estadios de desarrollo folicular provenientes de estos ovarios mostraron abundante irrigación, lo que puede relacionarse con mayor aporte de nutrientes e incluso colesterol, que es la molécula de la cual se originan las hormonas esteroideas sintetizadas y excretadas por el folículo. No obstante, la ruta molecular activada por el selenio para aumentar el riego

sanguíneo folicular no está clara y podría estar mediada por inhibición del óxido nítrico (Basini y Tamanini, 2000) o bien por aumento en presencia del factor de crecimiento endotelial vascular (VEGF); sin embargo, esto es solo una hipótesis.

El desarrollo del oocito es una de las actividades registradas a nivel de ovario y está determinada por interacciones endocrinas de factores paracrinós y autocrinós que llevan a la maduración del folículo y células localizadas en sus compartimentos, entre estas se encuentran: células de la granulosa y teca que al ser activadas permitirán la ovulación y luteinización y por tanto la liberación de un oocito maduro y en condición adecuada para ser fertilizado y progresar en su desarrollo durante la gestación. Al respecto existen estudios realizados con suplementación de selenio que han logrado incrementar la fertilidad e integridad de los oocitos y a la vez evitar la muerte celular prematura y mortalidad embrionaria (Agarwal *et al.*, 2005).

Las mejores etapas fisiológicas reproductivas para la suplementación con selenio son: pregestación y gestación (Mamon y Ramos, 2017), donde este mineral, protege al oocito de especies reactivas de oxígeno.

Los niveles de oxígeno y glutatión peroxidasa (GSHPx) son importantes para la evaluación del medio folicular. En humanos las pacientes con infertilidad inexplicada tienen niveles bajos de selenio a nivel folicular (Papaleo *et al.*, 2011), dado que este es componente de varias enzimas cruciales para la reproducción humana (Wdowiak *et al.*, 2017). En cuanto a hembras gestantes la inclusión de selenio en la dieta se involucra en la regulación de la foliculogénesis temprana y crecimiento del tejido ovárico (Grazul-Bilska *et al.*, 2009). Los estudios mencionados han permitido observar que el selenio como mineral esencial es determinante en el fenómeno reproductivo, caso específico es la actividad ovárica.

4.3. SELENOPROTEINAS

El selenio se encuentra unido a algunas proteínas formando selenoproteínas. A través de estas actúa como: mecanismo defensivo ante el estrés oxidativo, regulación de la actividad de la hormona tiroidea y el estado redox de la vitamina C y otras moléculas (Boosalis, 2008) como la peroxidasa.

Existen dos formas de selenoproteínas tisulares. La primera es la selenometionina; sustituida en varias proteínas en lugar del aminoácido metionina, representa la mitad del contenido de selenio en las dietas. La segunda es la selenocisteína, se encarga de regular la actividad biológica de la selenometionina, ambas son absorbidas en el intestino (Guimaraes *et al.*,1996) específicamente lo que respecta a selenometionina fue aprobado su uso en dietas para alimentación animal en 1970 (Schrauzer, 2001) y son consideradas como antioxidantes dietéticos (Boosalis, 2008). Investigaciones con ratones han permitido comprender el funcionamiento fisiológico de las selenoproteínas, sin embargo, muchas funciones de estas aún no son claras (Schweizer y Schomburg, 2005). Se han caracterizado e identificado alrededor de 30 selenoproteínas, de las más importantes seis son GPX, tres yodotironina deiodinasas (Ds) y tres tioredoxina reductasas (Basini y Tamanini, 2000). De igual forma se han comprobado las múltiples funciones que desempeñan en la señalización celular y modificación de la respuesta inmune, crecimiento y supervivencia celular y sistema endocrino (Beckett, 2005).

Las selenoproteínas proporcionan defensa contra el envejecimiento y daño al ADN en el ovocito, niveles altos de selenio y GPX1 se observan en células de la granulosa de folículos preovulatorios (Ceko *et al.*, 2014), además de expresar niveles altos de citocromo P450_{scc} (Irving-Rodgers *et al.*, 2009). Entre las proteínas del citocromo se encuentra el citocromo P450 (CYP-450), descrito como parte de la familia de hemoproteínas del grupo C encontradas desde bacterias hasta mamíferos, está localizado principalmente en membranas del retículo endoplasmático liso de las células del hígado, son enzimas responsables de la degradación de sustancias producidas por el propio organismo (esteroides, sales biliares, vitaminas liposolubles A y D, alcaloides endógenos, etc.) de las cuales, se han identificado más de 2,000 isoformas (Jaimes-Santoyo *et al.*, 2014). Las selenoproteínas tienen como función principal evitar actividad de óxido-reducción para brindar protección a las células y obtener energía a partir de la degradación de moléculas orgánicas.

4.4. OVARIOS

Son órganos glandulares, apareados, de forma ovoide, que producen hormonas sexuales y gametos femeninos dentro de los folículos. Están constituidos por epitelio germinal, corteza y médula, la corteza formada por tejido conectivo, vasos sanguíneos con ramificaciones que se extienden a la zona cortical (Van den Hurk y Santos, 2009). El ovario de mamíferos es responsable de generar oocitos (Kor *et al.*, 2013) requeridos para ser fertilizados y desarrollar un embrión, el microambiente del oocito está dado por varias capas de células de la granulosa que lo rodean (Tiwari *et al.*, 2015) y por concentraciones de cobre, zinc, cobalto, molibdeno y selenio, cuya concentración es mayor en folículos grandes, en comparación con el líquido de folículos pequeños. Miquilena y Moros (2012), encontraron en mujeres embarazadas mayor concentración de selenio presente en fluido folicular ($1.09 \mu\text{g dL}^{-1}$) comparado con las que no quedaron embarazadas ($0.94 \mu\text{g dL}^{-1}$). Se ha determinado que la sangre es la principal fuente de minerales traza en fluido folicular (Kor *et al.*, 2013); por lo cual, es importante proporcionar este tipo de minerales a los animales, para que se refleje en la circulación sanguínea y en el líquido folicular.

4.5. DESARROLLO FOLICULAR Y OVULACIÓN

Los folículos son estructuras embebidas en el estroma ovárico, el cual está compuesto por tejido conectivo vascularizado (Van den Hurk y Santos, 2009), y dos tipos principales de células: teca y granulosa. Las primeras, rodean la superficie externa del mismo y están en contacto con la capa de células de la granulosa; las segundas; cubren la parte interna del folículo y rodean al oocito, constituyendo el *cumulus oophorus*, muro folicular y la corona radiada, Figura 1; ambos grupos de células, en conjunto, se encargan de producir estrógenos (González del Pino, 2013). Las células de la teca se dividen en dos capas: interna y externa, la interna, es estimulada por LH y hCG para producir andrógenos que pasan a las células de la granulosa, donde serán aromatizados para transformarse en estrógenos, hormonas abundantes en los folículos ovulatorios, y específicamente en estradiol.

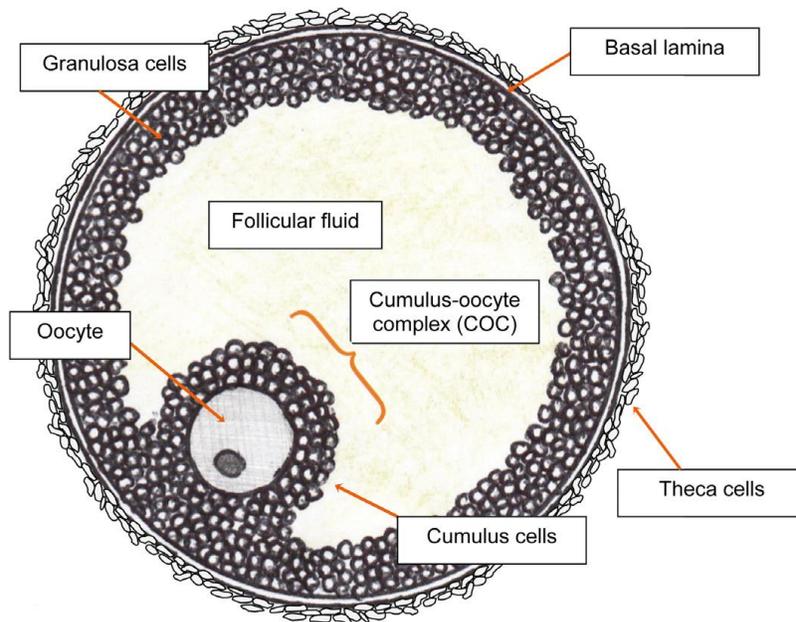


Figura 1. Representación esquemática de un folículo antral (Hennet y Combelles, 2012).

El desarrollo folicular es un evento fisiológico continuo (Abayasekara y Whathes, 1999). El desarrollo inicial es independiente de las gonadotropinas implicando factores intraováricos; posteriormente, el folículo adquiere receptores a gonadotropinas iniciando una etapa dependiente de estas hormonas (Baird y Campbell, 1998). Estudios *in vivo* e *in vitro* indican que la hormona folículo estimulante (FSH) activa el crecimiento del folículo preantral y con auxilio de la hormona LH lo lleva hasta la ovulación (Campbell *et al.*, 1995) y el aumento de esta última precede al reclutamiento de un grupo de folículos; los cuales, expresan ARNm que codifica para varias enzimas esteroidogénicas, receptores a gonadotropinas, factores reguladores locales como: factor de crecimiento similar a insulina (IGF) y transformante (TGF β), inhibinas activinas y proteínas morfogenéticas que se activan junto con gonadotropinas durante el desarrollo folicular (Webb *et al* 2003). Lo anterior resulta indispensable para que crezcan hasta liberar uno o varios óvulos en el proceso llamado ovulación; en caso contrario, sufren atresia (Adams *et al.*, 1994), la cual se ve reducida en folículos grandes en respuesta a gonadotropinas (Ben Saíd *et al.*, 2007). Regularmente, en ovejas y vacas existe una sola ovulación liberando varios óvulos dependiendo de la fase en que se encuentre ya sea de reclutamiento o selección. La tasa de ovulación

puede ser manipulada, administrando hormonas exógenas (gonadotropinas), y modificaciones en la dieta en periodos críticos de crecimiento del folículo (Hunter *et al.*, 2004). En los estudios de mecanismos responsables del desarrollo folicular y diferenciación, las ovejas han demostrado ser excelente modelo experimental porque su tasa de ovulación se ve afectada por diferencias genéticas y factores ambientales como: fotoperiodo, dieta y estrés. El ganado bovino, también, ha sido útil porque los procesos que conducen a la ovulación en la vaca están estrechamente controlados por diferentes factores; en éstas, la ovulación múltiple es rara comparada con la de ovejas y otras especies como la rata, ya que constantemente tienen tasa de ovulación elevada (Baird y Campbell, 1998; Scaramuzzi *et al.*, 2011). En el desarrollo folicular correcto, en la etapa de ovulación y diferenciación, las células de la granulosa se luteinizan, para formar cuerpos lúteos que van a producir progesterona y al igual que en el caso de los estrógenos, son sintetizados directamente del colesterol (Krieger *et al.*, 2001).

Hembras específicamente ruminantes, presentan un número de folículos establecido desde la edad fetal, además su tasa de ovulación es un factor determinante del tamaño de la camada.

4.6. COLESTEROL

El colesterol es una molécula con actividad dual, significa que puede tener efectos benéficos y tóxicos por ser soluble en agua (Brown y Goldstein, 1986), forma parte de la estructura de la membrana celular (Krieger *et al.*, 2001). Esta molécula es sintetizada a partir de la acetil-CoA y en su síntesis participan al menos 30 enzimas, se encuentra en: lipoproteínas, colesterol libre o como esteres de colesterol (Fig. 2). En la esteroidogénesis, los esteres son esterificados a través de 3 β -hidroxiesteroide deshidrogenasa (3 β HSD (Christenson y Devoto, 2003). El colesterol entra de manera directa, por vía sanguínea, como lipoproteínas de alta o baja densidad, se obtiene de los alimentos consumidos y otra parte se sintetiza en el mismo organismo (síntesis *de novo*), específicamente en el hígado y de ahí pasa a la sangre, al parecer; a este nivel el selenio influye en el aumento de colesterol (Rayman *et al.*, 2011).

La absorción de colesterol se realiza en el intestino delgado específicamente en la parte proximal del yeyuno, es mediada por una proteína transportadora específica

(Atmann *et al.*, 2004), posteriormente se aprovecha para el crecimiento y la réplica de células en mamíferos. Otra característica importante es su utilización como sustrato para la producción de ácidos biliares y hormonas esteroideas (Goldstein y Brown, 1985; Martínez *et al.*, 2001, Krieger *et al.*, 2001), esta última acción es considerada fundamental en reproducción animal.

La cantidad total intercambiable de este compuesto varía entre tejidos por lo que resulta difícil medir la cantidad exacta contenida en todo el cuerpo, dado que puede acumularse en los tejidos sin presentar cambios en la concentración (Myant, 1973).

A nivel de mitocondria, la proteína steroidogenic acute regulatory (STAR) se encarga de regular el movimiento de colesterol de la membrana externa hacia la interna (Christenson y Devoto, 2003), en donde se encontrará con la maquinaria enzimática específica para la síntesis de esteroides.

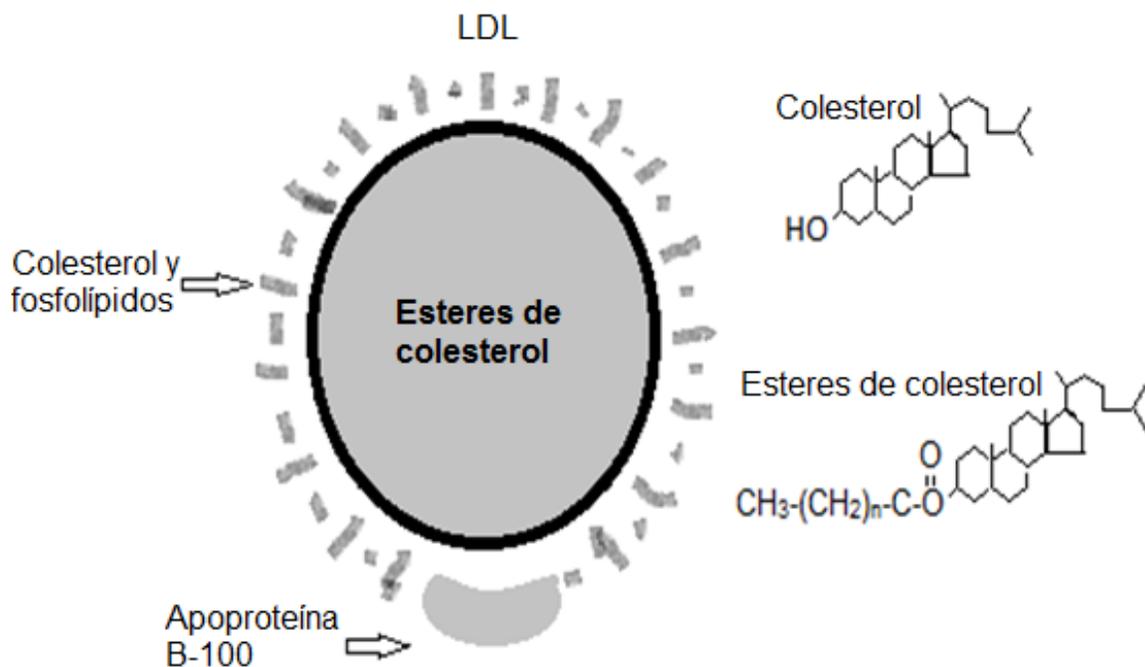


Figura 2. Estructura de la lipoproteína de plasma LDL y sus componentes de colesterol y esteroides de colesterol (Brown y Goldstein, 1986).

4.7. TRANSPORTE DE COLESTEROL

La principal forma utilizada por la célula para obtener colesterol es por endocitosis de partículas LDL o captación selectiva de ésteres de colesterol de HDL (Figura. 2; Brown y Goldstein, 1986). El colesterol se encuentra en todas las lipoproteínas del plasma y se transporta como lipoproteínas LDL o HDL. Dos terceras partes del colesterol se esterifican con ácidos grasos de cadena larga como el ácido linoleico y, estos ésteres de colesterol en plasma están en constante renovación y resíntesis continua; por otra parte, la mayor parte del colesterol esterificado en plasma se encuentra en forma de lipoproteínas HDL, que después se transfiere a LDL y lipoproteínas de muy baja densidad (VLDL; Figura. 3; Myant, 1973), y se deposita como esterol no esterificado en el compartimento endosomal de la célula (Xie *et al.*, 2006). En células esteroideogénicas el colesterol es transportado por un complejo proteico (receptores) a través de puntos específicos, a nivel de membrana; estas estructuras permiten que el transporte de colesterol se realice desde el citoplasma hasta el citocromo P450_{scc}, encargado de la ruptura de la cadena lateral del colesterol, de igual manera son requeridos diferentes tipos de uniones multiproteicas, las cuales requieren guanosín trifosfato (GTP) usado en el metabolismo celular que se asocia a la enzima GTPasa, además de la intervención de otras enzimas que van a actuar en el transporte de colesterol localizado en LDL. Sin embargo la función enzimática va a depender de cual sea el destino que tendrá la lipoproteína, ya sea membrana interna, o externa, espacio intermembranal o interior mitocondrial (Schroder y Power, 1997). En células ováricas como las del *cummulus* y ovocito, la actividad enzimática para el transporte de colesterol puede ser diferencial al resto de células con actividad esteroideogénica (Miranda *et al.*, 2010) dado que se requiere del transporte tanto de LDL como de HDL.

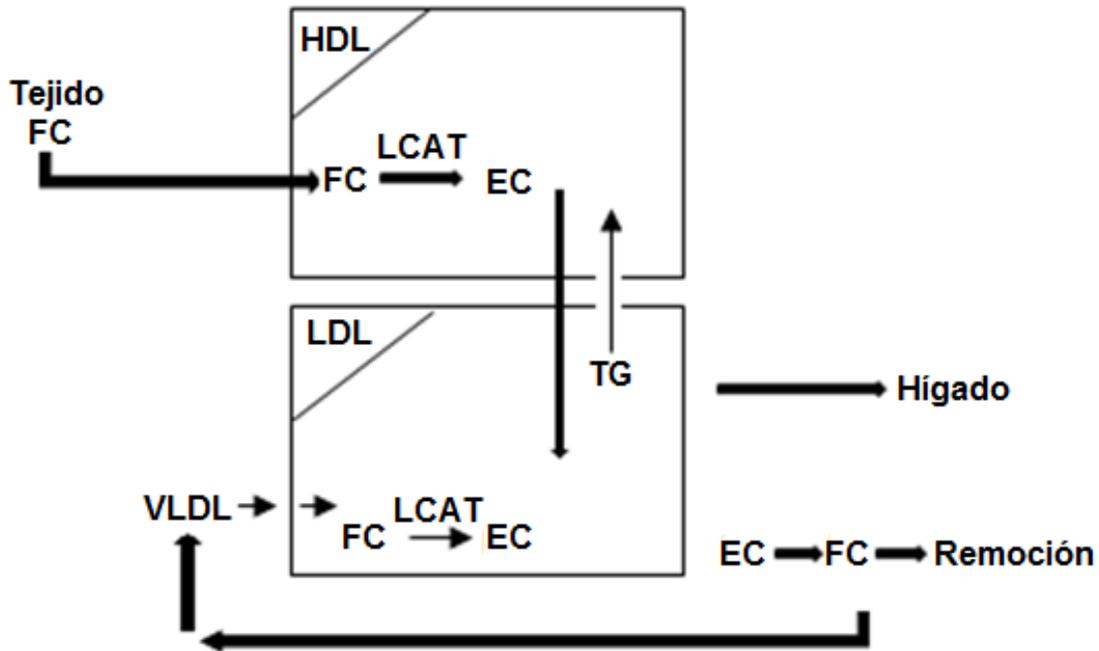


Figura 3. Transformación de HDL a LDL, colesterol libre (FC), ésteres de colesterol (EC), lipoproteínas de alta densidad (HDL), lipoproteínas de baja densidad (LDL), lipoproteínas de muy baja densidad (VLDL), lecitina colesterol acil transferasa (LCAT), triacil glicérols (TG) (Myant, 1973).

4.8. CÉLULAS ESTEROIDOGÉNICAS

A nivel de ovario y a lo largo del ciclo menstrual o estral, las células de la granulosa, teca y cuerpo lúteo, se encargan de producir esteroides mediante un complejo enzimático clave (P450_{scc}, 3 β HSD, citocromo P450 17- α -hidroxilasa y citocromo P450 aromatasa (Figura. 4; Botella, 1995). Antes de la ovulación las células de la granulosa muestran acumulación de ésteres de colesterol y los niveles de co-reguladores del receptor de esteroides juegan un papel importante en la modulación de la sensibilidad y capacidad de respuesta del tejido (Ho, 2003) para la síntesis de esteroides.

La esteroidogénesis originada a partir del colesterol puede darse a partir de la absorción de esta molécula que es transportada en LDL o HDL, o por el colesterol obtenido de la síntesis *de novo* (Xie *et al.*, 2006). También puede obtenerse de los

depósitos de ésteres presentes en vacuolas lipídicas intracelulares (Christenson y Devoto, 2003), como fuente de reserva.

Los tejidos esteroideogénicos se dividen en dos grandes grupos: los que sintetizan pregnolona como respuesta a un estímulo hormonal externo bien determinado, como en el ovario, las glándulas suprarrenales y el testículo; y un segundo grupo que incluye la placenta y el cerebro, que sintetizan hormonas esteroideas y que responden a estímulos autocrinos y paracrinos aún no identificados (Martínez *et al.*, 2001).

Los primeros estudios sobre el mecanismo de regulación de la síntesis de hormonas esteroideas fueron realizados en glándula suprarrenal (Stocco y Clark, 1996), considerada como tejido esteroideogénico principal. En otros órganos con actividad esteroideogénica, la ruta utilizada con este fin es similar.

En el ovario, al momento de la ovulación, las células de la teca incrementan la producción de (StAR), que tiene como función principal regular el transporte de colesterol en la mitocondria, estimulando la producción de andrógenos (Kallen *et al.*, 1998).

El primer paso es la conversión de colesterol a pregnolona; en los pasos siguientes, existen variaciones que dependen de ciertas enzimas específicas en cada tejido. De inicio, se facilita el suministro de colesterol a la membrana mitocondrial interna donde sirve como sustrato para la ruptura de la cadena lateral del citocromo P450 (P450_{scc}). A lo largo del proceso actúa el citocromo P450 en sus diferentes tipos hasta lograr la conversión de colesterol a pregnenolona. Los pasos siguientes son dependientes de hormonas tróficas (Stocco y Clark, 1996): ACTH en corteza adrenal, FSH y LH en gónadas, hasta lograr la obtención de esteroideas específicas para cada tejido.

A nivel de cuerpo lúteo las células tienen la capacidad de producir colesterol *novoo*, sin embargo, esta fuente no es importante en el funcionamiento normal de células lúteas, por los bajos niveles de HMG-CoA reductasa; enzima limitante de la velocidad en la ruta biosintética del colesterol, además de la falta de otras enzimas implicadas en

la biosíntesis de colesterol (Gwynne y Strauss III, 1982). Sin embargo, a este nivel los principales mecanismos para la obtención de colesterol pueden ser, ya sea, por endocitosis de las lipoproteínas de baja densidad LDL; ricas en colesterol, ó por captación selectiva de ésteres de colesterol, a través de lipoproteínas de alta densidad HDL (Christenson y Devoto, 2003). Siendo esta ruta la más común (81-98%) para la adquisición de colesterol (Xie *et al.*, 2006).

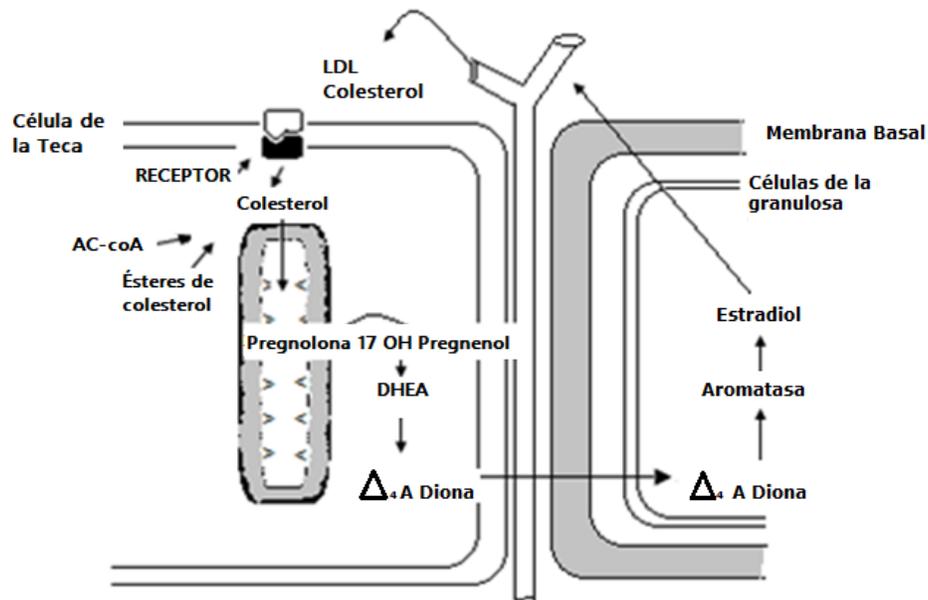


Figura 4. Proceso de esteroidogénesis en folículo, célula de teca y de la granulosa. (Botella, 1995).

4.9. LIPOPROTEÍNAS

Las lipoproteínas en plasma son la principal fuente de colesterol obtenido por la teca y células de la granulosa para la esteroidogénesis (Argov y Sklan, 2004), están compuestas de proteínas y depósitos de fosfolípidos que rodean el núcleo de lípidos neutros. Existen cinco lipoproteínas principales: de baja densidad (LDL), alta densidad (HDL), muy baja densidad (VLDL), transportador de triglicéridos sintetizados por el hígado, y quilomicrones, además el transportador de lípidos de la dieta y son sintetizados en el intestino delgado (Krieger *et al.*, 2001).

Entre los años 1950 y 1960 fueron identificadas dos principales lipoproteínas sanguíneas portadoras de colesterol: LDL y HDL (Goldstein y Brown, 2009).

4.10. RECEPTORES PARA LIPOPROTEINAS DE BAJA DENSIDAD (LDLr)

En el caso de lipoproteínas LDL, estas son reconocidas como la mayor fuente de colesterol para la biosíntesis de esteroides (Figura 5), su estructura consta de un núcleo micelar de lípidos no polares, incluidos triglicéridos y ésteres de colesterol rodeados por colesterol libre y fosfolípidos (Myant, 1973). Contienen aproximadamente 1700 moléculas (Xie *et al.*, 2006), las cuales son rápidamente internalizadas e hidrolizadas a aminoácidos, esto ocurre a nivel de lisosomas; lo anterior, a diferencia de los ésteres de colesterol, que se hidrolizan mediante una lipasa ácida liberando colesterol, el cual queda a disposición de los fibroblastos que actúan mediante un mecanismo especial para transportar la lipoproteína desde la superficie de la membrana al lisosoma, el cual es el único organelo donde es degradada rápida y completamente (Brown y Goldstein, 1986). El colesterol extracelular puede ser incorporado a la célula principalmente a través de partículas de LDL, mediado por receptores de estas lipoproteínas (LDLr; Martínez *et al.*, 2001), estos receptores se encuentran en la superficie de la membrana y son sintetizados cuando son requeridos. El descubrimiento de receptores LDLr en 1972, fue importante para explicar la homeostasis del colesterol plasmático y explicar las anomalías en la regulación del metabolismo del colesterol en pacientes con hipercolesterolemia familiar. Este se dio a través de su purificación en la corteza suprarrenal bovina (Wolfgang *et al.*, 1982); lo anterior, a partir de un precursor de 860 aminoácidos. Los primeros 21 aminoácidos son removidos de la superficie celular, dejando una proteína madura de 839 aminoácidos que es sintetizada en el retículo endoplasmático rugoso (ER). En la década de 1980 esta proteína fue caracterizada por completo, sus dominios son múltiples al igual que otros receptores que dirigen el movimiento del colesterol, estos dominios están codificados en exones, que a su vez, pueden ser compartidos entre muchas proteínas. El receptor LDLr se considera una glicoproteína de 160 (kDa) que se expresa en la mayoría de las células, debido a su contenido en apoproteína B 100 (apoB100), involucrada también en la movilización del colesterol en sangre, reconocida como el principal ligando para partículas LDL, así como la apoproteína E (apoE) igual de importante en la captación de estas lipoproteínas, partículas de quilomicrones, VLDL. LDLr, genéticamente presenta mutaciones que evitan el libre movimiento del colesterol entre organelos celulares

(Brown y Goldstein, 1986), LDLr se considera una proteína de mosaico, formada a partir de exones compartidos entre diferentes proteínas, por lo que pertenece a varias familias con origen genético similar. Para el caso del RNAm de LDLr, éste contiene más de 45 kilobases de longitud y 18 exones (Sudhof *et al.*, 1985).

Existen otros receptores altamente expresados en ciertas células esteroidogénicas; los cuales median la transferencia selectiva de ésteres de colesterol por HDL mediante procesos diferentes a la ruta normal de endocitosis (Acton *et al.*, 1996).

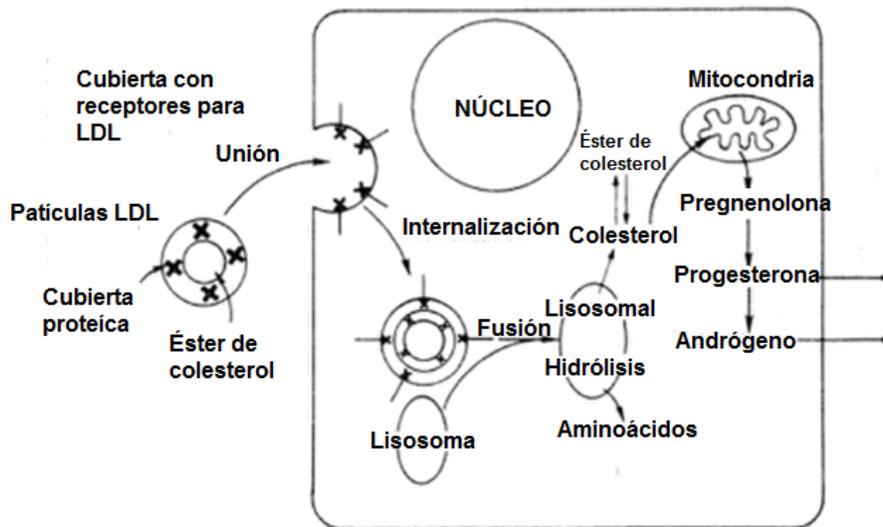


Figura 5. Mecanismo de acción de las partículas de LDL (Yen *et al.*, 2001).

4.11. RECEPTORES SR-B1 PARA LIPOPROTEÍNAS DE ALTA DENSIDAD

El Scavenger receptor clase B tipo 1 (SR-B1) es un receptor para HDL (Wang *et al.*, 1996; Webb *et al.*, 1997), el cual administra selectivamente partículas HDL a las células, además actúa como multiligando uniendo partículas VLDL y LDL (Shen *et al.*, 2018). Es fisiológicamente importante, ya que al igual que los LDLr, regula la absorción de ésteres de colesterol en hígado y tejidos esteroidogénicos, no solo es receptor para partículas HDL; además, actúa en el reconocimiento de patógenos, absorción de lípidos solubles como vitamina E y carotenoides (Acton *et al.*, 1996; Valacchi *et al.*, 2011). SR-

B1 se clasifica como proteína integral de membrana (Fukasawa *et al.*, 1996; Li *et al.*, 2016), formado por un polipéptido de 509 aminoácidos, presenta dos dominios de membrana hidrofóbica: un dominio N-glicosilado de 10 aminoácidos que permite a la proteína asociarse con la membrana y una cola terminal citoplasmática C-terminal con 490 aminoácidos (Kimura *et al.*, 2006), localizado en la zona peri-nuclear de las células (Ahras *et al.*, 2008), en pequeñas cavidades celulares asociadas a sensores de colesterol en varios tipos de células (Wang *et al.*, 2003). Se expresa en varios tejidos y células (Li *et al.*, 2016), glándulas adrenales y testículos (Webb *et al.*, 1997), folículo (Miranda *et al.*, 2007), influyendo de manera directa e indirecta en el desarrollo del oocito (Krieger, 2001). La expresión de este receptor está regulada por lipopolisacáridos, estrés oxidativo (Valacchi *et al.*, 2011) y retroalimentación en respuesta a las reservas de colesterol celular (Wang *et al.*, 1996), puede unirse a ligandos como lipoproteínas de baja densidad acetiladas (AcLDL) principalmente, aunque también lo hace a: fosfolípidos aniónicos, células apoptóticas, LDL y VLDL (Krieger *et al.*, 2001). El receptor reconoce dos apoproteínas (apo-AI y apo-AII) de partículas HDL relacionadas directamente con el receptor SR-B1 el cual presenta mayor afinidad por partículas enriquecidas con apoproteínas (apo-AII), con captación reducida de lípidos (Pilon *et al.*, 2000), cuyo mecanismo de aportación de lípidos es diferente con respecto a LDLr (Goldstein *et al.*, 1985). Tiene como función, facilitar la absorción de esteroides de colesterol de las partículas HDL a nivel de hígado (Krieger, 2001) y el metabolismo de estas mismas moléculas (Trigatti, 2003).

La estructura de la familia SR-B1 es diferente de las proteínas de la familia LDLr, como se mencionó, presenta dos dominios transmembrana con los extremos N y C de la proteína intracelulares, a diferencia de los miembros de la familia LDLr que presentan un dominio (Shen *et al.*, 2018). Este receptor muestra variantes dentro del ARNm como SR-B1.2; detectadas en tejidos de ratón conocidos por expresar SR-B1: en glándulas suprarrenales SR-B1.2 representa aproximadamente un tercio del ARNm de SR-B1 y en testículos representa el 79% del ARNm total (Webb *et al.*, 1997).

Existen tres postulados que respaldan la propuesta de que SR-B1 es un receptor importante de HDL: 1) distribución tisular de la expresión de este receptor, 2) expresión

de SR-B1 regulada hormonalmente *in vivo* e *in vitro* y 3) mediante alteraciones inmunoquímicas y genéticas (Krieger et al., 2001). SR-B1 se encuentra principalmente en tejidos esteroideogénicos de diferentes especies, facilita el transporte y absorción de colesterol proveniente de HDL; además, actúa como componente de organelos celulares (citoplasma y membrana plasmática) y como proteína de unión, con acción importante a nivel reproductivo tanto en hembras como en machos.

Dada la importancia del colesterol para síntesis de hormonas esteroideas en el folículo, y del selenio por su actividad antioxidante, al exponer los folículos a este, puede ser determinante en la expresión de receptores y localización de receptores LDLr y SR-B1 por lo que el objetivo fue identificar si la dosis o tiempo de exposición de folículos ováricos a selenometionina afecta la expresión de LDLr y SR-B1 *in vitro*.

5. MATERIALES Y MÉTODOS

El estudio se realizó con ovarios de ovejas sexualmente maduras, se colectaron en el rastro municipal de Capulhuac, Estado de México, fueron donados por el Sr. Mario Villamares. El cultivo folicular se realizó en el laboratorio de Biología de la Reproducción Animal perteneciente a la Facultad de Medicina Veterinaria y Zootecnia en la Universidad Autónoma del Estado de México (UAEMex), el montaje histológico se efectuó en el Laboratorio de Histopatología del CIESA, UAEMex, la etapa de inmunohistoquímica se llevó a cabo en el módulo de Nanotecnología y Reproducción del Colegio de Postgraduados, *Campus* Montecillo.

5.1. MANEJO DE OVARIOS

La colecta de ovarios se realizó directamente de la canal de ovejas adultas, se depositaron en 100 mL de solución salina estéril con 0.01 % de antibiótico de amplio espectro (Enrofloxacin; Bayer), se mantuvieron en hielo durante su traslado hasta el laboratorio donde se lavaron y se retiró el tejido circundante al ovario; posteriormente se colocaron en 750 mL de solución salina estéril con 250 mL de medio de cultivo (medio esencial: MEM, SIGMA-Aldrich). Se diseccionaron folículos con tamaño de 2 a 3 mm de diámetro, para la medición de estos se utilizó un vernier electrónico. Se obtuvieron 96 folículos antrales que se colocaron y mantuvieron en solución salina y MEM, previo a su cultivo y tratamiento con selenometionina.

5.2. TRATAMIENTO

Los folículos fueron colocados al azar en tubos ependorff con volumen de 2 mL, cuatro tubos por tiempo (0, 5, 10, 20 ng mL⁻¹; Figura 6) cuatro folículos por tubo, cada tubo incluyó 1 mL de MEM, 100 UI mL⁻¹ de gonadotropina coriónica equina (eCG) y 0.01% de antibiótico de amplio espectro (Enrofloxacin; Bayer); por último se aplicó selenometionina (United States Pharmacopedia, S-2-Amino-4-methylseleno butyric acid, Seleno-L-methionine) la cual, fue hidratada con agua desionizada a las diferentes dosis. Los folículos se incubaron por tres tiempos, como se muestra en la Figura (6), en condiciones de ambiente húmedo, 38°C de temperatura e inyección de 5% de CO₂. Al

cumplirse cada tiempo de cultivo; se lavaron los folículos con agua estéril y se colocaron en formol para continuar con el proceso de preparación histológica e inmunohistoquímica.

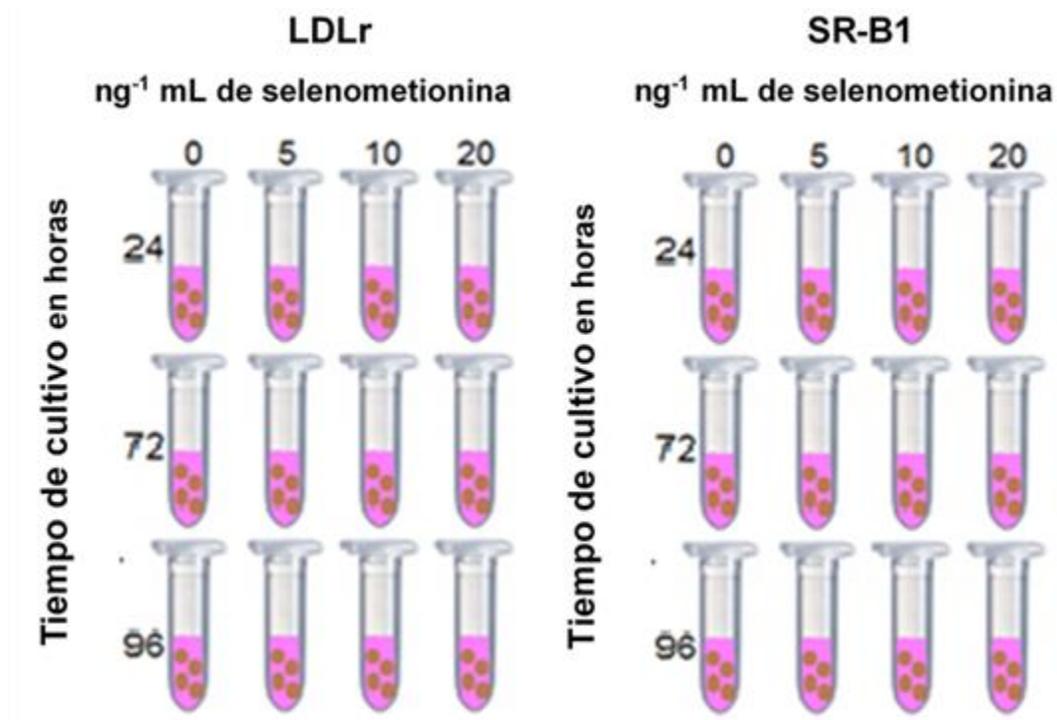


Figura 6. Distribución de tratamientos de selenometionina a folículos ováricos de ovejas *in vitro*.

5.3. INMUNOHISTOQUÍMICA

Los folículos retirados del medio de cultivo se fijaron en formol al 36 % durante 1 h, se enjuagaron con solución salina y conservaron en etanol al 75 %, para posteriormente realizar inclusión en bloques de parafina (Paraplast), usando el método convencional para muestras histológicas (CIESA, UAEMex). Se realizaron cortes histológicos de 3 μ m; los cuales se colocaron en portaobjetos electrocargados para realizar la inmunohistoquímica; como controles, positivos-positivo se tomaron células de hígado y, como negativo células foliculares sin presencia de anticuerpo.

Para la inmunohistoquímica se realizó como primer paso la remoción de parafina y posterior rehidratación del tejido. Cada una de las preparaciones histológicas fue colocada en xileno (100 %); se realizaron pases por etanol a porcentajes de, 96%, 90%, 80%, 70%, 50%, posteriormente, se enjuagaron en agua desionizada y solución buffer (PBS; 1X) por 5 minutos. Cada folículo fue delimitado con marcador de cera; se realizó bloqueo proteico, para esto se agregó leche descremada a temperatura ambiente y en cámara húmeda, se retiró el bloqueador con agua desionizada, PBS 1x, agua y tween 80 a 0.03%. Se aplicaron a cada folículo, anticuerpos LDLr y SR-B1, a concentración de 1:750 por 30 minutos; posteriormente, se retiró el anticuerpo con lavados de PBS y tween 80. Se aplicaron peróxidasas (VECTOR novaRED, substrate kit, for peroxidase) y se tiño con hematoxilina eosina (grills I; SIGMA-Aldrich). Para finalizar, se lavaron en etanol, reinvertiendo el orden de las concentraciones utilizadas al inicio. Se colocó medio de montaje (Richard-Allan Scientific; subsidiaria de Thermo Fisher Scientific) y cubre objetos a cada una de las preparaciones para su observación y evaluación en microscopio óptico (ZEISS Axio imager D2), con cámara (axiocam 505, color). En las observaciones microscópicas de cada folículo y para cada anticuerpo, se realizaron submuestras de área microscópica; estos resultados se obtuvieron como intensidad luminosa (candelas; cd) por unidad de área (μm).

5.4. VARIABLES EVALUADAS

- Expresión de receptor LDLr, en folículos antrales estimulada por selenometionina.
- Expresión de receptor SB-R1, en folículos antrales estimulada por selenometionina.

5.5. DISEÑO EXPERIMENTAL Y ANÁLISIS ESTADÍSTICO

El diseño empleado fue un completamente al azar con arreglo factorial 4 x 3 y submuestreo. Como primer factor, la dosis de selenometionina con cuatro niveles (0, 5, 10 y 20 ng mL^{-1}); segundo factor el tiempo de cultivo con tres niveles (24, 72 y 96 h),

resultando 12 tratamientos en total, con cuatro repeticiones cada uno. Considerando al folículo como unidad experimental.

Para el análisis de datos se utilizó el procedimiento PROC MIXED, con prueba de Tukey ($p < 0.05$) para comparación de medias con el paquete estadístico de SAS 9.4.

5.6. MODELO ESTADÍSTICO

$$Y_{ijk} = \mu + A_i + \beta_j + (A\beta)_{ij} + E_{ijk}$$

Dónde:

Y_{ijk} = Variable respuesta en el nivel i de A, nivel j de B y repetición k .

$i = 1, 2, \dots A$

$j = 1, 2, \dots B$

μ = Media general

A_i = Efecto del factor A al nivel i

β_j = Efecto del factor B al nivel j

$(A\beta)_{ij}$ = Efecto de la interacción AB al nivel i, j

E_{ijk} = Error aleatorio

6. RESULTADOS Y DISCUSIÓN

6.1. EXPRESIÓN DE RECEPTORES PARA LIPOPROTEÍNAS DE BAJA DENSIDAD (LDLr)

El colesterol es necesario para la esteroidogénesis, por lo que se requieren de receptores específicos para la internalización celular de este. En esta investigación se evaluó la acción del selenio sobre el transporte de colesterol en células esteroidogénicas. Se determinó la intensidad luminosa emitida por preparaciones foliculares mediante la técnica de inmunohistoquímica.

La expresión de receptores para lipoproteínas de baja densidad (LDLr) no fue diferente ($p > 0.05$) en ninguno de los tratamientos y tiempos; tomando como base la expresión del receptor en folículos del tratamiento testigo; sin embargo la importancia del colesterol introducido por la vía LDL y sus receptores para la síntesis de esteroides folicular es innegable y está regulada por gonadotropinas principalmente por la hormona luteinizante (LH): similarmente con influencia en su expresión (Carr *et al.*, 1981). Goldstein *et al.* (1976), señalaron que receptores LDLr se unen a lipoproteínas LDL cuando los tejidos mantienen concentraciones de colesterol de $2,5 \text{ mg dL}^{-1}$. En este trabajo no se evaluaron concentraciones de colesterol, lo que impide saber si la cantidad de colesterol circulante desencadena la presencia de LDLr. En esta investigación se observó que la expresión de receptores LDLr se mantuvo (basados en la intensidad luminosa) durante las 96 h de cultivo, en todos los tratamientos y ninguna dosis mostró disminución de la expresión (Figura 7). Lo anterior es diferente a lo reportado por Reaven *et al.* (1994) quienes realizaron pruebas con células de la granulosa proveniente de ratas, en cultivos por 96 h aplicando hCG y por Sekar *et al.* (2000) en células de la granulosa diferenciadas de cerdas, con LH, en cultivo por 48 h, este grupo de autores encontraron elevación en la expresión de LDLr. A pesar que, en el presente trabajo se empleó eCG no fue posible observar diferencias. Esto puede ser atribuido al tipo de tejido cultivado; en el presente estudio se usaron folículos completos cuyo grosor pudo impedir la perfusión de los nutrientes a las células de la granulosa

sensibles a LH y FSH, a diferencia de Reaven et al. (1994) y Sekar et al. (2000), que utilizaron cultivos de células de la granulosa.

En una investigación similar (Flores *et al.*, 2017) reportaron que la producción de estradiol se mantuvo elevada (1900 pg mL^{-1}) con la dosis de 20 ng mL^{-1} , por 96 h. Estos resultados al igual que los nuestros, indican que a pesar de que los LDLr no presentaron cambios en la expresión, la síntesis de esteroides si se afecta con dosis altas de selenio, lo que puede indicar que el selenio actúa aumentando la actividad esteroidogénica por ruta diferente a la de LDLr.

Basini y Tamanini (2000) empleando dosis de 5 ng mL^{-1} de selenio, menores a 20 ng mL^{-1} observaron que se estimuló la síntesis de estradiol en el cultivo *in vitro* mantenido por 96 y 144 h. Sin embargo el cultivo fue de células de la granulosa y no folículos completos como los utilizados en el presente trabajo, además el medio de cultivo fue diferente, lo que pudo influir en los resultados.

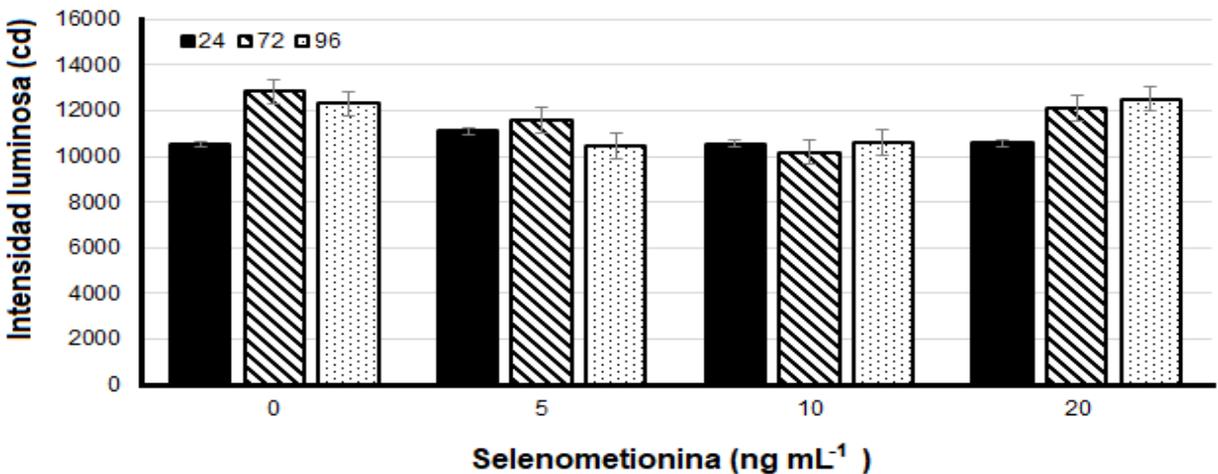


Figura 7. Expresión de LDLr en folículos *in vitro* tratados con selenometionina a diferentes tiempos (24, 72 y 96 h), intensidad luminosa en unidades candela (cd).

La localización del receptor LDLr se observó en ambos tipos celulares de folículos preovulatorios (teca y granulosa) independientemente al tratamiento (Figura 8). El tipo de localización coincide con lo encontrado por Argov y Sklan, (2004) en vacas, quienes reportan que la expresión de ARNm para LDLr se encuentra en células ováricas a lo largo del desarrollo folicular, células de la teca de folículos grandes y

medianos y células de la granulosa de todas las etapas foliculares. Por su parte, Lai *et al.* (2013), aplicando FSH \pm TGF β 1 reportan incremento en el citoplasma de LDLr a 6 y 12 h postratamiento; niveles que se mantienen hasta 48 h. Lo encontrado en el presente estudio y lo observado por los investigadores antes mencionados, es diferente a lo reportado por Garmey *et al.* (2000), en folículos de cerdas con detección de LDLr después de aplicar LDL, estos autores no encontraron expresión de RNAm de LDLr en células de la teca y la granulosa los días uno, tres y cinco en todas las muestras analizadas, lo que atribuyen a la respuesta individual de los folículos en etapas tempranas, dado que, la expresión inició después del día siete.

Otro aspecto a resaltar es la forma de expresión del receptor LDLr, cuya expresión se presentó en dos formas, la primera; en forma uniforme y en toda la célula (teca o granulosa; paneles A y B) y, la segunda, de forma punteada o en gránulos, como lo reporta Miranda *et al.* (2010). Esta expresión fue similar a la observada en tejido utilizado como de expresión positiva (Figura 8; Panel C).

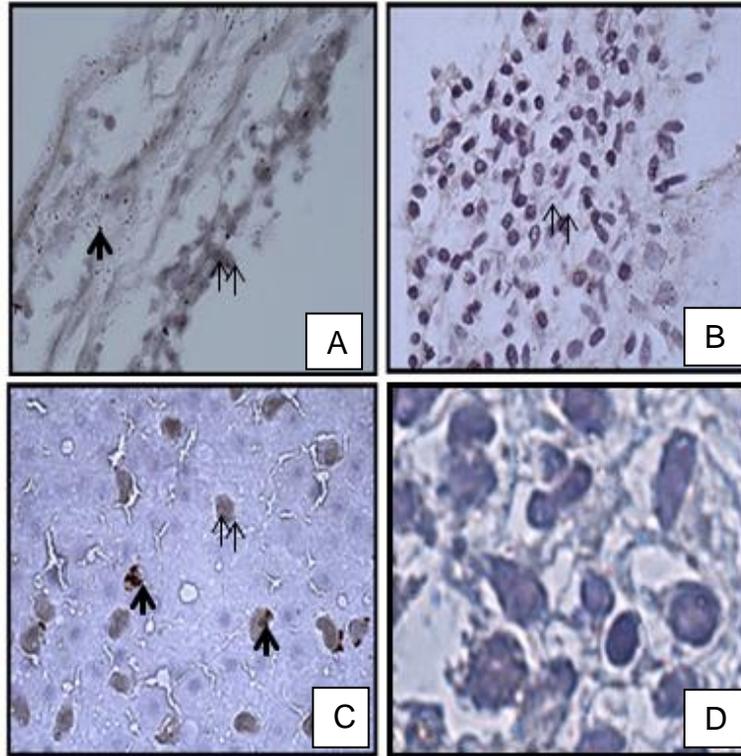


Figura 8. Expresión y localización de LDLr folicular por exposición *in vitro* de selenometionina., LDLr se localizó de forma uniforme (doble flecha), o de forma irregular (gránulos; flecha simple) dentro de las células foliculares (A, B) o en las células del hígado (C) utilizadas como positivas para la expresión de estos receptores; D, control negativo.

LaVoie *et al.* (1997), concluyen que ARNm de LDLr puede expresarse constitutivamente a lo largo de la actividad esteroidogénica del folículo maduro y CL, en cerdas prepúberes, cuando son tratadas con eCG/hCG y su localización se registra en membrana, citoplasma, zona perinuclear y ovocito (RNAm; Sato *et al.*, 2003); sin embargo, no se menciona si la presentación es homogénea o punteada; como sucedió en este caso.

6.2. EXPRESIÓN DE RECEPTORES SCARVENGER CLASE B TIPO I PARA LIPOPROTEINAS DE ALTA DENSIDAD (SR-B1)

Entre los receptores involucrados en el ingreso de colesterol a la célula esteroidogénica, se encuentran los SR-B; de ellos, el tipo uno con frecuencia presenta acción aditiva a LDLr (Stangl *et al.*, 1999). En la presente investigación se detectó la

expresión de este receptor, se encontraron diferencias para la interacción tratamiento y tiempo, con 5 ng mL^{-1} a 72 h ($p < 0.05$). Disminución similar, aunque sin aplicación de selenio, fue reportada en células del endotelio y músculo liso, con abundancia en colesterol y aplicación de HDL (Yeh *et al.*, 2002). Stangl *et al.* (1999), reportan que el colesterol transferido hacia las células que expresan SR-B1 aumenta progresivamente durante la incubación inicial por 5 h y posteriormente disminuye, asociado con el transporte selectivo de ésteres de colesterol de partículas LDL y HDL. Adicionalmente Shen *et al.* (2018), mencionan que existe disminución significativa de SR-B1 en células esteroideogénicas (corticales suprarrenales, ováricas y de Leydig) por acción de la función de factores reguladores de intercambio [Na (+) / H (+); NHERF3 y SIK1; Salt-inducible Kinase] para SR-B1; esta proteína es reconocida como reguladora de la actividad de receptores o transportadores. La disminución de la expresión de SR-B1 observada, en el presente trabajo, pudo deberse a la máxima actividad esteroideogénica del folículo, con lo cual los receptores se encontraban ocupados y no fue posible detectarlos en su totalidad con la técnica de inmunohistoquímica, dado que a 96 h de transcurrido el cultivo fue posible la detección del receptor.

Antes de la ovulación las células de la granulosa carecen de suficiente vascularización, lo cual limita la capacidad secretora de estas y además la capacidad para obtener colesterol precursor (HDL o LDL) que llega a la célula por vía sanguínea (Christenson y Devoto, 2003).

Con respecto a la presencia de receptores SR-B1, esta se mantuvo constante hasta las 96 h, como lo mostró la intensidad luminosa de la expresión (Figura 9). Este aumento también fue encontrado por Miranda *et al.* (2010), en ARNm de SR-B1 a las 36 h sin variación en cultivo de células de la granulosa tras la inyección de hCG e incluso, se encontró hasta la fase de luteinización. Azhar *et al.* (1998a), indican que la intervención de cAMP es importante para inducir la expresión de SR-B1 en células de la granulosa 6-9 h después del tratamiento y continua aumentando después de 48 h, este mismo mensajero influye en la expresión de LDLr, lo cual puede estar relacionado con lo ocurrido en la expresión de LDLr en la presente investigación. Por otra parte Cherian-Shaw *et al.* (2009), aislaron y prepararon cultivos de células de la granulosa

procedentes de macacos antes de la ovulación y aplicaron FSH, hCG más el factor TGF β 1 lo anterior hasta 48 h, en estas evaluaron los cambios en la expresión de receptores SR-B1 durante la luteinización, encontrando que las hormonas provocaron aumento de ARNm del receptor. En la presente investigación, al cultivo de folículos se le aplico eCG, lo cual puede influir en la expresión aquí observada.

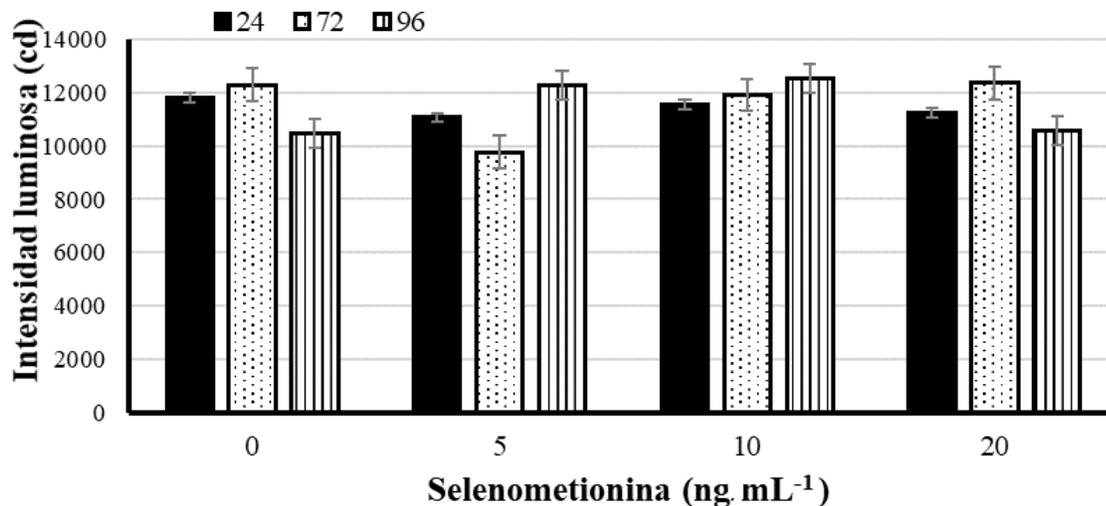


Figura 9. Expresión de SR-B1 en folículos *in vitro* tratados con selenometionina a diferentes tiempos (24, 72 y 96 h), intensidad luminosa (cd).

La localización del receptor SR-B1 se observó en el citoplasma y en la membrana y área perinuclear de ambos tipos celulares (teca y granulosa) de folículos preovulatorios, independientemente del tiempo de cultivo ($p > 0.05$). Respecto a la forma de presentación de SR-B1, se observó de forma uniforme o de forma irregular (gránulos) dentro de las células foliculares, lo que coincide con lo reportado por Miranda *et al.* (2010; Figura 10). La expresión de SR-B1 en núcleo, citoplasma, membrana (Yeh *et al.*, 2002) y zona perinuclear también se ha detectado con la aplicación de TGF β 1, FSH y LH (Lai *et al.*, 2013); al parecer, TGF β 1 no presenta efecto por sí sola, pero si en conjunto con hCG y FSH. Como se mencionó en párrafos anteriores, en esta investigación se utilizó eCG. En base a los reportes comentados, esta hormona es una gonadotropina la cual favorece la expresión de SR-B1; esta pudo ser la razón por la que no se observó disminución del receptor incluyendo al grupo testigo.

Al parecer, la localización en membrana, se debe a, que SR-B1 repercute en la organización y estructura de la membrana (De la Llera-Moya *et al.*, 1999) y a la estimulación del flujo de colesterol libre en las células foliculares. Por otra parte, en machos, la administración de hCG provocó aumento de SR-B1 en células de Leydig (Cherian-Shaw *et al.*, 2009). Otros tejidos con expresión de SR-B1 son el hígado, glándulas suprarrenales y glándula mamaria; todos ellos tejidos esteroideogénicos (Landschulz *et al.*, 1996; Acton *et al.*, 1996; Xie *et al.*, 2006), o que presentan absorción de grandes cantidades de ésteres de colesterol (Krieger *et al.*, 2001). En esta investigación se observó la expresión de SR-B1 hasta las 96 h de cultivo folicular; sin embargo, el selenio no fue el factor determinante en mantener la expresión del receptor y sí pudo verse favorecido por acción de la eCG.

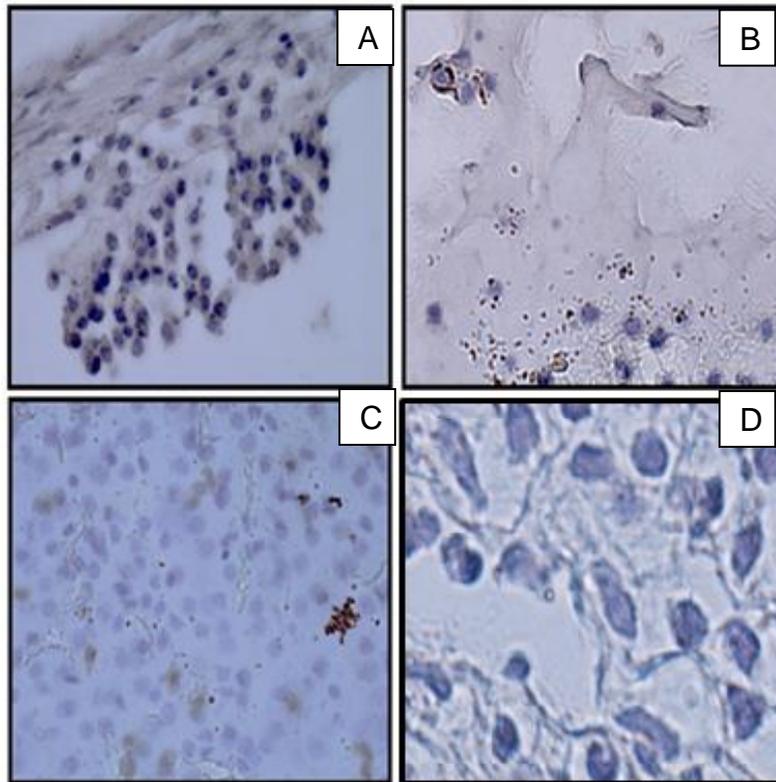


Figura 10. Expresión y localización de SR-B1 folicular con exposición *in vitro* de selenometionina. SR-B1 se localizó de forma uniforme (A), o de forma irregular (gránulos; B) dentro de las células foliculares. El panel C, muestra las dos formas de localización de SR-B1 en tejido positivo a la expresión de este receptor (hígado), D; control negativo.

7. CONCLUSIONES

La exposición del folículo ovárico a selenio orgánico (selenometionina) en diferentes dosis y tiempos no influyó en la expresión y localización de receptores para lipoproteínas de baja densidad (LDLr).

El selenio orgánico (selenometionina) a 5 ng mL^{-1} por 72 h influyó en la intensidad luminosa emitida por la expresión de receptores para lipoproteínas de alta densidad (SR-B1) en folículos *in vitro*.

La localización de receptores para lipoproteínas de baja (LDL) y alta densidad (HDL) se observó en teca y granulosa en folículos *in vitro*.

El tipo de localización de receptores para lipoproteínas de baja (LDL) y alta densidad (HDL) en folículos *in vitro* fue de forma uniforme y punteada.

Ambos receptores (LDLr y SR-B1) se localizaron en; membrana, citoplasma, y área perinuclear de células foliculares *in vitro*.

8. LITERATURA CITADA

- Abayasekara, D. R. E. y D. C. Wathes. 1999. Effects of alterin dietary fatty acid composition on prostaglandin synthesis and fertility. Departament. Of .Veteterinary. Basic Sciences. 61 (5), 275-287.
- Abedelahi, A., M. Salehnia., A, Allameh. and D, Davoodi. 2010. Sodium selenite improves the in vitro follicular development by reducing the reactive oxygen species level and increasing the total antioxidant capacity and glutathione peroxide activity. Hum. Reprod. 25, (4) 977–985.
- Acton, S, A, Rigotti., K. T. Landschulz., S. Xu., H. H. Hobbs., and M. krieger. 1996. Identification of scavenger receptor sr-bi as a high density lipoprotein receptor. Sci. 271, (5248) 518–520.
- Adams, N. R., J. A. Abordi., J. R. Briegel. and M. R. Sanders. 1994. Effect of diet on the clearance of estradiol-17 β in the ewe. Biol. Reprod. 51, 668–674.
- Agarwal, A., S. Gupta. and R. K. Sharma. 2005. Role of oxidative stress in female reproduction. Reprod. Biol. Endocrinol. 3, 28.
- Ahras M., T. Naing. and Y R Mcpherson. 2008. Scavenger receptor class b type i localizes to a late endosomal compartment. J. Lipid. Res. 49: 1569–1576
- Ammerman, C.B. and S. M. Miller.1975. Selenium in ruminant nutrition: a review1. J. Dairy Sci. 58, 1561–1577.
- Argov, N. and D. Sklan. 2004. Expression of mRNA of lipoprotein receptor related protein 8, low density lipoprotein receptor, and very low density lipoprotein receptor in bovine ovarian cells during follicular development and corpus luteum formation and regression. Mol. Reprod. Dev. 68, 169–175.
- Argov, N., D. Sklan. and A. Arieli. 2007. Role for LDL in estradiol-synthesis capacity of bovine ovarian follicles. Livest. Sci. 107, 289–293.
- Altmann, S. W., H. R. Davis., L. J. Zhu., X. Yao., I. M. Hoos., G. Tetzloff., S. P. N. Lyer., M. Maguire., A. Golovko, M. Zeng., L. Wang., N. Murgolo. and M. P. Graziano. 2004. Niemann-pick c1 like 1 protein is critical for intestinal colesterol absorption. Sci. 303: 1201–1204.

- Azhar, S., A. Nomoto., S. Leers-Sucheta. and E. Reaven. 1998a. Simultaneous induction of an HDL receptor protein (SR-B1) and the selective uptake of hdl-cholesteryl esters in a physiologically relevant steroidogenic cell model. *J. Lipid. Res.* 39, 1616–1628.
- Baird, D. T. and B. K. Campbell. 1998. Follicle selection in sheep with breed differences in ovulation rate. *Mol. Cell. Endocrinol.* 145, 89–95.
- Basini, G. and C. Tamanini. 2000. Selenium stimulates estradiol production in bovine granulosa cells: possible involvement of nitric oxide. *Domest. Anim. Endocrinol.* 18, 1–17.
- Beckett, G. J. 2005. Selenium and endocrine systems. *J. Endocrinol.* 184, 455–465.
- Behne, D. and A. Kyriakopoulos. 2001. Mammalian selenium-containing proteins. *Annu. Rev. Nutr.* 21, 453–473.
- Ben Saiïd, S., D. Lomet., D. Chesneau., L. Lardic., S. Canepa., D. Guillaume., C. Briant., C. Fabre-Nys., and A. Caraty. 2007. Differential estradiol requirement for the induction of estrus behavior and the luteinizing hormone surge in two breeds of sheep. *Biol. Reprod.* 76, 673–680.
- Boosalis, M. G. 2008. The role of selenium in chronic disease. *Nutr. Clin. Pract.* 23, 152–160.
- Botella II. J. 1995. El ovario: fisiología y patología. Ed. Díaz de santos, s.a. Juan bravo. 3a. 28006 Madrid. Cap. 6. pgs. 454: 49-51.
- Brown, M. S. and J. L. Goldstein. 1986. A receptor-mediated pathway for cholesterol homeostasis. *Sci.* 232, 34–47.
- Carr, B.R., R. K. Sadler., D. B. Rochelle., M. A Stalmach., P. C Macdonald. and E. R. Simpson. 1981. Plasma lipoprotein regulation of progesterone biosynthesis by human corpus luteum tissue in organ culture. *J. Clin. Endocrinol. Metab.* 52, 875–881.
- Ceballos, M. A. y F. G. Witter. 1996. Metabolismo del selenio en rumiantes. *Arch. Med. Vet.* 195:1062.
- Ceko, M.J., K. Hummitzsch., N. Hatzirodos., W. M. Bonner., J. B. Aitken., D. L. Russell., M. Lane., R. J. Rodgers. and H. H. Harris., 2014. X-ray fluorescence imaging and

other analyses identify selenium and gpx1 as important in female reproductive function. *Met.* 7, 71–82.

Cherian-Shaw, M., M Puttabyatappa., E Greason., A. Rodriguez., C. A. Vandevort. and L. C. Chaffin. 2009. Expression of scavenger receptor-b1 and low-density lipoprotein receptor and differential use of lipoproteins to support early steroidogenesis in luteinizing macaque granulosa cells. University of maryland school of medicine, Baltimore, Maryland. *Endocrinol.* 150: 957-965.

Christenson, L.K. and L Devoto. 2003. Cholesterol transport and steroidogenesis by the corpus luteum. *Reprod. Biol. Endocrinol.* 1, 90.

De la Llera-Moya, M., G. H. Rothblat., M. A. Connelly., G. Kellner-weibel., S. W. Sakr., M. C. Phillips. and D. L. Williams. 1999. Scavenger receptor b1 (SR-B1) mediates free cholesterol flux independently of hdl tethering to the cell surface. *J. Lipid. Res.* 40, 575–580.

Fernández Abeñña, D., Y. Presa., O. Irabuena. and S. Sterla. 2013. Efecto del selfos plus® en la fertilidad del semen fresco y congelado en carneros merino. *Rev. Argent. Prod. Anim.* 33, 43–52.

Finley, J.W. 2006. Bioavailability of selenium from foods. *Nutr. Rev.* 64, 146–151.

Fukasawa, M., H. Adachi., K. Hirota., M. Tsujimoto., H. Arai. and K. Inoue. 1996. SR-B1, a class b scavenger receptor, recognizes both negatively charged liposomes and apoptotic cells. *Exp. Cell Res.* 222, 246–250.

Garmey J. C., H. D. Guthrie., W. M. Garrett., M. H. Stoler. and J. D. Veldhuis. 2000. Localization and expression of low-density lipoprotein receptor, steroidogenic acute regulatory protein, cytochrome p450 side-chain cleavage and p450 17-alpha-hydroxylase/c17-20 lyase in developing swine follicles: in situ molecular hybridization and immunocytochemical studies. *Mol. Cel. Endocrinol.* 170:57–65.

Goldstein, J. L., S. K. Basu., G. Y. Brunschede. and M. S. Brown. 1976. Release of low density lipoprotein from its cell surface receptor by sulfated glycosaminoglycans. *Cell* 7, 85–95.

- Goldstein, J. L., M. S. Brown., R. G. Anderson., D. W. Russell. and W. J. Schneider. 1985. Receptor-mediated endocytosis: concepts emerging from the LDL receptor system. *Annu. Rev. Cell. Biol.* 1, 1–39.
- Goldstein, J.L., M. S. Brown., R. G. Anderson., D. W. Russell. and W. J. Schneider. 1986. A receptor-mediated pathway for cholesterol homeostasi. *Sci.* 232: 34-47.
- Goldstein, J. L. and M. S. Brown. 2009. The LDL receptor. *Arterioscler. Thromb. Vasc. Biol.* 29, 431–438.
- González del pino, F.J. 2013. Tumor de células de la granulosa en una yegua (TCG): reporte de un caso clínico. *Redvet. rev. Electr. vet.* 14.
- Gonzalez, F. E. E. 2018. Selenometionina en la expresión del factor de crecimiento endotelial vascular en folículos ovinos *in vitro*. Tesis de maestría en ciencias, Colegio de Postgraduados *Campus* Montecillo. 43 p.
- Grazul-bilska, A.T., Caton., W. Arndt., K. Burchill., C. Thorson., E. Borowczyk., J. J. Bilski., D. A. Redmer., L. P Reynolds. and K. A. Vonnahme. 2009. Cellular proliferation and vascularization in ovine fetal ovaries: effects of undernutrition and selenium in maternal diet. *Reprod.* 137, 699–707.
- Guimaraes, M. J., D. Peterson., A. Vicari., B. G. Cocks., D. J. Gilbert., N. A. Jenkins., D. A. Ferrick., R. A. Kastelein., J. F. Bazan and A. Zlotnik. 1996. Identification of a novel seld homolog from eukaryotes, bacteria, and archaea: is there an autoregulatory mechanism in selenocysteine metabolism *Proc. Natl. Acad Sci.* 93:15086-15091.
- Gwynne, J. T. and J. F. Strauss III. 1982. The role of lipoproteins in steroidogenesis and cholesterol metabolism in steroidogenic glands. *Endocr. Rev.* 3, 299–329.
- Harrison, J. H., D. D. Hancock. and H. R. Conrad. 1984. Vitamin e and selenium for reproduction of the dairy cow¹, 2. *J. Dairy Sci.* 67, 123–132.
- Hennet, L., M. and Combelles, C., M., H. 2012. The antral follicle: a microenviroment for oocyte differentiation. *Int. J. Dev. Biol.* 56: 819-831.
- Ho, S. M. 2003. Estrogen, progesterone and epithelial ovarian cancer. *Reprod. Biol. Endocrinol.* 1, 73.

- Hunter, M., R. Robinson., G. Mann. and R. webb. 2004. Endocrine and paracrine control of follicular development and ovulation rate in farm species. *Anim. Reprod. Sci.* 82–83, 461–477.
- Irving-Rodgers, H.F., M. L. Harland., T. R. Sullivan. and R. J. Rodgers. 2009. Studies of granulosa cell maturation in dominant and subordinate bovine follicles: novel extracellular matrix focimatrix is co-ordinately regulated with cholesterol side-chain cleavage cyp11a1. *Reprod.* 137, 825–834.
- Jaimes-Santoyo, J., A. Montesinos-Sampedro., R. E. De, Barbosa-Cobos., S. García Moreno-Mutio., D. Rodríguez-Ballesteros. y T. Ramos-Cervantes. 2014. El citocromo p-450. *Rev Hosp. Jua. Mex.* 81 (4), 250-256.
- Juniper, D. T., R. H. Phipps., D. I. Givens., A. K. Jones., C. Green. and G. Bertin. 2008. Tolerance of ruminant animals to high dose in-feed administration of a selenium-enriched yeast¹. *J. Anim. Sci.* 86, 197–204.
- Kallen, C.B., J. T. Billheimer., S. A. Summers., S. E. Stayrook., M. Lewis. and J. F. Strauss. 1998. Steroidogenic acute regulatory protein (star) is a sterol transfer protein. *J. Biol. Chem.* 273, 26285–26288.
- Kimura, T., H Tomura., C. Mogi., A. Kuwabara., A. Damirin., T. Ishizuka., A. Sekiguchi., M. Ishiwara., D. S. Im., K. Sato., M. Murakami. and F. Okajima. 2006. Role of scavenger receptor class B type 1 and sphingosine 1-phosphate receptors in high density lipoprotein-induced inhibition of adhesion molecule expression in endothelial cells. *J. Biol. Chem.* 281, 37457–37467.
- Kor, N. M., K. M. Khanghah. and A. Veisi. 2013. Follicular fluid concentrations of biochemical metabolites and trace minerals in relation to ovarian follicle size in dairy cows. *Ann. Rev. & Res. in Biol.* 3 (4), 397-404.
- Krieger, M. 2001. Scavenger receptor class b type 1 is a multiligand hdl receptor that influences diverse physiologic systems. *J. Clin. Invest.* 108, 793–797.
- Kumar, S., A. K. Pandey., W. A. A. Razzaque. and D. K. Dwivedi. 2011. Importance of micro minerals in reproductive performance of livestock. *Vet. Word.* 4, 230–233.
- Lai, W.A., Y. T. Yeh., M. T. Lee., L. S Wu., F. C Ke. and J. J. Hwang. 2013. Ovarian granulosa cells utilize scavenger receptor sr-b1 to evade cellular cholesterol homeostatic control for steroid synthesis. *J. Lipid Res.* 54, 365–378.

- Landschulz, K. T., R. K. Pathak., A. Rigotti., M. Krieger. and H. H. Hobbs. 1996. Regulation of scavenger receptor, class b, type i, a high density lipoprotein receptor, in liver and steroidogenic tissues of the rat. *J. Clin. Invest.* 98, 984–995.
- Lavoie, H. A., A. M. Benoit., J. C. Garmey., R. A. Dailey., D. J. Wright. and J. D. Veldhuis. 1997. Coordinate developmental expression of genes regulating sterol economy and cholesterol side-chain cleavage in the porcine ovary. *Biol. Reprod.* 57, 402–407.
- Li, J., J. Wang., M. Li., L. Yin., X. A. Li. and T. G. Zhang. 2016. Up-regulated expression of scavenger receptor class b type 1 (sr-b1) is associated with malignant behaviors and poor prognosis of breast cancer. *Pathol. Res. Pract.* 212, 555–559.
- Maiorino, M., L. Flohé., A. Roveri., P. Steinert., J. B. Wissing. and F. Ursini. 1999. Selenium and reproduction. *Biof.* 10, 251–256.
- Mamon, M. A. C. and G. B. Ramos. 2017. Maternal selenium-supplementation at various stages of periconception period: influence on murine blastocyst morphology and implantation status. *J. Anim. Sci. Technol.* 59. 7.
- Martínez, F., M. T. Espinosa-García., C. García., G. Maldonado., R. Milán., A. Uribe. y Ó. Flores-Herrera., 2001. Metabolismo energético y esteroidogénico de la placenta humana. *Rev Fac Med UNAM.* 44, 201–5.
- Martínez-Gómez, N., A. Domínguez-López., E. De J. Morales-Rosales., J. Lugo. y M. A. Mariezcurrena-Berasain. 2012. Efecto de la levadura enriquecida con selenio y selenito de sodio en la dieta de cerdos en finalización sobre el contenido de grasa intramuscular y ácidos grasos. *Trop. Subtrop. Agroec.* 15, 41-46.
- Mehdi, Y. and J. Dufrasne. 2016. Selenium in cattle: a review. *Mol.* 21, 545.
- Mehdi, Y., J. L. Hornick., L. Istasse. and I. Dufrasne. 2013. Selenium in the environment, metabolism and involvement in body functions. *Mol.* 18, 3292–3311.
- Miquilena, E. y A. H. Moros. 2012. Evaluación del contenido de proteína, minerales y perfil de aminoácidos en harinas de cajanus cajan, vigna unguiculata y vigna radiata para su uso en la alimentación humana. *Rev. Cie. Udo Agríc.* 12, 730–740.
- Miranda, J. L.; J., M. Binelli., K. Bertolin., R. M. Pelletier. and B. D. Murphy. 2010. Scavenger receptor-b1 and luteal function in mice. *J. Lipid. Res.* 51, 2362–2371.

- Myant, N. B. 1973. Cholesterol metabolism. *J. Clin. Pathol. Suppl. Clin path.* 5, 1.
- Papaleo, E., M. T. Potenza., C. Brigante., E. De Michele., M. Pellegrino. and M. Candiani. 2011. Nutrients and infertility: an alternative perspective. *Eur. Rev. Med. Pharmacol. Sci.* 15, 515–517.
- Paszowski, T., A. I. Traub., S. V. Robinson. and D. McMaster. 1995. Selenium dependent glutathione peroxidase activity in human follicular fluid. *Clin. Chim.* 236, 173–180.
- Pieczyńska, J. and H. Grajeta. 2015. The role of selenium in human conception and pregnancy. *J. Trace Elem. Med. Biol.* 29, 31–38.
- Pilon, A., O. Briand., S. Lestavel., C. Copin., Z. Majd., J. C. Fruchart., G. Castro. and V. Clavey. 2000. Apolipoprotein all enrichment of HDL enhances their affinity for class b type 1 scavenger receptor but inhibits specific cholesteryl ester uptake. *Arterioscler. Thromb. Vasc. Biol.* 20, 1074–1081.
- Rabiee, A. R., I. J. Lean., M. A. Stevenson. and M. T. Socha. 2010. Effects of feeding organic trace minerals on milk production and reproductive performance in lactating dairy cows: a meta-analysis. *J. Dairy Sci.* 93, 4239–4251.
- Rayman, M. P., S. Stranges., N. Ba. Griffi., R. Pastor-Barriuso. and E. Guallar. 2011. Effect of supplementation with high-selenium yeast on plasma lipids: a randomized, controlled trial. *Ann. Intern. Med.* 154: 656–65.
- Reaven, E., L. Tsai., M. Spicher., L. Shilo., M. Philip., A. D. Cooper. and S. Azhar. 1994. Enhanced expression of granulosa cell low density lipoprotein receptor activity in response to in vitro culture conditions. *J. Cell. Physiol.* 161, 449–462.
- Sato, N., K. Kawamura., J. Fukuda., Y. Honda., T. Sato., h. Tanikawa., H. Kodama. and T. Tanaka. 2003. Expression of LDL receptor and uptake of LDL in mouse preimplantation embryos. *Mol. Cell. Endocrinol.* 202, 191–194.
- Scaramuzzi, M. A. Driancourt., J. Dupont., J. E. Fortune., R. B. Gilchrist., Martin, G. B., K. P. McNatty., A. S. Mcneilly., P. Monget., D. Monniaux., C. Viñoles. and R. Webb. 2011. Regulation of folliculogenesis and the determination of ovulation rate in ruminants. *Reprod. Fertil. Dev.* 23, 444.
- Schrauzer, G. N. (2001). Nutritional selenium supplements: product types, quality, and safety. *J. of the Amer. Colle. of Nut.* 20(1), 1-4.

- Schrauzer, G. N. (2000). Selenomethionine: a review of its nutritional significance, metabolism and toxicity. *The J. of Nutr.* 130(7), 1653-1656.
- Schroder, H. J. and Power, G. G. 1997. Engine and radiator: fetal and placental interactions for heat dissipation. *Exp. Physiol.* 82, 403–414.
- Schweizer, U. and L. Schomburg. 2005. New insights into the physiological actions of selenoproteins from genetically modified mice. *Iubmb life int. Union biochem. Mol. Biol. Life* 57, 737–744.
- Sekar, N., J. C. Garmey. and J. D. Veldhuis. 2000. Mechanisms underlying the steroidogenic synergy of insulin and luteinizing hormone in porcine granulosa cells: joint amplification of pivotal sterol-regulatory genes encoding the low-density lipoprotein (LDL) receptor, steroidogenic acute regulatory (star) protein and cytochrome p450 side-chain cleavage (p450scc) enzyme. *Mol. Cell. Endocrinol.* 159, 25–35.
- Shen, W.J., S. Asthana., F. B. Kraemer. and S. Azhar. 2018. Scavenger receptor b type 1: expression, molecular regulation, and cholesterol transport function. *J. Lipid Res.* 8, 21-31.
- Sordillo, L. M. 2016. Nutritional strategies to optimize dairy cattle immunity 1. *J. Dairy Sci.* 99, 4967–4982.
- Spears, J. W. and W. P. Weiss. 2008. Role of antioxidants and trace elements in health and immunity of transition dairy cows. *Vet. J.* 176, 70–76.
- Stangl, H., M. Hyatt. and H. H. Hobbs. 1999. Transport of lipids from high and low density lipoproteins via scavenger receptor-bi. *J. Biol. Chem.* 274, 32692–32698.
- Stocco, D.M. and B. J. Clark. 1996. Regulation of the acute production of steroids in steroidogenic cells. *Endocr. Rev.* 17, 221–244.
- Sudhof, T.C., J. L. Goldstein., M. S. Brown. and D. W. Russell., 1985. The LDL receptor gene: a mosaic of exons shared with different proteins. *Sci.* 228, 815–822.
- Tiwari, M., S. Prasad., A. Tripathi., A. N Pandey., I. Ali., A. K. Singh., T. G. Shrivastav. and S. K. Chaube. 2015. Apoptosis in mammalian oocytes: a review. *Apop.* 20, 1019–1025.
- Trigatti, B. L. 2003. Influence of the hdl receptor sr-bi on lipoprotein metabolism and atherosclerosis. *Arterioscler. Thromb. Vasc. Biol.* 23, 1732–1738.

- Valacchi, G., C. Sticozzi., Y. Lim. and A. Pecorelli. 2011. Scavenger receptor class b type I: a multifunctional receptor. *Acad. Sci.* 1229, e1–e7.
- Van den Hurk, R. and Santos, R. 2009. Development of fresh and cryopreserved early-stage ovarian follicles, with special attention to ruminants. *Anim. Reprod.* 6, 72–95.
- Vázquez-Hernández, S. D., L. Miranda-Jiménez., O. Segura-León. y A. R. Quero-Carrillo. 2017. Desarrollo de folículos y cuerpo lúteo en cabras como respuesta al suministro de selenio. *Agropd.* 10(2): 15-18.
- Wang, N., W. Wang., J. L. Breslow. and A. R. Tall., 1996. Scavenger receptor B1 (SR-B1) is up-regulated in adrenal gland in apolipoprotein ai and hepatic lipase knock-out mice as a response to depletion of cholesterol stores in vivo evidence that sr-bi is a functional high density lipoprotein receptor under feedback control. *J. Biol. Chem.* 271, 21001–21004.
- Wang, P., P. Liu., J. Weng., E. Sontag. and R. R. Anderson., 2003. A cholesterol-regulated pp2a/heptp complex with dual specificity erk1/2 phosphatase activity. *J. Embo.* 22, 2658–2667.
- Webb, N. R., W. J. S. De Villiers., P. M. Connell., F. C. De Beer. and D. R. Van der westhuyzen. 1997. Alternative forms of the scavenger receptor tor bi (SR-B1). *J. Lipid Res.* 38 1490-1495.
- Wdowiak, A., E. Wdowiak. and I. Bojar. 2017. Evaluation of trace metals in follicular fluid in icsi-treated patients. *Ann. Agric. Environ. Med.* 75,44.
- Wolfgang, J. S., B. Ulrike., I. G. Joseph. and S. B. Michael. 1982. Purification of the low density lipoproteinreceptor, an acidic glycoprotein of 164, 000molecular weight. *J. Biol. Chem.* 257: 5.
- Xie, C., J. A. Richardson., S. D. Turley. and J. M. Dietschy. 2006. Cholesterol substrate pools and steroid hormone levels are normal in the face of mutational inactivation of npc1 protein. *J. Lipid Res.* 47, 953–963.
- Yatoo, M. I., A. Saxena., P. M. Deepa., B. P. Habeab., S. Devi., R. S. Jatav. and U. Dimri., 2013. Role of trace elements in animals: a review. *Vet. World.* 6, 963–967.

- Yeh, Y. C., G. Y. Hwang., I. P. Liu. and V. C. Yang. 2002. Identification and expression of scavenger receptor sr-bi in endothelial cells and smooth muscle cells of rat aorta in vitro and in vivo. *Atheros.* 161, 95–103.
- Yen, S. S., B. R. Jaffe. y L. R. Barbieri. 2001. *Endocrinología de la reproducción; fisiología, fisiopatología y manejo clínico* Editorial médica panamericana, 4^{ta}. Edición. Capítulo 6. El ciclo ovárico., Montevideo Uruguay. pgs: 913: 181.
- Yue, W., C. Zhang., L. Shi., Y. Ren., Y. Jiang.and D. O. Kleemann. 2009. 49 effect of supplemental selenomethionine on growth performance and serum antioxidant status in taihang black goats. *Asian-Australas. J. Anim. Sci.* 22, 365.