



XOCHIMILCO SERVICIOS DE INFORMACION
ARCHIVO HISTORICO

T
254

39926

UNIVERSIDAD AUTÓNOMA METROPOLITANA

DIVISIÓN DE CIENCIAS BIOLÓGICAS Y DE LA SALUD
UNIDAD XOCHIMILCO



CASA ABIERTA AL TIEMPO

**“CARACTERIZACIÓN BIOQUÍMICA DE LA MADURACIÓN Y
LA ATRESIA FOLICULAR EN LA OVEJA”**

T E S I S

Que para obtener el grado de Doctora en Ciencias Biológicas

P R E S E N T A

M.en BRA, ANA MARÍA ROSALES TORRES

Diciembre de 1999

El Doctorado en Ciencias Biológicas de la Universidad Autónoma Metropolitana está incluido en el padrón de Posgrados de Excelencia del CONACyT y además cuenta con apoyo del mismo Consejo, con el convenio PFP-20-93

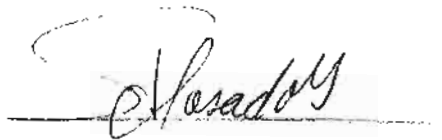
El jurado designado por las Divisiones de Ciencias Biológicas y de la salud de las Unidades Iztapalapa y Xochimilco aprobó la tesis que presentó

ANA MARIA ROSALES TORRES

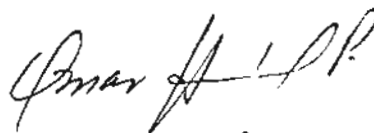
El día 8 de diciembre de 1999

Comité Tutorial:

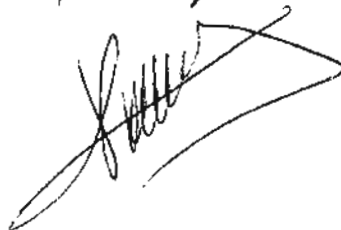
Tutor: Dr. Adolfo Rosado García



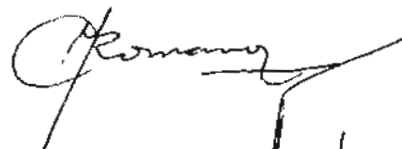
Asesor 1: Dr. Omar Hernández Pérez



Asesor 2: Dr. Vianney Ortiz Navarrete.



Sinodal 1: Dra. Marta Romano Pardo



Sinodal 2: Dr. Javier de Jesús Valencia Méndez



COMITÉ TUTORIAL

DIRECTOR DE TESIS

DR: ADOLFO ROSADO GARCIA

PROFESOR-INVESTIGADOR TITULAR "C"; INVESTIGADOR DISTINGUIDO
UNIVERSIDAD AUTONOMA METROPOLITANA IZTAPALAPA.

INVESTIGADOR EMERITO. SISTEMA NACIONAL DE INVESTIGADORES.

ASESOR

DR OMAR HERNANDEZ PEREZ.

INVESTIGADOR TITULAR DEL INSTITUTO MEXICANO
DEL SEGURO SOCIAL

ASESOR

DR. VIANNEY ORTIZ NAVARRETE.

INVESTIGADOR TITULAR DEPTO. DE BIOMEDICINA MOLECULAR
CINVESTAV

INVESTIGADOR NACIONAL NIVEL II

AGRADECIMIENTOS

Al Dr. Adolfo Rosado, por su valiosa y atinada dirección de esta tesis y por compartir conmigo la experiencia del trabajo científico, que me ha llevado a comprender mi compromiso con la ciencia.

A mis asesores: Dr. Omar Hernández y Dr. Vianney Ortiz, por su importante orientación.

A la Universidad Autónoma Metropolitana Xochimilco. Departamento de Producción Agrícola y Animal, por las facilidades que me brindaron para la realización de este trabajo.

Al Doctorado en Ciencias Biológicas de la Universidad Autónoma Metropolitana Xochimilco/Iztapalapa.

A la Coordinación de Investigación Biomédica del Instituto Mexicano del Seguro Social, Centro Médico Siglo XXI, por permitirme trabajar en sus instalaciones.

A la Unidad de Investigación Médica en Bioquímica del IMSS, por el apoyo que me otorgaron.

Al personal del laboratorio de Bioquímica Molecular: Dr. Omar Hernández, Luz Ma, Rebeca, Marcela, Gisela, Clara, Alejandro y José Luis, sin cuya ayuda y amistad no hubiese sido posible la realización de la presente.

Al Dr. José Moreno Rodríguez, jefe de la Unidad de Investigación Médica en Enfermedades Autoinmunes del IMSS, por permitirme amablemente utilizar el citómetro de flujo .

A mis compañeros, alumnos de grado y posgrado del laboratorio de Bioquímica de la Reproducción de la UAM-X por su apoyo incondicional.

A todos mis amigos, por su confianza.

A Leticia Alfaro, por su cariño y solidaridad .

A mis hermanos: José, Miguel, Carlos, Agustín y Rosario por su apoyo moral.

A mi esposo Julián y a mis hijos Pablo Damián y Sebastián .

A la memoria de mi madre.

Se necesita visión y valor para crear;
se necesita fe y valor para demostrar.
Owen D. Young

CARACTERIZACION BIOQUIMICA DE LA MADURACION Y LA ATRESIA FOLICULAR EN LA OVEJA

Ana María Rosales Torres

Universidad Autónoma Metropolitana, 1999

RESUMEN

Se cuantificó la participación diferencial de la apoptosis y la necrosis en folículos anótrales de dos tamaños diferentes y cuatro grados de atresia. La atresia se calificó por métodos macroscópicos, histológicos y por cuantificación de esteroides. El estudio bivariado por citometría de flujo con Anexina V-FITC e IP (Ioduro de Propidio), fue usado para detectar células vivas, (Anexina V negativas/IP negativas), células con apoptosis temprana (Anexina V positiva/IP negativo), y células necróticas o con apoptosis tardía (IP positivas). Además, nosotros utilizamos la electroforesis en gel para estimar cuantitativamente la fragmentación internucleosomal del DNA en la apoptosis. La muerte celular necrótica, se midió por la presencia y distribución de enzimas lisosomales (fosfatasa ácida y β -glucosaminidasa) en líquido folicular, y células de la granulosa. Además se calculó la población de células hipodiploides para cada tamaño y grado de atresia, también por citometría de flujo. Los resultados de citometría de flujo y de la electroforesis en gel correlacionaron positivamente con la progresión de la atresia, en los folículos pequeños atrésicos, hubo una mayor presencia de fragmentación internucleosomal de su DNA que en los folículos > de 6 mm. El estudio bivariado de Anexina V e IP, también indicó que la apoptosis y la necrosis, se incrementaron conforme avanzó la atresia, generalmente la apoptosis tuvo ventaja sobre la necrosis en los folículos pequeños. La fosfatasa ácida y la glucosaminidasa del líquido de los folículos de 3-6 mm, no tuvieron modificaciones significativas entre los folículos sanos y con atresia inicial y solo un pequeño aunque

significativo incremento, se observó en la actividad que mostraron estas enzimas en los folículos con atresia avanzada. Por el contrario, la actividad de las enzimas lisosomales en los folículos >6 mm, mostraron una correlación positiva entre el grado de atresia y las actividades de fosfatasa ácida y gluocosaminidasa en el líquido folicular. Este mismo comportamiento diferente con respecto al tamaño del folículo, se encontró en la actividad enzimática libre y unida a la membrana en las células de la granulosa. Durante todos los estadios de maduración folicular, estuvieron presentes la necrosis y la apoptosis, aunque principalmente la apoptosis, lo cual indica que el crecimiento y la maduración folicular involucra una continua renovación de las células de la granulosa, regulada por la apoptosis. Mecanismos reguladores de este equilibrio pueden participar en el destino final entre la ovulación o la atresia folicular.

BIOCHEMICAL CHARACTERIZATION OF THE FOLLICULAR MATURATION AND ATRESIA IN THE EWE.

Ana María Rosales Torres

Universidad Autónoma Metropolitana, 1999

Abstract

The differential quantitative participation of apoptosis and necrosis in ewe antral follicles of two different sizes, separated in four stages of atresia using macroscopic, histologic and steroid quantification methods was assessed. Annexin V binding and propidium iodide (PI) uptake was used to detect healthy live cells (Annexin V positive/PI negative), early apoptotic cells (Annexin V+/PI-) and necrotic or late apoptotic cells (PI+). Additionally we used internucleosomal DNA fragmentation as a quantitative estimate of apoptosis. Presence and distribution of lysosomal enzymes in follicular fluid and granulosa cells were used as a measure of necrotic cell death. Our results indicate that apoptosis predominate over necrosis in small atretic follicles. On the contrary, necrosis may be as important, or more important than apoptosis during atresia of large and pre-ovulatory follicles. Our results support the hypothesis that granulosa cell death, apoptosis and necrosis during follicular atresia, are simultaneously initiated by perturbations of the mitochondrial transmembrane potential. Specific synthesis of some lysosomal hydrolytic enzymes may be involved during the degradation of intracellular structures that accompany the initial phases of

apoptosis. The presence of dying cells at all stages of follicular maturation indicates that growth and maturation of ovarian follicles involves a continuous renewal of granulosa cells, regulated by apoptosis. Mechanisms regulating this equilibrium may participate in the final destiny, whether ovulation or atresia of ovarian follicles. We conclude that combination of the proposed methods constitute a better way to analyze cell death mechanisms, not only in follicles of different sizes and during the different stages of follicular atresia, but in many other cellular models.

INDICE

1.-INTRODUCCION	
1.1 Atresia folicular	1
1.-2 Muerte celular	17
1.2.1 Necrosis	22
1.2.2 Apoptosis	25
1.2.3 Papel de las mitocondrias en la muerte celular	38
1.3 Evidencias de los mecanismos de muerte celular que participan en la atresia folicular	43
2.-PLANTEAMIENTO DEL PROBLEMA	49
3.-MATERIAL Y MÉTODOS	51
4.-RESULTADOS	59
5.-DISCUSIÓN	78
6.-CONCLUSIONES	86
7.-BIBLIOGRAFÍA	87
8.-DIFUSIÓN DE LOS RESULTADOS	106

1. INTRODUCCION

Atresia Folicular

En la mayoría de las hembras de los mamíferos la dotación reproductiva está constituida por una cantidad determinada de ovocitos, específica de cada especie. Esto se debe a que todas las células germinales primarias, u ovogonias, han iniciado el proceso de meiosis sin dejar una poza de reserva que permita la producción posterior de nuevos ovocitos. Los ovocitos, rodeados ya por una capa de células, constituyen inicialmente una poza de folículos primordiales en reposo. Por un proceso de selección, cuyo mecanismo no está perfectamente dilucidado todavía, algunos de estos folículos abandonan periódicamente la fase de reposo para formar parte de la población de folículos en crecimiento, cuyo desarrollo los llevará, inevitablemente, a la ovulación o a la atresia. Se sabe que en las hembras por cada ovocito que madura y es ovulado muchos más inician su desarrollo pero sufren un proceso de degeneración que les impide llegar a los estadios finales de la maduración y finalmente a la ovulación, por tal motivo cualquier ovario normal contiene numerosos ovocitos en degeneración dentro de folículos que no pudieron alcanzar su desarrollo total. Este proceso de degeneración que sufre la mayoría de los folículos ováricos se conoce como atresia (Ingram, 1962).

La atresia representa uno de los fenómenos más importantes de la biología reproductiva de las hembras (Hurwitz et al., 1992). El término atresia es de origen griego, literalmente significa la clausura u obliteración de un orificio o conducto del cuerpo (a=no, tresos= perforación). La atresia folicular es un fenómeno universal que se presenta no solo en los mamíferos, sino, por lo menos en todos los vertebrados (Ryan y Lee., 1976; Saidapur, 1978). Sin embargo, mientras que en los mamíferos los cambios morfológicos que acompañan a la atresia son sólo perceptibles en las escalas celular y subcelular, en los vertebrados inferiores el desarrollo de atresia es mucho más perceptible, pues los folículos son obliterados y degenerados por numerosas células de la granulosa que muestran una actividad fagocítica masiva (Saidapur, 1978).

El ovario de la mujer, al momento del nacimiento, contiene aproximadamente 2 millones de ovocitos, este número va disminuyendo, de manera que al llegar a la pubertad sólo, están presentes un promedio de 400,000 folículos de los cuales alrededor de 400 serán ovulados normalmente durante la vida reproductiva de la mujer. Al llegar la menopausia, ya no hay folículos en el ovario. Esta sorprendente frecuencia del fenómeno de atresia (99.9% de los folículos con que cuenta una mujer al llegar a la pubertad sufren degeneración atrésica y únicamente uno de cada 500 de los folículos presentes en el momento del nacimiento serán ovulados) hace a este proceso parte integral de la función ovárica normal (Rotello et al., 1989).

En otras especies de mamíferos, también la gran mayoría de los folículos ováricos, entre el 70 y el 99.9% son eliminados sin que lleguen a la ovulación (Ryan y Lee, 1976).

La atresia se presenta en las hembras desde la vida prenatal. Aunque la atresia puede ocurrir en cualquier etapa del desarrollo folicular es más frecuente en los folículos antrales (Hirshfiel, 1991). Basándose en las anomalías de tinción de la zona pelúcida de los ovocitos foliculares del ovario de la cerda, Centola en 1982 estimó que el 56% de los folículo preantrales eran ya atrésicos. Esto puede compararse con los datos de este mismo investigador, utilizando este mismo método en los que se señala que el 73% y el 84% de los folículos antrales de tamaños mediano (3 a 5 mm) y grande (6 a 12 mm) respectivamente son atrésicos. En los humanos la atresia comienza alrededor del sexto mes de la vida fetal (Peters et al., 1975) y continúa ininterrumpidamente durante toda la vida reproductiva, dando lugar a una pérdida progresiva de células germinales.

El funcionamiento de los ovarios, desde el punto de vista del desarrollo folicular, es caracterizado por el continuo crecimiento y degeneración de los folículos. Solo unos pocos de los folículos que se desarrollan son seleccionados para ovular (Rosales y Rosado 1989; Hirshfiel, 1991) por lo que parecería posible llegar a la conclusión de que el destino normal de los folículos ováricos no es la ovulación, sino la atresia (Murdoch, 1992). Por ejemplo, en especies como la oveja que ovulan uno o

dos folículos por ciclo, es posible observar sobre la superficie del ovario numerosos folículos terciarios cuyo destino será la atresia (Fortune et al., 1991). De hecho hay algunas coincidencias que han hecho suponer que, por lo menos en folículos preovulatorios, la ovulación y la atresia siguen un patrón de desarrollo similar aunque con finales divergentes. Por ejemplo, el índice picnótico es un criterio frecuentemente usado para definir la atresia inicial, sin embargo, la picnosis es un fenómeno reportado con frecuencia en folículos preovulatorios sanos (Koering et al., 1982). También es conveniente mencionar que algunos cambios degenerativos que afectan a las células de la granulosa pueden observarse tanto en los folículos que terminarán en la atresia, como en aquellos que serán ovulados normalmente (Murdoch, 1992).

En condiciones naturales, la atresia, es un proceso paulatino e irreversible. Las alteraciones morfológicas del folículo dependen del grado de atresia alcanzado. Desde el punto de vista histológico se han propuesto varias maneras de clasificar la atresia folicular; de ellas, la más utilizada en la actualidad es la de Carson et al., (1979), que es una modificación a la propuesta por Byskov (1974):

Atresia I: Se refiere a los folículos no atrésicos, que presentan una capa granulosa íntegra y uniforme. Sus tecas son perfectamente evidentes y están en contacto con la granulosa. La membrana basal está intacta. No hay células con núcleo picnótico en la granulosa, o bien son muy escasas (< 5% al examinar un corte sagital hecho por los diámetros mayores del folículo).

Atresia II: Se encuentran algunas áreas discontinuas en la granulosa, provocadas por el desprendimiento de algunas células y presentan un porcentaje importante (de 5 a 20%) de células con núcleo picnótico o fragmentado localizadas generalmente adyacentes a la cavidad antral. La membrana basal se conserva intacta.

Atresia III: Las perforaciones de la capa granulosa están asociadas con extensas áreas de picnosis de los núcleos de las células de esta capa. se observa un aumento en el número de leucocitos extravasados, lo cual se correlaciona con el rompimiento de la membrana basal. En esta etapa es posible demostrar la presencia

de linfocitos T citotóxicos en la pared folicular (Bukovsky et al., 1984). Frecuentemente se observa hipertrofia de la teca (Guraya y Greenwald, 1964). Al observar la capa granulosa con el microscopio electrónico es clara la disminución o desaparición de las uniones fuertes y de las uniones comunicantes (gap junctions), lo cual aumenta la distancia intercelular y, probablemente, provoca la descamación de las células a la cavidad folicular.

Atresia IV: En este momento se presenta una perforación extendida de la granulosa, además de una separación parcial de la teca interna. Los núcleos picnóticos son evidentes en ambas capas, a pesar de que el número total de células con núcleo picnótico es menor que en el estadio anterior, probablemente a causa de que las células degeneradas han sido fagocitadas por macrófagos. El ovocito empieza a separarse de la pared folicular.

Atresia V: Los fragmentos residuales de la granulosa están totalmente separados de la teca. Los capilares tecales y el ovocito han desaparecido. El folículo se encuentra encogido y puede haber colapso total de las paredes, aparentemente debido a la contracción de tejido muscular liso que ha sido descrito en la teca (Mota y Familiari, 1981).

Estos mismos autores (Carson et al., 1979; Byskov, 1974) encontraron que la atresia es dependiente del diámetro folicular; el 79% de los folículos con diámetro menor a 1 mm fueron no atrésicos (atresia I y/o II), mientras que el 93% de los folículos mayores de 6mm fueron atrésicos (atresia III, IV y V).

Asimismo confirman el hecho de que las células de la granulosa pierden la capacidad de unir gonadotrofinas conforme avanza la atresia.

En trabajos recientes que comparan observaciones al microscopio óptico con aquellas hechas en microscopio electrónico, se encontró que el único signo de atresia temprana fue la presencia de núcleos picnóticos y fragmentados en las células de la granulosa. En algunos casos, uno de los signos de atresia temprana fue la retracción del ovocito (Byskov, 1979). Los estudios de folículos con atresia

avanzada realizados con microscopio electrónico revelaron alteraciones citoplasmáticas fácilmente observables que variaron de acuerdo con el grado de atresia, yendo desde la vacuolización y el aumento en el tamaño de las mitocondrias, hasta daños importantes en otros orgánulos. Los ovocitos en los folículos que se encuentran en proceso de atresia presentan una importante vacuolización y disminución de las microvellosidades, los organelos se observan severamente distorsionados y la zona pelúcida, además de presentar una importante condensación, se encuentra retraída hacia la placa de células de la granulosa (Gondos, 1982).

Mientras que en el folículo normal las células de la granulosa son esféricas y presentan numerosas microvellosidades, en la atresia temprana se observa que las células de la granulosa se aplanan y pierden las evaginaciones citoplasmáticas. Si se piensa que estas proyecciones se correlacionan con la presencia de receptores para la LH en las células de la granulosa, es fácil relacionar la pérdida de microvellosidades, observada durante el principio de la atresia, con la pérdida de receptores para esta hormona (Peluso et al., 1977).

Existe una propuesta para clasificar a los folículos por su estado de atresia basándose únicamente en su apariencia morfológica gruesa (observación simple, o ayudada por una lupa), lo cual permite clasificarlos para su estudio sin alterar ninguna de sus propiedades biológicas básicamente apoyada en tres aspectos: vascularización de la teca interna, integridad de la capa granulosa y translucidez del folículo. Este método ha sido desarrollado por Hay et al., (1976) y Moor et al., (1978) en la oveja, por Meinecke et al., (1982) en la cerda, por Henderson et al., (1984) en la vaca y por Rosales et al., (1990) en la cabra y en la oveja (Rosales et al., En prensa). En estos trabajos se ha demostrado que la clasificación morfológica que se indica a continuación puede correlacionarse satisfactoriamente con la clasificación histológica.

En el grupo número 1, se incluyen los folículos con apariencia translúcida, buena vascularización y capa granulosa regular. Este grupo se refiere a los folículos normales no atrésicos.

En el grupo 2 se incluyen los folículos que presentan apariencia grisácea o que han perdido su apariencia translúcida, pero que todavía presentan circulación sanguínea y escasos desprendimientos de la capa granulosa. Este grupo fue considerado "intermedio" y difícil de clasificar.

Finalmente un tercer grupo, en el cual se incluyen los folículos claramente atrésicos, cuya apariencia opaca obedece a que la mayor parte de los vasos sanguíneos se encuentran vacíos, así como a la presencia de grandes desprendimientos de la granulosa y de una gran cantidad de glóbulos blanquecinos "cuerpos atrésicos", dentro de la cavidad folicular. Este último grupo fue posteriormente dividido en dos subgrupos 3a y 3b, que incluyen a los folículos moderadamente atrésicos y severamente atrésicos.

MECANISMOS QUE PARTICIPAN EN EL DESARROLLO DE LA ATRESIA.

Hasta el momento no se conocen con precisión las causas que desencadenan o determinan la atresia folicular. Sin embargo, su universalidad permite suponer que es un proceso indispensable para la sobrevivencia de las especies, sujeto a una cuidadosa regulación, puesto que nunca interfiere con la reproducción normal y tal vez, indispensable para que se realice normalmente la maduración de los ovocitos que deberán ser ovulados (Guthrie, et al, 1995; Hsueh et al., 1994; Jolly et al., 1997) A pesar de la atención dedicada a este tema por diversos investigadores, no ha sido posible encontrar ningún marcador bioquímico o endocrinológico que permita predecir, con certeza, cuáles folículos terminarán atrésicos.

Desde el punto de vista morfológico, es difícil determinar cuando se inicia el proceso de atresia. Byskov (1974), tratando de obtener datos cuantitativos que permitieran determinar el principio de la atresia, estableció que la presencia de 5% o más de núcleos picnóticos en las células de la granulosa, encontradas al observar un

corte sagital en la zona de mayor dimensión del folículo, debe ser considerado como un signo definitivo de la presencia de atresia temprana. Los estudios de Brailly et al., (1981) han demostrado que los folículos humanos no ovulatorios con índices picnóticos menores al 3%, e índices mitóticos mayores al 11.5% son folículos normales; pueden considerarse atrésicos aquellos folículos con índices picnóticos mayores al 5% e índices mitóticos menores que lo normal.

Aunque no son claras las razones fundamentales que llevan a la muerte masiva de las células somáticas y germinales que constituyen los folículos ováricos, posiblemente este proceso de eliminación represente una ventaja evolutiva, de manera que se seleccionen para la ovulación, sólo los ovocitos que puedan asegurar que la fertilización terminará con la producción de un nuevo ser capaz de mantener el desarrollo de la especie. De manera general podría afirmarse que, a través de mecanismos completamente diferentes pero que requieren el aparente desperdicio de la gran mayoría de las gametas producidas, el proceso evolutivo funciona, tanto en el macho como en la hembra, para seleccionar sólo aquellas gametas que aseguren de la mejor manera posible, la supervivencia de la especie.

El mecanismo de selección de los folículos durante el ciclo estral normal, depende de su exposición a la hormona folículo estimulante (FSH), lo cual debe acontecer durante un estadio crítico del desarrollo. Folículos que reciben un aporte insuficiente de FSH durante el período crítico son destinados a la degeneración atrésica. El hecho que los folículos atrésicos en estadios avanzados del desarrollo posean una actividad esteroidogénica sustancial, permite suponer que el proceso de atresia pueda servir, además, como un mecanismo de eliminación endócrino intraovárico (Hsueh et al., 1994).

Varios procesos anatómo-fisiológicos están asociadas con la atresia folicular, entre ellos se encuentra: desprendimiento y degeneración de las células de la granulosa (Hay et al., 1976), presencia de células con núcleos picnóticos en la granulosa (Hay et al., 1976), fragmentación de la lámina basal (Bagavandoss et al., 1983), reducción en la síntesis de DNA (Greenwald, 1989), disminución de la síntesis

de estrógenos (Carson et al., 1979), disminución de la capacidad de fijación de gonadotrofina (De Felici et al., 1993). Recientemente se ha reportado que las células de la granulosa y de la teca, colectadas de folículos atrésicos, presentan fragmentación internucleosomal del DNA, característico de células que sufren apoptosis. La atresia también ha sido asociada con una falla en la producción o activación de las enzimas que participan en la remodelación tisular del tejido ovárico (García et al., 1997).

De acuerdo a lo mencionado anteriormente, sería necesario establecer algunos conocimientos fundamentales sobre el desarrollo folicular para poder comprender mejor los mecanismos que participan en la atresia una vez que la maduración folicular ha rebasado las fases de folículos primordiales.

Según la clasificación que en principio fue propuesta para el ratón (Otsuka et al., 1984) y más tarde adoptada para el humano y otras especies (Gougeon, 1986), se pueden distinguir 4 tipos de folículos (Fig. 1):

1) Folículos primordiales, que son folículos pequeños que consisten de un ovocito pequeño, pocas células de la granulosa flotantes y capa basamental. Los folículos primordiales se encuentran generalmente en la corteza externa del ovario y representan la llamada poza de folículos de reserva. En la mayoría de las especies domésticas la mayor fuente de este tipo de folículos es el epitelio superficial del ovario (Gosden, 1987); es aquí también donde se produce la mayor pérdida de este tipo de folículos (Woessner et al., 1989). La iniciación del crecimiento folicular, incluye el crecimiento del ovocito, así como la mitosis de las células de la pregranulosa y su conversión a células cuboidales. Se refieren con el nombre de folículos primarios, a aquellos folículos en donde el ovocito se halla ya completamente rodeado de una sola hilera de células granulosas cuboidales.

2) Por una serie de divisiones mitóticas de las células de la granulosa, los folículos primarios unilaminares, son convertidos en folículos multilaminares a los que se les da el nombre de folículos preantrales, secundarios, medianos o folículos en crecimiento. En estos folículos el ovocito comienza a crecer, se forma

la zona pelúcida, las células de la granulosa proliferan formando dos o tres capas que rodean al ovocito y las células del estroma ovárico se organizan y forman las células de la teca. Se inicia la formación del antro y la acumulación del líquido folicular.

3) Los folículos antrales, consisten de ovocitos bien desarrollados, con varias capas de células de la granulosa, un antro lleno de líquido, una capa basal que delimita la granulosa de la teca interna y capas tecales bien diferenciadas.

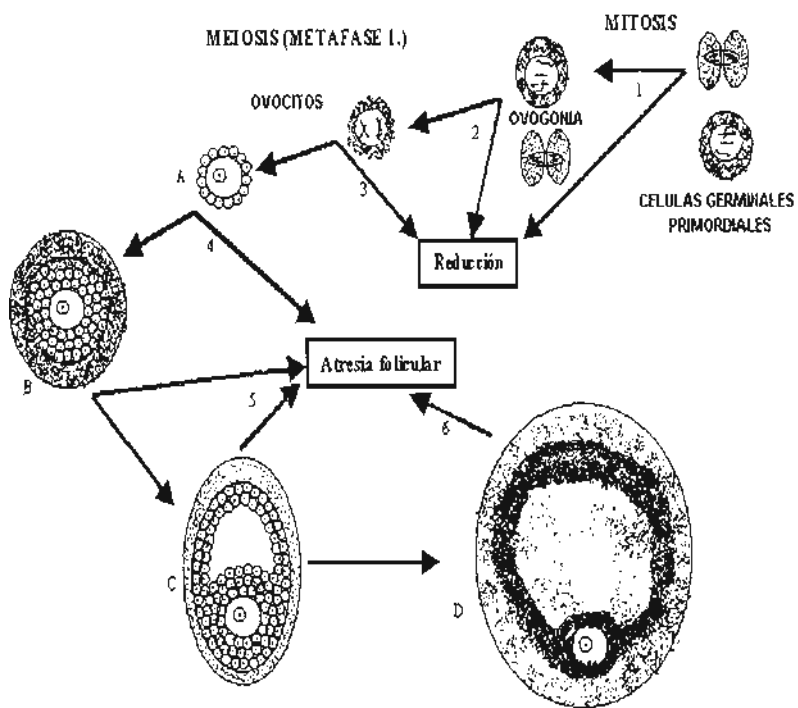
4) Los folículos preovulatorios, también llamados folículos de Graaf, adquieren su máximo diámetro y responden a los picos preovulatorios de gonadotrofinas.

En cada una de estas cuatro etapas del desarrollo folicular puede ocurrir el proceso degenerativo de la atresia. En los folículos preantrales es poco claro el mecanismo por el cual estos se vuelven atrésicos, sin embargo en varias especies se conoce que el porcentaje de folículos atrésicos se incrementa en la medida que aumenta el tamaño de los folículos, de manera que cuando los folículos llegan a ser antrales, una alta proporción de ellos son atrésicos. En la rata, el 70% de los folículos antrales son atrésicos; en el ratón el 50% (Jones, 1956); en la coneja, 60% (Petrucci, 1978), en el humano entre el 50 y el 75% (Magnusson et al., 1983), en la cerda el 73% de los folículos medianos (3-5 mm) y el 84% de los grandes (6-12 mm) son atrésicos (Centola, 1982).

En los mamíferos hay al menos seis olas de degeneración que ocasionan la pérdida masiva de células germinales durante el desarrollo folicular (ver Fig. 1). Las primeras tres de estas etapas u olas, ocurren antes de la formación del folículo, así que comprende básicamente la degeneración de células germinales, mientras que las otras tres etapas, se presentan en las distintas fases del desarrollo folicular.

1.- Degeneración de células germinales primordiales. Hacia la tercera semana de gestación, en el embrión humano, las células germinales primordiales se encuentran en el epitelio del saco vitelino, cerca de la alantoides. Para el mes de

Figura 1.- Reducción o pérdida de células germinales y atresia folicular durante el desarrollo ovárico. En el ovario fetal gran número de células germinales primordiales y ovogonias sufren degeneración (estadios 1 y 2). De la misma manera los ovocitos primarios que no se rodean de células foliculares, degeneran (estadio 3). Folículos en todos los estadios del desarrollo (preantrales A y B; antrales C; ovulatorios D) pueden sufrir atresia, sin embargo la mayoría de la atresia ocurre en los últimos estadios de desarrollo folicular (B y C) (Hsueh et al., 1994).



edad, estas células se han movido hacia la cresta genital, cerca del riñón. El desplazamiento de las células germinales parece estar dado por movimientos celulares activos asociados con la emisión de pseudópodos que propician movimientos amiboideos o por un movimiento de tipo laminar inducido por las células del intestino sobre las cuales se deslizan (Donovan et al., 1986), o bien por interacciones de las células germinales primordiales con fibronectina (Alvarez et al., 1986), un componente de la matriz extracelular. Algunos autores sugieren que las células somáticas de la cresta genital poseen o emiten señales que atraen a las células germinales, estas señales pueden estar mediadas por agentes quimiotácticos esteroidales; también se ha propuesto que el factor de crecimiento transformante (TGF- β) producido por la gónada primordial participa en la atracción quimiotáctica de las células germinales primordiales (Godin y Wylie et al., 1991). Durante su migración, las células germinales primordiales presentan una gran actividad mitótica, por lo que su número aumenta dramáticamente. La gran actividad de división celular culmina con la conversión de estas células en ovogonias. Se ha demostrado que varios factores de crecimiento regulan la proliferación de las células germinales primordiales en los roedores. Así mismo, factores que elevan el nivel intracelular de AMPcíclico, también estimulan la proliferación de estas células (De Felici, 1993). La falta de estos factores produce apoptosis en las células germinales en cultivo.

2.- Reducción de ovogonias. Las células germinales primordiales que colonizan el ovario en desarrollo se organizan en cordones o racimos y se convierten en ovogonias. Las ovogonias conservan una frecuencia elevada de mitosis (Wasarman y Albertin, 1994), pero en este caso la proliferación de las ovogonias se acompaña de una degeneración masiva, que afecta tanto a las células en interfase, como durante la mitosis (Beaumont y Mandal, 1962). Después que las células germinales colonizan la región urogenital, se inicia un proceso de proliferación y reorganización de las células somáticas mesenquimatosas y del epitelio celómico que origina: a) el tejido estromal que contiene a las células germinales primordiales

rodeadas por células derivadas de la rete ovari, precursoras de las células de la granulosa, de origen mesonéfrico y b) el tejido estromal que dará origen al tejido conectivo vascular e intersticial esteroideogénico (células de la teca interna) (Roy y Grewald, 1990).

3.- Degeneración de ovocitos. El cese de la mitosis en las ovogonias es acompañada por la transformación de la ovogonia en ovocito, en el cual comienza la meiosis. El proceso de la meiosis es iniciado en la mayoría de los mamíferos, durante la vida prenatal o poco después del nacimiento. El ovocito alcanza el estado de diploteno de la profase I, justo antes o inmediatamente después del nacimiento. Antes de completar el proceso meiótico, reaparecen la membrana nuclear y el nucléolo, el proceso se detiene y la célula entra en una profase II prolongada, conocida como dictioteno. El ovocito con un núcleo prominente, referido como vesícula germinal y en estado de diploteno difuso, permanece durante toda la infancia hasta alcanzar la pubertad.

Inmediatamente después de que se forma el ovocito es rodeado por una capa de células epiteliales aplanadas, lo que da lugar a la formación del folículo primordial. Justo antes que las células germinales alcancen el estado de folículo y coincidiendo con la entrada de las ovogonias a la meiosis, las células germinales sufren una reducción masiva (Beaumont y Mandal, 1962). Esta reducción también parece estar determinada por la capacidad del ovocito para rodearse de células pregranulosas, ya que en ratas se ha observado, que entre los días 1 a 3 después del nacimiento, la mayoría de los ovocitos son rodeados por células foliculares para formar los folículos primordiales, y sin embargo aquellos que permanecen desnudos, usualmente degeneran (Ogasawara et al., 1993).

4.- Estados degenerativos después de la formación del folículo. Los cambios degenerativos de la atresia, han sido más estudiados en esta etapa del desarrollo folicular. En los estadios tempranos del desarrollo folicular, los ovocitos permanecen juntos, formando nidos sin una clara membrana que los separe. Posteriormente la foliculogénesis inicia la transformación de los nidos de ovocitos, en

ovocitos individuales, cada uno rodeado de pocas células granulosas, y la formación de la capa basamental que rodea a cada ovocito. La capa simple de células pregranulosas, descansa sobre esta lámina basal o basamental, que está compuesta de un material amorfo. Las células granulosas se encuentran no solo en contacto, sino que sus membranas están íntimamente unidas en numerosos puntos a través de uniones fuertes. Durante los estadios tempranos del desarrollo folicular, el contacto entre las células de la granulosa se caracteriza por la adquisición de uniones membranales, que incluyen desmosomas cortos, adherencias zonales y uniones comunicantes (Minn et al., 1996). Conforme el folículo crece, hay cambios en la naturaleza del contacto célula-célula, las adherencias zonales y los desmosomas se van perdiendo y las uniones comunicantes aumentan en número y tamaño. Las uniones comunicantes son agregados de canales transmembranales que poseen un polo hidrofílico. A través de estos canales más del 85% de los nutrientes del citoplasma de una célula pasan a la otra, y de las células del cumulus al ovocito. Estas interacciones metabólicas constituyen el fenómeno conocido como acoplamiento metabólico (White, 1993).

Observaciones al microscopio electrónico han revelado que las células de los folículos antrales atresícos presentan alteraciones citoplásmicas que varían de acuerdo al grado de atresia y que van desde la vacuolización y el aumento del tamaño o dilatación de las mitocondrias y otros organelos, hasta daños más severos. Los núcleos de las células de la granulosa muestran con frecuencia una marcada condensación nuclear (picnósis) (Gondos, 1982). Cuando las células de la granulosa se desprenden y flotan en el espacio antral, adquieren formas irregulares y pierden sus evaginaciones citoplásmicas, mientras que las células normales son esféricas y tienen numerosas proyecciones citoplásmicas irregulares. Estas proyecciones citoplásmicas, se correlacionan normalmente con la presencia de receptores a LH (Ruiz, 1988), de modo que la pérdida de estas vellosidades, seguramente tiene que ver con la menor capacidad que los folículos atresícos tienen para unir gonadotrofinas (Pedersen y Peters, 1968).

En las células de la teca los cambios durante la atresia son específicos de especie. Mientras que en el humano, la rata y el conejo, estas células sufren extensiva hipertrofia (Erickson et al., 1985), la teca en el hámster no presenta cambios morfológicos importantes (Hubbard y Greenwald, 1985). Se cree que en las especies donde ocurre hipertrofia en las células de la teca, éstas pueden formar células intersticiales secundarias del estroma, esteroideogénicamente activas (Erickson et al., 1985).

En los ovinos, las células de la teca de folículos atrésicos, sufren condensación nuclear y degeneración celular, como la que sufre las células de la granulosa, aunque este proceso parece estar restringido a los estadios más avanzados de la atresia.

Los cambios más sobresalientes durante la atresia en los ovocitos, también varían con la especie, en el humano y la rata (Erickson et al., 1985), el ovocito sufre ruptura de la vesícula germinal, la apariencia de estos ovocitos es normal o igual a la de ovocitos que están reiniciando la meiosis, sin embargo los ovocitos de folículos sanos presentan una elevación importante en el consumo de oxígeno cuando éstos reinician la meiosis, mientras que la ruptura de la vesícula germinal de los ovocitos de folículos atrésicos, no se acompaña de este fenómeno (Locksin et al., 1991). En la oveja (Meinecke et al., 1982) y en la rata (Trump et al., 1967), los ovocitos colectados de folículos atrésicos tienen la misma capacidad que los procedentes de folículos sanos para fertilizarse *in vitro* y desarrollar embriones, lo cual quiere decir que en estas especies no se producen daños importantes en el ovocito durante la atresia.

Una característica común en varias especies de mamíferos, es que en la atresia de folículos grandes, los ovocitos, presentan cambios parecidos a los de la meiosis, a los que se les ha llamado "pseudomaduración o pseudodivisión". Esto incluye la ruptura de la vesícula germinal, alineación de los cromosomas en metafase y posiblemente hasta la expulsión de un cuerpo polar (Erickson, 1986).

Además de los cambios morfológicos e histológicos, han sido identificadas muchas modificaciones en los procesos bioquímicos durante la atresia folicular

(cuadro 1). Entre ellas se incluye, la reducción en la síntesis de DNA por las células de la granulosa (Greenwald, 1989), la supresión del acoplamiento metabólico por la pérdida de las uniones comunicantes (Wiensen et al., 1993), una disminución en la capacidad de fijación de gonadotrofinas (Carson et al., 1979), así como la disminución en la síntesis y expresión de los RNAm correspondientes a las aromatasas y a los receptores para gonadotrofinas (Tilly et al., 1992).

También se ha encontrado que durante la atresia folicular se incrementa la expresión de varios genes, entre ellos el de las proteínas que unen al Factor de Crecimiento Insulinoide (IGFBPs) (Murdoch, 1992), el de la glicoproteína-2-sulfatada, también conocida como TRPM-2 (Kaynard et al., 1992), el de una aspartil endopeptidasa lisosomal, la catepsina-D, y el del receptor para la angiotensina II (Daud et al., 1989).

A nivel enzimático, además de las modificaciones en la presencia y actividad de las aromatasas, se ha demostrado la participación de enzimas lisosomales (Quirk et al., 1995) y enzimas con actividad proteolítica y antiproteolítica en el desarrollo de la atresia (Rosado y Rosales, 1991), así como la de aquellas enzimas involucradas en la remodelación tisular, como colagenasas, gelatinasas, Pz-peptidasas (García et al., 1997) y del activador del plasminógeno (Meinecke et al., 1982).

TEORIAS SOBRE LA ATRESIA.

Por lo menos tres modelos teóricos pueden ser propuestos para explicar como se determina el destino de los folículos, el cual puede ser, como sabemos: la ovulación o, en la gran mayoría, la atresia. (Fig. 2)

a) Los folículos que sufren atresia pueden estar predeterminados por deficiencias inherentes al ovocito, las células foliculares o por su ambiente inmediato. Como la mayoría de los folículos son capaces de crecer bajo apropiada estimulación hormonal, este mecanismo no parece ser la base para la atresia de la mayoría de los folículos.

b) La mayoría, si no es que todos los folículos son capaces de llegar a la ovulación a menos que la atresia se dispare por estímulos atresiogénicos.

c) El destino final de todos los folículos es la atresia. Soló los folículos que alcanzan un estado específico de desarrollo que coincida con señales hormonales críticas, son dispensados de la atresia (Fig. 2).

MUERTE CELULAR

Existen diversas teorías que tratan de explicar las causas de la atresia (Rosado y Rosales 1991) pero todas ellas deben incluir finalmente un proceso que involucre la producción de muerte celular. Hace algunos años se postulaba que la atresia es el resultado de la limitaciones en aporte de nutrimentos y sustratos por una reducción de la suplementación sanguínea (Greenwald, 1989; Hay et al., 1976) inducida por el rápido crecimiento del folículo. Desde este punto de vista, era posible admitir que el proceso principal por el cual se iniciaba la muerte celular durante el proceso de atresia se debía fundamentalmente a la liberación de enzimas lisosomales y la producción de necrosis celular. Sin embargo, la determinación del gasto sanguíneo del folículo, realizada mediante el uso de esferas radiactivas, no mostró diferencias significativas entre el gasto sanguíneo del folículo normal y el del folículo en las etapas tempranas de atresia (Bruce y Moor, 1976). La reducción del gasto sanguíneo sólo fue encontrada en las atresias avanzadas. Estos resultados llevaron a considerar que la reducción en el gasto sanguíneo debe ser más bien una consecuencia que la causa de la iniciación de la atresia. En relación con esta hipótesis es necesario recordar que desde hace varios años se sabe que durante la fase folicular del ciclo estral el ovario es infiltrado por células cebadas (Loved et al., 1961).

**CAMBIOS MORFOLOGICOS Y BIOQUIMICOS QUE SE HAN
CORRELACIONADO CON LA ATESIA FOLICLAR.**

A. Células de la granulosa

- Pícnosis nuclear
- Disminución en la síntesis de DNA
- Disminución en la producción de estrógenos
- Incremento en la producción de progesterona
- Disminución de receptores y de su respuesta a gonadotrofinas
- Incremento en la expresión de proteínas unidoras de IGF
- Incremento en la expresión de SGP-2
- Incremento en la expresión del receptor a angiotensina II
- Incremento en la actividad de catepsina D
- Disminución de la expresión de la proteína de las uniones comunicantes
- Desprendimiento de la lámina basal
- Disminución de la actividad de metaloproteinasas.
- Producción de inhibidores de tripsina

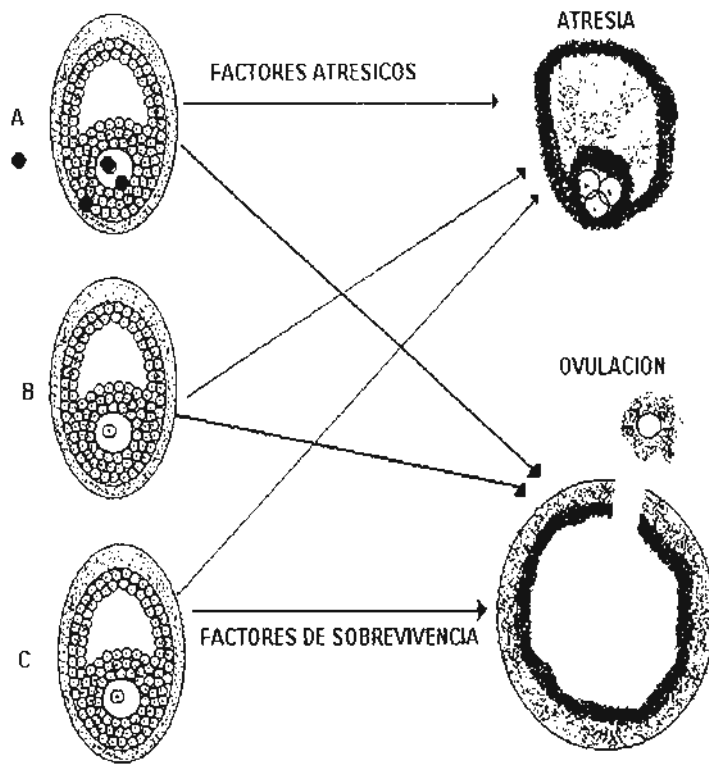
B. Células de la teca

- Hipertrofia y formación de células intersticiales secundarias en algunas especies
- y formación de núcleos picnóticos en otras.
- Disminución en la actividad de colagenasa intersticial

C. Ovocito

- Desprendimiento y pérdida de las uniones comunicantes
 - Modificaciones en la estructura de la zona pelúcida
 - Rompimiento de la vesícula germinal
-

Figura 2.- Tres modelos teóricos que determinan la atresia folicular. A, El destino folicular es determinado por deficiencias inherentes al ovocito, a las células somáticas o al ambiente folicular (•). B, Normalmente todos los ovocitos alcanzan la ovulación a menos que se expongan a factores atresiogénicos. C, Todos los folículos son destinados a la atresia a menos que se expongan a factores de sobrevivencia (Hsueh et al., 1994).



Recientemente (Krishna y Terranova, 1985) se encontró que durante el pico de LH se produce una degranulación masiva de estas células, lo cual libera al tejido ovárico cantidades importantes de histamina y heparina (Atkins et al., 1985) con la consecuente vaso dilatación. En la actualidad el pensamiento científico para explicar la muerte celular que ocurre durante la atresia folicular se orienta más a concluir que el proceso se debe fundamentalmente a un proceso apoptótico de las células de la granulosa, siendo la necrosis un mecanismo terminal debida al proceso inicial de apoptósis.

El importante papel que juega la muerte celular en muchos de los procesos biológicos, ha hecho que el estudio del proceso de muerte, por sí mismo, sea el foco de atención de numerosos grupos de investigación (Darzynkiewicz et al., 1997 y de Renvoizé et al., 1998). Resulta especialmente interesante discriminar entre los diferentes modos de muerte celular, particularmente entre la claramente definida como muerte celular programada (Ellis, et al., 1991), la apoptosis (Kerr et al., 1972) y la necrosis (Wyllie, 1981).

La muerte celular programada, de gran importancia durante algunos de los procesos más relevantes en biología como la diferenciación, el crecimiento y la morfogénesis, es importante porque es frecuentemente confundida indebidamente con la apoptosis, siendo ambos procesos completamente diferentes, aunque tengan algunos mecanismos bioquímicos comunes.

La apoptosis y la necrosis son dos formas de muerte celular con características morfológicas y bioquímicas claramente distinguibles (Wyllie et al., 1980). Sin embargo, ambos tipos de muerte pueden ocurrir simultáneamente en tejidos o cultivos celulares expuestos al mismo estímulo (Shimizu et al., 1996; Leist et al., 1995). Con frecuencia la intensidad del mismo estímulo, decide si es la apoptosis o la necrosis la que prevalece (Bonfoco et al., 1995; Dypbukt et al., 1994). Esto sugiere que mientras que algunos eventos tempranos en ambos tipos de muerte pueden ser comunes, se requiere de un elemento regulador que dirija a la célula hacia la apoptosis. En algunos estudios se ha observado que en la necrosis, los

niveles intracelulares de energía disminuyen, mientras que en la apoptosis esto no sucede (Ankarcrona et al., 1995). Estudios recientes indican que se requiere de ATP para ejecutar los distintos procesos del programa apoptótico (Leist et al., 1997), así por ejemplo se ha demostrado la necesidad de ATP para la activación de ciertas caspasas necesarias para la degradación de la lámina B, y producir el colapso nuclear que ocurre en la apoptosis (Leist et al., 1997). En un estudio realizado con linfocitos T inducidos a sufrir apoptosis se observó que las células murieron por necrosis cuando experimentalmente se les eliminó su contenido de ATP (Leist et al., 1997)

NECROSIS

Se ha propuesto que los lisosomas son organelos más resistentes de lo que se pensó en un principio y que sólo sufren alteraciones, identificadas por liberación de sus numerosos y poderosas enzimas hidrolíticas al citosol (Wilson et al., 1987; Zdolsek et al., 1990), en etapas tardías del proceso de degeneración celular.

Una de las principales razones para que se haya producido esta opinión parece ser el hecho de que los lisosomas pueden tener una apariencia ultraestructuralmente normal aún cuando las células presentan alteraciones degenerativas avanzadas. Se ha demostrado, sin embargo, que los lisosomas pueden mostrar una membrana estructuralmente intacta a la microscopía electrónica a pesar de que haya liberación de cantidades substanciales de marcadores enzimáticos, como la fosfatasa ácida y la catepsina D, al citosol (Hellquist et al., 1997). Es pues posible que la degeneración celular inducida por alteraciones lisosomales no requiera la ruptura de la membrana lisosomal, sino que pueda ser debida solo a desestabilización de su membrana, lo cual sería suficiente para permitir la infiltración citoplásmica de actividades importantes de enzimas hidrolíticas (Kane et al., 1980) y la iniciación del proceso de muerte celular.

En apoyo a la hipótesis original de De Duve y Watiaux (1966), que consideró a los lisosomas "bolsas suicidas", y en contraste a lo propuesto por Wilson et al., (1987) y por Zdolsek et al., (1990), actualmente se han revisado algunas ideas sobre la susceptibilidad de la membrana lisosomal a algunos factores capaces de alterarla, especialmente al estrés oxidativo (Brunk, et al., 1995; Zhang et al., 1995). Esto podría ser una consecuencia de su contenido normal, aunque en pequeñas cantidades, de Hierro. El Hierro intralisosomal puede ser el resultado de la digestión autofagocitaria de organelos y metalo-proteínas de vida larga (Erickson, 1969, Brunk, et al., 1992, Mortimore, et al., 1996). Por ejemplo la mitocondria y los citocromos endoplásmicos son ricos en metaloproteínas y por lo tanto en hierro (Sakaida, et al., 1990, Brunk, et al., 1992). Parece razonable asumir que una porción considerable de iones redox-activos en las células está localizado en la región intralisosomal (Brunk, et al., 1992, Zdolsek, et al., 1990) donde pueden catalizar reacciones oxidativas que bajo condiciones normales producen aumentos importantes en el contenido de ceroides y lipofuscina (Brunk, et al., 1995), factores capaces de facilitar las alteraciones en la permeabilidad de la membrana lisosomal. Es pues posible que bajo condiciones patológicas, tales como aumento en el estrés oxidativo, se produzca la peroxidación de las membranas lisosomales seguida de la liberación de poderosas enzimas hidrolíticas capaces de iniciar la degeneración o bien la muerte celular. El conocimiento actual de la participación de enzimas hidrolíticas citosólicas en el proceso de muerte celular, tanto apoptótica como necrótica, hace de estas posibilidades uno de los puntos de unión difíciles de resolver en la actualidad en el proceso de muerte celular (Brunk, et al., 1997, Hellquist, et al., 1997).

La necrosis ocurre en respuesta a una gran variedad de condiciones nocivas y sustancias tóxicas, incluyendo hipertermia (Buckley, 1972), hipoxia (Kyprianou and Isaacs, 1988), isquemia (Borgers et al., 1987), citotoxicidad (Trump et al., 1982), ataque por el complemento (Hawkins, 1972) y por el trauma directo de la célula (Trump et al., 1984). Las alteraciones lisosomales que acompañan el principio del fenómeno de necrosis parecen ser, en ocasiones, característicos del tipo celular, característica que lo hace semejante al proceso de iniciación de la apoptosis. Por

ejemplo, se han encontrado diferencias sustanciales sobre el efecto que puede tener el estrés oxidativo sobre la estabilidad de la membrana lisosomal en distintas células (Zhang, et al., 1996, Olejnicka, 1997). Este fenómeno puede ser un reflejo parcial de las diversas cantidades de hierro redox-activo intralisosomal consecuencia de diferencias específicas de la actividad autofagocitaria de diferentes estirpes celulares (Brunk, et al., 1992).

Los cambios característicos durante la necrosis son, en principio, la edematización del citoplasma y de los organelos intracitoplásmicos, especialmente de las mitocondrias, sin que se aprecien modificaciones significativas en la estructura nuclear. Estos cambios terminan produciendo la disolución de los organelos y la ruptura de la membrana plasmática, lo que ocasiona que todo el contenido celular sea vertido al espacio extracelular. Muchos de estos cambios morfológicos son debidos a la pérdida de la permeabilidad selectiva de la membrana plasmática (Trump et al., 1982). Las alteraciones se producen en respuesta a la desaparición temprana de las actividades de bombeo iónico por daño de las membranas celulares, seguido de la disminución de la generación de energía celular (Jennings y Reimer, 1981). Como los cationes se mueven y cruzan la membrana por los gradientes de concentración, esto se acompaña del transporte de líquido, causando la tremenda edematización de la célula. El incremento de Ca^{2+} citosólico libre resulta en la activación de fosfolipasas unidas a la membrana, las cuales degradan los fosfolípidos de la membrana y causan destrucción general de la membrana plasmática (Chien et al., 1978). La liberación de hidrolasas, por la ruptura de los lisosomas, participa desde el principio en el proceso de desintegración celular y es particularmente evidente en los estadios tardíos de la necrosis (Hawkins et al., 1972). Ocurre una rápida disminución de proteínas, RNA y DNA. EL DNA expuesto por la ruptura de la membrana nuclear y la digestión proteolítica de las histonas, es susceptible de ser degradado en fragmentos de diferentes tamaños por desoxiribonucleasas lisosomales. Este tipo de fragmentación del DNA, cuando se estudia por electroforesis en un gel de agarosa, se aprecia como un barrido que demuestra que la hidrólisis del DNA se hace siguiendo un espectro continuo de tamaños (Afanas'ev

et al., 1986). Típicamente la necrosis afecta grupos de células contiguas y se acompaña, usualmente, de una reacción inflamatoria desarrollada como respuesta a la liberación de fragmentos celulares.

APOPTOSIS

En contraste con la necrosis, muerte celular inducida por un daño o trauma celular, varios investigadores señalaron la presencia de un tipo de muerte celular que ocurre bajo distintas condiciones, pero aparentemente de manera espontánea, siguiendo un patrón bioquímico y morfológico distinto a la necrosis. En 1972 se propuso el término de apoptosis para esta forma de muerte celular (Kerr et al., 1972). Este término ha sido usado de manera indistinta, pero equivocada, con el de muerte celular programada, acuñado por algunos autores (Lobb et al., 1988) para describir la muerte regulada evolutivamente que ocurre en el contexto del desarrollo y que incluye la activación programada de genes. Como mencionamos arriba, en el momento actual es claro que no toda la muerte celular programada ocurre por apoptosis, y algunos ejemplos de apoptosis tienen lugar sin nueva expresión de genes (Schwall et al., 1993).

La apoptosis es un proceso activo, inducido por factores reguladores, generalmente extrínsecos a la célula misma, gobernada por un programa genético intrínseco de muerte, que afecta a células simples dispersas y se caracteriza por la retracción de la célula, condensación de la cromatina y la formación de pequeños pedazos esféricos de membrana que contienen fragmentos nucleares, referidas como cuerpos apoptóticos. La característica fundamental de la apoptosis es la activación de una endonucleasa, dependiente de Ca^{2+} y Mg^{2+} , la cual rompe el DNA de manera específica en el espacio internucleosomal produciendo fragmentos de 180-200 pares de bases o sus múltiplos. Estos fragmentos pueden ser observados en un gel de agarosa como bandas características en forma de escalera, que son marcadamente diferentes del patrón electroforético difuso que resulta del rompimiento del DNA al azar que ocurre durante la necrosis (Hsueh et al., 1996). Las

células que mueren por apoptosis son fagocitadas rápidamente por las células vecinas, ya que la fagocitosis ocurre antes de que se pierda la integridad de la membrana, de tal manera que tampoco hay componentes citoplásmicos en el espacio intercelular que produzcan una reacción inflamatoria (Hsueh et al., 1994). Las diferencias más importantes entre la apoptosis y necrosis se pueden observar en el cuadro 2.

Hasta hace algunos años, se pensaba que la mayoría de las células que sufrían apoptosis no tenían actividad proliferativa y por lo tanto permanecían en la fase G0 del ciclo celular (Schwartz y Osborne, 1993). Posteriormente con el uso de la citometría de flujo, en la cual se utilizan colorantes fluorocromáticos, se pudo concluir que la disminución de la coloración del DNA, correspondía a una marca característica de las células apoptóticas (Nakatani et al., 1992). Los primeros histogramas obtenidos de los estudios de las células apoptóticas por citometría de flujo evidenciaron que estas células formaban una región que se diferenciaba de las células diploides localizadas en la región G0/G1, por su menor contenido de DNA y le llamaron pico hipodiploide o "sub-G1" (Nakatani et al., 1992). Actualmente, se conoce como "A0" a esta región hipodiploide, que se localiza al lado izquierdo de la población G0/G1 de un histograma. Estudios de electroforesis en gel, han comprobados que las células de la región A0, efectivamente corresponden a células apoptóticas con fragmentación internucleosomal característico (Tapanainen et al., 1993).

Hasta hace poco tiempo se consideraba que la fragmentación internucleosomal del DNA era el primer cambio ocurrido durante la apoptosis, evidencias actuales indican que la célula apoptótica sufre una serie de cambios en la membrana celular que aparentemente preceden a la fragmentación del DNA, entre estos cambios se pueden mencionar: la expresión de sitios de unión a la trombospondina (Parker et al., 1998), la pérdida de residuos de ácido siálico (Saidapur, 1978) y la exposición de fosfatidilserina. Se sabe que en las células que sufren apoptosis, se rompe la asimetría en la composición de fosfolípidos de la

membrana plasmática, quedando expuestos en la cara externa de la membrana fosfolípidos, como la fosfatidilserina, que normalmente solo pueden encontrarse en la cara interna de la membrana celular (Fadok et al., 1992).

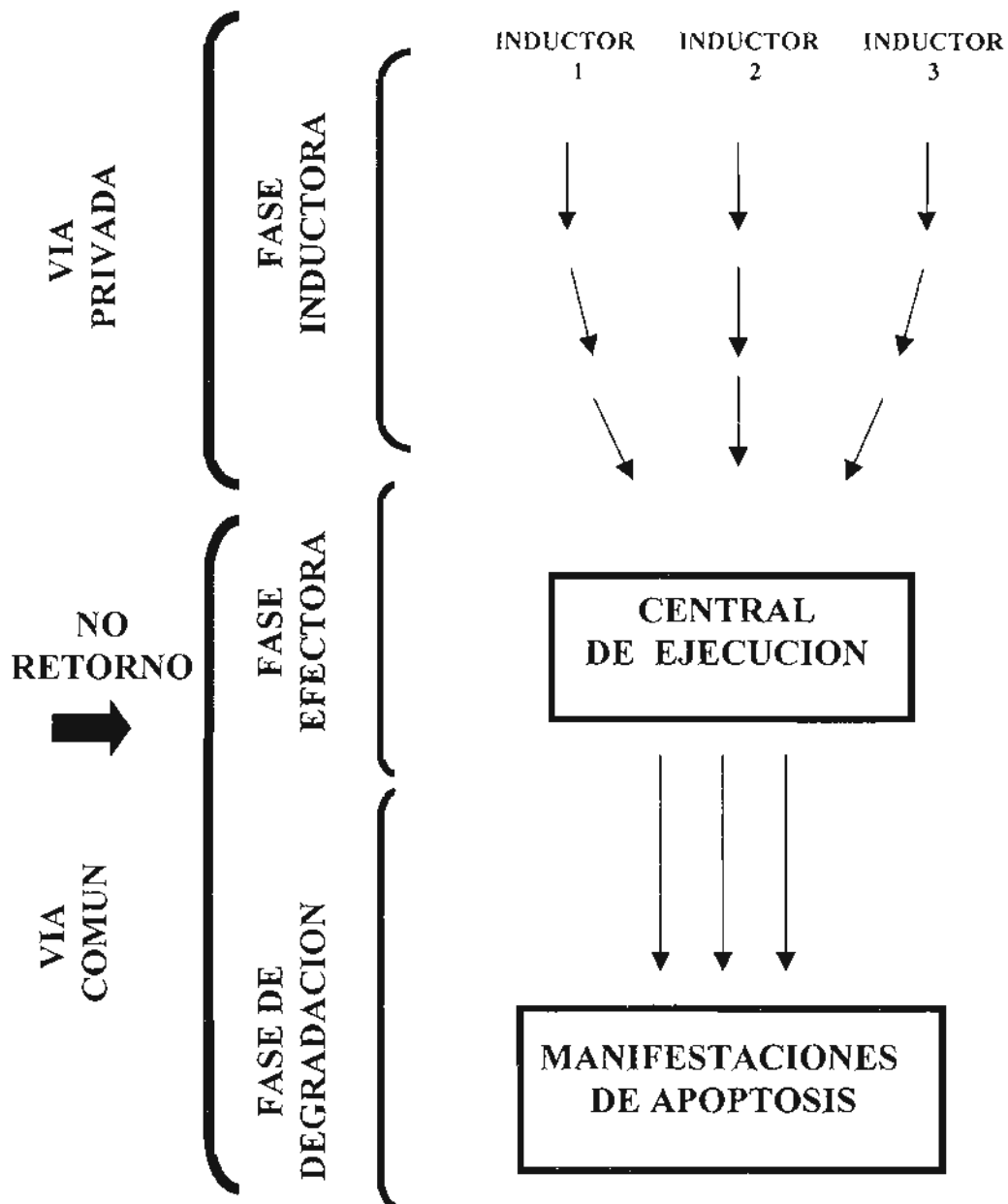
Se ha propuesto que estos cambios superficiales tempranos son los que ocasionan que las células apoptóticas sean rápidamente reconocidas por las células que las fagocitan, evitando así la ocurrencia de procesos inflamatorios en este tipo de muerte celular (Vaux et al., 1992).

Cuadro 2. Parámetros celulares y moleculares que distinguen la apoptosis de la necrosis.

CARACTERISTICA	APOPTOSIS	NECROSIS
Estímulo	Fisiológico	Patológico
Ocurrencia	Células solas	Grupos de células
Reversibilidad	No (después de los cambios morfológicos)	Si (hasta cierto punto)
Organelos citoplasmáticos	Hay edematización en los estados avanzados	Hay edematización muy rápido
Liberación de enzimas lisosomales	No	Si
Núcleo	Formación de pliegues en el contorno nuclear y rompimiento de éste (cariorrhexis)	Desaparece (cariolisis)
Cromatina nuclear	Compactación y formación de masas densas	Agrupamientos sin forma definida
Rompimiento del DNA	Internucleosomal	Al azar
Célula	Formación de cuerpos apoptóticos	Edematización y posterior desintegración
Fagocitosis por otras células	Presente	Ausente

(Gerschenson and Rotello 1992)

Fig. 3.- Vista esquemática de las 3 fases de la apoptosis. Durante la fase de iniciación, distintos inductores por diferentes vías, activan un ejecutor central. Estas vías son "privadas" dado que dependen del disparador inicial de la apoptosis. La fase común de la apoptosis tiene 2 fases distintas: la efectora, durante la cual se activa el ejecutor central y la cual está sujeta a mecanismos reguladores, y la fase de degradación (después del no retorno), durante el cual la apoptosis se vuelve manifiesta, tanto a nivel morfológico como del catabolismo bioquímico.



El proceso de la apoptosis ha sido subdividido en 3 fases diferentes (Fig 3): inductora, efectora y de degradación (Kroemer, 1995; Thompson, 1995).

Fase de inducción de la apoptosis.

Durante *la fase de iniciación o de inducción*, las células reciben el estímulo de muerte, la naturaleza de los estímulos depende de la célula que se trate, algunos inductores de muerte pueden ser por ejemplo: la falta en el medio de factores de crecimiento obligados así como la unión de los receptores membranales los cuales contienen los determinantes de muerte; a sus ligandos (Fas/Apo-1/CD95 y los receptores del Factor de Necrosis Tumoral TNF). También pueden inducir apoptosis las especies reactivas de oxígeno, la quimioterapia y la radioterapia, además interviene el sistema de segundos mensajeros como el Ca^{2+} , cinasas, ceramidas, etc. La fase de iniciación, constituye una vía privada o particular, ya que el estímulo letal, depende de cada célula (Thompson, 1995).

Fase efectora de la apoptosis.

Esta fase, igual que la de degradación, parece ser similar en todos los tipos de células. Varios investigadores han postulado la existencia de un "ejecutor central" (Kroemer et al., 1995) también llamado "máquina de muerte" (Martin and Green 1995). Investigaciones realizadas en los últimos años parecen indicar que la mitocondria juega un papel decisivo en esta fase efectora de la muerte celular. En este proceso también parecen participar de manera importante las caspasa (Henkart 1996; Martin and Green 1995). Muy probablemente el ejecutor central involucre fundamentalmente la alteración del transporte iónico a través de la membrana mitocondrial. Inicialmente la alteración en la membrana mitocondrial resulta en la formación de poros membranales que permiten la salida del citocromo c y la activación de algunos tipos de caspasas citosólicas, cambios en el metabolismo redox y en la regulación del flujo de iones.

Es hasta la fase efectora, cuando la célula ha tomado "la decisión de muerte", que el proceso de apoptosis entra en una vía común de reacciones metabólicas. Se considera que la célula entra en una fase del proceso de apoptosis en la cual los mecanismos se hacen irreversibles y ya no se puede dar marcha atrás. Durante la fase efectora, se activa un centro de ejecución dentro de la célula y se inicia un proceso celular en el cual convergen las vías particulares de iniciación en una (o muy pocas) vía(s) y en este momento los procesos celulares (potencial redox, expresión de oncogenes, incluyendo la familia de proteínas bcl-2) parecen tener una función reguladora decisiva. Cuando la célula ha iniciado irreversiblemente su camino hacia la muerte, se hacen manifiestos los cambios asociados con las fases terminales de la apoptosis como la fragmentación del DNA.

Fase de degradación de la apoptosis.

La fase de degradación es similar en todos los tipos celulares, esta etapa se caracteriza por la participación de enzimas catabólicas, especialmente de caspasas (**Cytosolic Aspartate-Specific ProteASES**) y endonucleasas, cuya actividad hidrolítica induce una serie de alteraciones ultraestructurales que contribuyen a que la célula cometa suicidio. Los cambios estructurales que presentan la mayoría de las células en esta fase del proceso se observan principalmente a nivel de cromatina y del núcleo. Con el microscopio electrónico se pueden distinguir: una reducción del volumen nuclear, condensación progresiva de la cromatina con formación de áreas compactas, que eventualmente envuelve todo el núcleo con áreas electrodensas (estas áreas muestran gran afinidad tintorial y han llevado al término de picnosis nuclear), destrucción de la envoltura nuclear, fragmentación del núcleo con formación de áreas compactas de cromatina rodeadas por la envoltura nuclear (cariorrhexis). En contraste, los cambios en el citoplasma son menos precisos, puede existir ampollamiento ("blebbing") de la membrana plasmática, incremento en la vacuolización, reducción del volumen celular y más tarde citolisis con signos de necrosis secundaria. Una importante característica de la apoptosis es que la membrana plasmática permanece casi intacta hasta los estadios tardíos del proceso.

En contraste con la necrosis primaria, las células apoptóticas no liberan su contenido y pueden formar cuerpos apoptóticos rodeados de membrana que pueden contener organelos, fragmentos nucleares y parte del citosol.

Durante la apoptosis ocurre fragmentación del DNA, vía la activación de nucleasas que generan:

- a) grandes fragmentos ≥ 50 mil pares de bases (Kbp) y,
- b) mono y oligómeros de 180-200 pares de bases (pb) que corresponde al tamaño del nucleosoma.

Aparentemente diferentes sistemas enzimáticos están involucrados en ambos tipos de fragmentación del DNA, algunas células sufren fragmentación de su DNA sin rompimiento oligonucleosomal (Fournel et al., 1995). La DNasa I y la ciclofilina C, inducen fragmentación del DNA en fragmentos de miles de pares de bases, pero sin rompimiento oligonucleosomal (Hughes y Cidloski 1997). La fragmentación nucleosomal involucra endonucleasas nucleares de ~ 30 y ~ 97 KDa así como endonucleasas citoplásmicas de ~ 65 Kda. Estas endonucleasas son inhibidas por Zn^{2+} (Kawabata et al., 1997; Pandey et al., 1997).

Las endonucleasas contenidas en el núcleo pueden ser activadas *in vitro* por diferentes estímulos incluyendo:

- Incremento en la concentración de Ca^{2+} o Mg^{2+} (Montague et al., 1997),
- Disminución del pH,
- Activación de proteasas semejantes a la tripsina (Fraser et al., 1996),
- Presencia del llamado factor mitocondrial inductor de apoptosis (AIF) (Susin et al., 1996),
- Presencia de un heterodímero (40/45 Kda) llamado factor fragmentador de DNA (DFF), que es activado por la caspasa-3 (Liu et al., 1997).

Aunque se ha inferido que las endonucleasas son las responsables de la muerte celular, esto no es necesariamente cierto porque algunos tipos celulares sufren apoptosis sin activación de endonucleasas (Nakamura et al., 1996; Fournel et al., 1995). Además células anucleadas pueden ser inducidas a seguir el proceso de apoptosis (Jacobson et al., 1994; Schulze- Osthoff et al., 1994). La relación entre fragmentación del DNA y condensación de la cromatina tampoco es clara, parece que se trata de eventos separados o independientes uno de otro (Kass et al., 1996; Ink et al., 1997), lo que hasta ahora es claro es que la fragmentación internucleosomal no es un evento temprano ni es una marca universal de apoptosis como se creía antes. Estudios *in situ con timocitos*, mostraron que la fragmentación del DNA se observó cuando las células se hallaban ya dentro de otras células, indicando que en ocasiones el reconocimiento heterofágico de las células apoptóticas ocurre antes de que comience la fragmentación de su DNA (Surh and Sprent, 1994).

Las evidencias sugieren la participación de cistein-proteasas específicas que hidrolizan las proteínas en las uniones en que participa el extremo carboxil del ácido aspártico, estas enzimas son conocidas como "caspasas" y tienen una importante función durante la apoptosis (Kumar and Lavin 1996). Todas las caspasas son sintetizadas como zimógenos, los cuales son procesados proteolíticamente para formar las enzimas maduras o activas, el rompimiento de los sitios para la maduración proteolítica de las pro-caspasas puede ser producido por las mismas caspasas, sugiriéndose que las caspasas forman parte de una cascada de activación y ampliación de la actividad proteolítica. En el humano se han reportado alrededor de 14 caspasas, algunas caspasas tienen la capacidad de auto-activarse, por ejemplo la caspasa-1 hidroliza y activa a la pro-caspasa 1, mas frecuentemente algunas caspasas pueden activar a otras siguiendo una secuencia, por ejemplo la caspasa 10 hidroliza parcialmente y activa a las procaspasas 6, 7 y 8, estas últimas al ser activadas, sin embargo, son incapaces de hidrolizar y activar a la procaspasa 10, sugiriéndose que las diferentes caspasas pueden actuar a distintos niveles en la cascada de la apoptosis. Concretamente, la caspasa-3 dispara un activador de

SUPER-FAMILIA DE LAS CASPASAS*

CASPASAS	SINONIMOS	FUNCION	DESCRITO EN
Caspasa 1	ICE	Inflamación	Mamíferos
Caspasa 2	ICEH-1, NEDD2	Apoptosis Iniciador/Efector	Mamíferos
Caspasa 3	Apopain, CPP32, Yama	Efector	Mamíferos
Caspasa 4	TX, ICH-2, ICE _{rel-II}	Iniciador/Efector (?)	Mamíferos
Caspasa 5	ICE _{rel-III} , TY	Iniciador/Efector (?)	Mamíferos
Caspasa 6	Mch2	Efector	Mamíferos
Caspasa 7	Mch3, ICE-LAP3, CMH-1	Efector	Mamíferos
Caspasa 8	MACH, FLICE, Mch5	Iniciador	Mamíferos
Caspasa 9	ICE-LAP6, Mch6	Iniciador	Mamíferos
Caspasa 10	FLICE2, Mch4	Iniciador (?)	Mamíferos
Caspasa 11	Solo en el ratón	Inflamación	Mamíferos
Caspasa 12	Solo en el ratón	(?)	Mamíferos
Caspasa 13	ERICE	Efector (?)	Mamíferos

*CITOSOLIC ASPARTATE-SPECIFIC PROTEASAS

endonucleasas conocido como DFF contenido en el citosol (Liu et al., 1997). Un gran número de sustratos de las caspasas se encuentran en el núcleo [lámina, poliADP- ribosa polimerasa(PARP), UI-70Kda, etc] y en el citoplasma (por ejemplo fodrin).

Al parecer algunas caspasas se localizan en el citosol (procaspasa-3 y -9 (Duan et al., 1996), mientras que otras, como la enzima convertidora de interleucina- β (ICE), se encuentra en la membrana plasmática (Singer, et al., 1995). Hasta ahora no es claro cómo las caspasas pueden acceder al núcleo para digerir sustratos como las lamininas nucleares y otros sustratos ya mencionados.

Numerosas proteínas pueden ser digeridas por las caspasas, pero algunos de estos sustratos han sido considerados como participantes indispensables en el proceso de inducción de la muerte celular, uno de estos "sustratos de muerte " es el PARP que se ha visto que tiene una particular importancia porque su rompimiento causa una activación enzimática que trae como consecuencia la disminución brusca de NAD (Leist, et al., 1997).

Además de las caspasas, un gran número de diferentes proteasas participan en el proceso de apoptosis, entre ellas se incluyen las serina proteasas, calpainas y proteosomas, sin embargo, su participación parece depender del tipo de estímulo y del tipo de célula. Un gran número de inhibidores de serina-proteasas han demostrado su efecto inhibitor de la fragmentación internucleosomal del DNA, sin afectar la formación de fragmentos ≥ 50 Kpb y la condensación de cromatina (Hara et al., 1996). Por otro lado se ha demostrado que la inhibición de serina-proteasas, no evitó la muerte celular, como cabría esperar si estas enzimas fueran piezas clave en la apoptosis (Penninger y Kroemer, 1998).

Otros eventos importantes que ocurren en la fase de degradación de la apoptosis, son los cambios a nivel de la membrana celular. La apoptosis se acompaña por una pérdida de la asimetría de la membrana, caracterizada por la

presencia en la cara externa de fosfolípidos como la fosfatidilserina y la fosfatidiletanolamina, que normalmente se encuentran en la cara interna de la membrana (Schlegel et al., 1993; Emoto et al., 1997). El mecanismo exacto por el cual se expone la fosfatidilserina no es del todo claro, sin embargo se sabe que es un evento no gobernado por el núcleo y dependiente de caspasas (McCarthy et al., 1997; Martín et al., 1996), probablemente también esté involucrada la inhibición de una aminofosfolípido translocasa dependiente de ATP "flipasa" (Tang et al., 1996) o la activación de una "inversora" activada por Ca^{2+} que podría perturbar la membrana activamente (Verthoven et al., 1995). Otra alternativa, podría ser un desorden en el citoesqueleto con rompimiento de fodrín, mediado por una caspasa, con la consecuente pérdida del anclaje de los residuos de fosfatidilserina a la cara interna de la membrana plasmática (Vanags et al., 1996).

La exposición de fosfatidilserina, ocurre antes que la membrana sea permeable a colorantes vitales como yoduro de propidio, bromuro de etidio o azul tripán. Sin embargo algunos cambios en la permeabilidad de la membrana ocurren relativamente temprano (Torres-Boca et al., 1995) y posiblemente facilitan la salida de potasio (Bortner y Cidlowski 1996) y de glutatión (Vandendobberlsteen, et al., 1996). La exposición de fosfatidilserina es funcionalmente importante porque los fagocitos poseen receptores a ella (Savill et al., 1993) de manera que las células que exponen este fosfolípido son reconocidas y removidas por las células con función fagocitaria.

La apoptosis se ha asociado con cambios importantes en el equilibrio redox (Slater et al., 1996). Estos cambios incluyen la pérdida de glutatión reducido (Macho et al., 1997), el cual es extruído de la célula (Vandendobberlsteen, et al., 1996) y no puede ser utilizado para mantener el equilibrio redox durante el proceso de la apoptosis. Durante la apoptosis existe también hiperproducción y/o eliminación reducida de las especies reactivas de oxígeno (Zamzami et al., 1995), consecuentemente los lípidos de la membrana tienden a estar oxidados en las células apoptóticas (Hockenbery et al., 1993).

Todo parece indicar que durante la etapa tardía de la fase de degradación de la apoptosis, los niveles citosólicos de Ca^{2+} se incrementan por arriba de sus niveles fisiológicos ($>1\mu\text{M}$) (Macho et al., 1997) mientras que los niveles de K^+ disminuyen (Bortner y Cidłowski 1996). Estos cambios deben tener algún impacto funcional ya que pueden participar en la activación de endonucleasas, pero su participación en la disfunción de la membrana o en la pérdida de la regulación del transporte específico de iones, no está claro.

PAPEL DE LAS MITOCONDRIAS EN LA MUERTE CELULAR

Es interesante resaltar que en los procesos fisiológicos y patológicos que inducen el proceso de muerte celular, normalmente coexisten células apoptóticas y necróticas (Kerr et al., 1987; Huschtscha et al., 1994; Darzynkiewicz et al., 1997). Existen numerosos ejemplos en los que el patrón de muerte celular *in vivo*, no corresponde estrictamente ni a apoptosis ni a necrosis, sino que con frecuencia se presentan características de ambos tipos de muerte (Darzynkiewicz et al., 1997).

Estudios recientes han demostrado que las particularidades de los procesos de apoptosis y necrosis no son tan fácilmente reconocibles como se había sostenido (Collins et al., 1992), resaltando que ambos tipos de muerte generalmente ocurren al mismo tiempo en células o tejidos expuestos al mismo estímulo patológico. Por ejemplo condiciones de isquemia o toxicidad que normalmente se relacionan con muerte celular necrótica, también pueden estar asociados con apoptosis (Darzynkiewicz et al., 1997). Marcadores específicos desarrollados para reconocer células que experimentan apoptosis son expresados por fibroblastos sometidos a daño físico o tóxico y que mueren por necrosis (Fernández et al., 1994), lo que indica que la apoptosis y la necrosis comparten propiedades bioquímicas. Tratamiento con calor o estímulos comúnmente relacionados con la necrosis, producen una disminución en la proporción de células que ciclan y un incremento en la proporción de células con contenido hipodiploide de DNA (Dyson et al., 1996), cambios que son relacionados con la apoptosis (Huschtscha et al., 1994). Estos resultados han

permitido proponer que la apoptosis y la necrosis, pueden ser producidas por el mismo estímulo patológico (Shimizu et al., 1996; Renvoizé et al., 1998) y sólo representar los extremos de una sola vía de muerte celular (Lemasters et al., 1998; Renvoizé et al., 1998) que comienza con el proceso referido como permeabilidad mitocondrial transitoria de la célula (PTM) (Columbano 1995; Zanzami et al., 1997; Lemasters et al., 1998). Una vez iniciado el proceso de muerte celular, las particularidades del metabolismo energético de la célula (Lemasters et al., 1998) y la disponibilidad intracelular de ATP definen si la célula morirá por necrosis o por apoptosis (Richter et al., 1996; Leist et al., 1997, Tsujimoto et al., 1997).

Desde que se demostró que las células anucleadas (citoblastos), pueden ser inducidas a sufrir apoptosis (Jacobson, et al., 1994; Nakajima et al., 1995), es claro que la vía que sigue este tipo de muerte celular puede funcionar independientemente del núcleo. La mitocondria (Newmeyer et al., 1994) y algunas proteasas específicas con acción equivalente a ICE (Enzima Convertidora de Interleucina 1 β) en los organismos inferiores (Lasebnik et al., 1994, Martin y Green, 1995) han sido señaladas como protagonistas del control citoplásmico de la desintegración nuclear en la apoptosis. Recientemente, se ha demostrado que las células sufren una reducción en el potencial transmembranal de la mitocondria ($\Delta\Psi_m$) antes de que presenten los signos comunes de la apoptosis nuclear (condensación de la cromatina y fragmentación internucleosomal del DNA) (Zanzami et al., 1996). Los cambios en el potencial transmembranal que ocurren para iniciar el proceso de muerte celular incluyen la desregulación de la funcionalidad de los poros de la membrana mitocondrial, proceso llamado permeabilidad transitoria de la mitocondria.

La permeabilidad transitoria de la mitocondria (PTM) constituye un evento crítico en la apoptosis y la necrosis, en ambos tipos de muerte la iniciación del mecanismo de PTM podría ocupar el primer paso del suceso y las consecuencias de la PTM ó segundo paso, pueden delimitar el modo o tipo de muerte celular.

Las consecuencias de PTM son suficientes por sí mismas para ocasionar la muerte celular: por el desacoplamiento que produce en la fosforilación oxidativa y un

mayor desorden en la regulación del potencial redox con un incremento en la generación de aniones superóxido (Vayssiere et al., 1994; Zanzami et al., 1995). Además la PTM es acompañada por la liberación de moléculas intermembranales de la mitocondria, que pueden ser tóxicas para las células (Susin et. al, 1996. Zanzami, et al., 1996). La mitocondria, que es una fuente generadora de energía, parece representar el eje central de decisión del control de la vida y la muerte, tanto por la importancia intrínseca de su funcionamiento, como por la liberación citosólica de factores que promueven la muerte celular. Uno de estos factores importantes es el citocromo C, una proteína que normalmente sirve de puente de electrones en el complejo protéico de la membrana mitocondrial interna. Una vez liberado, el citocromo C, ayuda a activar la familia de proteasas asesinas "caspasas". La liberación del citocromo C de la mitocondria es controlada por la familia de proteínas Bcl-2. Así el citocromo C liberado por la mitocondria que sufre PTM puede ayudar a la activación de la proteasa CPP32/Yama/apopain con la ayuda de otros factores aun no conocidos e inducir apoptosis (Liu et al., 1996). La mitocondria también contiene una proteasa apoptogénica (factor inductor de apoptosis o AIF) que es suficiente para inducir cambios apoptóticos del núcleo aislado *in vitro* en ausencia de componentes citoplásmicos (Susin et. al 1996; Zamzami, et al., 1996).

Resultados de algunos autores sugieren que las células que han sido conducidas a sufrir apoptosis, pueden morir por necrosis cuando las proteasa apoptogénicas fallan en entrar en acción. También cuando la PTM es inducida de manera rápida y masiva, comprometiendo de manera importante el aporte de ATP, ocurre necrosis, antes que las proteínas sean activadas y puedan actuar en los sustratos citoplásmicos y nucleares. En contraste, si la PTM se induce de forma suave y prolongada, se permite la activación y acción de proteasas específicas (AIF, CPP32 y otras proteasas), antes de la disminución de ATP, entonces la célula muere por apoptosis. En otros términos, la intensidad del estímulo que induce la PTM puede determinar cual de las dos vías de muerte seguirá la célula: una catástrofe bioenergética, culminando en necrosis, o la activación y acción de proteasas apoptogénicas que producen la apoptós.

Este escenario es compatible con los resultados en los que algunas drogas producen necrosis a dosis altas y apoptosis con bajas (Kroemer, et al., 1997), además es compatible con el hecho de que Bcl-2 puede evitar tanto la apoptosis como la necrosis (Kane, et al., 1993; Martinow et al., 1994; Shimizu, et al., 1996) y que la sobre expresión de bax puede inducir apoptosis y, en ausencia de activación de proteasas, necrosis (Xiang et al., 1996).

También se ha estudiado que durante la traducción de una señal de muerte celular apoptótica en la célula hay una alteración en la permeabilidad de las membranas de la mitocondria, que causa la translocación de proteínas apoptogénicas como el citocromo *C* en el citoplasma, que activa las proteínas proteolíticas que dirigen la muerte celular como las caspasas. La familia de proteínas Bcl-2, cuyos miembros pueden ser anti-apopticos o pro-apopticos, regulan la muerte celular por control de la permeabilidad mitocondrial durante la apoptosis. Se han establecido modelos con liposomas que llevan los canales de porina mitocondrial (también llamados canales de aniones dependiente de voltaje o VDAC) que muestran que las proteínas pro-apoptóticas Bax y Bak aceleran la apertura del VDAC, mientras que las proteínas anti-apoptóticas Bcl-X_L lo cierran por unión directa a bax y bak permiten al citocromo *c* pasar a través VDAC fuera de los liposomas, pero su paso es prevenido por bcl-X_L.

Los cambios dependientes de bax y bak en la permeabilidad de la mitocondria, conducen a la pérdida del potencial transmembranal de la mitocondria ($\Delta\psi$) y la liberación de citocromo *C*, que son mediadas por canales de poliproteínas llamados poros de permeabilidad de transición (PT), que incluye VDAC, ciclofilina D y al translocador de adenina nucleótido (ANT). El VDAC es una proteína abundante en la membrana microtondrial externa que forma un gran poro dependiente de voltaje en la bicapa lipídica y actúa como un mecanismo de regulación del movimiento de sustancias a través de la membrana de la mitocondria. Bax y Bak interactúan con el poro de PT en forma activa, bax se une a ANT y pueden formar poros por asociación de ANT y PT en liposomas (Shimizu, et al., 1999).

Existen dos modelos que tratan de explicar como se lleva acabo la liberación de citocromo *c* de la mitocondria.

1.- Apertura de un megacanal o poro de permeabilidad transitoria (PTP) seguida de la entrada de solutos y agua. La mitocondria se hincha, se produce la ruptura de las membranas externas mitocondriales, y se produce la liberación de citocromo *C*. El PTP parece consistir de proteínas provenientes de la membrana interna mitocondrial (incluyendo el translocador de adenin nucleotidos de ANT y de la membrana externa (VSAC)). Estas proteínas cooperan a través de sitios donde las dos membranas mitocondriales se oponen, para formar grandes canales de conducción que permiten el paso de moléculas con una masa molecular relativa (Mr) de por los menos 1500.

2.- Modelo sin cambios en la membrana mitocondrial externa. Este segundo modelo, que no pronostica trastornos en la membrana mitocondrial externa, pero sí la formación de canales lo suficientemente grandes como para permitir el paso de citocromo *C*. Este modelo está mejor asociado con la ausencia de cambios morfológicos mitocondriales, dado que el citocromo *C* es algo flexible, debido a su grupo prostético, el diámetro de los canales debe ser necesariamente más grande que el citocromo *C* (alrededor de 3 nm).

La capacidad de algunos miembros de la familia de Bcl-2- para formar canales de iones artificiales en la membrana lipídica, junto con el hecho de que bax y bak desencadenan la liberación de citocromo *C* cuando se adicionan directamente a la mitocondria, han permitido relacionar el papel de Bax y Bak, en la formación de canales, esto ha sido probado por el monitoreo del movimiento de flujo de citocromo *C* marcado con fluorescenina a través de los liposomas, donde han mostrado que ni Bax ni Bak solos pueden formar canales para el paso de citocromo *C*, sin embargo, Bcl-_{x1}, Bax y Bak pueden interactuar con VDAC (Shimizu et al., 1999).

Algunos autores (Martinou, 1999), sugieren que Bcl-_{x1} estimula que se cierren los canales VDAC en liposomas,, mientras que Bax y Bak, facilita su apertura. Sin embargo, Bax y Bak, permite el paso de citocromo *C* para pasar a través de VDAC.

Esto está soportado porque el diámetro de VDAC es normalmente pequeño para permitir el paso de citocromo *C*. Shimizu et al., (1999), proponen que después de que VDAC interactúa con Bax y Bak sufren cambios conformacionales, esto permite a VDAC- posiblemente en combinación con Bax o bak- formar un megacanal que permita al citocromo *C* atravesar la membrana. Otra función de VDAC, es la concerniente a ANT, la relación ATP/ADP -que es lo que permite que el ATP se mueva fuera de la mitocondria y ADP se mueva hacia dentro-, se ha demostrado que un evento temprano en la apoptosis (antes de la liberación de citocromo *c*) es un defecto en el intercambio mitocondrial de ATP/ADP. Por lo que durante la apoptosis, el ANT o VAC (o ambos) fallan en el transporte de adenin nucleótidos. (VanderHeiden et al., 1999).

Algunos miembros de la familia Bcl-2 son multifuncionales en el control de la liberación de moléculas, y esto es solo parte de su actividad, ya que también se han encontrado en otras membranas intercelulares tales como el retículo endoplásmico y membranas nucleares.

EVIDENCIAS DE LOS MECANISMOS DE MUERTE CELULAR QUE PARTICIPAN EN LA ATRESIA FOLICULAR.

Por estudios morfológicos comparativos, entre los daños que presentan las células foliculares durante la atresia y las células muertas por apoptosis, como son por ejemplo los núcleos picnóticos, característicos de la atresia que aparecen primero en la granulosa y después en la teca, se ha observado que son indistinguibles de la condensación que sufre la masa de cromatina nuclear en la apoptosis. Luego de la condensación de la cromatina que presentan las células atrésicas, éstas sufren cariorrexis (Hay et al., 1976; O'Shea et al., 1978). En la apoptosis, se produce una fragmentación nuclear, produciéndose los cuerpos apoptóticos (Hirshfield y Midgley 1978), que en la atresia se les llama cuerpos atrésicos. Lo anterior, y otros estudios bioquímicos recientes (Hughes y Gorospe, 1991; Tilly et al., 1991) han sugerido que la muerte celular apoptótica, es el

mecanismo molecular por el cual se degeneran los folículos ováricos durante la atresia. Esta afirmación se sustenta además, por los hallazgos que demuestran que en las células de la granulosa y teca colectadas de folículos atrésicos, existe una fragmentación internucleosomal de su DNA, característica de células que sufren apoptosis (Tilly et al., 1991; Tilly et al., 1992). Este patrón de fragmentación del DNA, se ha considerado como una característica importante aunque no una marca distintiva de la muerte apoptótica, las células durante la apoptosis, además presentan condensación de su estructura nuclear, compactación de sus organelos citoplásmicos y disminución de su talla (Arends et al., 1990).

Existen evidencias bioquímicas, que indican que en las células de la granulosa, de la teca y lúteas, está presente una actividad de endonucleasa, dependiente de Ca^{2+}/Mg^{2+} , que es capaz de producir la fragmentación internucleosomal del DNA característico de la apoptosis (Ben-Rafael et al., 1987). Aparentemente las hormonas gonadotrópicas son las promotoras de la expresión de este tipo de endonucleasas en el ovario (Zelevnik et al., 1989).

Recordemos que la FSH, juega un importante papel en el desarrollo y diferenciación folicular y en la maduración, vía su acción reguladora en las células de la granulosa. El mecanismo de acción de la FSH, incluye su unión a receptores específicos en la membrana plasmática y la subsecuente activación de la adenilato ciclasa, seguido por el incremento en la expresión genética de los receptores a la LH y la síntesis de "novo" de las enzimas esteroideogénicas, especialmente aromatasas y como resultado de esto se da la conversión de androstenediona a estrógenos (Hsueh et al., 1984). La androstenediona es producida en las células de la teca, bajo la influencia de la LH, de tal manera que tanto la FSH como la LH son fundamentales en la biosíntesis de estrógenos (Hodgen, 1989). Recientemente, esta teoría de "dos células", ha tenido que ser reevaluada, porque la biosíntesis de estradiol ovárico es estimulada igual por FSH que por gonadotropina post-menopáusica humana que contiene una relación igual de actividad de FSH y LH (Hodgen, 1989; Edelstein et al., 1990).

En algunos estudios al respecto, se ha demostrado que las gonadotropinas (Braw y Tsafiri, 1980) y los esteroides gonadales (Hsueh, 1986), modulan la incidencia de atresia en el ovario. EL tratamiento con estrógenos en ratas, incrementó el crecimiento folicular, el peso ovárico y el índice mitótico de las células de la granulosa (Bendell y Dorrington, 1991) así como la disminución en la incidencia de atresia folicular (Hsueh, 1986). En contraste, el tratamiento con andrógenos a ratas hipofisectomizadas, provocó deterioro en los folículos ováricos, incrementándose el número de células de la granulosa con picnosis nuclear, así como la degeneración de los ovocitos (Azzolin y Saiduddin, 1983).

En el líquido folicular de folículos atrésicos de diferentes especies, invariablemente disminuye la concentración de estrógenos, esta disminución puede ser frecuentemente acompañada de un aumento en los niveles de andrógenos (Maxson et al., 1985).

Estudios muy recientes, sugieren que los esteroides sexuales juegan un papel importante en la regulación de la apoptosis ovárica; con estrógenos, se previno la apoptosis y los andrógenos, antagonizaron el efecto de los estrógenos, por lo que es muy probable que estas hormonas estén involucradas en la regulación de la actividad de la endonucleasa dependiente de Ca^{2+} / Mg^{2+} (Billig et al., 1993). Sin embargo el mecanismo exacto, por el cual las hormonas producen o inhiben la atresia folicular es aún incierto.

En experimentos, en los que se utilizaron inhibidores de la síntesis de RNA y proteínas, mostraron que pueden regular la apoptosis, mediante la participación de inductores o represores intracelulares de ésta, dentro de los cuales pueden estar los esteroides o las hormonas peptídicas (Gerschenson y Rotello, 1992).

Así como las hormonas esteroides y /o gonadotropinas participan de manera muy activa en la presentación y progresión de la atresia, seguramente también tienen que ver de alguna manera con la activación de algunas enzimas y pueden modular este proceso degenerativo. Trabajos realizados en nuestro laboratorio (Rosales et al., 1990), demuestran que en la atresia folicular secundaria, las células de la

granulosa, son las que presentan el nivel más alto de actividad trípica, lo cual podría indicar que uno de los cambios bioquímicos iniciales en el fenómeno de la atresia, es la liberación o activación de la actividad proteolítica dentro de las células de la granulosa, lo cual produciría degeneración, inhibición del contacto intercelular, desprendimiento de las células hacia la cavidad folicular y finalmente liberación del ovocito, con lo cual llega a su fin el fenómeno de atresia.

A pesar de que los experimentos actuales sobre muerte celular en la atresia se están dirigiendo con mayor énfasis al estudio de la apoptosis, existen evidencias que permiten pensar que en la atresia folicular, participan más de un tipo de muerte celular (Pefuso et al., 1981; Kovacs et al., 1992; D'herde et al., 1996). En las etapas tempranas de la atresia folicular, se ha podido demostrar la presencia de células inflamatorias como leucocitos (Bukovsky et al., 1979; Hirshfiel, 1991), linfocitos T citotóxicos (Greenwald y Roy, 1994), y macrófagos (Gaytan et al., 1998) que invaden la granulosa, lo cual sugiere también la participación de la necrosis celular en la atresia.

Para el estudio de la muerte celular, han sido desarrollados varios métodos, la mayoría de los cuales detecta el incremento en la permeabilidad de la membrana, tal es el caso de la tinción de azul tripán, que tiñe las células muertas. La exclusión o incorporación del colorante fluorescente propidio al DNA y la retención celular de la fluoresceína, son pruebas indicadoras de viabilidad celular (Dive et al., 1992). Otros marcadores como el naranja de acridina o el verde fluorescente que se une a la doble hélice del DNA, facilitan la identificación de células apoptóticas, que por su condensación clásica de la cromatina, pueden ser observadas al microscopio de fluorescencia (Gregory y Serperse, 1991).

Para determinar la participación del fenómeno de necrosis en la progresión del proceso de atresia puede determinarse la distribución subcelular de algunas enzimas lisosomales en las células de la granulosa. En la necrosis, el hinchamiento de la célula y de algunos organelos intracelulares, particularmente de mitocondrias y lisosomas, es rápidamente seguido por la ruptura de la membrana de los lisosomas y

la liberación de los componentes intracelulares, incluyendo enzimas hidrolíticas. La presencia de actividades hidrolíticas lisosomales libres en el citoplasma y en el líquido folicular, debe ser el resultado de la ruptura de la membrana celular y lisosomal, o al menos de alteraciones importantes de la permeabilidad membranar, tanto lisosomal como plasmática, como indicadores importantes de la participación de la necrosis en el proceso de atresia.

Si una célula muere por apoptosis o por necrosis, es posible hacer la distinción, por sus alteraciones morfológicas y por el patrón de ruptura de su DNA, obtenido por electroforesis en geles de agarosa entre otras técnicas (Tilly et al., 1991). Actualmente, la citometría de flujo está permitiendo importantes avances en el estudio de la muerte celular, esta poderosa técnica favorece la identificación y separación de subpoblaciones celulares y utilizando fluorocromos distintos, se pueden medir simultáneamente diversos parámetros celulares (Watson, 1991).

El fundamento de la citometría de flujo, consiste básicamente en intercalar colorantes fluorométricos como el bromuro de etidio, el naranja de acridina, el yoduro de propidio o el Hoescht 33342 en el DNA del genoma celular, y después medir la fluorescencia emitida en la reacción en un citómetro de flujo (Afanas'ev et al., 1986). Esta técnica ofrece la posibilidad de cuantificar tan minuciosamente como se quiera los daños que presente cada una de las células de una determinada población (Huschtscha et al., 1994), además permite conocer en que momento del ciclo celular se encuentra cada una de ellas (G_0 , G_1 , S, G_2 y M), de tal manera que se pueden obtener los histogramas del DNA de las distintas subpoblaciones celulares (Watson, 1991; Darzynkiewicz y Traganos, 1990). Cuando el histograma de una subpoblación manifiesta un pico en la región G_0/G_1 (presíntesis), que es considerada región hipodiploide o región de muerte celular, presumiblemente en esta región están incluidas las células que están sufriendo apoptosis, y las células en la región S y G_2/M , son las células con actividad mitótica (Ojeda et al., 1990).

Estudios realizados con timocitos a los que se les indujo apoptosis con glucocorticoides, revelaron que algunas subpoblaciones celulares mostraban un pico

en su histograma por abajo de la región Go/G₁, a la cual denominaron región Ao, el DNA de las células en esta región, mostraba menos fluorescencia que la subpoblación Go/G₁. Como complemento de este estudio se les hizo electroforésis en gel a las células de la región Ao y con ésto se pudo comprobar que en esta región se encontraban las células que habían sufrido apoptosis y que por lo tanto mostraban fragmentación internucleosomal en su DNA (Telford et al., 1991).

En el conocimiento de la atresia folicular, la citometría de flujo ha dado importantes contribuciones. Utilizando esta técnica en un trabajo muy reciente, realizado con folículos de cerda, se encontró que en aquellos que fueron clasificados morfológicamente como atrésicos, el porcentaje promedio de células en la región Ao fue de 45.9+/-6.3%, mientras que en los morfológicamente sanos sólo fue de 5.3+/-1.6%, y los valores en esta región estuvieron inversamente relacionados con el porcentaje de células en Go/G₁ y por supuesto que el porcentaje de células en S + G₂/M fue muy bajo. Lo anterior, permite a los autores proponer que los folículos que al estudio de citometría de flujo muestren que el porcentaje de sus células de la granulosa en la región Ao sea >10% pueden ser considerados como bioquímicamente atrésicos, todo parece indicar que lo anterior es una nueva marca bioquímica de gran importancia en el estudio de la atresia folicular (Guthrie et al., 1994). En un estudio posterior en el que se determinó la apoptosis de las células de la granulosa por fluorescencia del DNA y por autorradiografía haciendo una separación electroforética del DNA genómico, se demostró la relación positiva que existe entre la mayor incidencia de células en la región Ao, la presencia de rompimiento internucleosomal del DNA y la disminución en la concentración de 17 β estradiol en los folículos atrésicos de la cerda (Guthrie et al., 1995).

2. PLANTEAMIENTO DEL PROBLEMA

Debido a que existen evidencias que señalan la participación de más de un tipo de muerte celular en el proceso de atresia folicular, así como la posibilidad de la participación de distintos mecanismos de muerte, de acuerdo al grado de avance del proceso y al desarrollo de cada folículo (Amsterdam et al., 1998; Gaytan et al., 1998), en este trabajo nos propusimos profundizar nuestros conocimientos sobre la participación de diferentes vías de muerte celular en la atresia folicular.

El propósito de este estudio es determinar la participación diferencial de apoptosis y necrosis en folículos antrales de oveja, de dos tamaños, y clasificados en cuatro grados de atresia, de acuerdo a su aspecto morfológico, histológico y a su cuantificación hormonal, en cuatro grados de atresia. Para el estudio del tipo de muerte celular por grado de atresia, utilizamos el método bivariado de Anexina V marcada con Isotiocianato de Fluoresceína (Anexina V-FITC), simultánea con Ioduro de Propidio (IP), propuesto por Vermes et al., (1995). La unión de Anexina V fluoresceinada a la fosfatidil-serina expuesta en la cara externa de la membrana es una técnica muy eficiente para detectar estadios tempranos de la apoptosis. Las células apoptóticas son reactivas a Anexina V después de presentar condensación de su cromatina, pero antes de que la membrana pierda su habilidad para excluir IP.

Con el uso simultáneo de IP y Anexina V-FITC, es posible detectar células vivas-sanas (Anexina V-/IP-), células con apoptosis temprana (Anexina +/IP-) y células necróticas o en apoptosis tardía (IP+), con la citometría de flujo. Además, la fragmentación internucleosomal y el contenido hipodiploide del DNA servirá en este trabajo, como una forma de estimar cuantitativamente la apoptosis. Algunos estudios han demostrado, como ya se mencionó, que las células de la granulosa con contenido hipodiploide de DNA son apoptóticas y que esto representa una marca bioquímica para folículos atrésicos en algunas especies (Guthrie et al., 1995; Hsueh et al., 1994; Blondin et al., 1996).

La determinación cuantitativa de la actividad de las enzimas lisosomales (usando fosfatasa ácida y β -glucosaminidasa como indicadores) en los diferentes

compartimentos intracelulares, la cuantificación de la unión de anexina V y/o IP y la presencia de fragmentación internucleosomal, nos permitirá determinar la participación diferencial de la necrosis y la apoptosis durante la progresión de la atresia folicular en dos tamaños diferentes de folículos. De acuerdo a nuestros resultados proponemos que la combinación de estos métodos puede ser una mejor forma de analizar los mecanismos de muerte celular, no sólo en folículos de diferente tamaño y grado de atresia, sino en cualquier otro tipo celular.

3.- MATERIAL Y METODOS

Los reactivos: buffer de fosfatos salino (PBS), Hepes (N-[2-Hidroxi-etil] piperazina-N'[2-ácido ethanosulfónico]), Nonidet NP-40, Rnasa A, azul de bromofenol, xilen cianol, los sustratos para las enzimas lisosomales 4-metil-umbeliferil-N-acetil-β-D-glucosaminido y 4-metil-umbeliferil-fosfato, agarosa, yoduro de propidio, triton X-100 y la dexametasona, estradiol y progesterona, fueron obtenidos de SIGMA Chemical Co.(St. Louis, MO USA). La proteinasa K fue obtenida de Boehringer Mannheim (Indianapolis, IN, USA). El etanol, glicerol y otras sales inorgánicas, fueron grado analítico obtenidas de Merk (Darmstadt, Germany). Las DNA, QC Particles, se obtuvieron de Becton Dickinson Systems (San José, CA USA). Las células U-937 fueron donadas por el laboratorio de Inmunología del Centro Médico Nacional S XXI, del Instituto Mexicano del Seguro Social.

Se obtuvieron ovarios de ovejas no gestantes sacrificadas en el rancho "LA AURORA" Estado de México. Los ovarios fueron transportados en una solución amortiguadora de fosfatos PBS 0.15 M pH 7.4, en hielo, hasta el laboratorio de Bioquímica Molecular del Centro Médico Nacional S XXI del IMSS, en un lapso no mayor a una hora desde la muerte del animal.

En el laboratorio se realizó la disección de los folículos utilizando pinzas de microcirugía. Después de lavar dos veces los folículos con PBS frío, se clasificaron utilizando un microscopio estereoscópico, (magnificación 120X) por tamaño en dos grupos: de 3 a 6 mm y mayores de 6 mm. y por su grado de atresia en cuatro grupos, para lo cual se siguió la metodología propuesta por Moor et al., (1978) y probada por nosotros para cabras (Rosales et al., 1990), los folículos se clasificaron como "no atrésicos" o atresia 1, atresia inicial o atresia 2, moderadamente atrésicos 3a y severamente atrésicos o con atresia 3b, de acuerdo a los siguientes criterios:

Se clasificaron como atresia 1, aquellos folículos sanos que presentaban abundante irrigación, apariencia brillante y sin desprendimientos aparente de su capa granulosa.

En el grupo de atresia 2, estuvieron los folículos que presentaban ligera disminución de su irrigación y pequeños desprendimientos de su capa granulosa.

El grupo de la atresia 3 se dividió en atresia 3a en cuyo grupo se incluyeron a los folículos con una importante disminución de su irrigación, desprendimientos abundantes de su capa granulosa y apariencia grisácea.

Finalmente en el grupo 3b se incluyeron los folículos con grandes desprendimientos de la capa granulosa, casi nula irrigación y pérdida del ovocito.

Aunque hemos probado con anterioridad que estos criterios morfológicos correlacionan adecuadamente con la clasificación histológica de los folículos sanos y atrésicos en ambos tamaños (Rosales et al., 1990; Ballesteros et al., 1992 y García et al., 1997), con el propósito de tener una prueba más de la veracidad de esta clasificación, se determinó estradiol (E_2) y (P_4) en el líquido folicular libre de células.

Después de la clasificación, el líquido folicular de cada folículo se recuperó inyectando 100 μ l de PBS 0.01 M pH 7.4 a los folículos de 3-6 mm y 200 μ l a los >6 mm y extrayendo la dilución con jeringa de insulina, aguja calibre 25 x 16 mm (flushing). Los contenidos foliculares fueron procesados para recuperar líquido folicular libre de células y células de la granulosa (Ballesteros et al., 1992). Los folículos se abrieron en dos partes usando un par de pinzas de microcirugía. Las dos partes del folículo se rasparon suavemente con pinzas de punta roma, sobre una placa de cristal con pozos de 100 μ l de capacidad. Para recuperar las células del raspado, se hicieron 2 lavados con 100 μ l cada uno de PBS frío, 0.01 M pH 7.4 con 0.2 mM de EGTA (Ballesteros et al., 1992; Guthrie et al., 1994). Tanto el líquido folicular con células suspendidas como la suspensión del raspado se centrifugaron a 600 x g 10' a 4°C. Los dos paquetes celulares obtenidos de ambas fracciones se juntaron y se lavaron con 600 μ l de PBS 0.01 M pH 7.4 con 0.2 M de EGTA. El líquido folicular se centrifugó nuevamente a 12,000 X g por 20 min para asegurar que estuviera libre de células, posteriormente, los líquidos se congelaron a -20°C hasta que se realizaron las determinaciones hormonales.

Las suspensiones celulares, se lavaron dos veces por centrifugación a 500 X g 10' a 4°C, con 600 µl de PBS 0.01 M pH 7.4. Después del lavado, las células se resuspendieron en 600 µl de PBS y se contaron las células en un hemocitómetro. Para los folículos de 3 a 6 mm fue necesario hacer una pool con las células de 3-5 folículos de la misma clasificación de atresia, ya que el promedio de células que se recuperan de los folículos de este tamaño es de 400 000 y el mínimo de células que los métodos usados requieren es de 1,000,000, en los folículos > de 6mm, fueron suficientes tres folículos, las suspensiones celulares, se dividieron en tres fracciones.

La primera alícuota fue procesada por los métodos previamente descritos por Ballesteros et al., (1992), para medir la actividad libre y unida a de N-acetyl-β-D-glucosaminidasa y la fosfatasa ácida. La actividad de las enzimas fue medida fluorométricamente por la liberación enzimática de 4-metil-umbeliferona de sus respectivos sustratos (4-metil-umbeliferil-N-acetil-β-D-glucosaminida y 4-metil-umbeliferil-fosfato) en el líquido folicular y los homogenizados de las células. Dado que la apoptosis es un proceso dinámico y muy rápido, todas las mediciones se hicieron a la brevedad, evitando trabajar las muestras con más de 3 horas post-mortem..

La segunda alícuota fue usada para medir la fragmentación del DNA, para lo cual se siguió la metodología propuesta por Gong et al., (1994) con la cual se hace la extracción del DNA pequeño de las células apoptóticas que puede ser observado en una electroforesis en gel, y en la misma muestra, se hace el estudio citométrico para ciclo celular del DNA de las células. A 100 µl (1 x 10⁶ células) de suspensión celular se le adicionaron 900 µl de etanol frío (mantenido en hielo) al 70%. Las células suspendidas en etanol se guardaron a -20°C por 72 hrs. después se centrifugaron a 800 X g por 5' y se removió el etanol.

El paquete celular de cada agregado celular se resuspendió en 40 µl de buffer de fosfatos-citrato (PC) que consistió de 192 partes de 0.2 M Na₂ HPO₄ y 8 partes de 0.1 M de ácido cítrico (pH 7.8), se dejaron 30' a temperatura ambiente, después las muestras se centrifugaron a 1000 X g 5', el sobrenadante fue transferido a nuevos

tubos y concentrados al vacío en el concentrador, Hetovac, Hoefer Scientific Instruments (San Francisco California) por 15', posteriormente se les agregó 3 μ l de Nonidet NP-40 al 0.25% en agua destilada, más 3 μ l de solución de Rnasa A (1 mg/ml, también en agua) las muestras se dejaron incubando por 30' a 37°C, luego se les agregó 3 μ l de proteinasa K (1 mg/ml) y nuevamente se incubaron por 30' a 37 °C. Después de la incubación se le adicionó a cada muestra 12 μ l de buffer de carga (0.25% azul de bromofenol, 0.25 % de xilencianol y 30% de glicerol). El contenido completo de cada muestra se corrió en un gel de agarosa 1% a 2 V/cm por 16 horas. El DNA de los geles se observó después de marcarlo con 5 μ g /ml de ioduro de propidio, en un analizador de imágenes Digital Imagen System 15-1000 (Alpha Innotech Corporation).

El paquete celular que quedó después de la remoción con el buffer de fosfatos-citrato, se resuspendió en 1 ml. PBS 0.01M, conteniendo (50 μ g de Rnasa, 50 μ g de Ioduro de Propidio y 0.1% de Triton X-100), la suspensión celular se filtró con una malla de nylon con poro de 30 μ m para evitar aglomerados celulares. Las muestras se dejaron a temperatura ambiente en el cuarto oscuro durante 20 min y después se leyeron en un citómetro de flujo FACSort (Becton Dickinson Systems, San José, CA), equipado con lámpara de láser de argón que emite una luz de excitación a 488nm, utilizando el programa CellFit.

Antes de cada medición, se verificó la calibración del instrumento, así como la correcta función de doble discriminación, de acuerdo a las indicaciones del estuche de Becton Dickinson (DNA, QC Particles Becton Dickinson Systems, San José, CA). Este estuche contiene CENs (Chicken Erythrocyte Nuclei, teñidos con Ioduro de Propidio, con los cuales se calibra la resolución y la linealidad del Instrumento y CTNs (Calf Thymocyte Nuclei, teñidos con Ioduro de Propidio (SIGMA Chemical Co.), que permiten verificar la correcta discriminación entre singletes (células en G2+M) y dobletes.(aglomerados de dos células en GO/G1).

El coeficiente de variación (CV) para el pico de los singletes, siempre fue menor o igual a 3% y la linealidad (pico de dobletes/pico de singletes) entre 1.95 y 2.05.

Con los CTNs, en cada experimento se verificó la capacidad del FACSort para discriminar entre células dobles en G₀/G₁ y dobletes verdaderos que se refiere a las células en fase G₂+M. Los CTNs se examinaron en una relación FL2-W vs FL2-A para tener una clara separación entre dobletes y singletes. Para confirmar la capacidad de doble discriminación, los CTNs se adquirieron con el programa CellFit y se formó una región para limitar los núcleos con singletes, la cual se analizó por un modelo de RFIT y se verificó que el CV de G₀/G₁ fuera menor o igual al 5% y que los porcentajes de G₀/G₁, S y G₂+M, correspondieran a los valores reportados en el inserto de cada estuche de calibración de DNA QC Particles (Becton Dickinson Systems, San José, CA). Por cada folículo se adquirieron y analizaron 10,000 células y como este método utiliza IP como fluorocromo, la fluorescencia emitida se leyó a 623nm (FL2).

Se consideraron como apoptóticas las células de la región hipodiploide, ubicadas al lado izquierdo de la región G₀/G₁ en los histogramas reportados por el citómetro.

En la tercera alícuota, se utilizó un procedimiento de doble tinción, que fue propuesto por Vermes et al., (1995), para lo cual usamos el "estuche" comercial Apoptosis Detection Kit (R&D Systems Catalog Number KNX 50). Los paquetes celulares se lavaron dos veces por centrifugación con PBS frío, después el paquete se resuspendió en buffer de marcado (Hepes 10mM, NaCl, 2.5mM, 2.5 mM de CaCl₂), para tener una concentración celular de 1×10^6 de células por ml. A 100 μ l de suspensión celular, se le adicionaron 10 μ l de Anexina V conjugada con Isotiocianato de Fluoresceína (AnexinaV-FITC) (10 μ g/ml) y 10 μ l de IP (50 μ g/ml de PBS). Las muestras se agitaron suavemente en vortex y después se incubaron por 15 min a temperatura ambiente en oscuridad, posteriormente se le agregaron 400 μ l de Hepes a cada muestra. Todas las muestras se pasaron por una malla de 30 μ m para evitar

aglomerados celulares, se analizaron en el citómetro 10,000 células de cada folículo inmediatamente después del filtrado. Por los rangos de emisión y excitación de cada fluorocromo, la FITC, se leyó como FL1 y el IP como FL2.

Siguiendo las indicaciones del estuche comercial, en cada experimento se prepararon 3 tubos adicionales; a) células no marcadas, b) células marcadas solo con Anexina V-FITC y c) células marcadas solo con IP. Esto se hizo con el propósito de establecer las fluorescencias intrínsecas, que serán consideradas como fluorescencias negativas, así como para realizar la compensación electrónica del Instrumento dado que se usaron dos fluorescencias, FL1 y FL2. Como control positivo para ambos fluorocromos (FITC y IP) y para poder diferenciar por su fluorescencia a las células apoptóticas y necróticas, se les produjo apoptosis a células de la línea U-937 con dexametasona (10^{-4} M por 72 horas) y necrosis por calentamiento a 59°C (durante 90 min) (Huschtscha et al., 1994).

Para analizar los datos de cada alícuota, se utilizó el programa de computadora Lysys II, el valor mínimo de FSC-H fue de 44 y la ganancia para FSC de E00. Las fluorescencias 1 y 2 se midieron en forma logarítmica, siendo el eje de la X para la fluorescencia 1 y el de las Y para la 2. La compensación de las fluorescencias fue de 7% para FL1-FL2 y del 25% para FL2-FL1. Se solicitó al citómetro una gráfica de acumulación de puntos de acuerdo a la relación FL1/FL2 de cada célula, esto permitió la formación de cuatro cuadrantes: el inferior izquierdo que corresponde a las células que no adquirieron ninguno de los fluorocromos y que por lo tanto se refiere a las células vivas; el inferior derecho que son células con FL1 +, que corresponden a las células apoptóticas; las del cuadrante superior derecho, FL2+, son las células necróticas.

Determinación de hormonas esteroideas

Las determinaciones de estradiol y progesterona en los líquidos foliculares se realizaron por radioinmunoensayo. Para la determinación de estradiol fue necesario hacer una dilución 1:25 y para progesterona 1:50. Para ambas determinaciones se utilizó el estuche de detección "COAT-A-COUNT" (Diagnostic Products Corporation,

Los Angeles CA.), el cual no requiere de extracción. La sensibilidad del método en el caso de estradiol fue de 8 pg/ml y para la progesterona de 0.02 ng/ml. Todas las muestras fueron procesadas en un solo ensayo con un coeficiente de variación intraensayo para estradiol de 6.34% y 5.28% para progesterona; los coeficientes interensayo fueron de 8.53% para estradiol y 9.42 % para progesterona.

Determinación de proteínas

La concentración de proteína de las muestras, se midió por el método de Lowry (1951).

Análisis Estadístico.

El análisis estadístico incluyó el análisis de varianza de una y dos vías (ANOVA) y prueba de Tukey (Sokal y Rohlf, 1969).

El modelo estadístico empleado para el análisis de las concentraciones hormonales fue el siguiente:

$$Y_{ijk} = \mu + G_i + T_j + GT_{ij} + E_{ijk}$$

Donde:

Y_{ijk} Es la variable en estudio (E_2 , P_4 o E_2/P_4)

μ Es la media general

G_i Representa el i-ésimo efecto de grupo folicular (grado de atresia clasificado microscópicamente)

T_j Representa el j-ésimo efecto del tamaño folicular

GT_{ij} Representa el efecto de interacción entre el i-ésimo efecto de grupo folicular con el j-ésimo efecto del tamaño folicular

E_{ijk} Error aleatorio o residuo

Cuando fue importante comparar folículos de diferentes tamaños, se utilizó la prueba de Student. Todos los cálculos estadísticos se realizaron en una computadora PC con el paquete estadístico Sigma Stat (Jandel Scientific Corporation San Rafael, CA).

En los resultados de las concentraciones hormonales, primero fue necesario hacer una transformación logarítmica de los datos y luego se hizo un análisis de varianza, y prueba de F de Fisher.

4.- RESULTADOS

Los resultados de las cuantificaciones hormonales en el líquido folicular (Tabla 1a y 1b), confirman que nuestro método de clasificación microscópica del progreso de la atresia en los folículos de la oveja, es adecuado. En efecto, el análisis de varianza bifactorial de los resultados (Tabla 1b), indica que hay diferencias altamente significativas en la concentración de estrógenos (E_2) y en la relación progesterona/estrógenos (P_4/E_2) con respecto al grado de atresia de los folículos, clasificada microscópicamente. El coeficiente de determinación (R^2) del modelo que incluye al grado de atresia y que explica las diferencias para ambos factores fue alto tanto para E_2 como para P_4/E_2 y en ambos casos el modelo fue altamente significativo ($p < 0.001$) (Tabla 1b). Además, la concentración de E_2 fue dependiente significativamente ($p < 0.05$), de la interrelación tamaño y grado de atresia de los folículos. La concentración de progesterona P_4 no estuvo relacionada con la clasificación morfológica de los folículos, pero tuvo una relación significativa con el tamaño del folículo siendo más alta en los folículos grandes (>6 mm) que en los folículos pequeños (3-6 mm).

La actividad de las enzimas lisosomales en el líquido folicular libre de células fue marcadamente diferente en los folículos pequeños y grandes (figura 1). En los folículos de 3-6 mm de diámetro, no hubo diferencias significativas ($p > 0.05$) en la actividad enzimática de fosfatasa ácida y glucosaminidasa entre los folículos del grupo 1 (sanos) y los del grupo 2 (con atresia inicial). Se encontró un incremento pequeño pero significativo en los folículos con atresia 3a y 3b sin que hubiera diferencias significativas entre ambos grupos. Por el contrario, en los folículos >6 mm se encontró una asociación positiva significativa ($p < 0.05$), entre los estadios de atresia y las actividades de fosfatasa y glucosaminidasa en el líquido folicular (Fig 1).

Un comportamiento diferencial similar con respecto al tamaño de los folículos se encontró en la actividad de las enzimas lisosomales libres y unidas a membrana en las células de la granulosa (Fig 2 y 3). En el caso de los folículos de 3-6 mm, la

Tabla 1a.

Concentración de hormonas esteroides, estradiol y progesterona, durante la atresia folicular en la oveja.

n	Grado de atresia	Tamaño Folicular	Estradiol	Progesterona	Progesterona/Estradiol
8	1	3-6 mm	4.26 ± 0.68	3.29 ± 0.86	0.60 ± 0.49
9	1	>6 mm	5.33 ± 0.40	4.57 ± 0.73	0.93 ± 0.51
8	2	3-6 mm	4.02 ± 0.54	4.66 ± 0.83	0.78 ± 0.58
6	2	>6 mm	4.22 ± 0.38	4.98 ± 0.75	0.95 ± 0.56
6	3 a	3-6 mm	4.02 ± 1.30	5.15 ± 0.57	1.23 ± 1.12
9	3 a	>6 mm	3.45 ± 1.02	5.78 ± 0.48	1.32 ± 1.19
9	3 b	3-6 mm	2.55 ± 0.51	4.38 ± 1.24	2.22 ± 1.39
6	3 b	>6 mm	2.14 ± 0.35	5.41 ± 0.90	2.57 ± 1.16

La concentración hormonal está presentada como log de la concentración nM de las hormonas en el líquido folicular.

Tabla 1b.

Análisis de varianza bifactorial de las determinaciones hormonales.

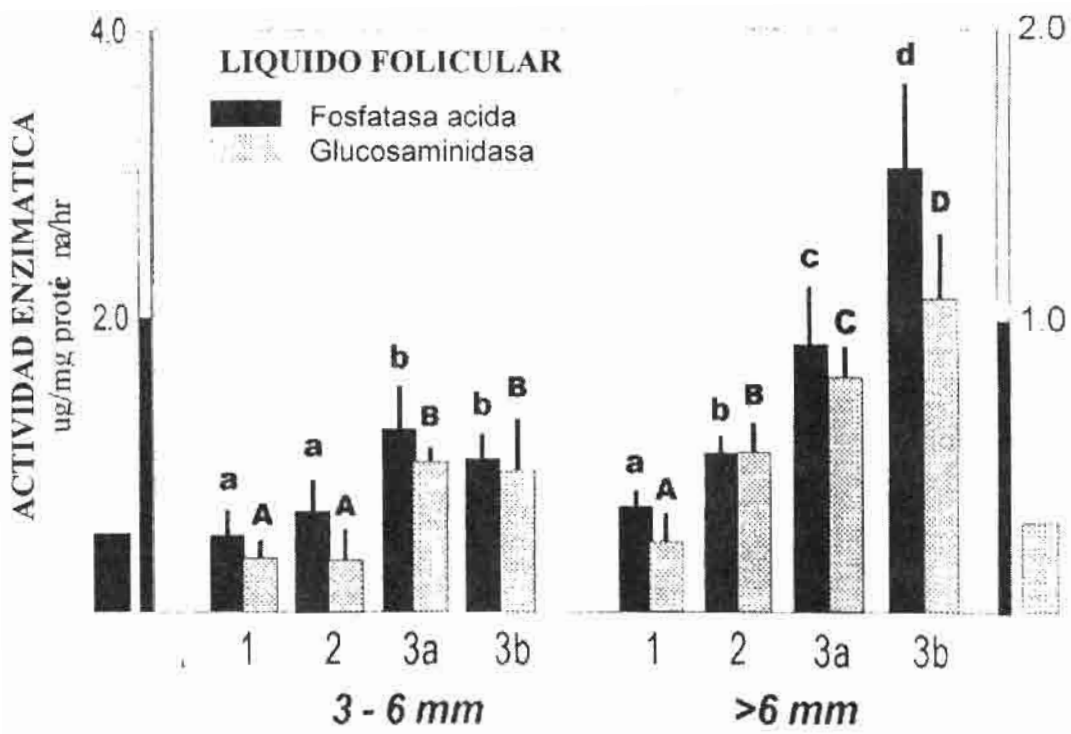
Fuente de Variación	D. F.	P ₄ /E ₂ (C.M.)	E ₂ (C.M.)	P ₄ (C.M.)
Grupos	3	18.49*	21.76*	0.50
Tamaño folicular	1	1.30	0.96	4.50***
Tamaño/Grupo	3	0.07	2.44**	1.66
R ²		0.53*	0.73*	0.14

* p < 0.001

** p < 0.05

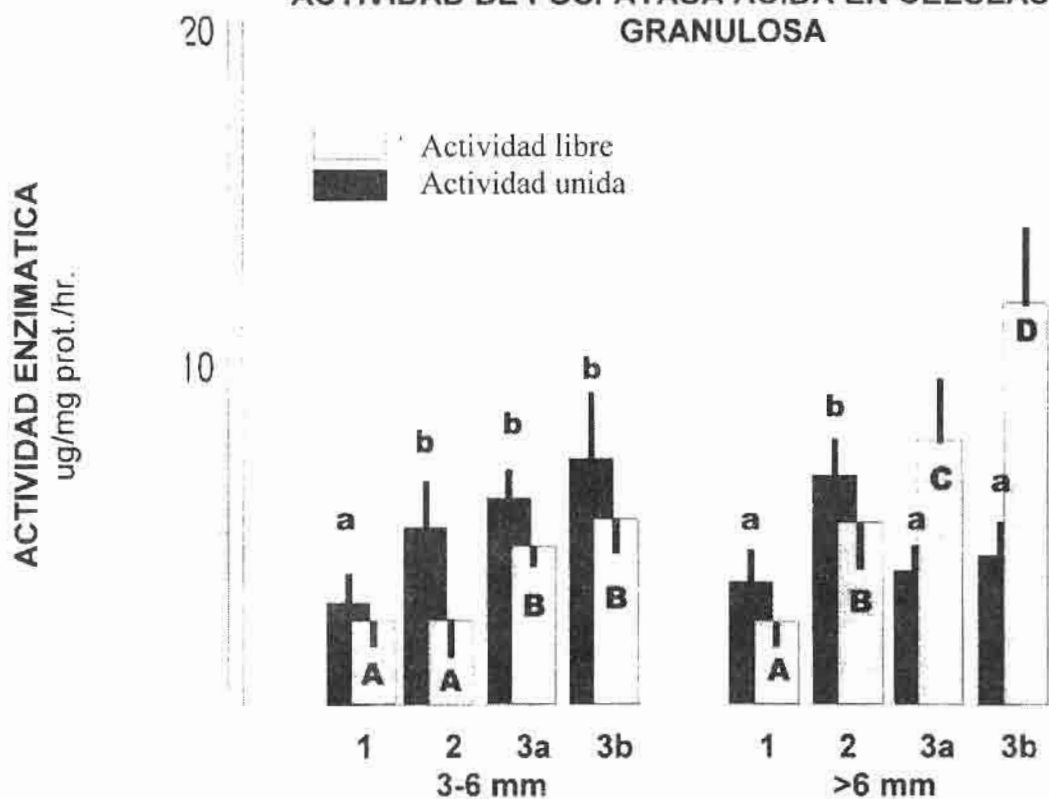
*** p < 0.10

Fig. 1.- Cambios en la actividad específica de las enzimas lisosomales en el líquido folicular libre de células, durante el desarrollo y la atresia folicular. Las actividades enzimáticas, se midieron fluorométricamente, por la liberación enzimática de 4-metilumbeliferona, a partir del sustrato correspondiente, de acuerdo a la metodología descrita por Rosado et al (1977) y modificada por Ballesteros et al (1992). Los valores representan el promedio \pm desviación estándar de por lo menos 6 experimentos independientes. Los datos fueron calculados estadísticamente para cada enzima por ANOVA de una vía y prueba de Tukey. Las letras diferentes sobre las barras indican diferencia significativa ($p < 0.05$), cuando se compararon con todos los otros valores para la misma enzima, independientemente del tamaño folicular, las diferencias por tamaño y grupo de atresia se indican con un asterisco.



La figura 2, representa la actividad libre y unida de fosfatasa ácida en células de la granulosa de folículos en crecimiento y atresia. Los valores representan los promedios \pm desviación estándar, obtenidos de los últimos 6 experimentos independientes. Los datos se calcularon estadísticamente para cada distribución subcelular por la prueba de ANOVA y de Tukey. Las letras diferentes sobre las barras indican la presencia de diferencia significativa ($p < 0.05$) cuando se compara con todos los otros valores de la misma distribución subcelular, independientemente del tamaño del folículo. El tamaño del folículo y el tipo de atresia de cada grupo de folículos se indica sobre la abscisa

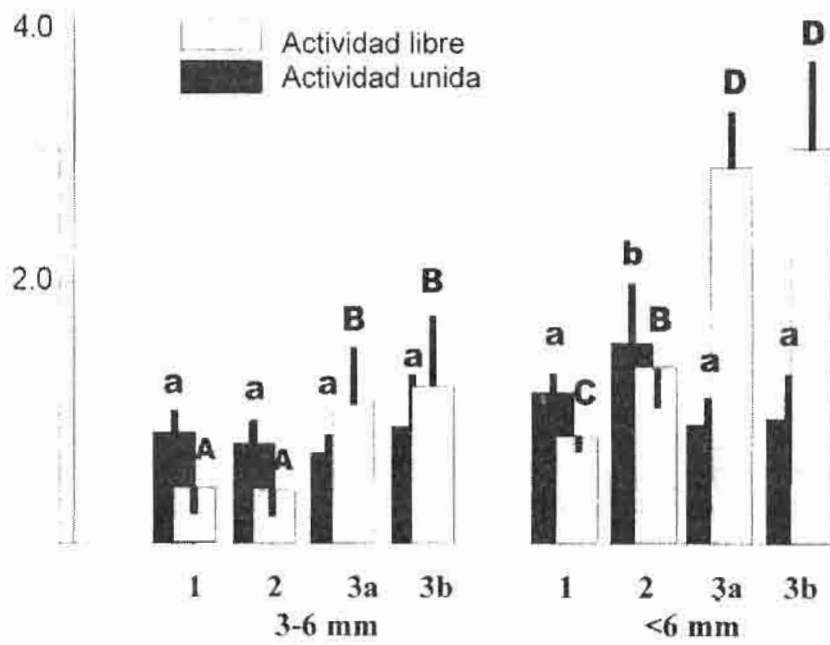
ACTIVIDAD DE FOSFATASA ACIDA EN CELULAS DE LA GRANULOSA



La figura 3, representa la actividad específica libre y unida de N-acetil- β -D-glucosaminidasa en células de la granulosa de folículos en crecimiento y diferentes grados de atresia. Los valores representan los promedios \pm desviación estándar, obtenidos de los últimos 6 experimentos independientes. Los datos se calcularon estadísticamente para cada distribución subcelular por la prueba de ANOVA y de Tukey. Las letras diferentes sobre las barras indican la presencia de diferencia significativa ($p < 0.05$) cuando se compara con todos los otros valores de la misma distribución subcelular, independientemente del tamaño del folículo. El tamaño del folículo y el tipo de atresia de cada grupo de folículos se indica sobre la abscisa

ACTIVIDAD DE GLUCOSAMINIDASA EN CELULAS DE LA GRANULOSA

ACTIVIDAD ENZIMATICA
ug/mg prot./hr.



actividad de glucosaminidasa unida a membrana permaneció sin cambios en todos los grupos de atresia, mientras que la actividad libre de las enzimas mostró un incremento pequeño en folículos con atresia avanzada. En los folículos de 3-6 mm sanos y con atresia inicial (grupos 1 y 2), no hubo cambios significativos en la actividad de fosfatasa ácida libre. La actividad de esta enzima, en folículos de éste tamaño, tanto en forma libre como unida a membrana, mostró un incremento significativo en los folículos con atresia 3a y 3b, sin diferencia significativa entre ellos. Las actividades enzimáticas en células de la granulosa obtenidas de folículos atrésicos >6mm, tuvieron un comportamiento diferente. La actividad libre de ambas enzimas lisosomales se incrementó casi linealmente con la progresión de la atresia, siendo los valores más altos para los folículos con atresia 3b (Fig 2 y 3). Por el contrario, como podría ser esperado, la actividad unida a membrana de ambas enzimas mostró un decremento significativo en los folículos con atresia 3a y 3b en comparación con los de atresia temprana.

Una de las características bioquímicas más importantes de la apoptosis, es el rompimiento internucleosomal del DNA con la formación de fragmentos ~200 pb. La fragmentación del DNA de las células puede ser evaluada por la determinación fluorocitométrica del contenido de DNA hipodiploide de los núcleos de las células y por la observación del patrón clásico de escalera del DNA encontrado en la electroforesis en gel de agarosa. En la figura 4 se presenta un ejemplo típico de la distribución fluorocitométrica del contenido de DNA durante el ciclo mitótico de células de la granulosa obtenidas de un folículo sano (atresia 1) (Fig 4A), y de un folículo con atresia avanzada (3b) (Fig 4B), ambos > 6 mm. Cada histograma ha sido dividido en 4 secciones: la primera llamada tradicionalmente A_0 , que representa al grupo de células con contenido hipodiploide de DNA. Cada histograma corresponde a la representación citofluorométrica de cada muestra analizadas de células de la granulosa, a partir del cual se calculó el porcentaje de células en cada sección. Los porcentajes y el análisis estadístico derivados de todos los histogramas se presentan en la Tabla 2.

Fig. 4. Estudio citofluorométrico del patrón de distribución de DNA (ciclo celular) de células de la granulosa de un folículo sano (grupo I) >6 mm (Fig. 4A) y un folículo del grupo 3b (atresia avanzada) >6 mm (Fig. 4B), estudiado por citometría de flujo.

Cada histograma está dividido en 4 secciones: la primera es la tradicionalmente llamada A_0 , que representa un grupo distinto de células con contenido hipodiploide de DNA. Las otras regiones representan la fase G_0/G_1 y G_2+M del ciclo celular.

Cada histograma, es una representación del total de células, a partir del cual se calculó el porcentaje de células en cada una de las fases del ciclo celular.

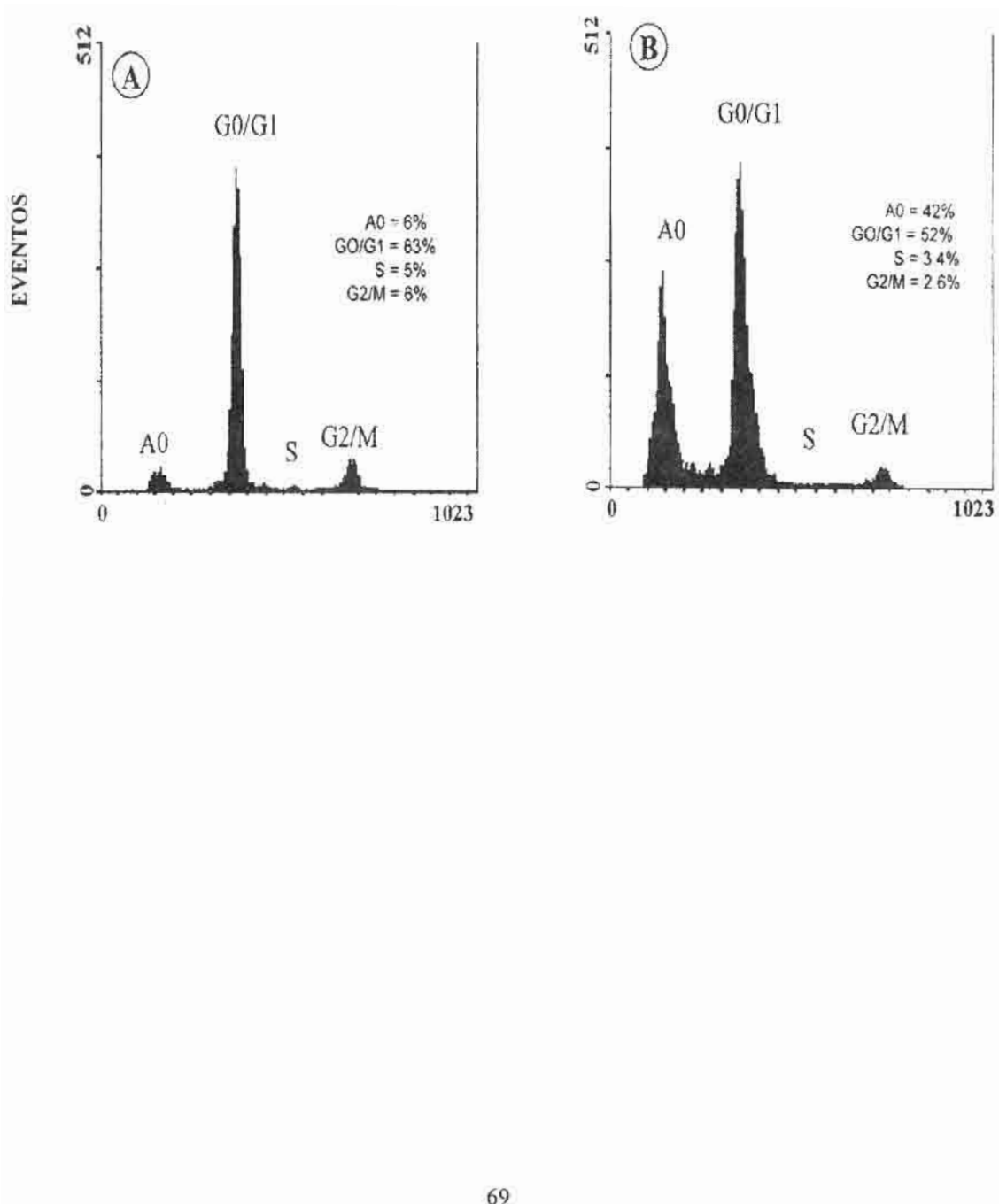


Tabla 2

Estudio por citometría de flujo del DNA hipodiploide (A_0), obtenido durante la interfase en células de la granulosa de folículos pequeños (3-6 mm), grandes (> 6 mm), sanos y atrésicos de ovejas.

	Ciclo celular (Folículos 3-6 mm)			Ciclo celular (Folículos > 6 mm)		
	n	A_0	G_0/G_1	n	A_0	G_0/G_1
Atresia 1	5	4.6 ± 2.1 ^a	87.5 ± 6.6 ^a	6	7.0 ± 1.9 ^a	83.3 ± 6.5 ^a
Atresia 2	4	*22.1 ± 2.3 ^b	*70.3 ± 3.8 ^b	4	14.6 ± 1.8 ^b	80.3 ± 5.6 ^a
Atresia 3 a	5	33.4 ± 8.0 ^c	60.3 ± 9.5 ^b	5	27.3 ± 2.2 ^c	64.2 ± 7.7 ^b
Atresia 3 b	4	55.9 ± 11.6 ^d	40.3 ± 11.3 ^c	4	44.8 ± 6.7 ^d	50.1 ± 4.2 ^c

Datos expresados en promedio ± desviación estándar, el número de casos se expresan como n.

Las letras diferentes significan que existe diferencia significativa ($p < 0.05$) entre los datos de la misma columna, según el análisis de varianza y la prueba de Tukey.

El asterisco que precede a los números, indica diferencia significativa ($p < 0.05$) en el porcentaje de células en un mismo momento del ciclo celular pero de diferente tamaño. (t de Student).

En todos los histogramas obtenidos de la citometría de flujo, se encontró una subpoblación de células que tenían menos DNA que la cantidad esperada para células viables (desde 4.6 ± 2.1 en células de folículos sanos de 3-6 mm a 55.9 ± 11.6 , obtenidas en la atresia 3b en el mismo tamaño folicular). El porcentaje de células con contenido de DNA hipodiploide fue positivamente correlacionado con el avance de la atresia, incrementándose más de 10 veces (4.6 ± 2.1 a 55.9 ± 11.6) en folículos de 3-6 mm de diámetro y sólo 6 veces (de 7.0 ± 1.9 a 44.8 ± 6.7), en folículos > 6 mm. Aunque consistentemente los folículos pequeños en todos los grados de atresia, tuvieron mayores porcentajes de células hipodiploides que los > 6 mm, solo hubo diferencia significativa en los folículos con atresia 2 o atresia inicial (Fig 4). La electroforesis en gel del DNA extraído de las células de la granulosa (Fig 5), confirman que la degradación endonucleolítica, se incrementó con el progreso de la atresia. El patrón de fragmentación en escalera del DNA en células de la granulosa de folículos pequeños con atresia inicial, fue consistentemente mejor definido (Fig 5 carril d), que el patrón obtenido de las células de la granulosa de folículos >6mm con el mismo grado de atresia.

La Figura 6, muestra los resultados del análisis citofluorométrico bivariado, realizado en las células de la granulosa, incubadas en un sistema compuesto por Anexina V-FITC e IP. Las células en la fase inicial de la apoptosis se caracterizan por conservar la integridad de su membrana y por la translocación o inversión de fosfatidilserina que normalmente se encuentra en la cara interna de la membrana, hacia la cara externa. De tal manera que las células apoptóticas incubadas en presencia de IP y Anexina V-FITC, sólo mostrarán fluorescencia debido a la unión de la Anexina V-FITC a la fosfatidilserina. Anexina V-FITC, también se une a las células necróticas, aunque en ese caso la unión se debe tanto a la translocación de la fosfatidilserina como a la pérdida temprana de la integridad de la membrana celular, de manera que en las células necróticas así como en la apoptosis avanzada, la fluorescencia de Anexina V-FITC, será acompañada, por la fluorescencia roja

producida por la unión de IP al DNA celular. La Figura 6A, representa un citograma de células de la granulosa obtenidas de un folículo no atrésico. La mayoría de las células, se observaron en el cuadrante inferior izquierdo, lo cual quiere decir que se trata de células sanas que excluyeron el IP y que son negativas a la tinción con Anexina V-FITC, hubo un importante número de células positivas a Anexina V (cuadrante inferior derecho), indicando la presencia de células apoptóticas, y muy pocas células se encontraron en el cuadrante superior izquierdo que evidenciaran células necróticas en este tipo de folículos. En la Fig 6B, en el que se presenta el citograma de un folículo con atresia 2, se puede ver que coexisten células sanas, apoptóticas y necróticas. En la Tabla 3, se presentan los porcentajes y la estadística del análisis fluorocitométrico bivariado de todos los folículos estudiados. Como puede observarse en esta tabla, la apoptosis y en menor porcentaje la necrosis, siempre está presente en aquellos folículos clasificados como sanos (atresia 1). El número de células de la granulosa vivas (Anexina V-/IP-), disminuyó constantemente, mientras que el número de células apoptóticas (Anexina V+/IP-) y necróticas (Anexina V+/IP+) aumentaron significativamente con el avance de la atresia.

La apoptosis fue el mecanismo de muerte más común en los folículos pequeños, ya que los porcentajes de células apoptóticas en estos folículos fueron consistentes y significativamente ($p < 0.05$) más altos que los porcentajes de células necróticas. En los folículos > 6 mm, la atresia avanzada se caracteriza por una proporción significativamente más alta de células necróticas (Anexina+/IP+) que de células apoptóticas (Anexina +/IP-).

Fig. 5.- Electroforesis en gel de agarosa de DNA de células de la granulosa obtenidos de folículos de normales y atrésicos de oveja. Después de la electroforesis a 2V/cm por 16 h, el gel se tiñó con ioduro de propidio y observado bajo luz UV usando un analizador de imágenes digital. Carril a, marcador de DNA, carril b, DNA obtenido de folículos no atrésicos (grupo 1) de 3-6 mm. Carril c, DNA de folículos con atresia inicial (grupo 2) de 3-6 mm. Carril d, DNA folículos de 3 a 6 mm con atresia inicial. Carril e y f, DNA de folículos 3a, >6mm y 3-6 mm respectivamente. Carril g, DNA de folículos 3b >6 mm.

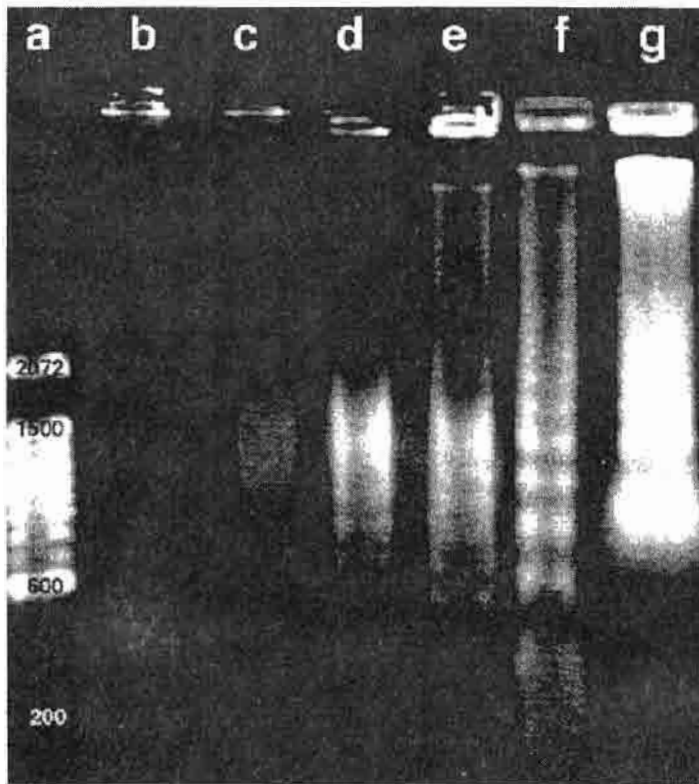
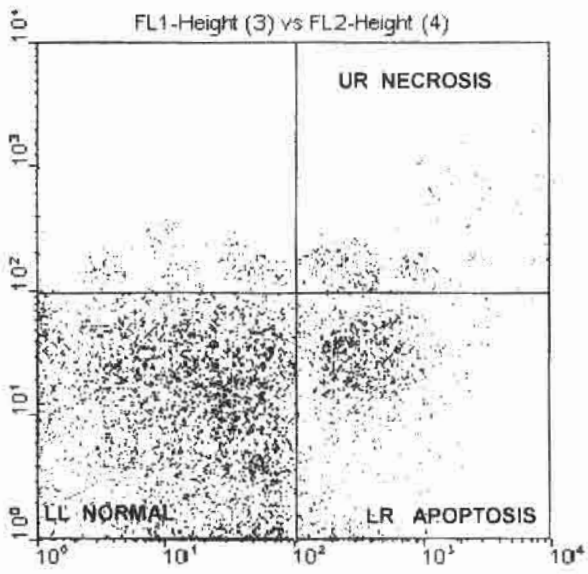


Fig. 6.- Análisis bivariado de la fluorescencia de células de la granulosa de folículos normales y atrésicos (3 a 6 mm.), con anexina V-FITC e IP. La fig. 6 A representa el diagrama células de la granulosa de folículos no atrésicos. La mayoría de las células se observan en el cuadrante inferior izquierdo, excluyen IP y son negativas para Anexina V, de manera que pueden ser consideradas células sanas, se observan algunas células apoptóticas. Anexina V(+) y IP(-). No se ven células necróticas IP(+) en el cuadrante superior derecho. La figura 6B representa el diagrama de células de la granulosa obtenidas de folículos con atresia inicial, se puede observar que coexisten células de la granulosa sanas (cuadrante inferior izquierdo), apoptóticas (cuadrante inferior derecho) y necróticas (cuadrante superior derecho).

A.-



B.-

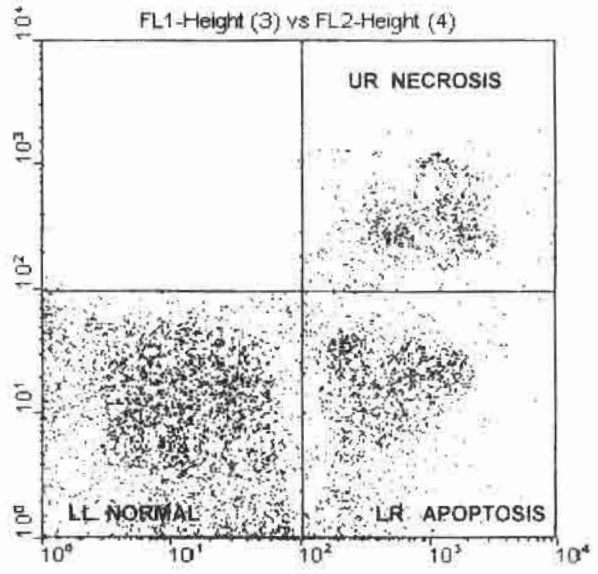


Tabla 3.

Distribución del porcentaje de células de la granulosa de folículos pequeños (3-6 mm, grandes (> 6 mm), sanos y atrésicos de oveja, obtenidos del estudio bivariado Anexina V-FITC/IP por citometría de flujo.

n	Tipo de Atresia	Tamaño Folicular	(%) Células Sanas Anexina(-) PI(-)	(%) Células Apoptóticas Anexina(+) IP(-)	(%) Células Necróticas Anexina(+) IP(+)
9	1	>6 mm	85.4 ± 8.9 ^a	*8.7 ± 2.6 ^a	4.8 ± 1.9 ^a
6	1	3-6 mm	86.2 ± 9.4 ^a	*9.2 ± 2.8 ^a	4.6 ± 2.1 ^a
6	2	>6 mm	68.9 ± 8.8 ^b	11.0 ± 3.0 ^{a,b}	14.1 ± 4.2 ^b
8	2	3-6 mm	70.3 ± 4.9 ^b	*19.2 ± 4.6 ^c	8.4 ± 2.3 ^c
9	3 a	>6 mm	43.4 ± 7.1 ^c	*22.1 ± 5.4 ^{c,d}	32.5 ± 3.9 ^{d,c}
6	3 a	3-6 mm	44.1 ± 6.4 ^c	*27.1 ± 4.0 ^d	18.7 ± 3.7 ^b
4	3 b	>6 mm	29.4 ± 4.5 ^d	*27.8 ± 4.3 ^d	36.9 ± 4.2 ^c
5	3 b	3-6 mm	27.3 ± 5.8 ^d	*38.9 ± 3.0 ^c	26.8 ± 4.9 ^d

Los datos representan el promedio ± la desviación estándar, la n indica el número de casos.

Las letras diferentes significan que hay una diferencia significativa (p<0.05) (ANOVA y prueba de Tukey)

El asterisco que precede al número indica una diferencia significativa (p<0.05) (t de student) entre el porcentaje de células apoptóticas y necróticas en el mismo tipo y tamaño de folículo.

5.- DISCUSION.

Nuestros resultados confirman que la utilización del microscopio estereocópico como criterio utilizado para la clasificación de la atresia de los folículos de oveja es satisfactorio (García et al., 1997). Observaciones histológicas con doble tinción (Moor et al., 1978; Braw and Tsafiriri, 1980) en folículos de diferentes estadios de atresia mostraron una buena correlación con la clasificación macroscópica realizada simultáneamente. Los resultados de este trabajo están totalmente de acuerdo con los de Moor et al (1978), quienes encontraron que la clasificación macroscópica e histológica de folículos normales y con atresia avanzada, coincidieron en el 95% de los casos. Estos criterios morfológicos tienen también una buena correlación con la concentración de hormonas esteroides en el líquido folicular. La concentración de estrógenos en el líquido folicular disminuyó conforme aumentó el grado de atresia, mostrando un coeficiente de determinación elevado y altamente significativo ($R^2=0.73$, $p<0.001$) con el estado de atresia establecido por los criterios macroscópicos. La relación P_4/E_2 , aunque con un coeficiente de determinación menor ($R^2 =0.53$, $p<0.001$), también fue un indicador de la correspondencia entre la clasificación macroscópica de los folículos y lo establecido como criterios endocrinológicos para el avance de la atresia.

La correlación entre la clasificación macroscópica de atresia folicular y algunos parámetros bioquímicos que se han señalado como diagnósticos de este proceso, han sido recientemente utilizados por algunos grupos de investigación (Hughes and Gorospe, 1991; Tilly et al., 1992). Nuestros resultados, en general están de acuerdo con los estudios morfométricos y hormonales realizados por Murdoch (1992) y por Tilly et al., (1992). Murdoch (1992), en ovejas sincronizadas, pudo seleccionar de esta manera folículos antrales destinados a la ovulación y folículos atrésicos. Estas investigaciones indicaron que los folículos que se volverían atrésicos, tuvieron una menor capacidad para producir estrógenos inmediatamente después de su estimulación con LHRH además de alteraciones significativas en su producción de progesterona. En los porcinos la disminución en la concentración de estrógenos en

líquido folicular pudo ser correlacionada con la presencia de evidencias morfológicas de atresia, tales como fragmentación internucleosomal de DNA y disminución en el RNAm de 2.6 Kilobases que codifica una especie de aromatasa (Tilly et al., 1992).

La integridad de la membrana plasmática es fundamentalmente preservada durante la apoptosis, sin embargo, la estructura y/o la función de la membrana plasmática puede estar modificada desde el paso inicial de este proceso. La externalización de residuos de fosfatidilserina (PS) y la concomitante pérdida de la simetría de los fosfolípidos de la membrana, es considerada actualmente como uno de los eventos más tempranos en la apoptosis. En este trabajo, se ha mostrado que el sistema fluorocitométrico que utiliza simultáneamente IP y Anexina V marcada con Isotiocianato de Fluoresceína, puede ser usado para hacer el seguimiento de la muerte celular de las células de la granulosa durante el proceso de la atresia en los folículos antrales de diferentes tamaños. En todos los folículos estudiados, atrésicos y no atrésicos, se encontraron núcleos cuyas afinidades tintoriales por el IP y la Anexina V-FITC mostraron características de células apoptóticas y células necróticas. En los folículos no atrésicos, el porcentaje de células apoptóticas (Anexina V-FITC +/IP-) fue dos veces más alto que el porcentaje de células necróticas, alcanzando valores tan altos como del 10%.

Se conoce poco sobre los eventos que acompañan las etapas tempranas del proceso de la necrosis que Majno y Joris (1995) llamaron "oncosis", sobre todo aquellos cambios que permitan su reconocimiento por citometría de flujo. La determinación de la integridad de la membrana plasmática no es suficiente para distinguir entre necrosis y apoptosis tempranas porque la integridad membranal es aparentemente preservada al comienzo de ambos procesos. La edematización o ampollamiento ("blebbing" o más adecuado "budding") de la célula se describe usualmente como una característica de la apoptosis, pero también puede ser observado durante la necrosis. Las alteraciones en las funciones mitocondriales y/o

el hinchamiento de las mitocondrias podría ser un factor diferencial (Darzynkiewicz et al., 1997), pero actualmente se sabe que puede estar presente en la etapa temprana de ambos mecanismos de muerte celular (Columbano, 1995; Zanzami et al., 1997; Lemasters et al., 1998). La necrosis puede estar acompañada de picnosis o distribución en forma irregular de la cromatina formando áreas irregulares de condensación que son morfológicamente indistinguibles de la picnosis, mientras que la apoptosis, por el contrario, puede ocurrir sin picnosis clara y, sobre todo, sin rompimiento internucleosomal, ni evidencias de degradación del DNA (Zamai et al., 1996). El estudio de la integridad lisosomal, con el uso de marcas metacromáticas como el naranja de acridina (Traganos y Darzynkiewicz 1994), además de no proporcionar datos cuantitativos no siempre permite identificar células en estadios tempranos de muerte (Darzynkiewicz et al., 1997). Estos hechos resaltan la importancia del presente estudio, ya que como se demostró, una característica fácilmente cuantificable en la necrosis temprana podría ser la liberación de enzimas lisosomales hacia el compartimento citoplásmico de la célula, sin que necesariamente se rompa la membrana celular. En el caso particular de la atresia la liberación de actividades hidrolíticas ocurre hacia la fracción del líquido folicular libre de células, lo cual se puede realizar por la simple modificación de las características de permeabilidad de la membrana celular. De hecho la presencia de actividad enzimática tanto en el líquido folicular como en la fracción intracelular libre correlaciona con el porcentaje de células que mostraron tinción con IP en el estudio bivariado de la citometría de flujo. Sin embargo, esto es considerablemente más demostrativo en las diferencias encontradas entre los folículos pequeños y grandes que experimentan atresia, dejando claro que, aunque la apoptosis y la necrosis están presentes simultáneamente en la atresia folicular, la necrosis mostró ser el mecanismo dominante de muerte celular en las células de la granulosa obtenidas de los folículos atrésicos mayores de 6 mm, mientras que su participación en los folículos pequeños demostró ser mucho menos importante. La prevalencia de la necrosis sobre la apoptosis en los folículos con atresia avanzada, ayuda a explicar algunas reacciones inflamatorias observadas durante la atresia (Bukovsky et al 1979;

Murdoch, 1992) y justificarian el hecho de que se acumulen macrófagos preferencialmente en este tipo de folículos (Gaytan et al 1998).

La presencia simultánea de varios modos de muerte celular en las células de la granulosa durante la atresia folicular ha sido previamente establecida. Kovacs et al (1992) sugirieron que la necrosis es la forma de muerte dominante en los folículos atrésicos de la gansa. D'Herde et al (1996), observaron tres vías de muerte celular durante la atresia en los folículos de la codorniz: apoptosis, necrosis y autofagocitosis. Si consideramos que la autofagocitosis, es el resultado de un incremento en la síntesis y liberación de hidrolasas lisosomales hacia el citoplasma, los resultados de D'Herde et al (1996) pueden ser completamente compatibles con los de este trabajo.

La hipertrofia de la teca, las alteraciones vasculares y la infiltración de células inflamatorias (Greenwald y Roy, 1994; Murdoch, 1992) son importantes puntos de referencia anatómicos en la atresia folicular. Son particularmente interesantes para nuestro estudio los resultados de Murdoch (1992) con relación al área de la teca interna ocupada por la red vascular. Los requerimientos en el incremento de flujo sanguíneo para el desarrollo de los folículos después de la producción del pico de LH, queda demostrado porque se presenta un incremento de más de 3 veces en este parámetro entre las 0 y las 12 horas después de la aplicación de LHRH. En los resultados de Murdoch (1992) queda muy claro que la vasodilatación de los vasos de la teca en los tiempos arriba mencionados, fue significativamente menor ($p < 0.05$) en los folículos destinados a la atresia. De acuerdo a esta investigación, durante los estadios tardíos de la atresia el flujo sanguíneo puede encontrarse profundamente comprometido. En las aves, el rompimiento de los vasos sanguíneos de la teca y la infiltración sanguínea preceden a cualquier cambio histológico demostrable en las células de la granulosa de folículos atrésicos (Gilbert et al., 1985). Hubbard y Greenwald (1985) y Greenwald (1989), también han mostrado que la atresia es acompañada por una severa reducción de la vascularidad folicular, fenómeno que parece preceder al colapso total de la capa granulosa. Por lo tanto se puede

considerar que uno de los eventos tempranos que ocurren cuando un folículo queda comprometido para seguir el camino de la atresia, puede ser la ruptura vascular temprana (Gilbert et al., 1985, y Hirshfiel 1991) acompañada de hipoxia folicular, particularmente de la ineficiente difusión de oxígeno y otros componentes sanguíneos hacia las células de la granulosa más alejadas de la pared del folículo (Hirshfield 1991; Murdoch, 1992). Estos factores serán tanto más importantes cuanto mayor sea el número de capas de células de la granulosa en los folículos grandes, o preovulatorios. Es pues posible proponer que la isquemia folicular tiene consecuencias más profundas en los folículos grandes que en los folículos pequeños. Esta hipótesis se sustenta porque en nuestros resultados las células apoptóticas (Anexina V+ / IP-) predominan sobre las necróticas en los folículos pequeños, mientras que en los folículos > 6 mm, las células necróticas (IP+) tienden a predominar sobre las apoptóticas. Esto también está sustentado por la diferencia significativa encontrada entre los folículos pequeños (3-6 mm) y grandes (>6mm), con relación al comportamiento de las actividades de enzimas lisosomales libres, tanto en el líquido folicular como en el compartimento citoplásmico de las células de la granulosa.

Este estudio presenta evidencias de la presencia simultánea de células necróticas y apoptóticas en poblaciones de células de la granulosa obtenidas de todos los estadios de maduración y grados de atresia, incluyendo los folículos que pueden ser considerados como no atrésicos por su valoración histológica y por la concentración de estrógenos en su líquido folicular. La presencia de células de la granulosa apoptóticas en folículos clasificados como sanos ha sido establecido previamente (Guthrie et al., 1995; Jolly et al 1994; Blondin et al 1996; Jolly et al 1997). En este trabajo la presencia de apoptosis en folículos sanos está indicada por un importante número de células de la granulosa que son Anexina(+), muestran concentraciones de DNA hipodiploide y tienen un patrón electroforético característico de rompimiento internucleosomal.

Blondin et al (1996), de acuerdo a la determinación histológica de picnosis y a la presencia de mitosis en las células de la granulosa, ha descrito la evolución de la atresia folicular en tres fases:

Folículos no atrésicos (<5% de núcleos picnóticos, >10% de mitosis),

Folículos inicialmente atrésicos (>5 y <15% de núcleos picnóticos, <10 y <5 % de mitosis), y

Folículos atrésicos (>15% de núcleos picnóticos, prácticamente ausencia de mitosis).

Estas mismas clases pero determinadas en este estudio por citometría de flujo, fueron aproximadamente <10%, 10-30% y > 30% de células en la región A_0 . Guthrie et al (1994), clasificaron folículos porcinos como bioquímicamente sanos o atrésicos usando la presencia de 10% de células en la región A_0 como punto de referencia. Nuestros datos concuerdan con estos resultados. El punto de corte entre folículos sanos y el comienzo de la atresia en nuestro estudio fue 9.2 ± 2.8 % de células que muestran unión a Anexina V y 7.0 ± 1.9 % de células con DNA hipodiploide característico de las células apoptóticas. La necrosis, aunque menos importante que la apoptosis, también está presente en los folículos sanos del grupo 1 como lo evidencia la presencia de células de la granulosa IP(+) y la presencia de actividad de enzimas lisosomales en compartimentos extra lisosomales de las células de la granulosa y en el líquido folicular. Nosotros sugerimos que la presencia de células muertas en todos los estadios de la maduración folicular indica que la población de células de la granulosa, durante el crecimiento y la maduración folicular están en continuo recambio, descartándose las células viejas por necrosis, pero fundamentalmente por apoptosis. Las perturbaciones en las modificaciones fisiológicas de este delicado equilibrio entre la muerte y la proliferación de las células de la granulosa pueden llevar al folículo a la atresia. Esta posibilidad es reforzada por los resultados de Murdoch (1992) que mostró que la picnosis de las células de la granulosa se incrementó significativamente en folículos pre-ovulatorios entre 12 y 24

hr después de la aplicación de LHRH sin diferencias significativas por la clasificación de atresia o no atresia del folículo.

Nuestros resultados también muestran que el progreso de la atresia comprende el aumento en el porcentaje tanto de necrosis como de apoptosis de las células de la granulosa. Estos resultados pueden sostener la hipótesis de que, como se ha establecido en algunos otros sistemas, la muerte de las células de la granulosa durante la atresia es iniciada por un mecanismo común que depende de la alteración del potencial transmembranal mitocondrial (Columbano, 1995; Zanzami et al, 1997; Lemasters et al 1998; Renvoizé et al 1998). En los folículos pequeños, donde la disminución del flujo sanguíneo es insuficiente para producir hipoxia en las células de la granulosa (Murdoch 1992), puede progresar la atresia básicamente a través de la apoptosis (Richter et al., 1996; Leist et al., 1997; Tsujimoto et al., 1997). La disminución en el flujo sanguíneo en los folículos grandes puede ser suficiente para comprometer la producción de ATP, produciendo la necrosis de las células de la granulosa como un importante y, en algunos casos, como la más importante vía de muerte celular (Leist et al 1997; Tsujimoto et al., 1997). También es importante hacer notar que la iniciación del proceso de atresia en los folículos pequeños y grandes está acompañada no sólo por la liberación de actividades enzimáticas lisosomales al compartimento citoplásmico de la célula, sino también por un incremento en la cantidad de actividad enzimática fija a la membrana celular en ambas enzimas estudiadas. Este hecho, no solamente indica la liberación o la activación de las enzimas, sino también un aumento significativo en la síntesis de enzimas lisosomales con actividad hidrolítica que puede ser necesaria durante la iniciación de la muerte celular.

Los lisosomas han sido involucrados en algunas funciones importantes relacionadas con la fisiología ovárica, incluyendo la regulación hormonal (Dougherty et al., 1982; Kornfeld, 1987), particularmente durante la maduración folicular (Ballesteros et al., 1992; Murdoch, 1992), y la atresia (Narimoto et al 1985; Wise,

1987; Woessner et al., 1989; D'Herde et al., 1996). Nuestros resultados indican que la apoptosis de las células de la granulosa puede ser otro de los procesos en el cual la participación de las enzimas lisosomales pueden ser importante. La apoptosis ha sido caracterizada como un proceso que depende de numerosas enzimas catabólicas, generalmente hidrolasas (Zanzami et al., 1997). La membrana mitocondrial, la nuclear, así como la laminina y otros complejos intracelulares sufren degradación proteolítica seguida por la fragmentación del DNA producida por nucleasas específicas (Darzynkiewicz et al, 1997). Algunas de las proteasas apoptogénicas (Liu et al 1996; Anjum y Khar, 1997) involucradas en este proceso pueden ser de origen lisosomal como ha sido demostrado en el caso de la aspartil-endopeptidasa o catepsina D (Dhanasekaran and Moudgal, 1989).

Desde este punto de vista resulta interesante correlacionar estos resultados con aquellos previamente publicados en relación a los cambios en la actividad proteolítica en el líquido folicular durante el desarrollo del folículo y la atresia (Rosales et al 1990). En la cerda (Hamabata et al 1994; Besnard et al 1996) ocurre un dramático incremento en la actividad proteolítica en el líquido folicular durante el crecimiento folicular. También se ha descrito un aumento en la actividad proteolítica, junto con un incremento en la proteína 3 unidora del factor de crecimiento insulinoide, en el líquido folicular de la oveja durante la atresia (Besnard et al, 1997). Los estudios de Liu et al (1993) en la rata y de Chandrasekher et al., (1995) en el humano, indican que estas proteasas pueden ser derivadas de las células de la granulosa pudiendo ser la expresión de daño en la membrana de estas células. Sin embargo una disminución significativa en esta clase de actividad ha sido reportado en el líquido folicular durante el desarrollo de la atresia en los folículos de la cerda (Besnard et al 1997). Estos resultados contradictorios indican que algunos procesos bioquímicos que participan en el crecimiento y la atresia folicular son seguramente especie-específicos.

6.- CONCLUSIONES

Las evidencias de los últimos años han permitido concluir que la diferenciación entre apoptosis y necrosis en sistemas *in vivo* no es tan simple como se pensó hace algunos años. La amplia gama de estudios altamente selectivos en sistemas *in vitro* ha permitido ampliar los conocimientos sobre los procesos que se siguen en ambos tipos de muerte, sin embargo, en algunos mecanismos como es el caso de la atresia folicular se han extrapolado algunos eventos que han ocasionado una generalización inconveniente, debido a que los procesos bajo condiciones patológicas o fisiológicas que se observan en la vida animal, son mucho más complejos.

Nuestros resultados, así como los de otros investigadores en diferentes especies animales presentan fuertes evidencias de la muerte celular por apoptosis en las células de la granulosa durante la atresia folicular en la oveja, sin embargo, los resultados de este trabajo demuestran que la necrosis también tiene un importante desempeño en la evolución de este proceso, y que ha sido injustamente negado por otros autores. La necrosis tiene una particular importancia en la atresia de los folículos grandes preovulatorios. Nosotros podemos proponer que la activación específica de enzimas lisosomales hidrolíticas, particularmente algunas proteasas (catepsina D), pueden estar involucradas en la degradación de estructuras intracelulares que acompañan a las fases iniciales de la apoptosis. Este es un aspecto de la hipótesis sobre el origen común de la muerte celular que debería merecer una importante atención. Finalmente la presencia de células muertas en todos los estadios de la maduración folicular indica que el crecimiento y la maduración de los folículos ováricos requieren una renovación continua de las células de la granulosa, reguladas por la apoptosis. Los mecanismos que regulen este equilibrio pueden participar en el destino final entre la ovulación y la atresia de los folículos ováricos.

7.- BIBLIOGRAFIA

Afanas'ev V.N., Karol B.A., Mantsygin Y.A., Nelipovich P.A., Pechatnikov V.A. and Umansky S.R. (1986) Flow cytometry and biochemical analysis of DNA degradation characteristic of two types of cell death. *FEBS Lett* 194:347-350.

Alvarez-Bylla A. and Merchant-Larios H. (1986) Mouse primordial germ cells use fibrinectin as a substrate for migration. *Exp. Cell. Res.* 165:362-368.

Amsterdam A., Dantes A., Husokawa K., Schere-Levy C.P., Kotsuji F. and Aharoni D. (1998) Steroid regulation during apoptosis of ovarian follicular cells. *Steroids* 63:314-318.

Anjum R. and Khar A. (1997) Caspase-mediated apoptosis in AK-5 tumor cells: A cell-free study using peptide inhibitors and antisense strategy. *Exp. Cell Res.* 236:371-377.

Ankarcrona M. J.M., Dypbukt E., Bonfoco B., Zhivotovsky S., Orrenius S.A. and Nicotera P. (1995) Glutamate induced neuronal death: a succession of necrosis or apoptosis depending on mitochondrial function. *Neuron*. 15:961-973.

Arends M.J., Morris R.G. and Wyllie A.H. (1990) Apoptosis: the role of the endonuclease. *Am. F. Pathol.* 136:593-608.

Atkins F.L., Dowell R.T. and Love S. (1985) Beta-Adrenergic receptors. Adenylate-cyclase activity and cardiac dysfunction in diabetic rat. *J. Cardio Ph.* 7(1):66-70.

Azzolin G.C. and Saiduddin S. (1983) Effect of androgens on the ovarian morphology of the hypopysectomized rat. *Proc. Soc. Exp. Biol. Med.* 172:70-73.

Bagavandoss P., Midgley Jr. A.R. and Wicha M. (1983) Developmental changes in the ovarian follicular basal lamina detected by immunofluorescence and electron microscopy. *J. Histo. Cytoc.* 31:633-640.

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

Beaumont H.M. and Mandal A.M. (1962) A quantitative and cytological study of oogonia and oocytes in the foetal and neonatal rat. *Proc R Soc Lond (Biol)* 155: 557-579.

Bendell J.J. and Dorrington J. (1991) Estradiol 17- β stimulates DNA- synthesis in rat granulosa- cells-action mediated by transforming growth factor-beta. *Endocrinol.* 128:2663-2665.

Ben-Rafael Z., Varello A.M., Meloni F., Fateh M., Mastroiani L. and Flicknger G. L. (1987) Flow cytometric analysis of DNA in human granulosa cells from in vitro fertilization cycles: relationships to oocyte maturity and fertilizability and to follicular fluid atroids. *J. Clin Endocr. Metab.* 65:602-605.

Besnard N., Pisselet C., Monniaux D. and Monget P. (1997) Proteolytic activity is involved in changes in intrafollicular insulin like growth factors binding protein-2, -3, -4 and 5 healthy growing and atretic follicles in the pig ovary. *Biol. Reprod.* 56:1050-1058.

Besnard N., Pisselet C., Zapf J., Hornebeck W., Monniaux D. and Monget P. (1996) Protelytic activity is involved in changes in intrafollicular insulin like growth factors binding proteins level during growth and atresia of ovine ovarian follicles. *Endocrinol.* 137:1599-1607.

Billig H., Furuta I. and Hseuehh A.J. (1993) Estrogens inhibit and androgens enhance ovarian granulosa cell apoptosis. *Endocrinol.* 133(5):2204-2212.

Blondin P., Duufour M. and Sirard M.A. (1996) Analysis of atresia in bovine follicles using different methods: flow cytometry, enzyme-linked immunosorbent assay and classical histology. *Biol Reprod.* 54:631-637.

Bonfoco E., Krainc D., Ankarcona M., Nicotera P. and Lipton S.A. (1995) Apoptosis and Necrosis: two distinct events induced respectively by mild and intense insults with NMDA or nitric oxide/superoxide in cortical cell cultures. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* 92:7162-7166.

Borgers M., Shu L.G., Xhonneux R., Thonlrquote E.F. and Van Overloop P. (1987) Changes in ultrastructure and Ca² distribution in the isolated working rabbit heart after ischemia: a time-related study. *Am. J. Pathol.* 126:92-102.

Bortner C.D. and Cidlowski J.A. (1996) Absence of volumen regulatory mechanisms contributes to the rapid activation of apoptosis in thymocytes. *Am. J. Physiol. Cell Physiol.* 40:950-961.

Brailly S., Gougeon A., Milgram E., Bomsei-Helmreich O. and Papiernik E. (1981) Androgens and progestins in the human ovarian follicles: differences in the evolution of preovulatory, heathy nonovulatory and atretic follicles. *J. Clin. Endocrinol. Met.* 53:128-133.

Braw R.H. and Tsafiri A. (1980) Effect of PMSG on follicular atresia in the rat ovary. *J. Reprod. Fertil.* 59:267-272.

Bruce N.W. and Moor R.M. (1976) Capillary blood flow to ovarian follicles, stroma and corpora lutea-anaesthetized sheep. *J. Reprod. Fertil.* 46:299-304.

Brunk U.T, Zhang H., Dalen, H. and Ollinger, K. (1995) Exposure of cells to nonlethal concentrations of hydrogen peroxide induces degeneration-repair mechanisms involving lysosomal destabilization. *Free Radical Biol. Med.* 19:813-822.

Brunk W.T., Jones C.B., and Sohal, R. S. (1992) A novel hypothesis of liposcinogenes and cellular aging bases on interactions between oxidative stress and autophagocytosis. *Mutt. Res.* 275:395-403.

Buckley I.K. (1972) A light and electron microscopic study of thermally injured cultured cells. *Lab. Invest.* 26:201-209.

Bukovsky A., Presl J. and Zidovsky J. (1979) Migration of lymphoid cells into the granulosa of rat ovarian follicles. *IRCS Med. Sci.* 7:603-604.

Bukovsky A., Presl J. and Holub (1984) The ovarian follicles as a model for the cell-mediated control of tissue growth. *Cell Tissue Res.* 236:717-724.

Byskov A.G. (1974) Cell kinetic studies of follicular atresia in the mouse ovary. *J. Reprod. Fertil.* 37:277-285.

Byskov A.G. (1979) Regulation of meiosis in mammals. *Ann. Biol. Anim Biochem Byoph.* 19:1251-1261.

Carson R.S., Findlay J.K., Burger H.G., Trounson A.O. (1979) Gonadotropin receptors of the ovine ovarian follicle during follicular growth and atresia. *Biol Reprod.* 21:75-87.

Centola G.M. (1982) Light microscopic observations of alterations in staining of the zona pellucida of porcine follicular oocytes: possible early indications of atresia. *Gam. Res.* 6:293-304.

Columbano A. (1995) Cell death: Current difficulties in discriminating apoptosis from necrosis in the context of pathological processes in vivo. *J Cellul. Bioc.* 58:181-190.

Collins R.J., Harmon, B.V., Gobe, G.C. and Kerr, J.F. (1992) Internucleosomal DNA cleavage should not be the sole criterion for identifying apoptosis. *Int. J. Radiat. Biol.* 61:451-453

Chandrasekher Y.A., Clark C.R., Faessen G.H. and Giudice L.C. (1995) Role of insuline-like growthfactor bindingprotein 4 (IGFBP 4) and IGFBP 4 protease in human granulosa cell function. In: Program of the 77th annual meeting of The Endocrine Society: Annaheim, Ca. Abstract 102.

Chien K.R., Abrams J., Serroni A., Martin J.T. and Farber J.L. (1978) Acelerated phospholipid degradation and associated membrane dysfunction in irreversible, ischemic liver cell injury. *J. Biol. Chem.* 1253:4809-4817.

D'Herde K., De Prest B. and Roels F. (1996) Subtypes of active cell death in the granulosa of ovarian atretic follicles in the quail (*Coturnix coturnix japonica*). *Reprod. Nutr. Dev.* 36:175-189.

Darzynkiewicz Z., Juan G., Xun Li, Gorczyca W., Murakami T, and Traganos F. (1997) Cytometry in cell Neurobiology: Analysis of apoptosis and accidental cell death (Necrosis). *Cytomet.* 27:1-20.

Darzynkiewicz Z. and Traganos F. (1990) Multiparameter flow cytometry in studies of the cell cycle. In *Flow cytometry and sorting 2nd*. Ed. Melamed M.R. Lindmon T and Mendelsonin ML New York pp. 469-501.

Daud A.I., Bumpus F.M. and Husain A. (1989) Evidence for selective expression of angiotensin II receptors on atretic follicles in the rat ovary: an autoradiographic study. *Endocrinol.* 122:2727-2734.

Duve C. and Wattiaux R. (1966) Functions of lysosomes. *An. Rev. Physiol.* 28:435-592.

De Felici M. and Dolci S. (1993) Proliferation of mouse primordial germ cells in vitro: a key role for cAMP. *Dev. Biol.* 157:277-280.

Dhanasekaran N. And Moudgal N. R. (1989) Studies on follicle atresia: role of gonadotropins and gonadal steroids in regulating cathepsin D activity of preovulatory follicles in the rat. *Endocrinology* 63:133-142.

Dive C., Gregory C.D., Philipps D.J., Evans D.L., Milner A.E. and Wyllie A. H. (1992) Analysis and discrimination of necrosis and apoptosis (programed cell death) by multiparameter flow cytometry. *Biochim. Bioph. Act.* 1133:275-285.

Donovan P.J., Stott D., Cairns L.A., Heasmam J. and Wyllie C.C. (1986) Migratory and postmigratory mouse primordial germ cells behave differently in culture. *Cell* 44: 831-838.

Dougherty J.J., Puri R.K. and Toft D.O. (1982) Phosphorylation in vivo of chicken oviduct progesterone receptors. *J. Biol. Chem.* 257:14226-14235.

Duan, H.J., Chinnaiya, A.M., Hudson, P.L., Wing, J.P., He, W.W., and Dixit, V.M. (1996) ICE-LAP3 a novel mammalian homologue of the *Caenorhabditis elegans* Cell death protein Ced-3 is activated during FAS-and tumor necrosis Factor-induced apoptosis. *J. Biol. Chem.* 271:1621-1625.

Dyrbukt J.M., M. Ankarcrona, M. Burkitt, A. Sjöholm, K. Ström, S. Orrenius, and Nicotera P. (1994) Different prooxidant levels stimulate growth, trigger apoptosis or produce necrosis of insulin-secreting RINm5F cells. The role of intra cellular polyamines. *J. Biol. Chem.* 269:30533-30560.

Dyson J.E.D., Simmons D.M., Daniel J., McLaughlin J.M., Quirke P. and Bird C.C. (1996) *Cell. Tissue Kinet.* 19:311-324.

Ellis R.E., Yuan J. and Horvitz H.R. (1991) Mechanisms functions and functions of cell death. *Annu Rev. Cell Biol.* 7:663-698.

Emoto K., Toyamasorimachi N., Karasuyama J.L., Inone K. and Umeda M. (1997) Exposure of phosphatidyl ethanolamine on the surface of apoptotic cells. *Exp. Cells Res.* 232:430-434.

Erickson G.F. (1986) An analysis of development and ovum maturation. *Semin Reprod Endocrinol.* 4:233-240.

Erickson G.F., Magoffin D.A., Dyer C.A. and Hofeditz C. (1985) The ovarian androgen producing cells: a review of structure/function relationships. *Endocr. Rev.* 6:371-399.

Erickson J.L.E. (1969) Mechanism of cellular autophagy. In *lysosomes in Biology and Pathology* (Edited by DINGLE, J.T.) Vol.2, pp345-387. Amsterdam: The North-Holland Publishing Co.

Fernández P.A., Rotello R.J., Rangini Z., Doupe A., Drexler H.C.A. and Yuan J. (1994) Expression of a specific marker of avian programmed cell death in both apoptosis and necrosis. *Proc. Natl. Acad. Sci. (USA).* 91:8641-8645.

Fadok V.A., Dennis R.V., Pricilla A.C., John C., Donna L.B. and Peter M.H. (1992) Exposure of phosphatidylserine on the surface of apoptotic lymphocytes triggers specific recognition and removal by macrophages. *The journal of Immunol.* 148:2207-2216.

Fournel S., Genestier L., Roualt J.P., Lizard G., Flacher M., Assossou O. and Revillar J.P. (1995) Apoptosis without decrease of cell DNA content. *FEBS letter* 367:188-192.

Fraser M.J., Tynan S.J., Papaioannou A., Irelan C.M. and Pittman S. M. (1996) Endo-exonuclease of human leukaemic cells:evidence for a role in apoptosis. *J. Cell. Sci.* 109:2343-2360.

García R., Ballesteros L.M., Hernandez-Perez O., Rosales A.M., Espinosa R., Soto H., Diaz de Leon L. and Rosado A. (1997) Metalloproteinase activity during growth, maturation and atresia in the ovarian follicles of the goat. *Anim. Reprod. Sci.* 47:211-228.

Gaytan F., Morales C., Bellido C., Aguilar E. and Sánchez-Criado J.E. (1998) Ovarian follicle macrophages: is follicular atresia in the immature rat a macrophage mediated event. *Biol. Reprod.* 58:52-59.

Gerschenson L.E. and Rotello R. J. (1992) Apoptosis a different type of cell death. *FASEB J.* 6:2450-2455.

Gilbert A.B., Perry M.E., Walker M.A. and Waddington D. (1985) Identification of atresia in small ovarian follicles of the domestic hen (*Gallus domesticus*). *IRCS Med. Sci.* 13:723-733.

Godin and Wylie C.C. (1991) TGF- β inhibits proliferation and has a chemotropic effect on mouse primordial germ cells in culture. *Develop.* 113: 1451-1457.

Gondos B. (1982) Ultrastructure of follicular atresia in the rat. *Gam. Res.* 5:199-206.

Gong J., Traganos F. and Darzynkiewicz Z. (1994) A selective procedure for DNA extraction from apoptotic cells applicable to gel electrophoresis and flow cytometry. *Ann. Bioch.* 218:314-319.

Gosden R.G. and Telfer E. (1987) Numbers of follicles and oocytes in mammalian ovaries and their allometric relationships. *J. Zool (Lond).*

Gougeon A. (1986) Dynamics of follicular growth in the human: a model from preliminary results. *Hum. Reprod.* 1: 81-87.

Greenwald G.S. (1989) Temporal and topographic changes in DNA synthesis after induced follicular atresia. *Biol. Reprod.* 41: 175-181.

Greenwald G.S. and Roy S.K. (1994) Follicular development and its control. In Knobil E. and Neill J. *The Physiology of Reproduction*. New York Raven Press, pp 629-724.

Gregory J.D. and Serperse E.H. (1991) Kinetic binding and resonance studies of yeast phosphoglycerate kinase (PGK). *FASEB J.* 5:1149.

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

Guthrie H.I., Grimes R.W., Cooper B.S. and Hammond J.M. (1995) Follicular Atresia in pigs: measurement and physiology. *J. Anim. Sci* 73:2834-2844.

Guthrie H.I., Welch G.R., Couper B.S., Zacaria A.D. and Johnson L.A. (1994) Flow cytometric determination of degraded desoxiribonucleic acid in granulosa cells to identify atretic follicles during preovulatory maturation in the pig. *Biol. Reprod.* 50:1303-1311.

Hamabata T., Okimura H., Yokoyama N., Takahashi T. and Takahashi K. (1994) Purification, characterization and localization of follipain, a novel serine proteinase from the fluid of porcine ovarian follicles. *J. Biol. Chem.* 269:17899-17904.

Hara S.S., Halicka H.D., Bruno S., Gong J. P., Traganos F. and Darzynkiewicz Z. (1996) Effect of protease inhibitors on early events of apoptosis. *Exp. Cell. Res.* 223:372-384.

Hawkins H.K., Ericsson J.L.E., Biberfeld P. and Trump B.F. (1972) Lysosome and phagosome stability in lethal cell injury: morphologic tracer studies in cell injury due to inhibition of energy metabolism, immune cytolysis, and photosensitization. *Am. J. Pathol.* 68: 255-288.

Hay M.F., Cran D.G. and Moor R.M. (1976) Structural changes occurring during atresia in sheep ovarian follicles. *Cell Tiss. Res.* 169: 515-529.

Hellquist H. B., Svensson I. and Brunk U. T. (1997) Oxidant-induced apoptosis: a consequence of lethal lysosomal leak?. *Redox Report.* 3:65-70.

Henderson K.M., Kieboom L.E., McNatty K.P., Lu S. and Heath D.A. (1984) [125I]hCG binding to bovine thecal tissue from healthy and atretic follicles. *Mol. Cell Endocrinol.* 34:91-98.

Henkar P.A. (1996) Ice family protease mediators of all apoptotic cell death. *Immunit.* 4:195-201.

Hirshfiel A.N. (1991) Development follicles en the mammalian ovary. *Int. Rev. Cytol.* 124:43-101.

Hirshfiel A.N. and Midgley A.R. (1978) Morphometric analysis of follicular development in the rat. *Biol. Reprod.* 19:606-611.

- Hockenbery D.M., Oltvai Z.N., Yin X.M., Milliman C.L. and Korsmeyer S.J. (1993) Bcl-2 Functions in an antioxidant pathway to prevent apoptosis. *Cell* 75:241-251.
- Hodgen G.D. (1989) Neuroendocrinology of the normal menstrual cycle. *J. Reprod. Med.*, 34(1):68-75.
- Hsueh G.D. (1986) Paracrine mechanisms involved in granulosa-cell differentiation. *Clin. End. Me.* 15(1):117-134.
- Hsueh A.J., Adashi E.Y., Jones P.B. and Welsh T.H. Jr. (1984) Hormonal regulation of the differentiation of cultured ovarian granulosa cells. *Endocrin. Rev.* 5:76-127.
- Hsueh A.J.W., Billig H., and Tsafri A. (1994) Ovarian follicle atresia: a hormonally controlled apoptotic process. *Endocrine Rev.* 15: 707-724.
- Hsueh A.J.W., Eisenhauer K., Chun Y.S., Hsu S.Y. and Billig H. (1996) Gonadal cell apoptosis. *Rec. Prog Horm Res.* 51:433-491.
- Hubbard C.J. and Greenwald G.S. (1985) Morphological changes in atretic Graafian follicles during induced atresia in the hamster. *Anat. Rec.* 212:353-357.
- Hughes F. M. and Cidlowski J. A. (1997) Utilization of an in-vitro assay to evaluate chromatin degradation by candidate apoptotic nuclease. *Cell Death Differ.* 4: 200-208.
- Hughes F.M. and Gorospe W.C. (1991) Biochemical identification of apoptosis (programmed cell death) in granulosa cells: evidence for a potential mechanism underlying follicular atresia. *Endocrinol.* 129:2415-2422.
- Hurwitz A. and Adashi E. (1992) Ovarian follicular atresia as an apoptotic process: a paradigm for programmed cell death in endocrine tissue. *Molecular and Cell Endocrinol.* 84:19-23.
- Huschtscha L.I., Jeitner T.M., Andersson C.E., Bartier W.A. and Tattersall M.H. (1994) Identification of apoptotic and necrotic human leukemic cells by flow cytometry. *Exp. Cell Res.* 212:161-165.
- Ingram D.L. (1962) Zuckerman, S., Mandl, A.M., Eckstein, P, eds. *The ovary*, New York; Academic Press, vol I pp. 247-273.
- Ink B., Zornig M., Baum B., Hajibagheri N., James C., Chittenden T. and Evan G. (1997) Human Bak induces cell death in *Schizosaccharomyces pombe* with morphological changes similar to those with apoptosis in mammalian cells. *Mol. Cell. Biol.* 17:2468-2474.

Jacobson M.D., Burne J.F. and Raff M.C. (1994) Programmed cell death and Bcl-2 protection in the absence of a nucleus. *EMBO J.* 13:1899-1910.

Jennings R.B. and Reimer K.A. (1981) Lethal myocardial ischemic injury. *Am J Pathol.* 102:241-255.

Jolly P.D., Smith P.R., Heath D.A., Hudson N.L., Lun S., Still I.a., Watts C. H. and MaNatty K.P. (1997) Morphological evidence of apoptosis and the prevalence of apoptotic versus mitotic cells in the membrane granulosa of ovarian follicles during spontaneous and induced atresia. *Biol Reprod.* 56:837-846.

Jolly P.D., Tisdall D.J., Heath D.A., Lun S. and MaNatty K.P. (1994) Apoptosis in bovine granulosa cells in relation to steroid synthesis, cyclic adenosine 3, 5-monophosphate response to follicle-stimulating hormone and luteinizing hormone, and follicular atresia. *Biol. Reprod.* 56:837-846.

Jones E.C. (1956) Ovarian follicle atresia: a hormonally controlled apoptotic process. *Endocrin. Rev.* 15:707-724.1994.

Kane A.B., Stanton R.P., Raymond E.G., Dobson M.E., Knafelc M.E. and Faber J.L. (1980) Dissociation of intracellular lysosomal rupture from cell death caused by silica. *J. Cell Biol.* 87:643-651.

Kane D.J., Sarafin T.A., Anton R., Hahn H., Gralla, E.B., Valentine, J.S., Ord T. and Bredesen D.E. (1993) Bcl-2 inhibition of neural death decrease generation of reactive oxygen species. *Sci.* 262:1274-1277.

Kass G.E.N., Eriksson J. E., Weis M., Orrenius S. and Chow S.C. (1996) Chromatin condensation during apoptosis requires ATP. *Bioch. J.* 318:749-752.

Kawabata H., Anzi N., Masutani H., Himara T., Dodo M., Masuda T., Yoshida Y. and Okuma M. (1997) Mg^{2+} or Mn^{2+} dependent endonuclease activities of human myeloid leukemia cell capable of producing nucleosomal-size DNA fragmentation

Kaynard A.H., Periman L.M., Simard J. and Melner M.H. (1992) Ovarian 3 β -hydroxysteroid dehydrogenase and sulfated glycoprotein-2 gene expression are differentially regulated by the induction of ovulation, pseudopregnancy, and luteolysis in the immature rat. *Endocrinol.* 130:2192-2200.

Kerr J.F., Searle J., Harmon B.M. and Bishop C.J. (1987) In: perspectives on mammalian cell death (Bowen, C.S., Ed.), pp:93-127. Oxford Univ. Press. New York.

Kerr J.F., Wyllie A.H. and Currie A.R. (1972) Apoptosis: a basic biological phenomenon with wide-ranging implications in tissue kinetics. *Br J. Cancer.* 26:239-257.

Koering M.J., Goodman A.L., Williams R.F. and Hodgen G.D. (1982) Granulosa cell pyknosis in the dominant follicle of monkeys. *Fertil. Steril.* 37: 837-844.

Kornfeld S. (1987) Trafficking of lysosomal enzymes. *FASEB J.* 1:462-468.

Kovacs J., Forgo V. and Peczely P. (1992) The fine structure of the follicular cells in growing and atretic ovarian follicles of the domestic goose. *Cell Tiss. Res.* 267:561-569.

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

Kroemer G., Petit P.X., Zanzami N., Vayssiere J.L. and Mignotte B. (1995) The biochemistry of programmed cell death. *FASEB J.* 9: 1277-1287.

Kroemer G., Zamami N. and Sisin S.A. (1997) Mitochondrial control of apoptosis. *Immunol. Today*, 18:44-51.

Kumar, S., and Lavin, M. F. (1996) *Cell Death Differ.* 3:255-267.

Kyprianou N. and Isaac J.T. (1988) Activation of programmed cell death in the rat ventral prostate after castration. *Endocrinol.* 122: 552-562.

Lazebnik Y.A., Kaufmann S.H., Desmoyers S., Poirier G. and Earnshaw W.C. (1994) Cleavage of poly (adp-ribose) polymerase by a proteinase with properties like ICE. *Nature (Lond.)*, 371:346-347

Leist M., Gantner F., Bohlinger I., Tiegs G., Germann P.G. and Wendel A. (1995) Tumor necrosis factor-induced hepatocyte apoptosis precedes liver failure in experimental murin shock models. *Am. J. Pathol.*, 146:1220-1234.

Leist M., Single B., Anna F., Castoldi, Simone Kühnle and Nicotera P. (1997) Intracellular Adenosine Triphosphate (ATP) Concentration: A Switch in the Decision Between Apoptosis and Necrosis. *J. Exp. Med.*, 185:1481-1486.

Lemasters J.J., Nieminen A.L., Qian T., Trost L.C. Elmore S.P. Nishimura Y., Crowe R.A. Cascio W.E. Bradham C.A., Brenner D.A. and Herman B. (1998) The mitochondrial permeability transition in cell death: a common mechanism in necrosis, apoptosis and autophagy. *Biochim. Biophys Acta*, 1366:177-196.

Liu C., Kim N., Yang J., Jemmerson R. and Wang X. (1996) Induction of apoptotic program in cell-free extracts: requirement for dATP and cytochrome c. *Cell*, 86:147-157.

Liu X.J., Malkowski M., Erickson G., Shimasaki S. and Ling N.C. (1993) Development of specific antibodies to rat insulin-like growth factor-binding proteins (IGFBP 2 to 6): Analysis of IGFBP production by rat granulosa cells. *Endocrinology*, 132:1176-1183.

Liu, X., Zou, H., Slaughter, C., and Wang, X., (1997) A heterodimeric protein that functions downstream of caspase -3 to trigger DNA fragmentation during apoptosis. *Cell*, 89:175-184.

Lobb D.K., Kobrin M.S., Kudlow J.E. and Dorrington JH. (1988) Transforming growth factor-alpha in the adult bovine ovary: identification in growing ovarian follicles. *Biol.Reprod.*, 40:1087-1093.

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

Lockshin R.A. and Williams C.M. (1991) Programed cell death and apoptosis: the molecular. *Basic of Cell Death* Ed. By LD Tomei and FO Cope. New York, Col Spring Harbor Lab Press, pp 47-60.

Lowry O.H., Rosebrough N.J., Fara A.L. and Randall R.J. (1951) Protein measurement with the folinphenol reagent. *J. Biol. Chem.*, 193:265-275.

Macho A., Hirseh T., Marzo I., Marchetti P., Dallporta B., Susin S.A., Zamzami N. And Kroemer G.(1997) Glutathione depletion is an early and calcium elevation is a late event of thymocyte apoptosis. *J. Immunol.*, 158:4612-4619.

Magnusson C., Bar Ami S., Braw R. and Tsafirri A. (1983) Oxygen consumption by rat oocytes and cumulus cells during induced atresia *J. Reprod Fertil.*, 68:97-103.

Majno G. and Joris I. (1995) Apoptosis, oncosis and necrosis. An overview of cell death. *Am J. Pathol.*, 146:3-16.

Martin S.J., Finuccane D.M., Amarantemendes G.P. Obrien G.A. and Green D.R. (1996) Phosphotildylserine externalization during CD 95-induced Apoptosis of cell and Cytoplasts requires ICE/CED-3 Proteasa activity. *J. Biol. Chem.*, 271:28753-28756.

Martin, S.J. and Green R. (1995) Protease activation during apoptosis: death by a thousand cuts? *Cell*, 82:349-352.

Martinou, J. C., Dubois-Dauphin-M. Staple, J. K., Rodriguez, I., Frankowski, H., Missotten M., Albertini P., Talabot D., Catsikas S., Pietra C. and Huarte J. (1994) *Neuron*, 13:1017-1030.

Maxson W.S., Haney A.F. and Schomberg D.W. (1985) Steroidogenesis in porcine atretic follicles: loss of aromatase activity in isolated granulosa and theca. *Biol. Reprod.*, 33:495-501.

McCarthy N.J., Whyte M.K., Gilbert C.S. and Evan G.L. (1997) Inhibition of Ced-3/ICE-related proteases does not prevent cell death induced by oncogenes, DNA damage, or the Bcl-2 homologue bak. *J. Cell Biol.*, 136:215-227.

Meinecke B., Meinecke-Tillmann S. and Gips H. (1982) Experimentelle untersuchungen zur steroidsekretion intakter and atretischer follikel in vitro. *Berl. Munch Tierarztl Wochenschr.*, 95:107-111.

Minn A.J., Boise L.H. and Thompson C.B. (1996) Bcl-Xs, antagonizes the protective effects of Bcl-XL. *J. Biol Chem.*, 271:6306-6312.

Montague J.W., Hughes F.M. and Cidlowski, J. A. (1997) Native recombinant Cyclophilins A, B and C degrade DNA independently of peptidylprolyl cis-trans Isomerase activity. *Biol. Chem.*, 272:6777-6684.

Moor R.M., Mary F.H., Dott H.M. and Cran D.J. (1978) Macroscopic identification and steroidogenic function of atretic follicles in sheep. *J. Endocrinol.* 77:309-318.

Mortimore G.E., Miotto G., Venerando R. and Kadowaki M. Autophagy. (1996) In subcellular biochemistry. Vol. 27, *Biology of the lysosome* LLOYD, J. B. (eds) London and New York, Plenum Press pp 93-135.

Motta P.M., and Familiari G. (1981) Occurrence of contractile tissue in the theca externa of atretic follicles in the mouse ovary. *Acta Anat.* 109: 103-114.

Murdoch W.J. (1992) Comparative morphology and steroidogenic function of antral ovine follicles destined for ovulation or atresia. *Dom. Anim. Endocrinol.* 9(3): 219-224.

Nakajima, H., P. Golstein, and P. A. Henkart. (1995) The target cell nucleus is not required for cell-mediated granzyme- or Fas-based cytotoxicity. *J. Exp. Med.* 181: 1905-1909.

Nakamura M., Yagi H., Kayaba S., Ishii T., Gotoh T., Ohtso S. and Itoh T. (1996) Death of germinal center B-cells without DNA fragmentation. *Eur. J. Immunol.* 26:1211-1216.

Nakatani A., Shimasaki S., Erickson G.F. and Ling N. (1992) Tissue-specific expression of four insulin-like growth factor-binding proteins (1, 2, 3 y 4) in the ovary. *Endocrinol.* 131:2350.

Narimoto K., Okamura H., Mori T., Sakai M., Espey L.L. and Ogawa K. (1985) Cytochemical localization of acid phosphatase in the rabbit ovarian follicle. *Acta Histochem Cytochem* 18:525-537.

Newmeyer D.D., Farschon D.M. and Reed J.C. (1994) Cell-free apoptosis in xenopus egg extracts. Inhibition by Bcl-2 and requirement for an organelle fraction enriched in mitochondria. *Cell* 79:353-364.

O' Shea J.D., Mary F. and Cran D.G. (1978) Ultrastructural changes in the theca interna during follicular atresia in sheep. *J. Reprod. Fert.* 54:183-187.

Ogasawara J., Watanabe-Fukunaga R., Adachi M., Matsuzawa A., Kasugai T., Kitamura Y., Itoh N., Suda T. and Nagata S. (1993) Lethal effect of the anti-Fas antibody in mice. *Nature* 364: 806-809.

Ojeda F., Guarda M.L., Maldonado C., Folch H. (1990) Protein kinase-C involvement in thymocyte apoptosis induced by hydrocortisone. *Cell Immunol.* 125:535-539.

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

Pandey S., Walker P.R. and Sikorsha M. (1997) Identification of a novel 97 Kda endonuclease capable of internucleosomal DNA cleavage. *Biochem.* 36:711-720.

Parker M.A., Scarlett J.L., Martin S.W. and Murph M.P. (1998) Induction of the mitochondrial permeability transition by peroxynitrite. *Biochem. Soc. Trans.* 25:909-914.

Pedersen T. And Peters H. (1968) Proposal for a classification of oocytes and follicles in the mouse ovary. *J. Reprod. Fertil.*, 17: 555-557.

Peluso J.J, Steger R.W. and Hafez E.S.E. (1977) Surface ultrastructural changes in granulosa cells of atretic follicles. *Biol. Reprod.*, 16:600-604.

Peluso J.J., Charlesworth J., England-Charlesworth C. (1981) Role of estrogen and androgen in maintaining the preovulatory follicle. *Cell Tissue Res.* 216:614-624.

Penninger J.M. and Kroemer G. (1998) Molecular and Cellular Mechanisms of T-Lymphocytes apoptosis *Rev. Adv. Immunol.* 68:51-144.

Peters H., Byskov A.G., Himelstein-Braw R. (1975) Follicular growth, the basic events in mouse and human ovary. *J. Reprod Fertil.* 45:559-566.

Petruss P. (1978) Gonadotrophin-target cell interactions: A model based on morphological localization. In *The gonadotropins; structure and function*. KW Mackerns Plenum Pub Co (eds) Nueva York pp:577-589

Quirk S.M., Cowan R.G., Joshi S.G. and Henrikson K.P. (1995) Fas antigen-mediated apoptosis in human granulosa/luteal cells. *Biol. Reprod.* 52: 279-287.

Renvoizé C., Biola A., Pallardy M. and Bréard J. (1998) Apoptosis: identification of dying cells. *Cell Biol. Toxicol.* 14:111-120.

Richter C., Schweizer M., Cossarizza A. and Franceschi C. (1996) Control of apoptosis by the cellular ATP level. *FEBS Lett.* 378:107-110.

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

Rosales-Torres A.M., Avalos R.A., Vergara O.M., Hernández-Peréz O., Ballesteros L.M., Gracia M.R., Ortiz N.V. and Rosado A. (1999) Atresia in ewe antral follicles a multiparametric study. Histology, flow cytometry, internucleosomal DNA fragmentation and lysosomal enzyme activities in granulosa cells and follicular fluid. *Mol. Reprod. Dev.* (en prensa).

Rosales A.M., Hernandez-Perez O., Dominguez R., Mercado E. y Rosado A. (1990) Proteolytic activities in goat antral follicles. *Anim. Reprod. Sci.* 23:213-222.

Rosales T.A.M. y Rosado A. (1989) Bioquímica de la maduración folicular en el mamífero. *Ciencia* 40:275-288.

Rotello R.J., Hockr M.B. and Gerschenson L.E. (1989) Biochemical evidence for programmed cell death in rabbit uterine epithelium. *Am. J. Pathol.*, 134:491-495.

Roy K.S. and Grewald G.S. (1990) Inmunohistochemical localization of epidermal growth factor-like activity in the hamster ovary with a polyclonal antibody. *Endocrinol.* 126:1309-1316.

Ruiz D.M.F. (1988) *Fundamentos de embriología y fisiología de la reproducción. Recopilación de textos básicos.* Editado por la UNAM. México DF.

Ryan R.J. and Lee C.Y. (1976) The role of membrane bound receptors. *Biol. Reprod.* 14:16-29.

Saidapur S.K. (1978). Follicular atresia in the ovaries of nonmammalian vertebrates. *Int. Rev.Cytol.* 54:225-244.

Sakaida K., Kyle M.E. and Barber J.L. (1990) Autophagic degradation of protein generates a pool of ferric iron acquired for the killing of cultured hepatocytes by oxidative stress. *Mol Pharmacol.* 37:435-442.

Savill J.S., Fadok V., Henson P. and Haslett C. (1993) Phagocyte recognition of cells undergoing apoptosis. *Immunol Today*, 14:131-136.

Schlegel R.A., Stevens M., Lumley-Sapansky K. and Williamson P. (1993) Altered lipid packing identifies apoptotic thymocytes. *Immunol. Lett.* 36:283-288.

Schulze-Osthoff K., Walezak H., Droge W. and Krammer P.H. (1994) Cell nucleus and DNA fragmentation are not required for apoptosis. *J. Cell. Biol.*, 127:15-20.

Schwall R.H., Robbins K., Jardieu P., Chang L., Lai C. and Terrel T.G. (1993) Activin induces cell death in hepatocytes in vivo and in vitro. *Hepatology*. 52: 385-388.

Schwartz and Osborne B.A. (1993) Programmed cell death, apoptosis and killer genes. *Immunol Today*, 14:582-590.

Shimizu S., Eguchi Y., Kamiike W., Itoh Y., Hasegawa K., Yamabe K., Otsuki Y., Matsuda H. and Tsujimoto Y. (1996) Induction of apoptosis as well as necrosis by hypoxia and predominant prevention of apoptosis by Bcl-2 and Bcl-xL. *Cancer Res.* 56:2161-2166.

Shimizu S., Narita M. and Tsujimoto Y. (1999) Bcl-2 family proteins regulate the release of apoptogenic cytochrome c by the mitochondrial channel VDAC. *Lett. to Nature*, 399:483-487.

Singer I.I., Scotts S., Chin J., Baney E.K., Limjuko G., Miller D.K. Chapman K and Kostura M.J. (1995) The interleukin 1- β -converting enzyme (ICE) is localized on the external cell surface membranes and the cytoplasmic ground substance of human monocytes by immuno-electron microscopy. *J. Exp. Med.*, 182: 1447-1459.

Slater A.F.G., Stefan C., Novel I., Vandendobbelsteen D.J. and Orrenius S. (1996) Signaling mechanisms and oxidative stress in apoptosis. *Toxicol. Lett.* 82:149-153.

Sokal R.R. and Rohlf F.J. (1969) *Biometry*. WH Freeman & Co (eds) San Francisco, USA. pp 299-342.

Surh C.D. and Sprent J. (1994) T-cell apoptosis detected in situ during positive and negative selection in the thymus. *Nature*, 372:100-103.

Susin S.A., Zamzami N., Castedo M., Hirsch T., Marchetti P., Macho A., Daugas E. and Geuskens, M., and Kroemer, G. J. (1996) Bcl-2 Inhibits the mitochondrial release of an apoptogenic protease. *Exp. Med.*, 184:1331-1342.

Tang X.J., Halleck M.S., Shelegel R.A. and Williamson P. (1996) A Subfamily of P-Type ATPases with Aminophospholipid transporting activity. *Sci.* 272:1495-1497.

Tapanainen J.S., Tilly J.L., Vihko K.K. and Hsueh A.J.W. (1993) Hormonal control of apoptotic cell death in the testis: gonadotropins and androgens as testicular cell survival factors. *Mol. Endocrinol.* 7:643-650.

Telford W.G., King L.E. and Fraker P.J. (1991) Evaluation glucorticocoid-induced DNA fragmentation in mouse thymocytes by flow cytometry. *Cell. Prolif.* 24:447-459.

Thompson C.B. (1995) Apoptosis in the pathogenesis and tratment of disease. *Sci.* 267:1456-1462.

Tilly J.L., Billig H., Kowalski K.I. and Hsueh A.J.W. (1992) Epidermal growth factor and basic fibroblast growth factor suppress the spontaneous onset of apoptosis in cultured rat granulosa cells and follicles by a tyrosine kinase-dependent mechanism. *Mol. Endocrinol.* 6:1942-1950.

Tilly J.L., Kowalski K.I., Johnson A.L. and Hsue A.J.W. (1991) Involvement of apoptosis in ovarian follicular atresia and postovulatory regression. *Endocrinol.* 129:2799-2801.

Tilly, J.L., Kowalski, K.I., Schomberg, D.W., Hsue, A.J.W. (1992) Apoptosis in atretic follicles is associated with selective decrease in Messenger Ribonucleic Acid transcripts for gonadotropin receptors and Cytochrome P450 Aromatase. *Endocrinol.* 131:1670-1676.

Torres-Roca J.F., Lecoœur H., Amatore C. and Gougeon M.L. (1995) Cell Death Differ. 2:309-319.

Traganos F. and Darzynkewicz Z. (1994) Lysosomal proton pump activity:Supravital staining with acridine orange differentiantes leukocytes subpopulation. *Meth. Cell Biol.* 41:185-195.

Trump B.F. and Bulger R.E. (1967) Studies of cellular injury in isolated flounder tubules. I. Correlation between morphology and function of control tubules and observations of autophagocytosis and mechanical cell damage. *Lab. Invest.* 16:453-482.

Trump B.F., Berezsky I.K. and Cowley RA. (1982) The cellular and subcellular characteristics of acute and chronic injury with emphasis on the role of calcium. In Cowley RA, Trump BF (eds) *Pathophysiology of Shock, Anoxia, and Ischemia.* Williams &Wilkins, Baltimore, MD, pp6-46.

Trump B.F., Berezesky I.K., Sato T., Laiho K.U., Phelps P.C. and De Claris N. (1984) Cell calcium, cell injury and cell death. *Environ Health Perspect.* 57:281-287.

Tsujimoto Y., Shimizu S., Eguchi Y., Kamiike W. and Matsuda H. (1997) Bcl-2 and Bcl-x-L block apoptosis as well as necrosis: possible involvement of common mediators in apoptotic and necrotic signal transduction pathways. *Leukemia*, 11 Suppl 3:380-2 Apr.

Vanags D.M., Pornares M.L., Coppola S., Burgess D.H. and Orrenius S. (1996) Protease involvement in fodrin cleavage and phosphatidylserine exposure in apoptosis. *J. Biol. Chem.* 271:31075-31085.

Vandendobberlsteen D.J., Novel C.S., Schlegel J., Cotgreave I.A., Orrenius S and Slater A.F.G. (1996) Rapid and specific efflux of reduced glutathione during apoptosis induced by anti-fas /APO-1 Antibody.

VanderHeiden M. G., Chandel N. S. Schumacker P. and Thompson C. B. (1999) *Mol. Cell.* 3:159-167.

Vaux-O.D., Aguila H. and Weissman Y. (1992) Bcl-2 prevents death of factor-deprived cell but fails to prevent apoptosis in targets of cell mediated killing. *Int. Immunol* 4:821-824.

Vayssiere O' J. L., Petit P. X., Risler Y. and Mignotte B. (1994) *Proc. Natl. Aca. Scie. USA* 91:11752-11756.

Vermes I., Haanen C., Steffens-Nakken H. and Reutelingsperger C. (1995) A novel assay for apoptosis flow cytometric detection of phosphatidylserine expression on early apoptotic cell using fluorescein labelled annexin V. *J. Immunolog.Meth.* 184:39-51.

Verthoven B., Schlegel R.A. and Williamson P. (1995) Mechanisms of phosphatidylserine exposure a phagocyte recognition signal, on apoptotic T Lymphocytes. *J. Exp. Med.* 182:1597-1601.

Wasarman P.M. and Albertin F.D. (1994) The mammalian ovum. In *Physiology of Reprod.* 2da Ed. Knobil E and Neill JD (eds.) Raven Press Ltd NY, pp 79-122.

Wattson A.R. (1991) Safety of Growth-Hormone. *LANCET*, 337:108.

White E. (1993) Death - defying acts: a meeting review on apoptosis. *Genes and development* 7:2277- 2284.

Wiensen J.F. and Midgley R.A. Jr. (1993) Changes in expression of connexin 43 gap junction messenger ribonucleic acid protein during ovarian follicular growth. *Endocrinol.* 133:741-746.

Wilson P.D. Firestone R.A. and Lenard J. (1987) The role of lysosomal enzymes in killing of mammalian cells by the lysosomotropic detergent N. dodecylimidazole. *J. Cell. Biol.* 104:1223-1229.

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

Woessner Jr. J.F., Morioka N., Zhu Ch., Mucaida T., Butler T. and LeMaire W.J. (1989) Connective tissue breakdown in ovulation. *Steroid*, 54: 491-499.

Wyllie A.H. (1981) Cell death: a new classification separating apoptosis from necrosis. In: Bowen ID, Lockshin R (eds) *Cell Death in Biology and Pathology*. Chapman and Hall, New York, pp 9-34.

Wyllie A.H. (1992) Apoptosis and the regulation of cell numbers in normal and neoplastic tissue. An overview. *Cancer Metast. Rev.* 11:95-103.

Wyllie A.H., Kerr F.K. and Currie A.R. (1980) Cell Death: the significance of apoptosis. *Int Rev. Cytol.* 68:251-306.

Xiang J., Chao D.T., and Korsmeyer, S. J. (1996) Cell-death may no require interleukina 1-beta converting enzyme like proteases. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.*, 93:14 559-14563.

Zamai I., Falcieri E., Marhefka G. and Vitale M. (1996) Supravital exposure to propidium iodide identifies apoptotic cells in the absence of internucleosomal DNA fragmentation. *Cytometry*, 23:303-311.

Zanzami N., Hirsch T., Dallaporta B., Petit P.X. and Kroemer G. (1997) Mitochondrial implications in accidental and programmed cell death: apoptosis and necrosis.

Zanzami N., Marchetti P., Castedo M., Decaudin D., Macho A., Hirsch T., Susin, S., Petit O.X. Mignotte B. and Kroemer, G. (1995) Sequential reduction of Mitochondrial Transmembrane potential and generation of reactive oxygen species in early programmed cell death. *J. Exp. Med.* 182:367-377.

Zanzami N., Susin S.A., Marchetti P., Hirsch T., Gómez-Monterrey L., Castedo M. and Kroemer G. (1996) Mitochondrial control of nuclear apoptosis. *J. Exp. Med.* 183:1533-1544.

Zdolesek J. M., Olsson M.G. and Brunk U.T. (1990) Prooxidative damage to lysosomes of cultured macrophages by acridine orange. *Phot. Phot.* 51:67-76.

Zeleznik A.J., Ihrig L. and Bassett S.G. (1989) Developmental expression of Ca^{2+} / Mg^{2+} dependent endonuclease activity in rat granulosa and luteal cells. *Endocrinol.* 125: 2218-2220.

Zhang H.C, Hoang T. Saeed B. and Ng S.C. (1996) Induction of apoptosis in prostatic tumore cell line Du145 by staurosporine a potent inhibitor of protein- kinase. *Prostate.* 29: 69-76.

Zhang H.C., Saced B. and Ng S.C. (1995) Combinatorial interaction of human Bcl-2/Bcl-xs interaction. *Biochem. Biophy. Res. Commun.* 208:950-956.

8.- DIFUSION DE RESULTADOS

Molecular Reproduction and Development

Incorporating Gamete Research

Editor-in-Chief

Ralph B.L. Gwatkin, Ph.D.
ReproGene
25460 Bryden Road
Beachwood, OH 44122, USA

Telephone (216) 765-8425

FAX (216) 765-0956

E-mail rbg@po.cwru.edu

Executive Editors

Bruce B. Brandhorst
Frank Constantini
Joseph Ilan
Akira Iritani
Alexander Spirin
Alan Trounson

8 Nov, 1999

Associate Editors

Eileen D. Adamson
David F. Albertini
Rod Balhorn
Barry D. Bavister
Anthony R. Bellve
Gilles Bleau
Robert E. Braun
Gottfried Brem
David G. Capco
Thomas T. Chen
E. M. Eddy
John J. Eppig
Robert P. Erickson
Martin Evans
Jacques-E. Fléchon
George L. Gerton
Francois Gros
Mary Ann Handel
Alan H. Handyside
Norman B. Hecht
Susan Heyner
Abraham Hochberg
Judith Ilan
William R. Jeffery
Roy Jones
Matthew H. Kaufman
Gerald M. Kidder
Abraham L. Kierszenbaum
Kyunghin Kim
Kenneth C. Kleene
Stanley P. Leibo
Frank J. Longo
Robin Lovell-Badge
Paul A. Marks
Stanley Meizel
Diana G. Myles
Yoshitaka Nagahama
Gary F. Olson
M.-C. Orgebin-Crist
Roger A. Pedersen
Sally D. Perreault
Paola Pierandrei-Amaldi
Dominic I. Poccia
Daniel A. Rappolee
Angie Rizzuto
Patricia Saling
Herbert Schuel
Gilbert A. Schultz
Richard M. Schultz
Gregorio Siracusa
John Sommerville
Sidney Strickland
Alex Tsafiri
Barbara C. Vanderhyden
Paul M. Wassarman
David G. Whittingham
Fred H. Wilt
Debra J. Wolgemuth

Ms Anna Maria Rosales-Torres
Universidad Auton Metropol-Xochimilco
Dep Produccion Agric 7 Animal
Calzada del Hueso 1100, Col Villa quietud
Delegacion Coyoacan, Mexico, DF 04960

Dear Ms Rosales-Torres:

I am pleased to inform you that your revised manuscript "Atresia in Ewe Antral Follicles...", Ed#5173, has been accepted for publication.

You will receive proofs in due course.

Sincerely,



Ralph Gwatkin
Adjunct Professor of
Reprod Biol, Case
Western Reserve
University

1
2 **Atresia in Ewe Antral Follicles a Multiparametric Study. Histology,**
3 **Flow Cytometry, Internucleosomal DNA Fragmentation and Lysosomal**
4 **Enzyme Activities in Granulosa Cells and Follicular Fluid** [≈]

5
6 Ana María Rosales-Torres*, Alejandro Avalos-Rodríguez¹, Marcela Vergara-Onofre¹, Omar
7 Hernández-Pérez**, Luz María Ballesteros**, Rebeca García-Macedo***, Vianney Ortiz-
8 Navarrete*** and Adolfo Rosado**

9
10 Universidad Autónoma Metropolitana. Unidad Xochimilco. División de Ciencias Biológicas y de la Salud,
11 Depto de Producción Agrícola y Animal.

12 ** Universidad Autónoma Metropolitana. Unidad Iztapalapa. División de Ciencias Biológicas y de la
13 Salud. Depto de Biología de la Reproducción.

14 ***Instituto Mexicano del Seguro Social. Centro Médico Nacional Siglo XXI. Unidad de Investigación
15 Médica.

16
17 *To whom all correspondence should be adressed. Universidad Autónoma Metropolitana-Xochimilco.
18 Departamento de Producción Agrícola y Animal, Calzada del Hueso No.1100 , Col. Villa Quietud, Deleg
19 Coyoacán, México, D.F. 04960.

20 Fax:(5) 724-52-38 e-mail: anamaria@cueyatl.uam.mx

21 Telephone: (5) 724-52-31.

22
23 **Short Tittle:** Atresia in Ewe Antral Follicles, a Multiparametric Study.

24
25 ≈This work was supported in part by # 1474-N 9207 from CONACYT (Consejo Nacional de Ciencia y
26 Tecnología).

27 ¹Grant 92031 and 53068 from CONACYT.

1 ABSTRACT

2
3 The differential quantitative participation of apoptosis and necrosis in ewe antral follicles of two different
4 sizes, separated in four stages of atresia using macroscopic, histologic and steroid quantification methods
5 was assessed. Annexin V binding and propidium iodide (PI) uptake was used to detect healthy live cells
6 (Annexin V positive/PI negative), early apoptotic cells (Annexin V+/PI-) and necrotic or late apoptotic
7 cells (PI+). Additionally we used internucleosomal DNA fragmentation as a quantitative estimate of
8 apoptosis. Presence and distribution of lysosomal enzymes in follicular fluid and granulosa cells were used
9 as a measure of necrotic cell death. Our results indicate that apoptosis predominate over necrosis in small
10 atretic follicles. On the contrary, necrosis may be as important, or more important than apoptosis during
11 atresia of large and pre-ovulatory follicles. Our results support the hypothesis that granulosa cell death,
12 apoptosis and necrosis during follicular atresia, are simultaneously initiated by perturbations of the
13 mitochondrial transmembrane potential. Specific synthesis of some lysosomal hydrolytic enzymes may be
14 involved during the degradation of intracellular structures that accompany the initial phases of apoptosis.
15 The presence of dying cells at all stages of follicular maturation indicates that growth and maturation of
16 ovarian follicles involves a continuous renewal of granulosa cells, regulated by apoptosis. Mechanisms
17 regulating this equilibrium may participate in the final destiny, whether ovulation or atresia of ovarian
18 follicles. We conclude that combination of the proposed methods constitute a better way to analyze cell
19 death mechanisms, not only in follicles of different sizes and during the different stages of follicular atresia,
20 but in many other cellular models.

21
22 **Key Words:** Follicular growth, Atresia, apoptosis, necrosis, lysosomal enzymes.
23

1
2
3
4
5
6
7
8
9
10
11
12
13
14
15
16
17
18
19
20
21
22
23
24
25
26
27

INTRODUCTION

In addition to the important role cell death plays in many biological processes, its study in itself, has become the focus of interest for numerous research groups. This growing interest is fundamentally directed towards the discrimination between the different modes of cell death, particularly between necrosis and apoptosis, and answers to the fact that apoptosis, and perhaps necrosis, can be pharmacologically modified to modulate the propensity of the cells to die as an answer to intrinsic and/or extrinsic signals (Schwartzman and Cidlowski, 1993; Darzynkiewicz et al., 1997; Renvoizé, et al., 1998). Currently, several authors agree that cell death can be produced by one of three mechanisms, namely: necrosis, apoptosis and programmed cell death. Programmed cell death is important for explaining the required and genetically programmed death of specific cell groups during normal tissue turnover, embryonic development and differentiation. Although apoptosis is an active genetically regulated process, it must be distinguished from programmed cell death, because apoptosis is not always programmed and not always "intrinsic", but induced by extrinsic pathological stimuli (Thompson, 1995; Columbano, 1995; Renvoizé, et al., 1998).

The paradigmatic differences between apoptosis and necrosis have been frequently stressed by numerous researchers (for a review see Darzynkiewicz et al, 1997). However, Majno and Joris (1995), and Levin (1995) have called our attention towards the complexities found when trying to categorize the different cell death modes, or when trying to define the time scale of the morphological and biochemical modifications that initiate and accompany cell demise. In effect, the drastic differences between apoptosis and necrosis have been obtained by the experimental induction of cell death in highly selected, simple, *in vitro* systems. It is interesting to note that in physiological and pathological processes involving cell death, there normally coexist both apoptotic and necrotic cells (Kerr et al. 1987; Huschtscha et al. 1994, Darzynkiewicz et al., 1997). There are numerous examples where the pattern of cell death in *in vivo* processes does not resemble conventional apoptosis or necrosis, but often has characteristics of both (see Darzynkiewicz et al., 1997).

1 Recent studies have shown that the differences between apoptosis and necrosis have been overstressed
2 (Collins et al, 1992), pointing out that both types of cell death generally occur at the same time in tissues or
3 cells exposed to the same pathological stimuli. Toxic or ischemic conditions usually related to necrotic cell
4 death, can be found associated to apoptosis (Darzynkiewicz et al., 1997). Specific markers developed for
5 recognizing cells experiencing programmed cell death are expressed by fibroblast submitted to direct
6 toxic or physical injury, and therefore, expected to die by necrosis (Fernández et al., 1994), indicating that
7 apoptosis and necrosis share similar biochemical properties. Heat treatment, a stimulus commonly related
8 to necrosis, produces a decrease in the proportion of cycling cells, and an increase in the proportion of cell
9 containing hypodiploid amount of DNA (Dyson et al., 1986), changes specifically related to apoptosis
10 (Huschtscha et al, 1994). These findings have led to the recent proposition that apoptosis and necrosis can
11 be produced by the same pathological stimuli (Shimizu et al., 1996; Renvoizé et al., 1998) and represent
12 two extremes of a unique pathway to cell death (Lemasters et al., 1998; Renvoizé et al., 1998), initiated by
13 the process referred to as mitochondrial permeability transition (Columbano, 1995; Zanzami et al., 1997;
14 Lemasters et al., 1998). The final road to cell death will be determined by the intensity of the initial damage
15 (Shimizu et al., 1996; Lemasters et al., 1998), the particularities of specific cell energy metabolism
16 (Lemasters et al., 1998), and the availability of intracellular ATP (Richter et al., 1996; Leist et al., 1997;
17 Tsujimoto, 1997).

18
19 Follicular atresia is the process by which most of the oocytes present in the ovary at the moment of birth are
20 lost during further development. Follicular atresia is initially manifested by death of the granulosa cells, i.e.
21 cells which coat the interior of the ovarian follicles and participate in the maintenance of the maturing
22 oocyte. On the other hand, oocyte degeneration occurs until the last stages of atresia (Driancoura, 1991). In
23 relation to the mechanism of cell death, one of the most important advances in the understanding of
24 follicular atresia has been the demonstration that the major cause of granulosa cell death may not be
25 necrosis, but apoptosis (Tilly et al., 1991; Hughes and Gorospe, 1991; Tilly et al., 1992). However, there
26 are findings that support the idea that more than one mode of cell death participates in the process of atresia
27 (Peluso et al., 1981; Kovacs et al., 1992; D'Herde et al., 1996). The participation of necrosis in the early
28 phases of the atretic process may be supported by the knowledge that leukocytes (Bukovsky et al, 1979;

1 Hirshfield, 1991), cytotoxic T lymphocytes (Greenwald and Roy, 1994), and macrophages (Gaytan et al.,
2 1998) invade the granulosa as a part of the development of this process, indicating the active participation
3 of certain inflammatory cells. In addition, although some evidence exists indicating that the mechanism of
4 atresia may differ in different stages of the process, or in the way atresia develops in follicles of different
5 dimensions (Luciano et al., 1994; Palumbo and Yeh, 1994; Amsterdam et al., 1998; Kim et al., 1998;
6 Gaytan et al., 1998; Li et al., 1998), no specific effort has been made to quantitatively study the
7 involvement of apoptosis and necrosis in follicles of different sizes and in different stages of atresia. In
8 view of all these facts, we conclude that it was necessary to enhance our knowledge about the participation
9 of different ways of granulosa cell death during the process of follicular atresia.

10
11 Using a stereoscopic microscope it is possible to identify the progress of atresia in dissected ovarian
12 follicles in ewe, sow, and cow (Greenwald and Roy, 1994). We have recently extended this possibility to
13 the macroscopic classification of ovarian follicles of different sizes in the goat (Rosales et al., 1990; Garcia
14 et al., 1996). This technique may be readily used to obtain quantitative information on the participation of
15 apoptotic and necrotic cell death during the progress of follicular atresia in antral follicles of different sizes.
16 This approach will require the accurate quantification of apoptotic and necrotic granulosa cells in different
17 stages of the process. Morphological studies are difficult and inaccurate for obtaining reliable, reproducible
18 and quantitative estimates of apoptosis and/or necrosis in heterogeneous cell populations. Several flow
19 cytometric procedures, as well as the presence of DNA fragments in agarose gel electrophoresis, offer the
20 possibility of precise quantifications of the apoptotic changes involved in granulosa cell death during
21 follicular atresia. Unfortunately, there is little information on reliable techniques for quantifying the number
22 of cells affected by necrosis. Most of the proposed procedures rely more on the demonstration of the absence
23 of apoptosis than on the assessment of the presence of necrosis.

24
25 In this study we assessed the differential quantitative participation of apoptosis and necrosis in ewe antral
26 follicles of two different sizes, separated in four stages of atresia using macroscopic, histologic and steroid
27 quantification methods. In order to do this, we decided to use in our study of granulosa cell death during
28 atresia, the Propidium Iodide (PI)/Annexin V bivariate analysis proposed by Vermes et al., (1995). The

1 binding of fluoresceinated Annexin V to externally exposed PS in unfixed cells is a useful technique for
2 detecting the very early stages of apoptosis. Apoptotic cells become reactive with Annexin V after the onset
3 of chromatin condensation, but prior to the loss of plasma membrane ability to exclude PI. Therefore, by
4 staining cells simultaneously with the Annexin V-fluorescein complex and PI, it is possible to detect
5 healthy live cells (Annexin V positive/PI negative), early apoptotic cells (Annexin V+/PI-) and necrotic or
6 late apoptotic cells (PI+) using flow cytometry. Additionally we used internucleosomal DNA fragmentation
7 as a quantitative estimate of apoptosis. Many studies have shown that granulosa cells with hypodiploid
8 DNA content are apoptotic and may represent a biochemical marker for atretic follicles in several animal
9 species (Guthrie et al. 1994; Hsueh, et al., 1994; Blondin et al. 1996). We also introduced the study of the
10 modifications in the sub-cellular distribution of lysosomal enzymes as a measure of necrotic cell death. In
11 necrosis, the swelling of the cell and of some other intracellular organelles, particularly mitochondria and
12 lysosomes, is rapidly followed by lysosomal membrane rupture and release of intracellular components,
13 including hydrolytic enzymes. Presence of free lysosomal hydrolytic activities in the cell cytoplasm and in
14 follicular fluid would be the result of lysosomal and granulosa cell membrane rupture, or, at least, of
15 granulosa cell membrane leakage as a consequence of cellular necrosis. We correlated the distribution and
16 activities of lysosomal enzymes, together with the binding of Annexin V and the presence of
17 internucleosome DNA fragmentation, with the progress of follicular atresia in follicles of two different
18 sizes. We propose that the combination of these methods would be a better way to analyze cell death
19 mechanisms, not only in follicles of different sizes and during the different stages of follicular atresia, but
20 in many other cellular models.

1 MATERIAL AND METHODS

2
3 Reagents. Phosphate buffered Saline (PBS), Hepes (), Nonidet NP-40, RNase A, bromophenol blue,
4 xylen cyanol, agarose, propidium iodide, Triton X-100 and dexametasone, estradiol and progesterone, and
5 the lysosomal enzyme substrates: 4-methyl-umbelliferyl-N-acetyl- β -D-glucosaminide and 4-methyl-
6 umbelliferyl-phosphate, were obtained from Sigma Chemical Corporation (St. Louis, MO, USA).
7 Proteinase K was obtained from Boehringer Mannheim (Indianapolis, IN, USA). Ethanol, glycerol and
8 other inorganic salts were analytical degree or better, obtained from Merck (Darmstadt, Germany). DNA
9 QC particles were obtained from Becton Dickinson Systems (San José, CA, USA), U-937 human cells were
10 a kind gift from the Immunochemistry Laboratory at the Centro Médico Nacional sXXI, Instituto Mexicano
11 del Seguro Social.

12
13 Ovaries from non-pregnant ewes were obtained from a local slaughterhouse and transported to the
14 laboratory (transport time never exceeded 30 min) in ice cold 0.15 M NaCl. Antral follicles were dissected
15 free from the ovarian stroma and initially separated by size into two groups: between 3 and 6 mm, and >6
16 mm. Follicles were dissected free of stromal tissue and separately classified under a stereomicroscope
17 (magnification X120) following the previously proposed criteria (Rosales et al., 1990; Ballesteros et al.,
18 1992) into 4 groups: "non-atretic" (stage 1), initially atretic (stage 2), moderately atretic (stage 3a) and
19 severely atretic (stage 3b). On a regular basis, 2 or 3 follicles from each class were randomly selected to be
20 macroscopically and histologically evaluated (Braw and Tsafiriri, 1980; Moor et al., 1978; García et al.,
21 1997) in a double blind study. We have previously shown that these macroscopic morphological criteria
22 correlate adequately with the histological classification of non-atretic and atretic follicles and are not
23 influenced by follicular size (Rosales et al., 1990; Ballesteros et al., 1992; García et al., 1997). However, in
24 order to improve on the macroscopically performed classification, estradiol (E2) and progesterone (P4)
25 were determined by radioimmunoassay (RIA) in the cell-free follicular fluid of all the follicles processed.

26
27 Once classified, fluid from each follicle was collected by flushing. After flushing, the follicles were cut
28 open with small iris scissors and gently scraped with a blunt probe to insure the adequate recovery of

1 granulosa cells (Hirshfield et al., 1988; Ballesteros et al., 1992; Guthrie et al., 1994). Care was taken to
2 avoid contaminating the follicular fluid with blood. In order to obtain sufficient biological material to run
3 the selected experimental procedures, it was necessary to pool the contents of several follicles pertaining to
4 the same size group and macroscopical classification (3 follicles >6 mm, 3-5 follicles 3-6 mm).

5
6 Follicular contents were then processed to recover cell-free follicular fluid and granulosa cells (Ballesteros
7 et al., 1992). Taking into consideration that apoptosis, as well as necrosis, may be induced by drastic
8 procedures, the follicular contents were initially centrifuged at low speed, 600 x g for 10 min, for separating
9 the granulosa cells. The supernatants were carefully siphoned out and recentrifuged at 12000 x g for 20 min
10 to insure the absence of cells from the follicular fluid.

11
12 Cell-free follicular fluid was utilized for assessing lysosomal enzyme activity (see below) and steroid
13 content. Estradiol and progesterone were measured by RIA in the cell-free follicular fluid using a no
14 extraction, solid phase, highly specific RIA (Coat-A-Count kit, Diagnostic Products Corporation, Los
15 Angeles, CA). Samples were stored at -20°C and batch-processed. After slow thawing at room temperature,
16 the samples were appropriately diluted and processed in duplicate, following the manufacturer's instructions,
17 with variations coefficients equal to: 6.34% and 4.28% intra-assay, and 5.94 and 5.13 inter-assay, for
18 estradiol and progesterone, respectively. The detection limits were 8 pg/ml for estradiol and 20 pg/ml for
19 progesterone.

20
21 Granulosa cells were washed twice by centrifugation, 500 x g for 10 min at 4°C, using 600 µl of phosphate
22 buffered (0.01 M) saline, pH 7.4 (PBS), resuspended in 600 µl of the same solution and counted using a
23 hemocytometer. Granulosa cell suspensions were divided into three aliquots for the measurement of
24 lysosomal enzyme activities, DNA fragmentation and Annexin V binding. Since apoptosis is a very rapid
25 and dynamic process, all the tests used for measuring it were performed as quickly as possible, while
26 enzymatic determinations were generally done on the following day.

1 The first aliquot of granulosa cells was processed using the methods previously described (Ballesteros et
2 al., 1992), for measuring "free" and intralysosomal-plus membrane-bound fractional activities of N-acetyl-
3 β -D-glucosaminidase and acid phosphatase. Enzymatic activities were measured fluorometrically in
4 granulosa cell homogenates and in cell-free follicular fluid, following the enzymatic release of 4-methyl-
5 umbelliferone from adequate substrates following the methodology described by Rosado et al. (1977), and
6 modified by Ballesteros et al. (1992). Measurements were done in a Perkin-Elmer MPF-3 spectrophoto-
7 fluorimeter.

8
9 The second aliquot was used to study DNA fragmentation following the procedure proposed by Gong et al.
10 (1994). This technique permits the cytofluorometric determination of fractional DNA content and the
11 electrophoretic analysis of the presence of endonucleolytic DNA degradation in the same population of
12 granulosa cells. Briefly, 100 μ l of granulosa cell suspension (1×10^6 cells) was mixed with 1 ml 70%
13 ethanol. The cell suspensions were stored in the fixative at 4°C for 72 h and then the cells were recovered
14 by 5 min, 4°C centrifugation at 800g. Ethanol was thoroughly removed. The cell pellets were resuspended
15 in 40 μ l of a 1:24 (V/V) mixture of 0.1 M citric acid and 0.2 M phosphate buffer, adjusted to pH 7.8,
16 allowed to stand at room temperature for 30 min and then centrifuged at 1000g for 5 min at room
17 temperature. The supernatant was concentrated by vacuum in a HetoVac concentrator (Hoefer Scientific
18 Instruments, San Francisco, CA) and sequentially treated: 15 min with 3 μ l of 0.25% Nonidet NP-40
19 (Sigma Chemical Co.) in distilled water; 30 min at 37°C with 3 μ l of RNase A (1 mg/ml distilled water),
20 and finally, 30 min at 37°C with 3 μ l of proteinase K (1 mg/ml). After these treatments, 12 μ l of loading
21 buffer (0.25% bromphenol blue, 0.25% xylene cyanol FF, 30 % glycerol) were added and the complete
22 sample was electrophoresed in 1% Agarose gel at 2 V/cm for 16 h. The gels were observed under uv light
23 after staining with 5 μ g/ml of propidium iodide. The gels were studied with a digital image analyzer
24 (Digital Image System 15-1000, Alpha Innotech Corporation).

25
26 Pelleted cells removed from the Phosphate-citrate buffer described above, were resuspended in 1 ml of PBS
27 containing 50 μ g RNase A (Sigma Chemical Co.), 50 μ g propidium iodide and 0.1% Triton X-100. The cell
28 suspension was filtered through a 30 μ m nylon mesh filter to eliminate aggregated cells and incubated in

1 the dark for 20 min at room temperature. DNA analysis was performed using a FACSort (Becton Dickinson
2 System, San Jose, CA) cytofluorometer. The PI was excited through the use of the 488 nm line of an argon
3 laser and the results obtained from a minimum of 10 000 cells analyzed by the CellFit program using the
4 DNA QC particles (Becton Dickinson) for verifying instrument performance and quality control.

5
6 The third aliquot of the granulose cells obtained from the selected follicles was used for the double staining
7 procedure proposed by Vermes et al., (1995) with propidium iodide (PI) and FITC-Annexin V, using the
8 R&D Apoptosis Detection Kit (KNX50, Research & Development systems). Isolated granulose cells were
9 twice washed by centrifugation with PBS and resuspended in binding buffer (10 mM HEPES, 140 mM
10 NaCl, 2.5 mM CaCl₂, all adjusted to pH 7.4) to obtain a final concentration of 10⁶ cells/ml. To 100 µl of
11 cell suspension, 10 µl of conjugated Annexin V-FITC and 10 µl of the PI reagent were added. The mixture
12 was gently vortexed, filtered through a 30 µm nylon mesh filter to eliminate cell conglomerates, and
13 incubated for 15 min in the dark at room temperature. Following the incubation and without washing the
14 cells of excess reagents, 10 000 cells were obtained and counted by bivariate fluoro-cytometry (FACSort,
15 Becton Dickinson Systems) using the Lysis II program with FL1 adjusted for measuring FITC, and FL2
16 for measuring PI.

17
18 Proper analysis of the Annexin V-FITC / PI double staining procedures requires that the electronic
19 compensation of the cytofluorometer be set to exclude any overlap of the two emission spectra and also, to
20 compensate the scatter gate for changes in light scattering properties of normal, apoptotic and necrotic cells
21 (Vermes et al, 1995). Therefore, adequate control tubes were also set to fix electronic compensation and
22 quadrant statistics: a) unstained cells, b) cells stained with Annexin V-FITC only and c) cells stained with
23 PI only. To check on the confiability of the method and to define the range of the contour diagrams, we
24 used the U-937 cell line treated with dexametasone (10⁻⁴ M for 72 h) to induce apoptosis, and with heat
25 (59°C 90 min) to induce necrosis (Huschtscha et al., 1994).

Protein concentration was measured by the method of Lowry et al. (1951). Haemoglobin was determined in follicular fluid (Crosby and Furth, 1956) as an index of blood contamination. Follicular fluids with more than 25 µg haemoglobin per ml were not included in the study (Rosales et al., 1990).

The statistical analysis of groups was done using one- and two-way ANOVA as necessary and Tukey's test (Sokal and Rohlf, 1969). When it was important to compare follicles of different sizes, Student's t test was utilized. All statistical calculations were done using a PC-computer and a Sigma Stat (Jandel Scientific Corporation, San Rafael, CA) statistical package.

RESULTS

The comparison between macroscopic and histologic studies support the applicability of our system for follicular classification. Follicles macroscopically classified in Groups 1 or 3b were histologically found to be almost totally composed (>90%) of non-atretic or advanced atretic follicles (atresia III of Moor et al., 1978, and Braw and Tsafiriri, 1980), respectively. Follicles classified within stage 2 (initially atretic) were the only follicles that consistently showed the presence of an important number of follicles (65%) that could be classified as atresia I (Moor et al., 1978, and Braw and Tsafiriri, 1980) by pure histological evidence, the rest being 18% non atretic and 17% in intermediate stages of atresia (atresia II). Group 3a is also important because it is the only group with a significant number of follicles (59%) considered moderately atretic (atresia II) from an histological viewpoint, the rest being fundamentally (32%) in stage III of atresia, and only 9% in stage I.

The results of endocrinological quantifications in follicular fluid (Tables 1a and 1b) confirm that our method of macroscopic classification of the progress of atresia in ewe follicles is adequate. In effect, a two way ANOVA analysis of our results (Table 1b) indicates that there are highly significant differences in E2 concentration, and in the P4/E2 ratio, in relation to the macroscopic classification of atresia. Correlation coefficients for both factors with the established stage of follicular atresia were also highly significant (Table 1b). In addition, the E2 concentration is significantly dependent on the interrelationship between follicular size and atresia group. P4 concentration was not related to the morphologic classification of follicles, but was significantly related to follicular size, being higher in big (>6 mm), than in small (3-6 mm) follicles.

The activities of the lysosomal enzymes in cell-free follicular fluid was remarkably different in the small than in the large follicles (Figure 1). In follicles 3-6 mm in diameter, acid phosphatase and glucosaminidase showed no significant modification between follicles in group 1 (healthy) and follicles in group 2 (initially atretic). A small, but significant increase in activity was found in follicles in groups 3a and 3b, without any significant difference between these two stages of atresia. On the contrary, lysosomal enzyme activity in

1 follicles ≥ 6 mm was reflected by a highly significant positive correlation between the stages of atresia and
2 the activities of acid phosphatase and glucosaminidase in follicular fluid (Figure 1).

3

4 A similar size-differential behavior was found in free or membrane-bound lysosomal enzyme activity of
5 granulosa cells (Figs. 2 and 3). In the case of 3-6 mm follicles, glucosaminidase bound activity remained
6 without changes in all atresia groups, while free activity of this enzyme showed a small increase in follicles
7 with advanced atresia. No significant changes in free- or bound-acid phosphatase activity were
8 characteristic of initial atretic changes (groups 1 and 2) in follicles 3-6 mm in diameter. The activity of
9 acid phosphatase in follicles of this size, both free and membrane-bound, showed a significant increase in
10 stage 3a and 3b follicles, with no significant differences between these two groups of atresia.

11

12 The enzyme activity of granulosa cells obtained from atretic follicles ≥ 6 mm followed a different behavior.
13 The free activities of the two lysosomal enzymes, increased almost linearly with the progression of atresia,
14 reaching their highest values on stage 3b atretic follicles (Figs. 2 and 3). On the contrary, as could be
15 expected, bound activity of both enzymes showed a significant decrease in groups 3a and 3b follicles.

16

17 One of the major biochemical characteristics of apoptosis is chromosomal DNA cleavage at
18 internucleosomal sites, fragmenting DNA in size multiples of ~ 200 base pairs. DNA fragmentation can be
19 tested by fluorocytometric determination of cells with hypodiploid DNA content, and by the appearance in
20 gel electrophoresis of a typical DNA ladder pattern. Figure 4 depicts the DNA cell cycle distribution of
21 granulosa cells obtained from one healthy follicle (group 1) (Fig. 4A) and one follicle of group 3b
22 (advanced atresia) (Fig. 4B) both > 6 mm. Each histogram is divided into 4 sections: the first named
23 traditionally A_0 , represents a distinct group of cells with hypodiploid content of DNA. Each histogram, as
24 measured by DNA-cytofluorometry, is a representation of all cells analyzed from each granulosa cell
25 sample, which allows for assessing cell percentages in each section. These percentages and the statistical
26 analysis derived from them, are presented in Table 2. In all the DNA histograms obtained by flow
27 cytometry, a subpopulation of cells (from 4.6 ± 2.1 in cells obtained from healthy 3-6 mm follicles, to 55.9
28 ± 11.6 in cells obtained from subgroup 3b, 3-6 mm atretic follicles), was found to possess less DNA than

1 the normal amount expected in viable granulosa cells. The percentages of cells with hypodiploid DNA
2 content were positively correlated with the progression of atresia, increasing more than 10 times (from 4.6
3 ± 2.1 to 55.9 ± 11.6) in follicles 3-6 mm in diameter, and only 6 times (from 7.0 ± 1.9 to 44.8 ± 6.7) in
4 follicles >6 mm. It must be stressed that small atretic follicles consistently had higher percentages of
5 hypodiploid cells than follicles >6 mm, although this difference only reached the limit of statistical
6 significance in group 2, initially atretic follicles. Gel electrophoresis of DNA extracted from granulosa cells
7 (Figure 5) confirmed that endonucleolytic DNA degradation increases with the progression of atresia.
8 Figure 5, lane d, shows that DNA fragmentation clearly produced a DNA ladder pattern in granulosa cells
9 obtained from 3-6 mm initially atretic follicles, while the image obtained from granulosa cells from initially
10 atretic follicles >6 mm reflected a mixture of endonucleolytic and random DNA breakdown, displaying a
11 continuous spectrum of sizes and appearing as a DNA-smear on agarose gels (Fig. 5, lane c).

12
13 Figure 6 shows the results of cytofluorometric bivariate analysis of granulosa cells incubated in a system
14 composed by FITC-Annexin V and PI. Cells in the initial phases of apoptosis are characterized by the
15 preservation of plasma membrane integrity and by the translocation of phosphatidylserine from the inner to
16 the outer leaflet of plasma membrane. Therefore, apoptotic cells incubated in the presence of PI and FITC-
17 Annexin V will show only fluorescence due to FITC-Annexin V binding to extruded PS. Binding of FITC-
18 Annexin V occurs also in necrotic cells, but in this case binding is due both to PS translocation and to the
19 presence of the early loss of cell membrane integrity. Therefore, in necrotic cells, as well as in advanced
20 apoptotic cells, the fluorescence due to FITC-Annexin V binding, will be accompanied by the red
21 fluorescence produced by the binding of PI to cell DNA. Figure 6A represents a cytogram of granulosa
22 cells obtained from a non-atretic follicle. Most of the cells, lower left quadrant, exclude PI and are negative
23 for Annexin V and can be considered healthy granulosa cells, but there is a significant number of Annexin
24 V positive cells (lower right quadrant) indicating the presence of apoptotic cells. No necrotic cells, PI
25 positive (upper right quadrant) are present. In Fig. 6B, granulosa cells obtained from a group 2 follicle,
26 healthy, apoptotic and necrotic granulosa cells coexist. The statistical analysis of the cell percentages
27 obtained by the bivariate fluorocytometric analysis of all the studied follicles is show in Table 3. Apoptotic
28 and, in lower percentages, necrotic cells are already present in those follicles classified as healthy (group 1).

The number of healthy granulosa cells (Annexin V (-)/PI (-)) continuously decreases, while the number of apoptotic (Annexin V (+)/PI (-)) and necrotic (Annexin V (-)/PI (+)) cells significantly increases with the progression of atresia. Apoptosis seems to be the preferred mechanism of death in small follicles, i.e. percentages of apoptotic cells in small follicles are consistently and significantly ($p < 0.05$) higher than the percentages of necrotic cells. On the contrary, atresia in larger ($> 6\text{mm}$) follicles is characterized by the prevalence of necrotic over apoptotic cells.

DISCUSSION

Our results confirm that the stereoscopic microscope criteria utilized for the classification of atretic follicles in the ewe is satisfactory (García et al., 1997). Double blind histological (Moor et al., 1978; Braw and Tsafiriri, 1980) observations of follicles in different stages of atresia showed good correlation with the macroscopic classification simultaneously established. Our results are in complete agreement with those by Moor et al (1978), who found that, in the ewe, gross and histological classification of normal and advanced atretic follicles agreed in over 95% of the cases.

These morphological criteria are also in good standing with the follicular fluid concentration of steroid hormones. Estradiol concentration in follicular fluid decreases from group 1 to group 3b follicles showing a highly significant correlation coefficient ($R^2 = 0.73$, $p < 0.01$) with the stage of atresia established by our macroscopic criteria. The relation P4 / E2, although with a less important level of significance ($R^2 = 0.53$, $p < 0.05$), was also indicative that the macroscopic classification of follicles is in agreement with the established endocrinologic criteria for the advance of atresia. The correlation between the macroscopic classification of atretic follicles and biochemical parameters of atresia have been recently utilized satisfactorily by other research groups (Hughes and Gorospe, 1991; Tilly et al. (1992). Our results are in general agreement with the quantitative morphometric and hormonal studies by Murdoch (1992) and by Tilly et al. (1992). Murdoch (1992) in synchronized ewes, selecting antral follicles simultaneously committed to ovulation or atresia, confirmed this. This researcher indicates that follicles that would become atretic have, immediately after their stimulation with LHRH, a diminished capacity to produce estrogens, while modifications in the production of progesterone, if any, were observable only after 24 hr of LHRH administration. Tilly et al. (1992) found that decreases in the estrogen concentration of porcine follicles can be correlated with the presence of morphological evidence of atresia, of internucleosomal DNA fragmentation, and with a decrease in 2.6 kilobase aromatase mRNA.

Plasma membrane integrity is fundamentally preserved in apoptosis. However, membrane structure and/or function can be modified from the initial steps of the process. Externalization of phosphatidylserine (PS)

1 residues, and the concomitant loss of phospholipid membrane asymmetry, is now recognized as one of the
2 early events in apoptosis. In this work we show that bivariate, Annexin V and PI, cytofluorometry systems
3 can be used to follow granulosa cell death during the progression of atresia in antral follicles of different
4 sizes. Annexin V binding and PI staining of cell nuclei were simultaneously present in granulosa cells
5 obtained from every follicle studied, atretic or non-atretic. In non-atretic follicles the percentage of
6 apoptotic cells (Annexin V+, PI-) was twice as high as the percentage of necrotic cells, reaching values as
7 high as 10%. We must add that in general, cytofluorometric determinations of cell size versus cell
8 complexity (Dive et al., 1992; Huschtscha et al., 1994), confirmed the results obtained by the Annexin V/PI
9 bivariate analysis (data not shown).

10
11 Little is known about the events that accompany the early necrotic process that Majno and Joris (1995) call
12 "oncosis" and which may be useful for oncotic cell recognition by flow cytometry. Measurement of
13 membrane integrity may not distinguish between early necrotic and apoptotic cells because it is largely
14 preserved at the beginning of both processes. Blebbing, or more adequately budding, usually described as
15 characteristic of apoptosis, can also be observed during necrosis. Alterations in mitochondrial function
16 and/or mitochondrial swelling might be a differentiating factor (Darzynkiewicz, et al., 1997), but may be
17 also similar during the early stages of both mechanisms of cell death (Columbano, 1995; Zanzami et al.,
18 1997; Lemasters et al., 1998). Necrosis may be accompanied by picnosis or irregular chromatin distribution
19 forming patchy areas of condensation that resemble picnosis while on the contrary, apoptosis may occur
20 without evidence of DNA degradation or without internucleosomal cleavage (Zamai et al., 1996).
21 Measurement of lysosomal integrity by the uptake of the metachromatic fluorochrome acridine orange
22 (Traganos, et al., 1994), in addition to being not quantitative, is not always able to identify cells in the early
23 stages of cell death (Darzynkiewicz et al., 1997). These facts stress the importance of our results pointing
24 that a demonstrable, easily quantifiable feature of early necrosis may be the release of lysosomal enzymes
25 into the cytoplasmic compartment of the cell, and in the particular case of atresia, into the cell-free fraction
26 of follicular fluid. In fact, presence of free-intracellular and follicular fluid lysosomal enzyme activities
27 correlates with the percentage of granulosa cells showing PI staining in bivariate flow cytometric
28 determinations, but is considerably more demonstrative of the differences found between small and large

1 follicles experimenting atresia, making clear that, although apoptosis and necrosis are simultaneously
2 present in atretic follicles, necrosis seems to be the dominating mechanism of cell death in granulosa cells
3 obtained from atretic follicles bigger than 6 mm, while its participation in cell death of small (3-6 mm)
4 atretic follicles seems to be negligible. The prevalence of necrosis over apoptosis in late atretic follicles will
5 help to explain some of the inflammatory reactions observed during atresia (Bukovsky et al., 1979;
6 Murdoch, 1992), and why macrophages accumulate preferentially in these kind of follicles (Gaytan et al.,
7 1998).

8
9 The simultaneous presence of several modes of granulosa cell death during follicular atresia have been
10 previously stressed. Kovacs et al. (1992) suggest that necrosis is the dominant form of cell death in atretic
11 goose follicles. D'Herde et al. (1996) distinguish three ways of granulosa cell death during atresia in quail
12 follicles: apoptosis, necrosis and autophagocytosis. If we consider that autophagocytosis is the result of an
13 increase in the synthesis and release into the cell cytoplasm of lysosomal hydrolases, the results of D'Herde
14 et al. (1996) may be completely compatible with ours.

15
16 Thecal hypertrophy, vascular alterations and infiltration of inflammatory cells (Greenwald and Roy, 1994;
17 Murdoch, 1992) are important anatomical landmarks of follicular atresia. Of particular interest to our study
18 are the results by Murdoch (1992) in relation to the area of the theca interna occupied by vascular lumens.
19 The requirements of increasing blood flow for the developing follicle after the gonadotropin surge are
20 shown by the fact that there was an increase of more than 3 fold in this parameter between 0 and 12 h
21 following LHRH. Thecal vasodilatation from 0 to 12 h was significantly smaller ($p > 0.05$) in follicles
22 destined to atresia. According to this researcher, during the late stages of atresia, follicular blood flow was
23 deeply compromised. In the fowl, disruption of thecal vessels and leakage of blood precedes any
24 histologically demonstrable changes in the granulosa cells of spontaneously atretic follicles (Gilbert et al.,
25 1985). Hubbard and Greenwald (1985) and Greenwald (1989), have also shown that atresia is accompanied
26 by a sharply reduced follicular vascularity preceding the total collapse of the granulosa layer. Therefore it
27 must be considered that one of the earlier factors participating in atresia may be granulosa cell hypoxia due
28 to an inefficient increase in the required follicular blood flow (Murdoch, 1992), to the early participation of

1 vascular disruption (Gilbert et al., 1985), and to inefficient oxygen diffusion into the innermost granulosa
2 cells (Hirshfield 1991). Due to the increasing number of granulosa cells layers in large, fully grown, or
3 preovulatory follicles, it is conceivable that follicular ischemia will have deeper consequences in large than
4 in small follicles (Hirshfield 1991). This hypothesis is supported by the findings that apoptotic cells
5 (Annexin V+, PI- in bivariate MCF analysis) predominate over necrotic ones in small atretic follicles. On
6 the contrary, necrotic cells (PI+) tend to predominate over apoptotic ones in large follicles. This fact is also
7 supported by the significant differences in the behavior of free, and follicular fluid, lysosomal enzyme
8 activities in small (3-6 mm) and large (>6mm) atretic follicles.

9
10 The present study provides evidence that apoptotic and necrotic cells are simultaneously present in the
11 population of granulosa cells obtained from all stages of follicular maturation and atresia, including
12 follicles that can be considered as non-atretic by histological observation and estrogen measurement in
13 follicular fluid. Presence of granulosa cell apoptosis in follicles classified as non-atretic has been previously
14 stressed (Guthrie et al., 1994; Jolly et al., 1994; Blondin et al., 1996; Jolly et al., 1997). In this study, the
15 presence of apoptosis in healthy follicles is indicated by an important number of granulosa cells that are
16 Annexin V (+), show hypodiploid concentrations of DNA and have gel electrophoretic patterns
17 characteristic of internucleosomal DNA cleavage. Blondin et al. (1996) have described the evolution of
18 follicular atresia as divided in three phases, as determined by histological determination of picnosis: non-
19 atretic follicles (< 5% picnotic nuclei), slightly atretic (>5 to <15% picnotic nuclei), and atretic (>15%
20 picnotic nuclei). These same classes, as determined by flow cytometry were approximately <10%, 10-30%,
21 and >30% of cells in the A₀ region (Blondin et al, 1996). Guthrie et al. (1994) classified porcine follicles as
22 biochemically healthy or atretic using 10% A₀ cells as a cutoff point. Our data agree with these results. The
23 cutoff point between non-atretic and initially atretic follicles in our study are 9.2 ± 2.8 percentage of cells
24 showing Annexin V binding and 7.0 ± 1.9 percentage of cells with hypodiploid DNA characteristic of
25 apoptotic cells. Necrosis, although less important than apoptosis, is also present in healthy, group I follicles,
26 as evidenced by the presence of PI (+) granulosa cells and by the demonstration, in this group of follicles,
27 of lysosomal enzyme activities in follicular fluid and in the free, extralysosomal compartment of granulosa
28 cells. We suggest that the presence of dying cells at all stages of follicular maturation, indicates that the

1 population of granulosa cells during follicular growth and maturation is in continuous exchange, the old
2 cells discarded by apoptosis (Wyllie, 1992). Perturbations or physiological modifications of this delicate
3 equilibrium between death and proliferation of granulosa cells, may compel the follicle to atresia. This
4 possibility is reinforced by the results of Murdoch (1992) showing that pyknosis of granulosa cells
5 increased significantly from 12 to 24 hr after LHRH in pre-ovulatory follicles without significant
6 differences dependent on follicular atretogenic or non-atretogenic classification.

7
8 Our results also show that progression of atresia involves increases in the percentage of both necrotic and
9 apoptotic granulosa cells. These results may support the hypothesis that, as has been established in some
10 other systems, granulosa cell death during atresia is initiated by a common mechanism depending on the
11 disruption of the mitochondrial transmembrane potential (Columbano, 1995; Zanzami et al., 1997;
12 Lemasters et al., 1998; Renvoizé et al., 1998). Small follicles, where blood flow decreases are insufficient
13 to produce hypoxia of granulosa cells (Murdoch, 1992), will progress to atresia mainly through apoptosis
14 (Richter et al., 1996; Leist et al., 1997; Tsujimoto, 1997). The decrease in blood flow in large follicles
15 would seem to be enough to compromise the production of ATP, making necrosis of granulosa cells as
16 important or in some cases more important than apoptosis as the main mechanism of cell death (Leist et al.,
17 1997; Tsujimoto, 1997). It is important to stress that initiation of the process of atresia in small and in large
18 follicles is accompanied not only by the release of intralysosomal activities into the cytoplasmic
19 compartment of the cell, but by an increase in the amount of bound activities of the enzymes tested,
20 indicating an increase in the synthesis of lysosomal hydrolytic activities that may be necessary during the
21 initiation of cell death.

22
23 Lysosomes have been involved in some important functions related to ovarian physiology, including
24 hormonal regulation (Dougherty et al., 1982; Kornfeld, 1987), particularly during follicular maturation
25 (Ballesteros et al., 1992; Murdoch, 1992), and atresia (Narimoto et al., 1985; Wise, 1987; Woessner et al.,
26 1989; D'Herde et al., 1996; García et al., 1996). Our results indicate that apoptosis of granulosa cells may
27 be another of the processes in which the participation of lysosomal enzymes may be important. Apoptosis
28 has been characterized as a process depending on the participation of numerous catabolic enzymes, mostly

1 hydrolases (Zanzami et al., 1997). Mitochondrial membrane, nuclear membrane, laminin and other
2 complex intracellular structures undergo proteolytic degradation, followed by DNA fragmentation due to
3 specific nucleases (Darzynkiewicz et al, 1997). Some of the apoptogenic proteases (Liu et al., 1996; Anjum
4 and Khar, 1997; Besnard et al., 1997) involved in this process may be lysosomal in origin, as has been
5 shown in the case of aspartyl endopeptidase cathepsin D (Dhanasekaran and Moudgal, 1989).

6
7 From this standpoint, it is tempting to correlate our findings with those associated with changes in follicular
8 fluid proteolytic activity during follicular growth and atresia (Rosales et al. 1990). In the pig, (Hamabata et
9 al., 1994; Besnard et al. 1996) a dramatic increase in follicular fluid proteolytic activity occurs during
10 follicular growth. Also, proteolytic activity against Insulin-like growth factor binding protein-3 increases in
11 sheep follicular fluid during atresia (Besnard et al., 1997). Since the studies of Liu et al. (1993) in the rat,
12 and of Chandrasekher et al. (1995) in the human, indicate that this protease(s) may be derived from
13 granulosa cells, these increases in proteolytic activity during follicular growth and atresia may express the
14 existence of granulosa cell membrane damage. However, a significant decrease in this kind of activity has
15 been reported in pig follicular fluid during the development of atresia (Besnard et al. 1997). These
16 contradictory results indicate that some of the biochemical processes participating in follicular growth and
17 atresia are surely species-specific.

1 CONCLUSIONS

2
3 Evidence obtained in recent years has led to conclude that differentiating between apoptosis and necrosis,
4 in *in vivo* systems, is not as simple as was implied some years ago. It is now evident that the extension of
5 the knowledge acquired by the study of simple, highly selected *in vitro* systems to the much more complex,
6 naturally produced pathological and/or physiological processes observed in live animals, such as follicular
7 atresia, has generated an undesirable degree of generalization. Our results, as those from other research
8 groups in other animal species, provide strong evidence that granulosa cell death during follicular atresia in
9 the ewe occurs mainly through apoptosis. However, it is clear from our results that the role played by
10 necrosis during the evolution of this process has been unjustifiably neglected, particularly during atresia of
11 large and pre-ovulatory follicles. Our results also support the hypothesis that granulosa cell death, apoptosis
12 and necrosis during follicular atresia are initiated by a common pathological alteration, probably through
13 the perturbation of the mitochondrial transmembrane potential. We stress the fact that specific synthesis of
14 lysosomal hydrolytic enzymes, particularly some proteases (like aspartyl endopeptidase cathepsin D) may
15 be involved during the degradation of intracellular structures that accompany the initial phases of apoptosis.
16 This is an aspect of the hypothesis about the common origin of cell death that would merit particular
17 attention. Finally, the presence of dying cells at all stages of follicular maturation indicates that growth and
18 maturation of ovarian follicles involves a continuous renewal of granulosa cells, regulated by apoptosis.
19 Mechanisms regulating this equilibrium may participate in the final destiny, whether ovulation or atresia of
20 ovarian follicles.
21

1
2
3
4
5
6
7

Acknowledgements

We would like to thank to the Laboratorio de Bioquímica Hormonal of the Instituto Nacional de la Nutrición, Mexico City for their help in the steroid assays for this research.

Bibliography

Amsterdan A, Dantes A, Husokawa K, Schere-Levy CP, Kotsuji F, Aharoni D (1998): Steroid regulation during apoptosis of ovarian follicular cells. *Steroids* 63:314-318.

Anjum R and Khar A (1997): Caspase-mediated apoptosis in AK-5 tumor cells: A cell-free study using peptide inhibitors and antisense strategy. *Exp Cell Res* 236:371-377.

Ballesteros LM, Rosales AM, Rosado A and Hernández-Pérez O (1992): Activity, compartmentation and subcellular distribution of lysosomal enzymes during follicular maturation in the goat. *Anim Reprod Sci* 27:129-139.

Besnard N, Pisselet C, Zapf J, Hornebeck W, Monniaux D, Monget P. (1996): Proteolytic activity is involved in changes in intrafollicular insulin like growth factors binding proteins levels during growth and atresia of ovine ovarian follicles. *Endocrinology* 137:1599-1607.

Besnard N, Pisselet C, Monniaux D, Monget P (1997): Proteolytic activity is involved in changes in intrafollicular insulin-like growth factor-binding protein-2, -3, -4 and -5 in healthy growing and atretic follicles in the pig ovary. *Biol Reprod* 56:1050-1058.

Blondin P, Dufour M and Sirard M.A. (1996): Analysis of atresia in bovine follicles using different methods: flow cytometry, enzyme-linked immunosorbent assay, and classical histology *Biol Reprod* 54:631-637.

Braw RH and Tsafiriri A (1980): Effect of PMSG on follicular atresia in the rat ovary. *J Reprod Fertil* 59:267-272.

Bukovsky A, Presl J, Zidovsky J (1979): Migration of lymphoid cells into the granulosa of rat ovarian follicles. *IRCS Med Sci* 7:603-604.

Chandrasekher YA, Clark CR, Faessen GH, Giudice LC (1995): Role of insuline-like growth factor binding protein-4 (IGFBP-4) and IGFBP-4 protease in human granulosa cell function. In: Program of the 77th annual meeting of The Endocrine Society: Anaheim, Ca. Abstract 102.

Columbano A (1995): Cell death: Current difficulties in discriminating apoptosis from necrosis in the context of pathological processes in vivo. *J Cellular Biochem* 58:181-190.

1
2 Collins RJ, Harmon BV, Gobe GC, Kerr JFR. (1992): Internucleosomal DNA cleavage should not be the
3 sole criterion for identifying apoptosis. *Int J Radiat Biol* 61:451-453.

4
5 Crosby WH and Furth FW (1956): A modification of the benzidine method for measurement of
6 hemoglobin in plasma and urine. *Blood* 11:380-385.

7
8 D'Herde K, De Prest B, Roels F (1996): Subtypes of active cell death in the granulosa of ovarian atretic
9 follicles in the quail (*Coturnix coturnix japonica*). *Reprod Nutr Dev* 36:175-189.

10
11 Darzynkiewicz Z, Juan G, Xun Li, Gorczyca W, Murakami T, and Traganos F (1997): Cytometry in cell
12 Necrobiology: Analysis of apoptosis and accidental cell death (Necrosis). *Cytometry* 27:1-20.

13
14 Dhanasekaran N and Moudgal NR (1989): Studies on follicle atresia: role of gonadotropins and gonadal
15 steroids in regulating cathepsin-D activity of preovulatory follicles in the rat. *Endocrinology* 63:133-142.

16
17 Dive C, Gregory CD, Philipps DJ, Evans DL, Milner AE, Wyllie AH (1992): Analysis and discrimination
18 of necrosis and apoptosis (programmed cell death) by multiparameter flow cytometry. *Biochim. Biophys*
19 *Acta* 1133:275-285.

20
21 Dougherty JJ, Puri RK and Toft DO (1982): Phosphorylation in vivo of chicken oviduct progesterone
22 receptors. *J Biol Chem* 257: 14226-14235.

23
24 Driancoura M (1991): Follicular dynamics in sheep and cattle. *Theriogenology* 35:55-79.

25
26 Dyson JED, Simmons DM, Daniel J, McLaughlin JM, Quirke P, and Bird CC (1986): *Cell Tissue Kinet*
27 19:311-324.

28
29 Fernández PA, Rotello RJ, Rangini Z, Doupe A, Drexler HCA and Yuan J (1994): Expression of a specific
30 marker of avian programmed cell death in both apoptosis and necrosis. *Proc Natl Acad Sci (USA)* 91:8641-
31 8645.

32
33 García R, Ballesteros LM, Hernández-Pérez O, Rosales AM, Espinosa R, Soto H, Díaz de León I. and
34 Rosado A (1997): Metalloproteinase activity during growth, maturation and atresia in the ovarian follicles
35 of the goat. *Anim Reprod Sci* 47:211-228.

- 1 Gaytan F, Morales C, Bellido C, Aguilar E., Sánchez-Criado JE. (1998): Ovarian follicle macrophages: Is
2 follicular atresia in the immature rat a macrophage mediated event. *Biol Reprod* 58:52-59.
3
- 4 Gilbert AB, Perry ME, Walker M.A, Waddington D (1985): Identification of atresia in small ovarian
5 follicles of the domestic hen (*Gallus domesticus*). *IRCS Med Sci* 13:723-733.
6
- 7 Gong J, Traganos F, Darzynkiewicz Z (1994): A selective procedure for DNA extraction from apoptotic
8 cells applicable to gel electrophoresis and flow cytometry. *Anal Biochem* 218:314-319.
9
- 10 Greenwald GS (1989): Temporal and topographic changes in DNA synthesis after induced follicular
11 atresia. *Biol Reprod* 41:175-181.
12
- 13 Greenwald GS and Roy SK (1994): Follicular development and its control. In . Knobil E and Neill J (ed):
14 "The Physiology of Reproduction." New York: Raven Press, pp 629-724.
15
- 16 Guthrie HI, Welch GR, Couper BS, Zacaria AD and Johnson LA (1994): Flow cytometric determination of
17 degraded desoxiribonucleic acid in granulosa cells to identify atretic follicles during preovulatory
18 maturation in the pig. *Biol Reprod* 50:1303-1311.
19
- 20 Hamabata T, Okimura H, Yokoyama N, Takahashi, T, Takahashi, K (1994): Purification, characterization
21 and localization of follipain, a novel serine proteinase from the fluid of porcine ovarian follicles. *J Biol*
22 *Chem* 269:17899-17904.
23
- 24 Hirshfield AN, Flickinger GL, and Ben-Rafael Z (1988): Flow cytometric analysis of granulosa cell
25 proliferation in the rat. *J Reprod Fert* 84: 231-238.
26
- 27 Hirshfield, A.N. (1991): Development of follicles in the mammalian ovary. *Inter Rev Cytol* 124:43-101.
28
- 29 Hsueh AJW, Billing H and Tsafiriri A (1994): Ovarian follicle atresia: a hormonally controlled apoptotic
30 process. *Endocr Rev* 15:707-724.
31
- 32 Hubbard CJ and Greenwald GS (1985): Morphological changes in atretic Graafian follicles during induced
33 atresia in the hamster. *Anat Rec* 212:353-357.
34
- 35 Hughes FM and Gorospe WC (1991): Biochemical identification of apoptosis (programmed cell death) in
36 granulosa cells: evidence for a potential mechanism underlying follicular atresia. *Endocrinology* 129:2415-
37 2422.

- 1
2 Huschtscha LI, Jeitner TM, Andersson CE, Bartier WA, and Tattersall MHN (1994): Identification of
3 Apoptotic and Necrotic Human Leukemic Cells by Flow Cytometry. *Exp Cell Res* 212:161-165.
4
5 Jolly PD, Tisdall DJ, Heath DA, Lun S, MaNatty KP. (1994): Apoptosis in bovine granulosa cells in
6 relation to steroid synthesis, cyclic adenosine 3',5'-monophosphate response to follicle-stimulating
7 hormone and luteinizing hormone, and follicular atresia. *Biol Reprod* 51:934-944.
8
9 Jolly PD, Smith PR, Heath DA, Hudson NL, Lun S, Still LA, Watts CH, MaNatty KP (1997):
10 Morphological evidence of apoptosis and the prevalence of apoptotic versus mitotic cells in the membrane
11 granulosa of ovarian follicles during spontaneous and induced atresia. *Biol Reprod* 56:837-846.
12
13 Kerr JFR, Scarle J, Harmon BM, and Bishop CJ (1987): In: *Perspectives on Mammalian Cell Death*
14 (Bowen, C.S., Ed.), pp:93-127, Oxford Univ Press New York.
15
16 Kim JM, Boone DL, Auyeung A, Tsang BK (1998): Granulosa cell apoptosis induced at the penultimate
17 stage of follicular development is associated with increased levels of Fas and Fas Ligand in the rat ovary.
18 *Biol Reprod* 58:1170-1176.
19
20 Kornfeld S (1987): Trafficking of lysosomal enzymes. *FASEB J.* 1:462-468
21
22 Kovacs J, Forgo V, Peczely P (1992): The fine structure of the follicular cells in growing and atretic
23 ovarian follicles of the domestic goose. *Cell Tissue Res* 267:561-569.
24
25 Leist M, Single B, Castoldi AF, Kuhnle S, Nicotera P (1997): Intracellular adenosine triphosphate (ATP)
26 concentration: a switch in the decision between apoptosis and necrosis. *J Exp Med* 185:1481-1486.
27
28 Lemasters JJ, Nieminen AL, Qian T, Trost LC, Elmore SP, Nishimura Y, Crowe RA, Cascio WE, Bradham
29 CA, Brenner DA, Herman B (1998): The mitochondrial permeability transition in cell death: a common
30 mechanism in necrosis, apoptosis and autophagy. *Biochim Biophys Acta* 1366:177-196.
31
32 Levin S (1995): Commentary: A toxicologic pathologist's view of apoptosis or I used to call it necrobiosis,
33 but now I am singing the apoptosis blues. *Toxicol Pathol* 23:533-539.
34
35 Li J, Kim JM, Liston P, Li M, Miyazaki T, Mackenzie AE, Korneluk RG, Tsang BK (1998): Expression of
36 the inhibitor of apoptosis proteins (IAPs) in rat granulosa cells during ovarian follicular development and
37 atresia. *Endocrinology* 139:1321-1328.

1
2 Liu XJ, Malkowski M, Guo Y, Erickson G, Shimasaki S, Ling NC (1993): Development of specific
3 antibodies to rat insulin-like growth factor-binding proteins (IGFBP-2 to 6): Analysis of IGFBP production
4 by rat granulosa cells. *Endocrinology* 132:1176-1183.
5
6 Liu XJ, Kim CN, Yang J, Jemmerson R, Wang X (1996) Induction of apoptotic program in cell-free
7 extracts: requirement for dATP and cytochrome c. *Cell* 86:147-157.
8
9 Lowry OH, Rosebrough N J, Fara A L and Randall RJ (1951): Protein measurement with the folinphenol
10 reagent. *J Biol Chem* 193: 265-275.
11
12 Luciano AM, Pappalardo A, Ray C, Peluso JJ (1994): Epidermal growth factor inhibits large granulosa
13 cells apoptosis by stimulating progesterone synthesis and regulating the distribution of intracellular free
14 calcium. *Biol Reprod* 51:646-654.
15
16 Majno G and Joris I (1995): Apoptosis, oncosis and necrosis. An overview of cell death. *Am J Pathol* 146:3-
17 16.
18
19 Moor RM, Mary FH, Dott HM and Cran DJ (1978): Macroscopic identification and steroidogenic function
20 of atretic follicles in sheep. *J Endocrinol* 77:309-318.
21
22 Murdoch WJ (1992): Comparative morphometry and steroidogenic function of antral ovine follicles
23 destined for ovulation or atresia. *Domestic Animal Endocrinology* 9(3): 219-224.
24
25 Narimoto K, Okamura H, Mori T, Sakai M, Espey II and Ogawa K (1985): Cytochemical localization of
26 acid phosphatase in the rabbit ovarian follicle. *Acta Histochem Cytochem* 18:525-537.
27
28 Palumbo A, and Yeh J (1994): In situ localization of apoptosis in the rat ovary during follicular atresia. *Biol*
29 *Reprod* 51: 888-895.
30
31 Peluso JJ, Charlesworth J, England- Charlesworth C (1981): Role of estrogen and androgen in maintaining
32 the preovulatory follicle. *Cell Tissue Res* 216:614-624.
33
34 Renvoizé C, Biola A, Pallardy M and Bréard J (1998): Apoptosis: identification of dying cells. *Cell Biol*
35 *Toxicol* 14:111-120.
36

1 Richter CM, Schweizer A, Cossarizza C, Franceschi (1996): Control of apoptosis by the cellular ATP level.
2 FEBS Lett 378:107-110
3
4 Rosado A, Mercado E, Gallegos AJ, Wens MA and Aznar R (1977): Subcellular distribution of lysosomal
5 enzymes in the human endometrium. I. Normal menstrual cycle. Contraception 16:287-297.
6
7 Rosales AM, Hernández-Pérez O, Domínguez R, Mercado E And Rosado A (1990): Proteolytic and
8 antiproteolytic activities in goat antral follicles. Anim Reprod Sci 23:213-222.
9
10 Schwartzman RA and Cidlowski JA (1993): Apoptosis: The biochemistry and molecular biology of cell
11 death. Endocrin Rev 14:133-151
12
13 Shimizu S, Eguchi Y, Kamiike W, Waguri S, Uchiyama Y, Matsuda H, and Tsujimoto Y (1996): Bcl-2
14 blocks loss of mitochondrial transmembrane potential while ICE inhibitors act at a different step during
15 inhibition of death induced by respiratory chain inhibitors. Oncogene 13: 21-29.
16
17 Sokal RR and Rohlf FJ (1969): "Biometry." San Fco: WH Freeman &Co, pp 299-342
18
19 Thompson C B (1995): Apoptosis in the pathogenesis and treatment of disease. Science 267, 1456-1462.
20
21 Tilly JL, Kowalski KI, Johnson AL, Hsue A.J.W. (1991): Involvement of apoptosis in ovarian follicular
22 atresia and postovulatory regression. Endocrinology 129:2799-2801.
23
24 Tilly JL, Kowalski KI, Shomberg DW, and Hsueh AJW (1992): Apoptosis in atretic ovarian follicles in
25 associated with selective decrease in messenger ribonucleic acid transcripts for gonadotropin receptors and
26 cytochrome P450 aromatase. Endocrinology 131(4): 1670-1676.
27
28 Traganos F and Darzynkiewicz Z (1994): Lysosomal proton pump activity: Supravital staining with
29 acridine orange differentiates leukocytes subpopulation. Meth Cell Biol 41:185-195.
30
31 Tsujimoto Y, Shimizu S, Eguchi Y, Kamiike W, Matsuda H (1997): Bcl-2 and Bcl-xL block apoptosis as
32 well as necrosis: possible involvement of common mediators in apoptotic and necrotic signal transduction
33 pathways. Leukemia 11 Suppl 3:380-2
34
35 Vermes I, Haanen C, Steffens-Nakken H and Reutelingsperger Ch (1995): A novel assay for apoptosis flow
36 cytometric detection of phosphatidylserine expression on early apoptotic cell using fluorescein labelled
37 annexin V. J Immunol Meth 184:39-51.

1
2
3
4
5
6
7
8
9
10
11
12
13
14
15
16
17
18
19
20

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

Woessner Jr, JF, Morioka N, Zhu Ch, Mucaida T, Butler T and LeMaire WJ (1989): Connective tissue breakdown in ovulation. *Steroid* 54: 491-499.

Wyllie AH (1992). Apoptosis and the regulation of cell numbers in normal and neoplastic tissues. An overview. *Cancer Metast Rev* 11:95-103.

Zamai I, Falcieri E, Marhefka G, Vitale M (1996): Supravital exposure to propidium iodide identifies apoptotic cells in the absence of internucleosomal DNA fragmentation. *Cytometry* 23:303-311.

Zanzami N, Hirsch T, Dallaporta B, Petit PX, Kroemer G (1997): Mitochondrial implications in accidental and programmed cell death: apoptosis and necrosis. *J Bioenerg and Biomembr* 29 (2):185-193.

Figure 1

Changes in specific activities of lysosomal enzymes in cell-free follicular fluid of growing and atretic follicles. Enzymatic activities were measured fluorometrically following the enzymatic release of 4-methylumbelliferone from adequate substrates following the methodology described by Rosado et al. (1977), and modified by Ballesteros et al. (1992). Values represent the mean \pm the standard deviation obtained from at least 6 independent experiments. Data were statistically calculated for each enzyme by one way ANOVA and Tukey's test. Different letters above bars indicate the presence of significant differences ($p < 0.05$) when compared with all other values of the same enzyme, independently of follicular size. The size and the atretic sub-group of each kind of follicle are indicated on the abscise.

1
2
3
4
5
6
7
8
9
10
11
12
13
14
15
16
17
18
19
20

Figure 2

Changes in specific activity of free and bound acid phosphatase in granulose cells of growing and atretic follicles. Values represent the mean \pm the standard deviation obtained from at least 6 independent experiments. Data were statistically calculated for each subcellular distribution by one way ANOVA and Tukey's test. Different letters above bars indicate the presence of significant differences ($p < 0.05$) when compared with all other values of the same subcellular distribution, independently of follicular size. The size and the atretic sub-group of each kind of follicle are indicated on the abscise.

1
2
3
4
5
6
7
8
9
10
11
12
13
14
15
16

Figure 3

Changes in specific activity of free and bound N-acetyl- β -D-glucosaminidase in granulose cells of growing and atretic follicles. (See Figure 2)

1
2
3
4
5
6
7 **Figure 4**
8

9 Representative flow cytometric DNA cell cycle distribution of PI stained ewe granulosa cells obtained from
10 one healthy follicle (group 1) (Fig. 4A) and one follicle of group 3b (advanced atresia) (Fig. 4B) both > 6
11 mm. Each histogram is divided into 4 sections: the first named traditionally A_0 , represents a distinct group
12 of cells with hypodiploid content of DNA. The other regions represent the phases G0/G1, S and G2+M of
13 the cell cycle. Each histogram, as measured by DNA-cytofluorometry, is a representation of all cells
14 analyzed from each granulosa cell sample such that cell percentages in each section can be calculated, these
15 percentages are indicated in each figure.
16
17
18
19
20

1
2
3
4
5
6
7
8
9
10
11
12
13
14
15
16
17
18
19

Figure 5

Agarose gel electrophoresis of DNA fragmentation in granulosa cells obtained from normal and atretic ewe follicles. After electrophoresis at 2 V/cm for 16 h the gels were stained with propidium iodide and observed under uv light using a digital image analyzer. Lane a, marker DNA. Lane b, DNA obtained from a non-atretic (group 1) 3-6 mm follicle. Lane c, DNA from an initially atretic (group 2) >6mm follicle. Lane d, DNA from an initially atretic (group 2) 3-6 mm follicle. Lanes e and f, DNA from group 3a follicles, >6mm and 3-6 mm respectively. Lane g, DNA from a group 3b follicle >6 mm.

Figure 6.

Log fluorescence dot plot cytofluorometric analysis of FITC-Annexin V and PI stained normal and atretic granulosa cells. Figure 6A presents a representative diagram of granulosa cells obtained from a non-atretic (group 1) follicle. Most of the cells are present in the lower left quadrant, exclude PI and are negative for Annexin V, and can be considered healthy granulosa cells. Some apoptotic, Annexin V positive-PI negative, granulosa cells can be observed. No necrotic cells, PI positive (upper right quadrant) are present. Figure 6B shows a representative diagram of granulosa cells obtained from a group 2, initially atretic follicle 3-6 mm: healthy (lower left quadrant), apoptotic (lower right quadrant) and necrotic (upper right quadrant) granulosa cells coexist.

