

T
1182

AA XOCHIMILCO SERVICIOS DE INFORMACION
ARCHIVO HISTORICO

124216

124216



Casa abierta al tiempo

UNIVERSIDAD AUTÓNOMA

METROPOLITANA

XOCHIMILCO/IZTAPALAPA

DIVISIÓN DE CIENCIAS BIOLÓGICAS Y DE LA SALUD

**“MECANISMOS DE MUERTE CELULAR EN LA MADURACIÓN Y
ATRESIA FOLICULAR EN LA OVEJA”**

T E S I S

QUE PARA OBTENER EL
GRADO DE DOCTOR EN
CIENCIAS BIOLÓGICAS
P R E S E N T A
MC. ALDO ISRAEL ALONSO POZOS

COMITÉ TUTORIAL:

TUTORA DRA. ANA MARÍA ROSALES TORRES

ASESOR DR. CARLOS GUTIÉRREZ AGUILAR

ASESORA DRA. MARTA ROMANO PARDO

MÉXICO, D.F.

JUNIO/2006

EL DOCTORADO EN CIENCIAS BIOLÓGICAS DE LA UNIVERSIDAD AUTÓNOMA METROPOLITANA PERTENECE AL PADRÓN DE POSGRADOS DE EXCELENCIA DEL CONACYT Y ADEMÁS CUENTA CON APOYO DEL MISMO CONSEJO, CON EL CONVENIO PFP-20-93.

EL PRESENTE TRABAJO DE TESIS SE REALIZÓ EN EL LABORATORIO DE BIOQUÍMICA DE LA REPRODUCCIÓN DE LA UNIVERSIDAD AUTÓNOMA METROPOLITANA UNIDAD XOCHIMILCO Y EL LABORATORIO DE BIOLOGÍA CELULAR Y CITOMETRÍA UNIDAD IZTAPALAPA.

CON EL APOYO:

DE BECA DOCTORADO OTORGADA POR EL CONACYT (REGISTRO 137889)

DE BECA POSGRADO UAM DE ALUMNO DE MAESTRÍA Y DOCTORADO EN PROCESO DE ELABORACIÓN DE LA IDÓNEA COMUNICACIÓN DE RESULTADOS DE TESIS Y UN FINANCIAMIENTO POR PARTE DE CONACYT (PROYECTO No – 37767-B)

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

Aldo Isrrael Alonso Pozos

El día 23 de Junio del año de 2006

Jurado:

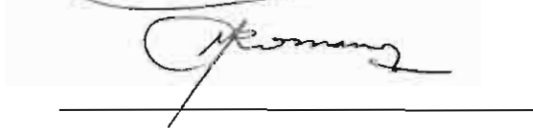
Tutora: Dra. Ana María Rosales Torres



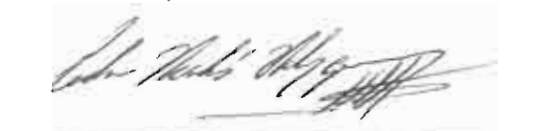
Asesor: Dr. Carlos Gutiérrez Aguilar



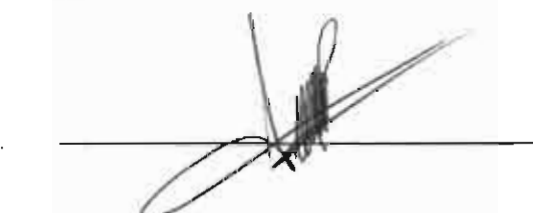
Asesora: Dra. Marta Romano Pardo



Sinodal: Dr. Pedro Nicolás Velásquez



Sinodal: Dr. Mario Pérez Martínez



DEDICATORIAS:

A la memoria de: Edgardo Alonso Pozos, Juan Pozos, Eufracia Parrado, Eligio Alonso y Rosita Leyte

A mis padres: Margarito Anatolio Alonso Leyte y Lucia Pozos Parrado

A mis hermanos: Abigail, Yubal y Eliseo

Al amigo incondicional que nunca se aparta de mi

A mi nueva familia: Lía, Itzel, Juana, Juan

A mi Familia por siempre: Eliberto, Eduardo, María, Vicente, Abril, Eric, Laura, Lesli, Ulises, Yolanda e (hija), Guillermo, Marisol, Hazael, Gaspar, Adriana, Ariel, Irán, Carolina, Gabriela, Antonio, Juana, Antonio (hijo), Walter, Aurora, Juan, Yesenia, Dafne, ILCE, Margarita, Miguel Ángel, Miguel Ángel (hijo), Gamaliel, Natividad, Aquetzali, Braian, Anabel, Luís, Anabel, Alberto, Rafael; Abigail, Pedro.

AGRADECIMIENTOS:

A LA DRA ANA MARÍA ROSALES TORRES

AL DR ADOLFO ROSADO GARCÍA

A LA DRA MARCELA VERGARA ONOFRE

AL DR CARLOS GUTIERREZ AGUILAR

ALA DRA MARTA ROMANO PARDO

A MIS COMPAÑEROS: Alejandro, Beatriz, Alicia, Román, Laura, Vanesa, Adrián, Ángel, Jesús, Pilar, Nayeli, Raquel, Marisela, Verónica, Andrés.

RESUMEN

La integridad del folículo depende de una apropiada irrigación que le permitan mantener el aporte de oxígeno a todos sus componentes celulares a pesar del acelerado crecimiento del mismo. La atresia folicular es la degeneración de los folículos anovulatorios y es el destino más común en el proceso de desarrollo folicular. En la atresia folicular se presenta muerte celular que puede ocurrir por apoptosis o por necrosis. En los últimos años se ha demostrado que junto con las gonadotropinas existen factores de crecimiento que modulan la angiogénesis folicular. Entre estos últimos, destaca el factor de crecimiento endotelio vascular (VEGF) del cual se conocen 4 isoformas con actividad biológica (VEGF120, VEGF164, VEGF188, VEGF205). Este estudio tuvo como propósito determinar la relación entre la expresión de VEGF con el tamaño folicular (folículos pequeños, 3-6 mm; o grandes >de 6 mm) y el tipo de muerte celular (necrosis o apoptosis) en células foliculares de ovejas.

Los folículos de ovejas se clasificaron por tamaño en dos grupos (3-6 mm y >6 mm) y por grado de atresia en folículos sanos (atresia 1), moderadamente atrésicos (atresia 2) y con atresia avanzada (atresia 3). La atresia se verificó por la relación estradiol/progesterona. Se realizó RT-PCR para mRNA de VEGF de sacos foliculares con células de granulosa (SCG) y sacos foliculares sin células de granulosa (SSG). La proporción de células en apoptosis o necrosis fue estimada por citometría de flujo, a través del potencial de membrana mitocondrial con rodamina (Rh123) como indicador de apoptosis y la integridad de la membrana lisosomal con naranja de acridina (AO) como indicador de necrosis. La concentración relativa de RNAm para VEGF en SCG fue mayor en folículos grandes que en los pequeños, mientras que en SSG, VEGF fue mayor en los folículos pequeños. La concentración relativa de VEGF fue

significativamente mayor en SCG de los folículos atrésicos que en sanos, sin embargo esto no ocurrió en SSG. Los mRNA de las isoformas detectadas en las células foliculares en orden de importancia fueron: VEGF120, 164 y 188. El mRNA para VEGF120 en SCG de ambos tamaños de folículo aumento significativamente de folículos sanos hacia moderadamente atrésicos ($p < 0.05$) para folículos pequeños (0.44 ± 0.17 vs 0.75 ± 0.025) y grandes (0.38 ± 0.030 vs. 0.45 ± 0.040). Los mRNA para VEGF120, 164 y 188 en los SCG de folículos grandes aumentaron significativamente de folículos sanos hacia moderadamente atrésicos, para las isoformas VEGF120 (0.38 ± 0.030 vs 0.45 ± 0.040); VEGF164 (0.36 ± 0.041 vs 0.45 ± 0.030) y VEGF188 (0.36 ± 0.019 vs 0.65 ± 0.045 $p < 0.05$). En los SSG, el mRNA de VEGF120, disminuyó significativamente conforme la atresia avanzó, mientras que el mRNA de VEGF164 aumentó de manera significativa ($p < 0.05$) en ambos tamaños de folículo. En la atresia de folículos de ambos tamaños co-existen células con mitocondrias y lisosomas permeabilizados. Sin embargo, en los folículos atrésicos pequeños predominan las células en apoptosis mientras que en los folículos grandes predominan las células con necrosis.

Los resultados de estos estudios nos indican que en los folículos pequeños moderadamente atrésicos en donde predomina la muerte por apoptosis, hubo mayor expresión del mRNA de VEGF120 que en los sanos. En contraste, en los folículos grandes donde el tipo de muerte fue principalmente por necrosis, el mRNA de las tres isoformas VEGF120, 164 y 188 fue mayor en los folículos con atresia inicial que en los sanos.

ABSTRACT

Follicle growth relies on a well developed vascular network and the appropriate diffusion of oxygen to all cellular compartments within the follicle, at the time of exponential follicle growth. Attrition is the most common fate of follicle development and cells died either by apoptosis or necrosis when atresia occurs. Recently it has been shown that factors, other than gonadotrophins, regulate follicle angiogenesis. The vascular endothelial growth factor (VEGF) is the most likely regulator of vascular growth within the follicle and has 4 known isoforms with biological activity. (VEGF120, VEGF164, VEGF188, VEGF205). In this study we examined the relationship between VEGF expression and follicular size and type of cell death (necrosis or apoptosis) in sheep ovarian follicles.

Ovarian follicles were dissected out and classified according to their size in small (3-6 mm) and large (>6 mm) and according to its apparent degree of atresia in healthy, mildly atretic and atretic follicles. Atresia classification was verified by the relationship between oestradiol and progesterone. The presence of mRNA for VEGF was determined by RT-PCR of follicle shells with (SCG) or without (SSG) granulosa cells. The proportion of apoptotic or necrotic cells was estimated by flow cytometry after the determination of an increase in mitochondrial membrane permeability with rhodamine 123 (Rh123) or an increase in lysosomal membrane permeability with acridine orange (AO). Messenger RNA for VEGF in SCG was greater in large than in small follicles. In contrast, in SSG VEGF was greater in small than in large follicles. mRNA expression was larger in atretic than in healthy follicle shells with granulosa, but not when the granulosa cells were excluded. mRNA isoforms detected in follicular cells were VEGF120, 164 and 188. VEGF120 increased in SCG in early stages of atresia of both small and large

follicles. Whilst for SCG from large follicles there was an increase in mRNA expression for VEGF120, 164 y 188 in early phases of atresia. In SSG, VEGF120 mRNA expression decreased, whilst VEGF164 mRNA expression increased in both follicle sizes as atresia progressed. It was observed that both types of cell dead were present in atretic follicles. However, in small atretic follicles apoptosis occurs more readily than necrosis.

In summary, our results show that in moderate atretic follicles where cell dead occurs preferentially by apoptosis, there is a higher expression of mRNA for VEGF120 in healthy follicles. In contrast, in large follicles, where cell dead occurs by necrosis, VEGF mRNA expression for isoforms 120, 164 and 180 was found to be greater in early atretic than in healthy large follicles.

Índice general

Introducción.....	1
1. Asociación entre proliferación y muerte celular durante el desarrollo folicular.....	3
2. Proliferación y muerte celular en el proceso de atresia folicular (degeneración del folículo del ovario).....	9
2.1. Mecanismos de muerte celular en la atresia folicular.....	13
2.1.1. Muerte celular.....	13
2.2.2 Características morfológicas de los diferentes tipos de muerte celular.....	15
2.1.2.1. Muerte celular por apoptosis.....	15
2.1.2.2. Muerte celular por necrosis.....	17
2.1.2.3 Muerte celular con características de apoptosis y necrosis.....	19
2.1.3 Organos intracitoplasmáticos en la decisión entre el tipo de muerte por necrosis y apoptosis.....	20
2.1.3.1 Lisosomas en el proceso de muerte celular.....	20
2.1.3.2 Mitocondria en el proceso de muerte celular.....	24
2.1.4 Tipos de muerte en las células de la granulosa durante la atresia folicular de la oveja.....	30
2.1.5 Pruebas utilizadas para medir muerte y viabilidad celular.....	33
2.1.5.1 Pruebas para medir muerte y viabilidad con base a los cambios	

de la membrana plasmática.....	33
2.1.5.2 Pruebas para medir muerte y viabilidad con base en los cambios del DNA.....	34
2.1.6 Tipo de muerte en las células de la teca durante la atresia folicular de la oveja.....	35
3 La angiogénesis durante el desarrollo folicular.....	36
3.1 El factor de crecimiento del endotelio vascular y la angiogénesis folicular.....	39
3.1.1 Gonadotropinas y el factor de crecimiento del endotelio vascular....	47
3.1.2 Estrógenos y el factor de crecimiento del endotelio vascular.....	49
3.1.3 Hipoxia, ayuno y el factor de crecimiento del endotelio vascular.....	49
3.2 Atresia folicular y el factor de crecimiento del endotelio vascular.....	50
Planteamiento del problema.....	54
Hipótesis.....	57
Objetivo general.....	58
Objetivos particulares.....	58
Material y métodos.....	59
Resultados.....	68
Discusión.....	85
Conclusiones.....	98
Bibliografía.....	99

Publicaciones derivadas del Doctorado.....	121
---	------------

Índice de tablas.

Tabla 1. Resumen de factores de crecimiento que se expresan para modular la proliferación y muerte de células foliculares durante el desarrollo del folículo del ovario.....	4
Tabla 2. Criterios de clasificación del grado de atresia en la oveja.....	11
Tabla 3. Miembros de la familia de Bcl-2 que modula a PT y al apoptosoma.....	28
Tabla 4 Participación de apoptosis y necrosis en células de la granulosa obtenidas de folículos preovulatorios de ovejas de diferente tamaño y grado de atresia, cultivadas con Anexina y Ioduro de Propidio.....	32

Índice de cuadros y figuras

Cuadro 1. Relación estradiol/progesterona en el líquido folicular de los folículos de oveja en diferentes tamaños y etapas del proceso de atresia.....	69
Cuadro 2. Concentración relativa de VEGF/ β -actina durante el desarrollo y atresia folicular de las ovejas.....	71

Cuadro 3. Abundancia relativa (VEGF/ β -actina) de diferentes isoformas de VEGF durante el desarrollo y atresia folicular de la oveja en sacos foliculares con o sin células de granulosa.....	73
Cuadro 4. Porcentaje de células de la granulosa incubadas con Rodamina 123 en diferentes intensidades de fluorescencia verde (530 nm).....	79
Cuadro 5. Intensidad de fluorescencia de 640 nm de las células de la granulosa incubadas con naranja de acridina.....	82
Figura 1. El desarrollo folicular de la oveja.....	7
Figura 2. Alteraciones de las membranas de los lisosomas y de la mitocondria...	22
Figura 3. Modelo propuesto para la estructura del PT.....	27
Figura 4. Concentración relativa de VEGF durante el desarrollo y atresia folicular de la oveja en saco con granulosa y en saco sin granulosa.....	74
Figura 5. Producto de RT PCR separado por electroforesis donde se muestran las isoformas de VEGF (A y C) en los diferentes tamaños 3-6 mm (carril 1, 2 y 3) y mayores de 6 mm (carril 4, 5, y 6) y grados de atresia (carril 1 y 4, atresia 1; carril 2 y 5, atresia 2; carril 3 y 6 atresia 3) y para β -actina (B y D).....	75
Figura 6. Análisis citofluorométrico de las células de la granulosa incubadas con rodamina 123 (Rh123) excitadas a 488 nm y la emisión se observó a 530 nm usando filtros apropiados.....	80
Figura 7. Análisis citofluorométrico de las células de la granulosa obtenidas de folículos de 3-6 mm de diámetro (A) > de 6 mm (B) y en tres diferentes grados de	

atresia incubadas con naranja de acridina.....	84
--	----

Introducción

La vida y la muerte parecen procesos antagónicos, por lo tanto hace difícil comprender que la muerte modula a la vida, incluso en procesos opuestos como el desarrollo y degeneración de tejidos existe interacción entre muerte y proliferación de células (Lai *et al*, 2005). El folículo ovárico de las ovejas es un claro ejemplo de una interacción entre la proliferación y muerte celular, la relación entre la proliferación y muerte celular es dinámica durante el desarrollo folicular y en degeneración del folículo. La degeneración folicular del ovárico, se conoce como atresia folicular, a diferencia de otros procesos degenerativos que causan una patología al tejido afectado, la atresia folicular no afecta la función del ovario o de otros folículos (Greenwald and Roy, 1994). La atresia folicular parece afectar con mayor incidencia a los folículos que tienen una gran tasa proliferativa como son los de mayor diámetro (Quirk *et al*, 2004).

En la atresia folicular de la oveja se observa la participación de dos tipos de muerte conocidas como apoptosis y necrosis, la participación preponderante de cada tipo de muerte depende del tamaño del folículo. En los folículos pequeños participa principalmente la muerte por apoptosis, mientras que en los folículos grandes es la necrosis el principal tipo de muerte (Rosales *et al*, 2000). La presencia de ambos tipos de muerte celular dentro del desarrollo y atresia folicular de la oveja así como en cultivos celulares *in vitro* hace suponer que ambos procesos de muerte pueden tener una vía en común. La vía en común para ambos tipos de muerte dentro del desarrollo folicular podrían ser similar a la observada en otros modelos donde se demuestra que la permeabilidad de las membranas mitocondrial y del lisosoma

pueden ejecutar el proceso de muerte celular (Zhao *et al*, 2003). Esos cambios en la permeabilidad de la membrana no están profundamente estudiados en el proceso de desarrollo y atresia folicular del ovario de las ovejas, por lo que en esta investigación se centró la atención a este rubro.

La atresia folicular es desencadenada por múltiples causas, uno de los primeros cambios que ocurren en el proceso de la atresia es la disminución de la irrigación y la muerte de las células de la granulosa (Jiang *et al*, 2003). Los estudios encaminados para comprender los mecanismos moleculares que modulan la formación de nuevos vasos sanguíneos así como la protección celular que mantiene íntegra a la capa granulosa, señalan al Factor de Crecimiento Endotelio Vascular (VEGF) como uno de los principales responsables de estos procesos (Shweiki *et al*, 1993). La expresión de este factor de crecimiento también está relacionada con el tamaño folicular (Taylor *et al*, 2004). En el humano y otras especies, al menos cinco isoformas con actividad conocida han sido reportadas de VEGF (VEGF121, VEGF145, VEGF165, VEGF189 y VEGF206) y según parece con acciones diferentes cada una de ellas. Las isoformas del factor de crecimiento endotelio vascular provienen de la codificación de ocho diferentes RNA mensajeros provenientes de un mismo gen (Cui *et al*, 2003). Resulta interesante conocer si existe relación entre el tipo de muerte celular preponderante en un folículo y la expresión de alguna isoforma de VEGF.

1. Asociación entre la proliferación y muerte celular en el desarrollo folicular

La relación entre la proliferación y la muerte celular se ha considerado como un mecanismo relevante que contribuye a la regulación de la vida (Morales, 2005). Existe una relación entre la proliferación y la muerte celular en los diferentes organismos pluricelulares que les permite mantener su estructura y el crecimiento organizado de órganos y tejidos (Lai *et al*, 2005). En organismos pluricelulares se observan claros ejemplos de una asociación entre la proliferación y la muerte. En el desarrollo embrionario se observan fenómenos masivos de proliferación y muerte que modelan a partir de una célula un ser pluricelular típico de cada especie (Flores-Pérez, 2002). En los tejidos adultos la relación entre proliferación y muerte celular determina el número de células de los epitelios, hepatocitos y de la epidermis (Soria-González and Orea-Solano, 2002). El desarrollo del folículo del ovario también es un claro ejemplo de la relación entre la proliferación y la muerte celular (Quirk *et al*, 2004).

Existe una relación íntima entre la proliferación y muerte celular que es modulada por factores de crecimiento (Schutte and Ramaekers, 2000). En el desarrollo folicular diversos factores de crecimiento controlan la proliferación y la muerte celular, en la Tabla 1, se muestra la acción de cada factor de crecimiento conocido hasta el momento durante el desarrollo folicular. En el desarrollo del embrión y en tejido adulto, la muerte ocurre con más frecuencia en los tejidos que están proliferando que en los que se encuentran quiescentes (Quirk, *et al*, 2004). Así mismo, el desarrollo del folículo ovárico de la oveja implica una serie de eventos altamente coordinados de crecimiento como consecuencia de la relación entre la proliferación y muerte de sus células (Greenwald and Roy, 1994).

Tabla 1. Resumen de factores de crecimiento que se expresan para modular la proliferación y muerte de células foliculares durante el desarrollo del folículo del ovario

Familia	Factor	Origen	Blanco	Acción	Cita
Superfamilia (SF) TGFβ/DPP	Proteína de la morfogénesis del hueso 4 (BMP4) y BMP8b	Ectodermo extraembrionario	Saco vitelino (SV)	División de la célula germinal primordial (CGP)	Ying et al, 2000
SF TGFβ	Factor de crecimiento transformante β (TGFβ)	Gónada (G)	CGP	Migración de CGP a la G	Ffranch-Coustant et al, 1991
SF PDGF	Ligando steel/kit (KL)	Se localiza en la senda del SV a la G	CGP.	Migración de CGP División de CGP	Kesher et al, 1991 Matsui et al, 1992
Desconocido	Desconocido	Red ovárica	Ovogonia (OG)	Meiosis de OG	Wassarman and Albertini, 1994
SF PDGF	Desconocido.	Desconocido.	Ovocito (OC)	Arresto de meiosis	Horie et al, 1991
SF TGFβ/Inhibina	Activina A	Granulosa (Gra) del folículo secundario (FS)	Folículo primordial (FPm)	Inhibe el reclutamiento inicial (RI)	Mizunuma et al, 1999
SF TGFβ/MIS	Sustancia Inhibitoria Mulleriana (MIS)	Gra de FP y folículo antral (FA)	FPm	Inhibe el RI	Durlinger et al, 2002
SF FGF.	Factor de crecimiento fibroblástico básico (bFGF)	OC	Gra del FPm	RI	Nilsson and Skinner, 2004
SF TGFβ/DPP	BMP-7, BMP-15.	OC	Gra del FPm	RI	Lee et al, 2001. Otsuka and Shimasaki, 2002
SF FGF/HGF	KL	Gra del FPm	OC Teca (TC) indiferenciada	RI Reclutamiento de TC	Yoshida et al, 1997 Parrott and Skinner, 2000
Familia EGF	TGF α	TC de FS	Gra de FS Endotelial de TC	Crecimiento Folicular lento (CFL) Angiogenesis	Roy and Greenwald, 1991 Schreiber et al 1986
Familia IGF	Factor de crecimiento insulinoide I (IGF-I)	Gra de FS	TC y Gra de FS	CFL	Zhou et al, 1991
SF FGF	bFGF	Gra de FS	Gra de FS	CFL	Parrott and Skinner, 1998

Webb et al, 2004

Saco vitelino (SV), célula germinal primordial (CGP), ovogonia (OG), granulosa (Gra), teca (TC), gonada (G), folículo primordial (FPm), folículo secundario (FS), folículo antral (FA), crecimiento folicular lento (CFL), reclutamiento inicial (RI), reclutamiento cíclico (RC).

Tabla 1. Continuación de tabla anterior...

Familia	Factor	Origen	Blanco	Acción	Cita
SF TGFβ/ Inhibina	Factor de diferenciación del crecimiento-9 (GDF-9)	OC FS	TC de FS	Desarrollo de TC interna y TC externa.	Elvin et al, 1999
Superfamilia TGFβ/ Inhibina	Activina A	Gra de FS	Gra de FS OC FPM Hipotálamo/hipófisis	CFL Maduración del OC Inhibe el RJ Reclutamiento ciclico (RC)	Findlay, 1993 Alak et al, 1996 Mizunuma et al, 1999 Amsterdam and Selvaraj, 1997
Familia EGF Familia IGF Familia FGF. Superfamilia TGFβ/ Inhibina	EGF/TGF α IGF-I bFGF Inhibina A	TC del FA Gra del FA Gra del FA Gra del FA	Gra del FA Teca del FA Teca del FA -Hipotálamo/hipófisis	Crecimiento folicular rápido y Selección del foliculo dominante	Webb et al, 2004 Rivera and Fortune, 2003

Webb et al, 2004

Con relación a la proliferación de las células, a la sensibilidad y la dependencia a las gonadotropinas; el desarrollo del folículo ovárico de la oveja, incluye cinco clases de folículos, los cuales se describen a continuación y se pueden observar en la figura número 1 (Scaramuzzi *et al*, 1993; Pesce and De Felici, 1994; McGee and Hsue, 2000; Richads, 2001).

1) Los folículos primordiales: Las células de la pregranulosa están quiescentes y forman una simple capa que rodean a un ovocito libre de zona pelúcida. La población de folículos primordiales constituye la poza de reserva que en la oveja está integrada por 40,000-300,000 folículos los cuales miden 0.03-0.07 mm, y están libres de vasos sanguíneos.

2) Los folículos “comisionados” (folículos primarios y secundarios): Las células de la granulosa proliferan lentamente y el folículo alcanza un tamaño de 0.03 a 0.20 mm en

aproximadamente 130 días. El crecimiento del folículo está relacionado con el aumento del tamaño del ovocito. Alrededor de 30 folículos son “comisionados” a crecer de una manera irreversible, abandonan el estado primordial en una secuencia ordenada para que finalmente sólo 25 inicien la formación del antro (Cahill and Mauleon, 1980).

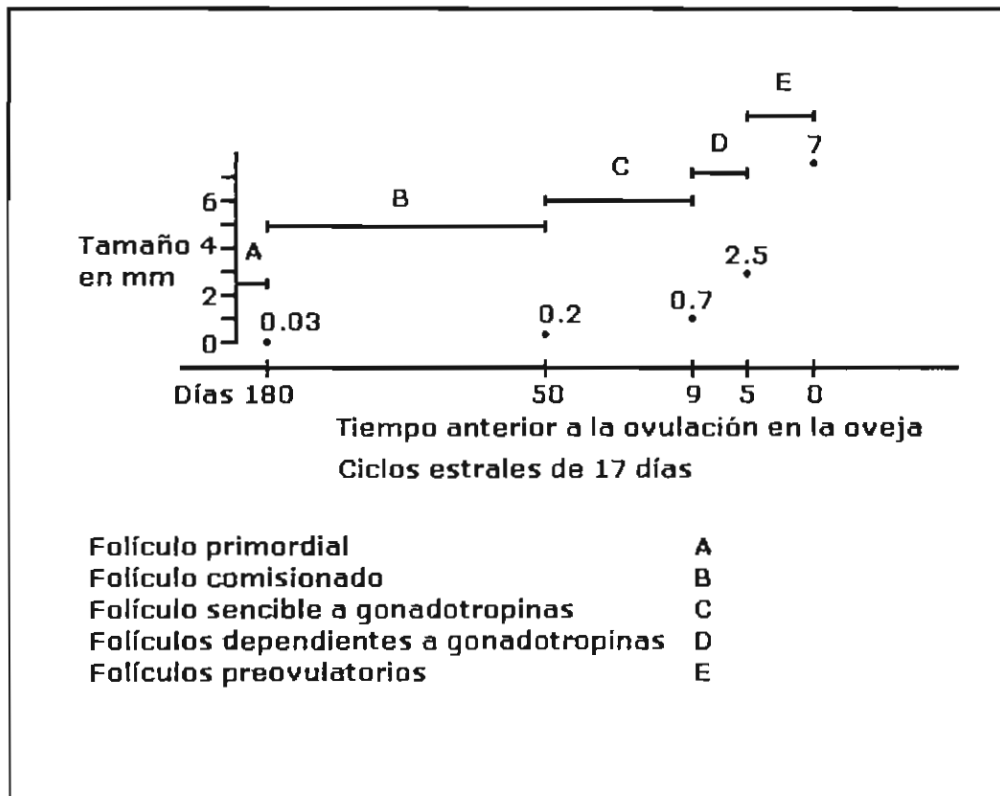


Figura 1. El desarrollo folicular de la oveja. Está acompañado de dos etapas de crecimiento, la primera etapa implica un crecimiento lento del folículo, en la segunda etapa hay un crecimiento rápido del folículo que está influenciado por las gonadotropinas y posiblemente finalice en una ovulación (Modificado de Scaramuzzi *et al*, 1993).

3) Folículos sensibles a gonadotropinas (folículo antral temprano): El ovocito no aumenta de tamaño por lo que el crecimiento del folículo depende de la acumulación de líquido folicular en el antro y de la proliferación de las células granulosas y la teca. El crecimiento es lento y tarda 30 días para aumentar de 0.2 a 0.7 mm. Estos folículos no dependen de gonadotropinas pero pueden responder a FSH. En los folículos más desarrollados, las células de la granulosa aromatizan los androgenos a estradiol acumulándose en el líquido folicular, esta actividad se incrementa en forma paralela al aumento de receptores a FSH (Scaramuzzi *et al*, 1993).

4) Folículos dependientes de gonadotropinas (folículos antrales tardíos). El crecimiento del folículo es rápido aproximadamente crece de 0.7 a 2.5 mm en cinco días. La tasa de proliferación de las células de la granulosa es la máxima cuando alcanza un diámetro de 0.85 mm. En esta etapa ocurre el proceso conocido como reclutamiento cíclico, el folículo sólo es sensible a FSH por un periodo de tiempo corto que en la oveja es al menos de 36-48 horas, donde FSH rescata a 5 de los 25 folículos sensibles a gonadotropinas, el resto de ellos degeneran. En este estadio de desarrollo las células de la granulosa producen estrógenos y aparecen los receptores a LH (LHR) (Scaramuzzi *et al*, 1993).

5) Folículos ovulatorios (folículos preovulatorios): El incremento en el tamaño del folículo ovulatorio es debido al aumento en el número de las células de la granulosa y a la acumulación del líquido folicular en el antro. Este crecimiento del folículo es rápido y requiere de 4 días para alcanzar un tamaño de 2.5 a 6.0 mm. De los 5 folículos dependientes de gonadotropinas sólo 1 ó 2 alcanzan esta fase. La actividad de la aromatización de las células de la granulosa es la máxima y por esta razón es la responsable de más del 90% de la concentración de estradiol en la circulación (Scaramuzzi *et al*, 1993).

2. Proliferación y muerte celular en el proceso de atresia folicular (degeneración del folículo del ovario)

Existen muchos ejemplos de procesos degenerativos que son iniciados por un incremento de la muerte celular, principalmente las enfermedades de Alzheimer, Parkinson, Huntington, esclerosis lateral amiotrófica, retinosis pigmentaria, epilepsia e infarto del miocardio (Price *et al*, 1998; Jiménez-del Río y Vélez-Pardo, 2001; Ogier-Denis and Codogno, 2003).

En los rumiantes, como en otros mamíferos, la atresia folicular ovárica es un proceso degenerativo extenso que se propaga en todo el folículo y por la cual este pierde su integridad estructural (Sharma, 2000; Chedrese, 2003). La atresia folicular puede ser iniciada y propagada por la muerte de las células foliculares (Clark *et al*, 2004). Actualmente se encuentra en controversia cual de las células foliculares inicia con la atresia aunque se mantiene la idea generalizada que inicia con la muerte de las células de la granulosa y algunos otros apoyan que se inicia con la muerte de las células endoteliales de la teca (Makrigiannakis *et al*, 1999, Clark *et al*, 2004)

Durante la atresia folicular, la muerte de las células foliculares sigue dos patrones degenerativos diferentes; en los folículos preantrales involucra cambios degenerativos que inician en el ovocito y continúa hacia las células de la granulosa, mientras que en los folículos antrales, donde se centró estudios, el proceso degenerativo inicia en la granulosa, continua en la teca y finaliza en el ovocito.

La habilidad para identificar con precisión los cambios degenerativos en el folículo es un prerrequisito si se desean realizar estudios de cualquier índole sobre la atresia folicular, para ello existen diferentes métodos que permiten diferenciar entre los folículos sanos y atrésicos:

- 1) Determinación de la atresia folicular con base en la relación en la concentración de esteroides. En todas las especies examinadas, incluida la oveja, el inicio y progresión de la atresia, se correlaciona con una caída en la síntesis de estrógenos acompañado por la mayor concentración de progesterona en el líquido folicular (McNatty *et al*, 1985). La atresia de los folículos ováricos de los rumiantes se ha determinado midiendo la concentración de E2 y P4 en el líquido folicular para estimar la relación E2/P4 para los folículos sanos que es >1.0 mientras que para los folículos atrésicos es de <1.0 . (Rosales *et al*, 2000; Jiang *et al*, 2003).
- 2) Determinación de la atresia por cuantificación de núcleos picnóticos en cortes histológicos de folículos. Los folículos sanos tienen $< 5 \%$ de células de la granulosa con núcleos picnóticos, mientras que los folículos atrésicos presentan $> 5 \%$ de células con núcleos picnóticos (Westhof *et al*, 1991).
- 3) Clasificación morfológica de la atresia sin fijar el tejido. Los criterios de clasificación, como los que se observan en la tabla 2 permiten claramente diferenciar los folículos sanos de los que son atrésicos, independientemente del tamaño del folículo antral. El método requiere que el folículo esté libre de tejido estromal y se realice con ayuda del microscopio estereoscópico (Moor *et al*, 1978; Rosales-Torres *et al*, 2000). Además claramente se ha

demostrado una adecuada correlación entre los criterios morfológicos con los criterios histológicos para identificar el grado de atresia en la oveja (Rosales-Torres *et al*, 2000).

Tabla 2. Criterios de clasificación del grado de atresia en la oveja. Principalmente se basan en la integridad de la capa de la granulosa, presencia del complejo cumulo-ovocito, irrigación de la capa de la teca y en la apariencia del folículo.

Atresia (Rosales-Torres <i>et al</i> , 2000)	Atresia (Moor <i>et al</i> , 1978)	Capa de la granulosa	Complejo cumulo-ovocito	Irrigación de capilares	Apariencia del folículo
1	I	Continua	Visible, unido a la pared del folículo	Abundante	Brillante
2	II	Áreas pequeñas discontinuas o desprendimientos	Visible, unido a la pared del folículo	Ligera disminución de la irrigación	Disminuye su brillo
3a	III	Áreas grandes con desprendimientos	Visible, unido a la pared del folículo	Disminución de la irrigación	Grisácea
3b	IV	Perforación extensa	Visible, pero separado de la pared del folículo	Ausentes	Grisácea
	V	Totalmente separada	Ausente	Ausente	Grisácea

La incidencia de la atresia en los folículos de ovejas es altamente dependiente del diámetro folicular, el 21% de los folículos pequeños son atrésicos, mientras que en los mayores de 6 mm el 93% son atrésicos (Carson *et al*, 1979). Esta relación de atresia y tamaño

folicular también ha sido encontrada en otras especies como en humano y mono (Hsueh, *et al*, 1994).

El oxígeno es absolutamente requerido para la supervivencia del tejido en crecimiento y en latencia, la insuficiente provisión de oxígeno aun cuando el déficit sea transitorio puede producir un daño celular irreversible (López-Barneo *et al*, 2001). La distancia a la que el oxígeno puede difundir dentro de un tejido que consume oxígeno es muy corta, típicamente está dentro de un rango de 20-100 μm . La necesidad para un suplemento adecuado de oxígeno a todas las partes del tejido es un requerimiento funcional que puede ser satisfecho por estructuras del sistema vascular (Zakrzewicz *et al*, 2002). El sistema vascular del folículo preovulatorio se encuentra en las tecas, no invade a la capa basamental y a las células de la granulosa, se considera como una estructura multicelular libre de sistema vascular (Neeman *et al*, 1997). El medio intrafolicular es caracterizado por tener una baja concentración de oxígeno, una condición que es muy evidente para los folículos preovulatorios, el gas debe difundir de los vasos presentes en la teca a través de la capa basal hacia la capa de la granulosa y acumularse dentro del líquido folicular. Las células del folículo y el ovocito se han adaptado a este medio ambiente por una extrema sensibilidad al estrés oxidativo (Van Blerkom *et al*, 1997). Al aumentar de tamaño, el folículo aumenta su capacidad esteroideogénica y con ello el estrés oxidativo. Los requerimientos metabólicos para estimular este proceso puede repercutir en la formación anormal de especies óxido reactivas, especialmente cuando el NAPH pierde electrones hacia el O_2 para formar O_2^- y este no es liberado a la P450 reductasa (Cross and Jones, 1991).

2.1. Mecanismos de muerte celular en la atresia folicular

2.1.1. Muerte celular

La muerte celular es un proceso que culmina con la actividad metabólica. En contraste a la quiescencia, que se caracteriza por el descenso de muchas actividades metabólicas, los cambios que acompañan a la muerte son irreversibles. Con frecuencia en el proceso de muerte celular es difícil definir el momento donde los cambios son irreversibles es decir en que momento la célula pasa al punto sin retorno del proceso de muerte (Darzynkiewicz *et al*, 1997).

De experimentos *in vitro* ha surgido la evidencia que ha permitido dividir el proceso de muerte celular en tres fases:

1. La fase de inducción: El proceso de muerte puede ser activado o inhibido por una gran diversidad de señales tanto internas como externas que se encuentran selectivamente en cada tipo celular. Las señales que inhiben la muerte celular pueden estar ausentes o bien las señales que activan pueden sobrepasar la señal que inhibe y favorecer su entrada a un umbral crítico que inicia el proceso de muerte (Ramírez-Camond *et al*, 1999). Algunas señales que inhiben la muerte de las células de la granulosa son las gonadotropinas, el factor de crecimiento insulinoide, la interleucina 1β , el factor de crecimiento epidermal, el factor de crecimiento fibroblástico básico, TGF- α , Bcl-2 y Bcl-xlong entre otras. Algunas señales que activan la muerte de las células de la granulosa incluyen a TGF- β , IL-6, androgenos, especies oxígeno reactivas, Bax, antígeno Fas, p53, TNF y caspasas (Hussein, 2005).

2. La fase efectora: Todas las señales de muerte converge en un integrador y ejecutor central. El ejecutor central desencadena el proceso de muerte celular en forma irreversible, por lo que puede considerarse como el punto sin retorno del proceso de muerte celular (Kroemer *et al*, 1998).

Actualmente se encuentra en debate cual de los organelos intracitoplasmático puede participar como ejecutor central, pero se ha postulado la participación preponderante de la mitocondria y de los lisosomas. La mitocondria tiene un papel clave como integrador y ejecutor central que puede activar la vía de la muerte por necrosis o por apoptosis (Van Loo *et al*, 2002). Paradójicamente, la mitocondria es un organelo esencial para muchos procesos para la supervivencia de la célula principalmente por la producción de energía en forma de ATP, control redox y la homeostasis del calcio (Kim *et al*, 2003). También los lisosomas tienen un papel clave como integradores y ejecutor central del proceso de muerte que puede activar tanto el proceso de necrosis como el de apoptosis (Sohn *et al*, 2003). Incluso se ha propuesto la participación simultánea de la mitocondria y del lisosoma como ejecutor de muerte celular a través de la teoría del eje lisosoma/mitocondria en el proceso de muerte celular (Zhao *et al*, 2003). No hay estudios que establezcan una relación entre la participación de los lisosomas y las mitocondrias en el proceso de muerte celular en la atresia y desarrollo folicular en la oveja.

3. La fase de degradación: Las proteínas efectoras de la muerte celular son activadas en esta fase, en la apoptosis las proteasas son específicas, éstas degradan parcialmente y selectivamente los componentes de la célula (Newmeyer and Ferguson-Miller, 2003). Por el contrario, en el caso de la necrosis, las proteasas son inespecíficas y degradan a todos los constituyentes de la célula (Yamashima, 2000).

2.1.2 Características morfológicas de los diferentes tipos de muerte celular

2.1.2.1. Muerte celular por apoptosis

La muerte por apoptosis es un proceso activo, es un mecanismo altamente regulado por un programa genético de la célula, puede ser comparada a un suicidio celular. El término de apoptosis se propuso por Kerr *et al*, (1972) para describir un tipo de muerte celular caracterizado por el encogimiento de la célula y a la marginación de la cromatina hacia la capa nuclear, lo cual crea figuras curvas que ha sido descritas como medias lunas o también como pétalos, por lo que se le nombró apoptosis que es un término de origen griego para referirse a la caída de los pétalos de las flores. En la actualidad se han utilizado como sinónimos los términos de apoptosis y de muerte celular programada (PCD), sin embargo, es inadecuado utilizarlos como sinónimos, puesto que la PCD requiere de un programa genético que decide cuando iniciar con la muerte, mientras que la apoptosis es uno de los varios programas de muerte que puede ser activado por el programa genético de la PCD. El programa genético de la PCD se activa en un tiempo determinado y también puede activarlo algunos estímulos o factores endógenos o exógenos. Uno de los principales mediadores de la muerte por apoptosis es la actividad de las caspasas (citosólica aspartato proteasasa específicas) (Kerr *et al*, 1972).

Las características morfológicas de la muerte por apoptosis se han descrito en numerosos tipos celulares bajo una gran variedad de condiciones experimentales y fisiológica, incluyen principalmente la liberación de la célula de la matriz extracelular, la célula adopta una forma redonda, el citoplasma se condensa, la cromatina nuclear se condensa en grumos densos que se desplazan hacia la superficie de la membrana nuclear y además se fragmenta en

los espacios internucleosomales para producir fragmentos de 180-200 pb y sus múltiplos. La membrana nuclear permanece intacta, aunque se produce una redistribución de los poros nucleares. Estos cambios se asocian con alteraciones de las proteínas nucleares que son degradadas. Se ha demostrado alteraciones en la topoisomerasa, las proteínas de la lámina o nucleares reguladoras de la mitosis. El núcleo se fragmenta (cariorraxis) y forma múltiples fragmentos de diferentes tamaños que parecen gotas que tienen DNA y se dispersan por todo el citoplasma. Si bien en la muerte por apoptosis aparentemente no hay lesiones graves de la membrana citoplasmática lo cierto es que se deforma y sufre numerosos abombamientos, así como pérdida de la asimetría, aparición de sitios de unión a trombospodina y pérdida de residuos de ácido siálico. En los estadios finales, la membrana plasmática se fusiona para empaquetar y envolver los constituyentes del citoplasma así como los fragmentos nucleares para formar los denominados cuerpos apoptóticos. Los cuerpos apoptóticos son eliminados al entorno extracelular, donde son endocitados por células fagocíticas o por las células vecinas, lo que evita la lesión y la consiguiente respuesta inflamatoria. De estudios *in vitro* donde se inhibe la endocitosis de las células vecinas y por consiguiente no se eliminan los cuerpos apoptóticos, estos continúan con la muerte por necrosis y se conoce como necrosis secundaria (Crompton, 1999; Bouchier-Hayes *et al*, 2005).

2.1.2.2. Muerte celular por necrosis

La palabra necrosis, proviene del término griego *nékrosis* que significa mortificación, también se ha llamado muerte celular accidental y puede pensarse como un asesinato de la célula. La necrosis se observa cuando las células mueren por un traumatismo grave y súbito. La célula necrótica presenta un núcleo condensado que es altamente basófilo (se tiñe con hematoxilina). El sitio de mayor daño está localizado en la membrana plasmática, se observa principalmente la ruptura y los cambios en la permeabilidad que finalmente edematizan a la célula, por ello que se ha propuesto el término de oncosis “hinchazón” para designar este tipo de muerte celular. La célula necrótica libera su contenido citoplásmico hacia el tejido subyacente, donde su presencia desencadena una reacción inflamatoria. La muerte es pasiva y desencadenada por una perturbación en el medio ambiente más que por un programa genético de la célula (Kitanaka and Kuchino, 1999).

Dentro del proceso de necrosis se observa una disminución de la concentración de ATP citoplasmático, principalmente por la apertura desregulada del poro de permeabilidad mitocondrial. (He and Lemasters, 2002) y por la actividad de la poli-(ADP-ribosa) polimerasa (PARP), una enzima que consume ATP al reparar el daño al DNA (Gobell *et al*, 2001). La disminución de ATP tiene como principales consecuencias:

1) Una pérdida de permeabilidad selectiva de la membrana plasmática: Principalmente una entrada de Na^+ y una pérdida de K^+ por disminución de la actividad de la ATPasa de $\text{Na}^+\text{-K}^+$, como consecuencia hay una entrada masiva de H_2O al citoplasma que causa la hinchazón de la célula. Hay alteración del potencial de membrana que favorece la entrada de calcio libre hacia

el interior de la célula como consecuencia de la apertura de canales de calcio dependientes de voltaje, así como la apertura de un canal de calcio heterodimérico formado por el receptor acetilcolina nicotínico 7 (RACN-7) y DES-2 aunado a la inhibición del rectificador de la concentración de calcio de la membrana plasmática dependiente de ATP (PMCA) (Ono *et al*, 2003). El incremento de calcio citosólico libre activa a las fosfolipasas unidas a la membrana, que degradan los fosfolípidos de la membrana y le causan perturbaciones, así mismo se observa una activación de calpaina que causa daño a la membrana lisosomal, liberación de sus enzimas y como consecuencia una rápida desintegración de la célula (Yamashima, 2000). Las desoxiribonucleasas lisosomales digieren el DNA en fragmentos de diferente tamaño.

2) La pérdida de la asimetría de la membrana citoplasmática se manifiesta por la exposición de fosfatidilserina en la cara externa y la fosfatidiletanolamina en la cara interna de la membrana. En las células normales los fosfolípidos se distribuyen asimétricamente en la membrana plasmática, la fosfatidiletanolamina se encuentra principalmente en la cara externa, mientras que la fosfatidilserina se localiza casi completamente en la cara interna de la membrana plasmática. El mecanismo por el cual se expone la fosfatidilserina involucra la inhibición de la flipasa traslocasa aminofosfolípido dependiente de ATP y por la activación de Bid por un mecanismo aun desconocido (Vermes *et al*, 1995).

2.1.2.3 Muerte celular con características de apoptosis y necrosis

Se ha establecido la hipótesis de que las caspasas son determinantes críticos de las características morfológicas de la muerte celular por apoptosis, pero no necesariamente implica que esto sea un determinante entre la vida y la muerte en un programa de muerte celular. En estudios donde se inhibe artificialmente la activación de las caspasas se observa una ausencia de características morfológicas de apoptosis, pero no una inhibición propia del proceso de muerte, el cual puede continuar por necrosis (Kitanaka and Kuchino, 1999).

Se ha observado que el proceso de muerte celular no siempre se acompaña por características clásicas de apoptosis o de necrosis. Diversos ejemplos de muerte celular se han descrito en los que las características morfológicas o bioquímicas no son típicas ni de apoptosis ni de necrosis sino que tienen ambas características (Darzynkiewicz *et al*, 1997). En algunos casos, la integridad de la membrana plasmática se preserva, pero se observa una degradación del DNA característico de necrosis. En otras situaciones, la degradación del DNA puede presentar un patrón típico de apoptosis (escalera), pero la célula muestra otras características de necrosis. Estas observaciones hacen suponer que la célula posee ambos programas de muerte celular, pero que en algunas situaciones pueden activarse separadamente y dar como resultado características típicas de los procesos de muerte, sin embargo también puede activarse los dos programas parcialmente y con esto se apreciarían características de ambos tipos de muerte (Darzynkiewicz *et al*, 1997).

2.1.3 Organelos intracitoplasmáticos en la decisión entre el tipo de muerte por necrosis y apoptosis

El folículo de las ovejas es un claro ejemplo de un modelo de estudio donde participan simultáneamente el proceso de muerte celular por apoptosis y por necrosis. Se considera en este trabajo que el tamaño del folículo influye tanto en la incidencia de la atresia folicular como en el tipo muerte celular. En la oveja no hay estudios que relacionen los cambios en la permeabilidad de los lisosomas y de la mitocondria con respecto al tamaño del folículo.

2.1.3.1 Lisosomas en el proceso de muerte celular

Los lisosomas son organelos citoplasmáticos delimitados por membrana. En su interior tiene un pH de 4-5 y contienen alrededor de 60 diferente hidrolasas identificadas hasta el momento, con actividad catalíticas como las fosfatasas, nucleasa, glicosidasas, proteasas, peptidasas, sulfatasas y lipasas, que son capaces de digerir todas las macromoléculas de la célula (de Duve, 1983; Cuervo and Dice, 2000). Las catepsinas corresponden a las hidrolasas lisosomales que más se han estudiado. Se han dividido en tres subgrupos de acuerdo a la presencia de un aminoácido en su sitio activo, las catepsinas cisteina (B, C, H,F, K, L, O, S, V, W y X/Z), las catepsinas aspartato (D y E) y las catepsinas serina (G) (Rawlings *et al*, 2004). Todas ellas tienen una buena actividad a pH de 4-5; pero otras tienen actividad a pH neutros como el contenido en el citoplasma, aunque puede existir un descenso en su estabilidad o puede estar acompañado de alteraciones en su especificidad o de ambos.

En el proceso de muerte celular por necrosis hay una ruptura de la membrana lisosomal, lo cual libera todo su contenido hacia el citosol, principalmente las catepsinas y otras enzimas hidrolíticas que son las ejecutoras principales de la muerte (Fukuda *et al*, 1993; Syntichaki and Tavernarakis, 2002).

Permeabilización de la membrana lisosomal (LMP). Por estudios donde se daña la membrana lisosomal artificialmente con detergentes (como la esfingosina o Leu-Leu-Ome), estrés oxidativo (usando peróxido de hidrogeno o con daño fotooxidativo) y con antibióticos que se unen a la membrana lisosomal, se ha podido conocer que la LMP puede desencadenar tanto la apoptosis como la necrosis (Kroemer and Jäättela, 2005). Según los autores existe una relación entre la extensión de la ruptura de la membrana lisosomal y el modo de muerte celular. De acuerdo a este modelo, una limitada liberación del contenido lisosomal puede desencadenar la muerte por apoptosis, mientras que una ruptura generalizada de la membrana lisosomal desencadena la necrosis celular (Kågedal *et al*, 2001). Cabe señalar que la vía de muerte lisosomal no está limitada a modelos experimentales, la LMP también participa en la ejecución de la muerte celular que es inducida por la activación del receptor de muerte (Brunk and Svensson, 1999).

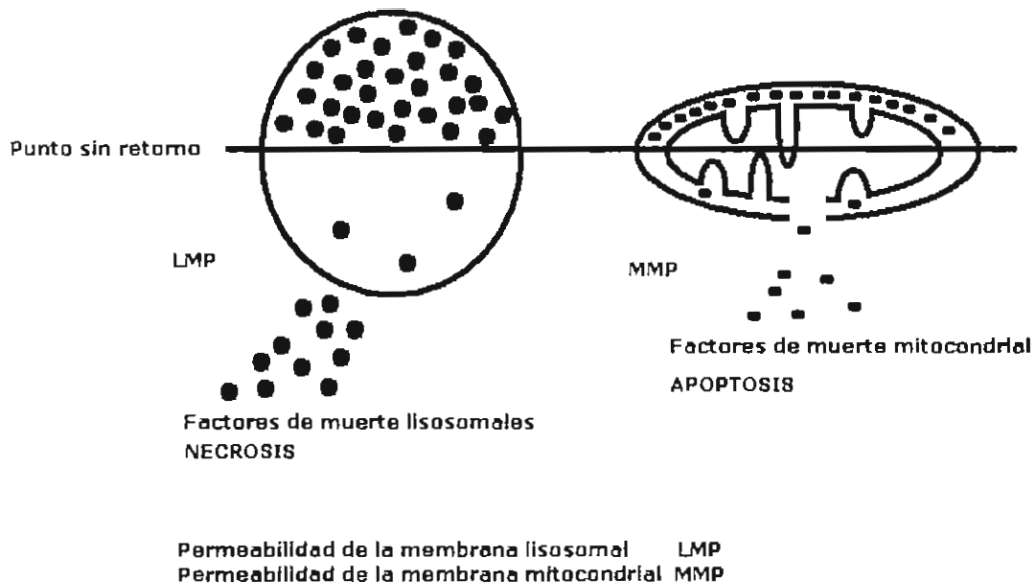


Figura 2. Alteraciones de las membranas de los lisosomas y de la mitocondria. Se consideran como el punto sin retorno del proceso de muerte, los factores de muerte liberados por la permeabilidad de la membrana lisosomal (LMP) modulan el tipo de muerte por necrosis, mientras que los factores de muerte liberados por la permeabilidad de las membranas mitocondriales (MMP) está involucrada en modular el tipo de muerte por apoptosis (Kroemer and Jäättela, 2005).

Si la LPM resulta en una liberación selectiva de ciertas catepsinas o si todas las enzimas lisosomales son liberadas simultáneamente del lumen lisosomal no se conoce con precisión. El análisis de células tratadas con taurosporina cargadas con partículas de dextran que incrementan su tamaño, marcadas con isotiocinato de fluoresceína (FITC) sugieren una liberación selectiva, basado sobre el tamaño molecular. Esta hipótesis también es apoyada porque otro autor ha encontrado la presencia en el citoplasma de moléculas de 40 kDa más que moléculas de 200 kDa (Kroemer and Jäättela, 2005).

La integridad de la membrana lisosoma se puede medir de dos maneras, la primera consiste en medir la presencia y actividad de una enzima característica del lisosoma, en el citoplasma, las enzimas características pueden ser la fosfatasa ácida (Rosado *et al*, 1977; Yasuda *et al*, 2000; Rosales Torres *et al*, 2000) y β -galactocdasa (Zhao *et al*, 2001). Así mismo se puede utilizar algunas propiedades de algunos fluorocromos para poder medir los cambios membranales lisosomales, principalmente el uso del naranja de acridina (AO) que es lipofílico, es una base débil que se ha considerado como un agente lisosomotrópico (Traganos and Darzynkiewicz, 1994). Dentro de este grupo encontramos al Lyso Tracker Red que tiene las mismas propiedades que el AO (Chen *et al*, 2005). El AO tiene un propiedad en su estado nativo es lipofílico y es capaz de atravesar las membranas celulares, pero entrando en los lisosomas con pH ácidos y siendo AO una base débil acepta los protones y cambia sus propiedades lipofílicas a hidrofílicas de tal forma que puede quedar atrapado dentro del lumen lisosomal (Traganos y Darzynkiewicz 1994). En el lumen lisosomal, AO forma agregados que emiten una fluerecencia roja, puede observarse una relocalización de AO en el citoplasma de

las células que presentan cambios en la permeabilidad de la membrana lisosomal sin que estas presenten cambios ultraestructural (Roberg *et al*, 1999).

2.1.3.2 Mitocondria en el proceso de muerte celular

La mitocondria es una estructura que está constituida por una membrana exterior y una membrana interior, la membrana interior está plegada y forma crestas. El espacio entre las dos membranas se llama espacio intermembranal y el espacio ubicado en el interior de la membrana interna recibe el nombre de matriz. La mitocondria es la unidad generadora de energía en la célula, en la matriz mitocondrial se localizan las enzimas del ciclo de Krebs, de la beta oxidación, mientras que en la membrana interna mitocondrial se localizan los complejos de la cadena oxidativa (Balaban, 1990).

Mitchell (1961) sugirió que en la membrana mitocondrial interna los electrones son transferidos a través de los complejos de la cadena de fosforilación oxidativa hasta el O₂ en una serie de reacciones acopladas de óxido-reducción que producen una translocación de protones hacia el espacio intermembranal mitocondrial para generar un diferencial de potencial electroquímico necesario para la síntesis de ATP. Este potencial electroquímico que recibe el nombre de delta Psi ($\Delta\psi$) está constituido por la distribución asimétrica de los protones que generan tanto como un gradientes de concentración como un gradiente eléctrico (Chen and Smiley, 1993).

Diversas señales de muerte celular convergen sobre las membranas de la mitocondria para inducir cambios en la permeabilidad de la membrana mitocondrial (MMP) (Ferri and

Kroemer 2001). La MMP se ha considerado como un mecanismo fundamental en el proceso de muerte por apoptosis y necrosis (Crompton, 1999). La MMP favorece una caída del $\Delta\psi$, una liberación de proteínas desde el espacio intermembranal mitocondrial como las procasasas 2, 3, 8 y 9 (Van Loo et al 2002), así como de Smac/Diablo, Omi/HtrA2, la MMP puede desencadenar un descenso en los niveles de ATP acompañado con un aumento en la producción de especies óxido reactivas (Bratton *et al*, 2001; Verhagen *et al*, 2002;).

La MMP implica la apertura de un megacanal mitocondrial que se conoce como poro de permeabilidad mitocondrial de alta conductancia (PT), el cual es un complejo de proteínas que ponen en contacto la membrana externa con la membrana interna (Zanzami and Kroemer, 2001). Los principales componentes de PT son: una proteína de la membrana mitocondrial interna, la adenina nucleotido traslocador (ANT), una proteína de la membrana externa, porin o canal aniónico dependiente de voltaje (VDAC), proteínas del citosol como la hexocinasa, proteínas del espacio intermembranal mitocondrial como la creatincinasa y la ciclofilin D que es una proteína de la matriz mitocondrial.

El PT puede estar cerrado o abierto, diversos miembros de la familia de Bcl-2, que se describen en la tabla 3, pueden modular a PT. En condiciones fisiológicas el PT esta cerrado, VDAC regula el movimiento de sustancias a través de la membrana mitocondrial externa mientras que el ANT intercambia ADP del espacio intermebranal por ATP de la matriz mitocondrial. Al inicio del proceso de muerte se abre el PT y dependiendo de la intensidad del estímulo, la conductancia de PT puede estar regulada para estímulos moderados o puede estar desregulada para los estímulos intensos, así como por miembros de Bcl-2 (He and Lemasters,

2002). Como se observa en la figura 3, este evento es clave para decidir si la célula muere por apoptosis o necrosis.

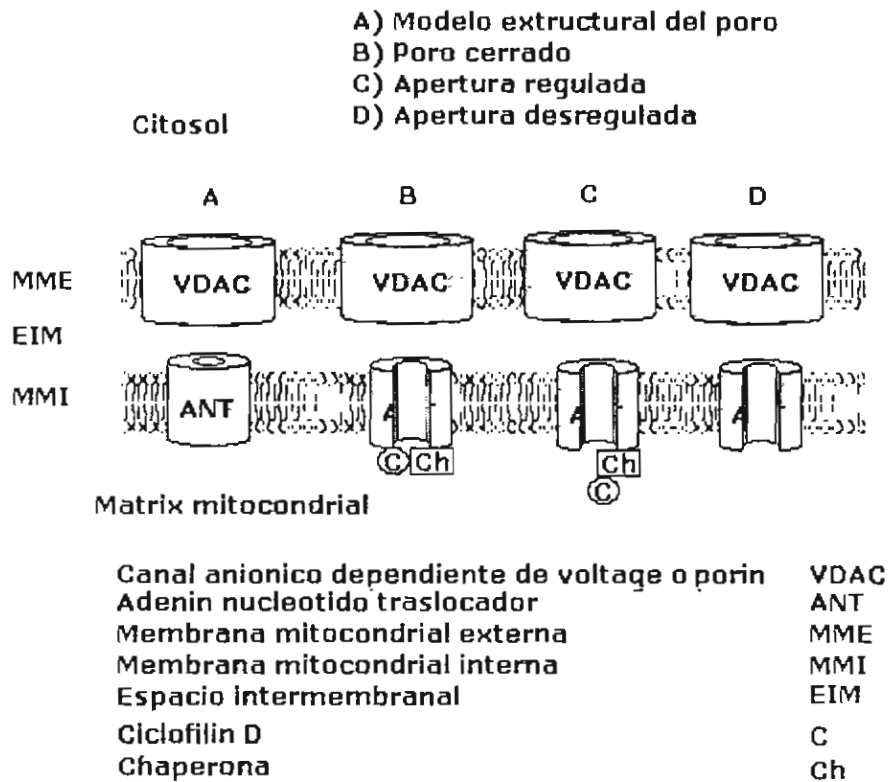


Figura 3. Modelo propuesto para la estructura del PT. Este está formado principalmente por el canal anionico dependiente de voltage o porin de la membrana mitocondrial externa y el adenin nucleotido traslocador ANT de la membrana mitocondrial interna. El PT puede estar cerrado, abierta en forma regulada o desregulada. La intensidad del estimulo de muerte influye en la magnitud de la apertura de PT y en el tipo de muerte celular (He and Lemasters, 2002).

Tabla 3. Miembros de la familia de Bcl-2 que modula a PT y al apoptosoma. El apoptosoma es un complejo multiprotéico formado por 8 Apaf-1 y 8 procaspasas-9, en condiciones fisiológicas la procaspasas-9 está unida a proteínas inhibidoras de apoptosis a (IAP) , que inhiben la unión de procaspasa-9 al apoptosoma, La PT libera factores del espacio intermembranal que favorecen la formación del apoptosoma como Smac/Diablo, Omi/HtrA2 liberan a la procaspasa-9 de IAP y junto con el citocromo c que activa al apoptosoma (He and Lemasters, 2002).

MOLÉCULA	FUNCIÓN	ACCIÓN
Miembros de Bcl-2 que inhiben la apertura de PT Bcl-2, Bcl-w, Mcl-I, Bfl-1 y Ced-9 Bcl-xL y Diva/Boo	Unión con VDAC y ANT Unión con factor inductor de la apoptosis 1 (Apaf-1)	Inhibe la apertura de PT Inhibe la formación del apoptosoma
Miembros de Bcl-2 que se localizan en la membrana mitocondrial y que abren a PT Bax, Bak, Bok, Bcl-xS, Blk, Harakiri/DP5, NIP3L/Nix y NIP3	Unión con VDAC y ANT	Abre el PT y se favorece la liberación de Cit C y la activación del apoptosoma
Miembros de Bcl-2 que se localizan en el citoplasma en forma inactiva y tienen que ser degradados para activarse Bad, Bod/Bim, Bid, Bik, Bmf, Bnip3, Noxa, Puma y Spike.	VDAC y ANT	Abre el PT y se favorece la liberación de Cit C y la activación del apoptosoma
Citocromo C (Cit C) liberado por la MMP	Apoptosoma	Activa al apoptosoma
Smac/Diablo y Omi/Htr A2 liberados por la MMP	Unido a Procaspasa-9	Inhibe a XIAP y favorece la formación del apoptosoma
Inhibidor de la apoptosis IAP y XIAP	Unión con Procaspas-9	Inhibe la formación del apoptosoma

Existen pruebas para medir indirectamente los cambios en la permeabilidad mitocondrial, principalmente metodologías que miden cambios en el potencial de membrana mitocondrial, entre se encuentra algunos fluorocromos como la rodamina 123 (Rh123) emite en la escala de verdes, tiene una carga positiva y puede difundir por la membrana mitocondrial lo que le permite ser atraído o expulsado de la matriz mitocondrial con base en los cambios en el potencial de la membrana mitocondrial. Otro fluorocromo utilizado para medir el potencial de membrana mitocondrial es el 5,5',6,6'-tetracloro-1,1',3,3'-tetraetil-benzimidazol-carbocianina iodide (JC-1) tiene las mismas propiedades que Rh123, pero al acumularse en el interior de la matriz mitocondrial forma agregados que emiten luz de color rojo. Si disminuye el potencial de membrana disminuye la formación de agregados de JC-1 y cambia a color verde (Reers *et al*, 1991; Troyano *et al*, 2001).

Esquemáticamente, la extensión del daño a la membrana de los lisosomas y la mitocondria puede inducir la muerte por necrosis si el daño es muy extenso o por apoptosis cuando es poco extenso. La inducción de la muerte celular por apoptosis requiere de MMP pero a menudo requiere de una interacción entre LMP/MMP. La muerte por necrosis primero requiere de una LMP con una subsecuente MMP (Guicciardi *et al*, 2004).

La opción entre necrosis y apoptosis puede depender de la intensidad del estímulo que está provocando la agresión, por ejemplo en células leucémicas L1210 que se trataron con el agente fotosensible clororin 6 triacetoximentil éster, a baja dosis causó MMP y desencadena la apoptosis, mientras que a altas dosis provocó LMP y la muerte por necrosis (Kessel and Poretz, 2000).

2.1.4 Tipos de muerte en las células de la granulosa durante la atresia folicular de la oveja

Algunos estudios en la oveja han establecido que las células de la granulosa durante la atresia folicular mueren principalmente por apoptosis. Esto ha sido demostrado al medir la degradación interoligonucleosomal del DNA de las células de la granulosa de ovejas y otras especies de mamíferos y aves (Jolly *et al*, 1997). La apoptosis también está presente en otros tipos de células del ovario de la oveja principalmente en las células lúteas durante la regresión del cuerpo lúteo, así como en las células de la superficie del ovario y en las células apicales durante el proceso de ovulación (Sawyer *et al*, 1990).

En la oveja la atresia de folículos dependientes de gonadotropinas es inducida por la inyección de fluido folicular de bovino (bFF) a las 12 horas del tratamiento se observa la fragmentación interoligonucleosomal del DNA de las células de la granulosa, a las 24 h pérdida de la actividad de la aromatasa y pérdida de la respuesta de LH. Estos resultados indican que las células de la granulosa comienzan a morir por apoptosis antes que haya un apreciable descenso en la capacidad de las células de la granulosa para responder a los gonadotropinas o a la síntesis de estradiol. Parece que un incremento en la incidencia de la apoptosis de las células de la granulosa es un evento muy temprano durante la atresia (Jolly *et al*, 1996).

Las descripciones histológicas como los núcleos picnóticos, la cariorresis y la formación de cuerpos apoptóticos frecuentemente se aplican a cambios celulares que ocurren durante la atresia, pero no necesariamente son específicos de la muerte celular por apoptosis.

Las características morfológicas de la muerte de las células de la granulosa durante la atresia no se han descrito específicamente en el contexto de cambios conocidos que ocurren durante el proceso de apoptosis (Kerr *et al*, 1994).

En un estudio en el cual se midió en células de la granulosa de folículos de oveja la participación diferencial de la muerte por necrosis y apoptosis por un análisis bivariado utilizando yoduro de propidio como indicador de permeabilidad de membrana y a la Anexina V como indicador de la pérdida de asimetría de la membrana celular, así como por la presencia de enzimas lisosomales en forma libre, se demostró la participación de la apoptosis y de la necrosis dentro del desarrollo folicular y la atresia en la oveja (Rosales-Torres *et al*, 2000; ver tabla 4). Este estudio no está en contradicción con los anteriores puesto que hay que recordar que en algunas situaciones puede existir la presencia de características de ambos tipos de muerte y además como se describe adelante algunas metodologías utilizadas para los estudios de muerte celular no pueden diferenciar entre los tipos de muerte.

Tabla 4. Participación de apoptosis y necrosis en células de la granulosa obtenidas de folículos preovulatorios de ovejas de diferente tamaño y grado de atresia, cultivadas con Anexina y Ioduro de Propidio.

n	Atresia	Tamaño en mm	Células sanas (%)		Células apoptóticas (%)		Células necróticas (%)	
			Anexina(-) PI (-)	Anexina(+) PI (-)	Anexina(+) PI (-)	Anexina(+) PI (+)		
9	1	>6	85.4±8.9a	*8.7±2.6a		4.8±1.9a		
6	1	3-6	86.4±9.4a	*9.2±2.8a		4.6±2.1a		
6	2	>6	68.9±8.8b	11.0±3.0a,b		14.1±4.2b		
8	2	3-6	70.3±4.9b	*19.2±4.6c		8.4±2.3c		
9	3a	>6	43.4±7.1c	*22.1±5.4c,d		32.5±3.9d,e		
6	3a	3-6	44.1±6.4c	*27.1±4.0d		18.7±3.7b		
4	3b	>6	29.4±4.5d	*27.8±4.3d		36.9±4.2e		
5	3b	3-6	27.3±5.8d	*38.9±3.0e		26.8±4.9d		

Los datos se presentan como promedio y \pm la desviación estándar del número de casos indicado por n. Dentro de la misma columna letras diferentes indican diferencias significativas entre los datos ($P > 0.005$ por la prueba de ANOVA y Tukey)

Tomado de Rosales-Torres *et al*, 2000.

2.1.5 Pruebas utilizadas para medir muerte y viabilidad celular

Existe una serie de exámenes que utilizados aisladamente no permitir diferenciar entre células vivas y muertas, así como entre tipos de muerte celular, sin embargo como se resalta más adelante es necesario utilizar exámenes bivariadas donde se utiliza una o más de las exámenes que mencionaremos adelante.

2.1.5.1 Pruebas para medir muerte y viabilidad con base en los cambios de la membrana plasmática

Se han diseñado diversas pruebas que han permitido observar cambios en la membrana plasmática de las células:

1) Una de las primeras se basa en medir la integridad de la membrana plasmática. Estas pruebas por si mismas son incapaces de discriminar entre las células vivas y con apoptosis, las cuales mantienen la integridad de sus membranas, ni entre células en necrosis y con apoptosis tardía, ya que en ambos casos existe pérdida de la integridad de la membrana. Las membranas intactas de las células vivas y las células apoptóticas tempranas pueden excluir colorantes catiónicos como el azul tripan, el yoduro de propidio, bromuro de etidio, monoazida de etidio y el D-actinomicin-amino-7 (7-AMD), mientras que en las membranas de las células con necrosis y con apoptosis tardía pierden la capacidad de excluir estos colorantes (Belloc *et al*, 1994). Otra prueba empleada para medir la integridad membranal es la del diacetato de fluoricein (FDA), el cual es incorporado por las células vivas y es hidrolizado por esterasas

intracelulares, que se encuentran constitutivamente en todas los tipos de células, a fluoresceína, la molécula que queda atrapada en las células con membrana plasmática intactas (Riedy *et al*, 1991).

2) Otras pruebas que miden los cambios en la pérdida de la función de transporte a través de la membrana plasmática como el fluorocromo Hoechst 33342 (HO342), SYTO-16 y el LCS-751 son excluidos por las células vivas pero no por las células apoptóticas (Ormerod *et al*, 1993).

3) La asimetría de la membrana plasmática se pierde tanto en las células necróticas como en las células apoptóticas, principalmente se observa una exposición de fosfatidilserina, que generalmente se localiza en el interior de la membrana. El anticoagulante anexina V se une a la fosfatidilserina. La combinación de Anexina V y Ioduro de Propidio (PI), un colorante que se intercala en la doble hélice de DNA en células que tienen permeabilizadas sus membranas permite identificar y diferenciar entre células vivas (AV-/PI-), células con apoptosis temprana (AV+/PI-) y células necróticas (AV+/PI+) (Koopman *et al*, 1994).

2.1.4.3 Pruebas para medir muerte y viabilidad con base en los cambios del DNA

Condensación de la cromatina nuclear o núcleos picnótico se pueden observar tanto en la muerte por necrosis como en la muerte por apoptosis, los tejidos son fijados y sometidos a la prueba de hematoxilina la cual se intercala a las núcleos de la células muertas con picnósis (van Wezel *et al*, 1999).

En los procesos de muerte hay una degradación extensa del DNA que resulta en múltiples fragmentos del DNA, el fragmento del DNA principalmente el extremo 3'OH

terminal puede ser detectado por la unión a nucleótido que están conjugados con biotina o digoxigenina, en una reacción catalizada por una transferasa terminal TdT (TUNEL) o por una DNA polimerasa. Posteriormente se utiliza un anticuerpo conjugado con un fluorocromo contra dioxigenina (Li *et al*, 1995). Estas técnicas pueden marcar preferentemente a las células apoptóticas pero también puede marcar a las células necróticas (Grasi-Kraupp *et al*, 1995). Se ha mencionado que son inadecuadas para separar completamente poblaciones de células con apoptosis y necrosis (Frey, 1995).

2.1.6 Tipo de muerte en las células de la teca durante la atresia folicular de la oveja

Existen muchas interrogantes alrededor de la participación de la muerte de las células de la teca en la atresia folicular y pocas investigaciones encaminadas a medir los cambios específicos de la teca de los folículos atrésicos. En la rata, aves y bovino se ha reportado que existe una menor tasa de muerte que la que ocurre en las células de la granulosa (Nakayama *et al*, 2000). En un estudio de cambios ultraestructurales en la teca interna del ovario de la oveja, O'Shea *et al* (1978), también observaron que la muerte celular de la teca interna fue menor que la observada en la granulosa y que la frecuencia de muerte en la teca estuvo relacionado con el avance en el proceso de atresia. Más recientemente, Nakayama *et al* (2000), estudiando los folículos de bovino, encontraron que en el proceso inicial de atresia folicular, la teca interna también presenta células apoptóticas aunque apoya el hecho que la atresia comienza con la apoptosis de la granulosa.

Otros autores mencionan que la muerte de las células endoteliales de los vasos sanguíneos que irrigan al folículo desencadena el proceso de la atresia folicular (Jiang *et al*, 2003). Una de las causas principales de enfermedades neurodegenerativas, es la muerte de las células endoteliales de los vasos sanguíneos las cuales se manifiestan por fallas en la difusión de oxígeno, una pérdida de la perfusión, pérdida de la vasoregulación en el tejido nervioso (Storkebaum and Carmeliet, 2004). Hay *et al* (1976), han demostrado la importancia de la adecuada irrigación en la salud del folículo, la presencia de los vasos sanguíneos provee al folículo de nutrientes y oxígeno. Un signo temprano de atresia incluye una desaparición selectiva de la red interna sin cambios sustanciales de la vasos sanguíneos de la teca interna (Moor and Seamark, 1986).

3 La angiogénesis durante el desarrollo folicular

El desarrollo y crecimiento de los tejidos y órganos de los mamíferos está acompañado por cambios en el riego sanguíneo normal. Uno de los mecanismos por medio del cual se ajustan estos cambios es la proliferación de una de las dos células precursoras de los vasos sanguíneos, a saber: 1) El hemoangioblastoma es un precursor que se diferencia hacia la célula endotelial, la cual prolifera para forma *de novo* el sistema sanguíneo primario, en un proceso que en conjunto se conoce como vasculogénesis; 2) La célula endotelial de los capilares de los vasos sanguíneos preexistentes en los tejidos y órganos es un precursor que también puede proliferar para dar origen a una nueva red microvascular compuesta de arteriolas, capilares y vénulas en un proceso referido como angiogénesis (Risau, 1997). La angiogénesis es un

proceso confinado a un área del capilar sanguíneo donde se observan cambios fisiológicos y morfológicos de la pared de los capilares así como cambios en la tasa mitótica de la célula endotelial, lo que ha permitido a algunos autores dividirlo en dos fases; la de activación y la de resolución. En la fase de activación se observa en orden cronológico y en dirección hacia el estímulo quimiotáctico: 1) Aumento de la permeabilidad de la pared del vaso. 2) Disociación de las células endoteliales de la capa interior de la pared del capilar. 3) Degradación confinada que forma un agujero en la lámina basal de la capa interior de la pared del capilar, así como degradación de la matriz extracelular. 4) Brote sólido, formado por las células endoteliales, que proliferan y migran a través del agujero e invaden la matriz extracelular. La fase de resolución comprende a su vez: a) Inhibición de la proliferación y migración de la célula endotelial, b) Formación de la membrana basamental, c) Formación del hueco capilar y establecimiento del flujo sanguíneo, y d) Diferenciación de la nueva red microvascular (Pepper, 2001).

La angiogénesis puede ser un evento de naturaleza esporádica principalmente en el proceso de curación de lesiones tisulares, así como en situaciones patológicas como el crecimiento y metástasis de los tumores. La angiogénesis prominente se observa durante el crecimiento de órganos y tejidos, así como en la hembra adulta principalmente en la glándula mamaria, placenta, útero y en el folículo del ovario. La angiogénesis que acompaña a la foliculogénesis se presenta en períodos cíclicos en las diferentes etapas del ciclo estral (Denekamp, 1984; Nottola *et al*, 1997; Zimmerman *et al*, 2003). En la foliculogénesis, la angiogénesis y regresión de vasos proporcionan los cambios en la red microvascular del folículo (Charney *et al*, 1975).

Durante el desarrollo folicular la angiogénesis no es distribuida igualmente. Los folículos en la etapa de primordial y primario, están cercanos a las arteriolas espiradas del estroma pero no poseen una red vascular propia (Wulff *et al*, 2001; Jiang *et al*, 2002). Existen pruebas que demuestran que la angiogénesis folicular inicia al finalizar la formación de las tecas en el folículo secundario tardío y parece estar restringida al compartimiento de la teca. A través del uso de un marcador específico de la célula endotelial CD31 y del marcador de proliferación BrdU, se ha demostrado que no hay células endoteliales en los primeros estadios del desarrollo folicular en los primates y sólo se localizan en la teca de los folículos secundarios tardíos, en donde también las células endoteliales proliferan (Wulff *et al*, 2001). Así mismo al realizar estudios morfológicos de la red microvascular con la técnica de microscopía electrónica, sólo los folículos secundarios de los porcinos, presentaron dos arteriolas espiradas en el estroma que circundaba al folículo, estas arteriolas se hacen rectas antes de entrar en el folículo; las arteriolas dentro de la teca externa del folículo entran en anastomosis, de estas arteriolas se originan algunos capilares largos que forman una malla poligonal en la teca externa del folículo, pero no invaden la teca interna ni la capa basamental (Parrott and Skinner, 2000; Jiang *et al*, 2002).

La angiogénesis folicular continúa en el folículo antral temprano principalmente la red microcirculatoria de la teca externa envía a la teca interna pequeñas ramas de capilares, los cuales en la teca interna se arreglan en una simple capa que no penetran la capa basamental del folículo (Geva and Jaffe, 2000; Jiang *et al*, 2002). En el folículo antral tardío se establece la red vascular interna, en donde los capilares se dividen para formar una red rica de capilares semejante a una canasta. El establecimiento de la red capilar interna, coincide con el periodo

de rápido crecimiento y diferenciación del folículo (Neeman *et al*, 1997; Jiang *et al*, 2002;). La selección del folículo dominante puede depender de la formación diferencial de este suplemento vascular y de un incremento en la permeabilidad vascular (Fortune *et al*, 2001; Stouffer *et al*, 2001). El desarrollo del folículo preovulatorio es dependiente de la angiogénesis puesto que la angiogenesis folicular mantiene la función endócrina de la teca como resultado de una adecuada liberación de hormonas, colesterol, nutrientes y oxígeno (Zelevnik *et al*, 1981; Neeman *et al*, 1997; Davis *et al*, 2003). El folículo dominante preovulatorio de bovinos como consecuencia del activo desarrollo de capilares en la teca interna tiene una red de capilares muy extensa al compararlo con los otros folículos, aunque son escasos los capilares en la región apical del folículo (Brannstrom *et al*, 1998; Jiang *et al*, 2003).

3.1 El factor de crecimiento del endotelio vascular y la angiogénesis folicular

La angiogenesis tiene un papel primario en el desarrollo folicular y está confinada a la capa de la teca del folículo, sin penetrar la membrana basamental que separa la capa de la teca de la capa de las células de la granulosa (Zelevnik *et al*, 1981; Stouffer *et al*, 2001). Aunque la angiogenesis es exclusiva de la teca, las células de la granulosa ejercen un importante papel en el proceso al producir diversos factores angiogénicos que actúan en forma parácrina con la teca (Grasselli *et al*, 2003).

De un estudio en cultivo *in vitro* de células endoteliales de la aorta y células de la granulosa de cerdo colectadas de folículos de diferentes tamaños, se observó que las células de la granulosa de los folículos pequeños estimulan la proliferación y la formación de brotes de

las células endoteliales, mientras que las células de la granulosa de los folículos grandes favorecen la elongación del brote endotelial (Grasselli *et al*, 2003). Otro estudio *in vitro* de células endoteliales en cultivo con extractos de células de la teca o con extractos de las células de la granulosa demostró que las células de la granulosa de folículos de cerdo estimulan la migración y proliferación de las células endoteliales, mientras que los estratos de la teca no tienen ningún efecto sobre las células endoteliales. Estas observaciones ponen de manifiesto que aunque sólo la teca del folículo es vascular las células de la granulosa ejercen un importante papel en la migración y la proliferación de las células endoteliales (Makris *et al*; 1984).

La angiogénesis folicular depende de una interacción entre diversos factores de crecimiento producido por las células de la granulosa y de la teca que pueden actuar en diferentes momentos sobre las células endoteliales, algunos estimulan el crecimiento y otros median la reorganización de las células endoteliales hacia estructuras vasculares complejas. Además, la modulación durante la angiogénesis folicular tanto de la expresión y de la acción de estos factores es aun incierta (Tamani and Ambrogi, 2004).

De los resultados con modelos celulares en cultivo, se ha interpretado que el proceso de la angiogénesis puede ser desencadenado por factores de acción angiogénica directa y por los factores de acción angiogénica indirecta. El factor de acción angiogénica directa es liberado y se une a su receptor que se localiza en la célula endotelial, entre ellos se encuentran el factor de crecimiento del endotelio vascular (VEGF), el factor de crecimiento fibroblástico básico (bFGF) y la fosfolipasa de timidina (TP). Los factores con acción angiogénica indirecta, favorecen la transcripción del mRNA de VEGF; principalmente se incluye al factor

de crecimiento transformante alfa y beta (TGF- α , TGF- β), al factor de crecimiento y diferenciación plaquetaria (PDGF), al factor de necrosis tumoral alfa (TNF- α), al factor de crecimiento fibroblástico-4 (FGF-4), al factor de crecimiento de queratinocitos (KGF/FGF-7), al factor de crecimiento epidermal (EGF), interleucina-1 α (IL-1 α); IL-1 β ; IL-6 y al factor de crecimiento insulinoide (IGF-1) (Pertovaara *et al*, 1994).

La hipoxia de los tejidos que es particularmente notable en la periferia de áreas necróticas de los tumores, induce la transcripción del mRNA de VEGF, por lo que se considera de acción angiogénica indirecta (Minchenko *et al*, 1994). Interesantemente otros miembros de los factores de crecimiento de acción angiogénica directa e indirecta no son estimulados por la hipoxia, por lo que VEGF se considere un mediador importante de la angiogénesis inducida por hipoxia (Enholm *et al*, 1997).

VEGF es uno de los principales factores angiogénicos, también es conocido como factor de permeabilidad vascular (VPF), ya que es un potente factor que estimula la proliferación y migración de la célula endotelial. Adicionalmente tiene un papel muy importante en mantener la estructura microvascular, así como en el mecanismo de permeabilización de los capilares con una potencia de 50,000 veces superior a la histamina (Redmer *et al*, 2001). VEGF pertenece a la superfamilia de factores de crecimiento de unión dimérica con enlaces disulfuro. Aunque su nomenclatura correcta es VEGFA, es usual usar solo VEGF para referirse a este factor, otros miembros de esta superfamilia comprenden a la familia del factor de crecimiento derivado de plaquetas (PDGF), VEGFB, VEGFC y VEGFD. Se han reportado dos homólogos de VEGFA, el VEGFE de origen viral que causa lesiones en la piel acompañado de una proliferación microvascular aguda en la oveja; así como el VEGF

de la glandula endocrina (EG-VEGF), también conocido como procinetin 1 (PK-1) (Ferrara *et al*, 1992).

La transcripción del gen *vegf*, que reside en el cromosoma 6p21.3 en el humano, genera un pre-mRNA de VEGF que por el proceso de maduración alternativa, incluye o excluyen diferentes exones para formar 8 mRNA de VEGF. La traducción por el ribosoma de los 8 mRNA de VEGF maduros da origen a 8 isoformas de la proteína de VEGF conocidas como: VEGF121, VEGF145, VEGF148, VEGF165, VEGF183, VEGF189, VEGF206, VEGF165b (Cui *et al*, 2003).

En un modelo esquemático donde ocurre la traducción en los ribosomas de un mRNA de VEGF con todos sus exones codifica para una cadena polipeptidica formada de 238 aminoácidos, el exón 1 codifica para los aminoácidos que están en la posición 1 a la 26, el exón 2 al 5 codifica para los aminoácidos que están en la posición 27 a la 141, el exón 6a1 codifica para los aminoácidos que está en la posición 142 a la 159, el exón 6a2 codifica para los aminoácidos que están en la posición 160 a la 165, el exón 6b codifica para los aminoácidos que están en la posición 166 a la 182, el exón 7a codifica para los aminoácidos que están en la posición 183 a la 209, el exón 7b codifica para los aminoácidos que están en la posición 210 a la 226, el exón 8a codifica para los aminoácidos que están en la posición 227 a la 232 y el exón 8b codifica para los aminoácidos que están en la posición 233 a la 238 (Robinson and Stringer, 2001).

Los 8 mRNA de VEGF maduros tiene en común: 1) Una región sin traducción en el extremo 5' del mRNA (5'UTR) unido en codon 5'AUG y otro UTR en el extremo 3' (3'UTR) que puede unirse al codon final del exon 8a o al codon final del exon 8b. 2) Los exones del

uno al cinco que codifican para los aminoácidos Met-1 a la Lys-141, los aminoácidos que están en la posición Met-1 a la Ala-26 pertenecen al péptido señal, que es necesario para la secreción de la proteína de VEGF, el exón tres codifica para la Cys-51 y Cys-61, necesarios para la dimerización antiparalela de los monomeros de VEGF, y la Asp-63, Glu-64 y Glu-67 que forman el sitio de unión al receptor 1 de VEGF (VEGFR1), el exon 4 codifica los residuos Arg-82, Ile-83, Lys-84 y His-86 que forman el sitio de unión con el VEGFR2 (Stouffer *et al*, 2001; Robinson and Stringer, 2001).

Los 12 residuos de aminoácidos codificados por el exón 8 del mRNA de VEGF pueden darle propiedades angiogénicas o antiangiogénicas. Teóricamente la Ser-233, Leu-234, Tre-235, Arg-236, Lis-237 y Asp-238 codificados por el exon 8b podrían dar origen a una nueva familia de isoformas VEGFxxxA con acción antiangiogénica, sin embargo, sólo se ha localizado a VEGF165b que es un homólogo de VEGF165, las células de cáncer y normales (Woolard *et al*, 2004).

La Cys-227, Asp-228, Lis-229, Pro-230 Arg-231 y Arg-232 codificadas por el exon 8a dan origen a la familia de isoformas VEGFA con propiedades angiogénicas. Los aminoácidos que se encuentran en la posición 142 a la 165 y en 183 a la 209 codificada por los exones 6a y 7a, tiene sitios de unión débiles a heparina, mientras que los aminoácidos que se encuentran en la posición 166 a la 182 codificadas por el exon 6b presenta sitios de unión fuerte a heparina, mientras que los aminoácidos 142 a 226 codificados por exones del 6a,6b,7a,7b, son necesarios para la unión con los proteoglicanos heparin sulfatados (HSPG) de la matriz extracelular (ECM), los aminoácidos 183 al 226 codificados por el exon 7 son necesarios para la unión con el co-receptor neurofilin 1 (NRP) (Stouffer *et al*, 2001).

Exclusivamente las proteínas de VEGF ejercen su acción al unirse a los receptores tipo tirosinacinasas como: A) La tirosinacinasas parecida a *fms* (Flt-1) o también conocida como receptor-uno de VEGF (VEGFR-1). B) La cinasa de hígado fetal (Flk-1) es homólogo murino de la región dominio cinasa (KDR) o VEGFR-2. C) VEGFR-3 D) co-receptor NRP. VEGFR-1 es “señuelo” que previene la unión de VEGF con su co-receptor NP-1 y por consiguiente con VEGFR-2, por otro lado VEGFR-1 estimula la producción de uPA, tPA y MMP-9. VEGFR-1, es necesario para la formación de tubos capilares, es expresado por las células endoteliales que proliferan y por las que están quiescentes. VEGFR-2 es expresado en la célula del endotelio vascular y median los efectos de VEGF en la proliferación, migración, supervivencia y en la angiogénesis (Terman *et al*, 1991; Berisha *et al*, 2000a; Boonyaparakob *et al*, 2003).

Las isoformas VEGF121, VEGF148, VEGF165 y VEGF165b son solubles y las otras VEGF145, VEGF183, VEGF189 y VEGF206 se unen generalmente a la membrana y a los constituyentes de la ECM (Stouffer *et al*, 2001).

Las isoformas de VEGFA como VEGF165 puede unirse al VEGFR-1 y VEGFR-2 y al co-receptor NP-1 y NP-2, VEGF145 puede unirse selectivamente a los co-receptores neuropilin NP-2, VEGF121 y la isoforma de VEGF110, producida por proteólisis de VEGF189 o de VEGF206, se une a VEGFR-1 y VEGFR-2, pero no a NP-1 y NP-2, con una importante disminución de la angiogénesis (Terman *et al*, 1991; Berisha *et al*, 2000a; Boonyaparakob *et al*, 2003).

La expresión de VEGF ocurre en células de la granulosa y teca e induce la angiogénesis en la teca durante el desarrollo del folículo (Shweiki *et al*, 1993). VEGF/VPF puede incrementar la permeabilidad vascular y se ha hipotetizado que junto a las

gonadotropinas media el proceso fisiológico de la formación del antro (Zimmermann *et al*, 2003). Por otra parte VEGF puede tener una acción directa sobre las células de la granulosa y actuar como un factor autocrino que modula la producción de estrógenos en células de la granulosa en los folículos pequeños y grandes (Grasselli *et al*, 2002) y además recientemente se le ha atribuido un papel citoprotector para estas células (Greenaway *et al*, 2004).

En la angiogénesis folicular de los primates están presentes diferencialmente durante el desarrollo folicular el mRNA de VEGF y la proteína de VEGF en las células de la teca y en las células de la granulosa; en el folículo preantral y antral se encuentran presentes en las células de la teca mientras que en los folículos preovulatorios se localizan en las células de la granulosa cercanas al ovocito, mientras que en los folículos primordiales en células de la granulosa no están presentes (Stouffer *et al*, 2001; Taylor *et al*, 2004).

En el proceso de angiogénesis folicular en los primates, las células de la granulosa expresan el mRNA de VEGF al final del desarrollo del folículo secundario y su máxima expresión la alcanza en los folículos antrales. Mientras que la expresión del mRNA del receptor Flt-1 (VEGFR-1) se expresa en las células de la teca tanto del folículo secundario tardío como en el folículo antral. Por lo tanto, VEGF actúa de manera paracrina estimulando la angiogénesis en la capa de la teca de los folículos. Al bloquear a VEGF con la administración soluble del receptor truncado del Flt-1-FC (VEGFTrapA40), dramáticamente se reduce la proliferación de las células endoteliales y de las células de la teca. Así el efecto antiproliferativo indirecto de VEGF sobre las células de la teca puede ser debido a que en condiciones normales estimula la permeabilidad del vaso, cuando se bloquea a VEGF esta función es inhibida y moléculas como la hormona luteinizante (LH) no difunde hacia las

células de la teca y no estimula la mitosis. Al bloquear a VEGF disminuye la expresión del mRNA del receptor Flt (VEGFR-1) y el mRNA del receptor Flk-1/KDR (VEGFR-2) en las células endoteliales de la teca en los folículos terciarios, un claro signo de la importancia de este péptido en este estadio del desarrollo (Wulff *et al*, 2001).

En los bovinos se expresan los receptores Flt-1 (VEGFR-1) y Flk-1 (VEGFR-2) en las células endoteliales de la teca interna de los folículos del ovario (Gerber *et al*, 1997). Durante el desarrollo folicular del ovario de los bovinos se expresa poco el mRNA de VEGF en los folículos pero se hace más pronunciada su expresión en las células de la granulosa y teca en el desarrollo del folículo dominante, principalmente en las células de la granulosa existe un incremento de la expresión del mRNA de VEGF y una acumulación de la proteína VEGF en el líquido folicular (Berisha *et al*, 2000b).

Un estudio reciente reporta que las células de la granulosa de los folículos de cerdos expresan el mRNA de VEGF (Barboni *et al*, 2000; Shimizu *et al*, 2002). En los folículos preovulatorios, los niveles altos de VEGF presentes en el líquido folicular difunden lentamente hacia la teca y crea un gradiente angiogénico que atrae los vasos sanguíneos hacia la granulosa, sin embargo no cruza la barrera representada por la capa basamental. Un aumento en la expresión de VEGF durante la fase folicular puede ser útil para incrementar el número de folículos destinados a ovular (Tamani and Ambrogi, 2004; Kaczmarek *et al*, 2005). En esta especie se expresan el mRNA de VEGF en las teca y en granulosa, en la angiogénesis folicular en la cerda se han identificado dos isoformas de VEGF en los folículos medianos y grandes, en las células de la granulosa se expresan las isoformas VEGF120 y la VEGF164 mientras que los receptores se expresan en las células de la teca VEGFR-1 y VEGFR-2

(Shimizu *et al*, 2002; Boonyaparakob *et al*, 2003). Durante el desarrollo folicular VEGF120, comparado con VEGF164, tiene un papel angiogénico muy importante (Shimizu *et al*, 2003a). La inyección de fragmentos de *vegf* dentro del ovario de cerdas tratadas con gonadotropina coriónica de equino aumenta los niveles de VEGF en el líquido folicular y la expresión de VEGF120 y de VEGF164 en las células de la granulosa de los folículos antrales, así como la expresión de mRNA de VEGFR-1 (Flt-1) en las células de la teca interna (Shimizu *et al*, 2003b).

En los folículos preovulatorios de ovinos, la expresión de mRNA de VEGF ha sido detectada en las células de la granulosa y en la teca interna (Redmer *et al*, 2001). En los roedores las células de la granulosa de los folículos secundarios producen VEGF y tiene receptores de VEGFR-1 (Flt-1) y VEGFR-2 (Flk/KDR) en las células de la teca (Quintana *et al*, 2004).

3.1.1 Gonadotropinas y el factor de crecimiento del endotelio vascular

La expresión de mRNA de VEGF, de la proteína o de ambos, en el folículo ovárico de varias especies es estimulada por las gonadotropinas (Kaczmarek *et al*, 2005). En los folículos de ratas, se ha mostrado que la exposición a cantidades elevadas de gonadotropinas aumenta tanto la expresión de VEGF como los receptores VEGFR-1 (Flt-1) y VEGFR-2 (Flk/KDR) (Gomez *et al*, 2003). La angiogénesis folicular dependiente de gonadotropinas en el ratón es inhibida al administrar un anticuerpo específico contra el receptor VEGFR-2 (Flk-1/KDR) se observa que existe un bloqueo del desarrollo de los folículos antrales con una reducción del

antro folicular y reducción en la producción de estradiol e incluso la administración exógena de gonadotropinas en ratones hipofisectomizados no restaura esta condición. Además la administración del anticuerpo contra el receptor VEGFR-2 (Flk-1/KDR) no induce ningún efecto sobre la vascularización preexistente, pero inhibe la angiogénesis folicular (Zimmermann *et al*, 2003). Las cerdas tratadas con eCG aumentan la expresión del mRNA de VEGF120, VEGF164 en las células de la granulosa de los folículos medianos y grandes, como los niveles de VEGF en el líquido folicular (Shimizu *et al*, 2003b). Las gonadotropinas estimulan la producción y expresión de VEGF *in vitro* eCG induce la expresión de mRNA de VEGF120 y de VEGF164 en las células de la granulosa *in vivo* (Christenson and Stouffer, 1997). La expresión de mRNA VEGF es regulada por una gran variedad de factores, entre estos está el IGF-1 el cual estimula la expresión de mRNA VEGF por las células de la granulosa *in vitro* (Hsu and Hammond, 1987). Shimizu *et al* (2002), indican que la expresión del mRNA de VEGFR-1 (Flt-1) y de VEGFR-2 (Flk-1) aumenta en el tejido de la teca de los folículos medianos y grandes después del tratamiento de eCG se ha sugerido que la expresión de VEGFR-1 (Flt-1) y de VEGFR-2 (Flk-1) pueden ser activados por diferentes isoformas de VEGF (Shimizu *et al*, 2002). El efecto de la hipoxia en la expresión de VEGFR-1 (Flt-1) y de VEGFR-2 (Flk-1) en el tejido de la teca en el desarrollo folicular es poco conocido, pero es afectada aunque en menor extensión que VEGF (Gerber *et al*, 1997; Shimizu *et al*, 2003a).

3.1.2 Estrógenos y el factor de crecimiento del endotelio vascular

El resultado de la administración intrabursal de estrógenos en ratas, claramente demuestra que los estrógenos pueden directamente estimular la expresión de VEGF a nivel del ovario (Danforth *et al*, 2003). Así mismo en las células de la granulosa de roedores la administración intraperitoneal de VEGF120 y VEGF164 estimulan la angiogénesis e indirectamente la producción de E2 (Iijima *et al*, 2005). En cerdos, no obstante, los estrógenos no estimulan la producción de VEGF en los folículos cultivados *in toto* (Mattioli *et al*, 2001). Así mismo se observa que en los bovinos los estrógenos no ejercen ningún efecto sobre la angiogénesis folicular (Acosta *et al*, 2003). Por lo tanto, la demostración de una relación causal entre estrógenos y la expresión de VEGF requiere de más estudios adicionales (Kaczmarek *et al*, 2005).

3.1.3 Hipoxia, ayuno y el factor de crecimiento del endotelio vascular

Estudios realizados en primates revelan que la expresión de VEGF en el folículo antral es independiente de la secreción de gonadotropinas mientras que la expresión de VEGF en el folículo preovulatorio está bajo control gonadotrópico, principalmente de LH (Taylor *et al*, 2004). En contraste en las especies como el cerdo la expresión de VEGF en el folículo antral depende de FSH mientras que la expresión de VEGF en los folículos preovulatorios es independiente de LH (Barboni *et al*, 2000). Es posible que otros factores paracrinos esten

involucrados en la regulación de la expresión VEGF en el desarrollo del folículo del ovario (Kaczmarek *et al*, 2005).

La hipoxia es un factor angiogénico de acción indirecta que modula la producción de VEGF (Enholm *et al*, 1997). La hipoxia estimula reversiblemente la expresión de mRNA de VEGF en los folículos de bovinos cultivados *in vitro* a diferentes concentraciones de oxígeno. La hipoxia aumenta gradualmente en el líquido folicular durante el desarrollo folicular y posiblemente pueda desencadenar la angiogénesis del folículo. Principalmente, aumentan la expresión de VEGF en los folículos preovulatorio de los cerdos (Bianco *et al*, 2003). Por el contrario, la hipoxia no ejerce ningún efecto sobre la expresión de VEGF en las células de la granulosa de primates (Martinez-Chequer *et al*, 2003). Los niveles de mRNA de VEGF en la teca y en la granulosa son marcadamente influenciados por el ayuno, con un aumento preliminar en la expresión de VEGF en la teca acompañado de una reducción en la expresión de VEGF en las células de la granulosa (Tamani and Ambrogi, 2004).

3.2 Atresia folicular y el factor de crecimiento del endotelio vascular

En los ovarios de los rumiantes la atresia folicular es un proceso degenerativo extenso que se propaga en todo el folículo y por el cual el folículo pierde su integridad estructural (Sharma, 2000; Chedrese, 2003). La atresia folicular involucra la muerte de las células foliculares (Yu *et al*, 2004). La muerte celular es un proceso irreversible que culmina con la actividad biológica de la célula y tiene tres fases; fase de inducción, fase de ejecución y fase de degradación (Kroemer *et al*, 1995; 1998, 2005; Darzynkiewicz *et al*, 1997). En la fase de

inducción, el estímulo que activa la muerte es una señal interna o externa, esta fase puede ser reversible. La muerte de las células de la granulosa es un evento predominante en el inicio y progresión de la atresia folicular en el ovario (Makrigiannakis *et al*, 1999). Durante la atresia folicular el proceso de muerte de las células de la granulosa es modulado por múltiples señales intraováricas o extraováricas (Rosado y Rosales, 1991). En la fase efectora o muerte celular se activa el “ejecutor central” y al liberar factores de muerte entra en una etapa irreversible que se conoce como punto de no retorno. Los ejecutores centrales, como las mitocondrias y los lisosomas, se activan posiblemente en el proceso de atresia folicular del ovario (Alonso-Pozos *et al*, 2003). Finalmente en la fase de degradación se activan las proteínas específicas que modulan las características morfológicas para cada tipo de muerte celular. En el proceso de atresia folicular se observan células de la granulosa con características de muerte celular por necrosis, apoptosis y autofagia (Kovacs *et al*, 1992; D’Herde *et al*, 1996; Rosales-Torres *et al*, 2000).

Uno de los signos tempranos de la atresia folicular es una reducción en la síntesis de DNA en las células endoteliales acompañado de una disminución de la vascularidad del folículo (Greenwald, 1989). Los folículos con atresia inicial regeneran cuando son cultivados *in vitro*, lo que sugiere que el folículo permanece en el estado atrésico debido a un descenso de la vascularidad, que limita el acceso a los nutrientes, sustratos y hormonas tróficas necesario para el metabolismo de las células foliculares (Moor and Seaman, 1986). Además, un incremento de la densidad vascular alrededor del folículo preantral contribuye a la inhibición de la atresia (Shimizu *et al*, 2003b). Las alteraciones en los capilares de los folículos atrésicos pueden desencadenar una reacción inflamatoria que puede ser más una

consecuencia que la causa primaria de atresia (Macchiarelli *et al*, 1993). En los bovinos se ha mostrado que durante el proceso de atresia la muerte por apoptosis de las células endoteliales aparece primero en la red externa de la teca y subsecuentemente se presenta en los capilares de la teca interna (Isobe *et al*, 2001). En contraste los folículos antrales de las conejas presentan cambios degenerativos en los capilares de la red vascular interna (Macchiarelli *et al*, 1993). Así mismo en la cerda se observa alteraciones de los capilares de la red interna de vasos sin que se afecten los capilares de la red externa (Mattioli *et al*, 2001). Sin embargo en la atresia folicular de las ovejas las alteraciones de los capilares se observan en las etapas tardías, con un descenso progresivo de capilares cercanos a la capa basal (Redmer *et al*, 2001). Se ha postulado que la muerte de las células endoteliales de la teca es un factor que puede desencadenar el inicio de la atresia, sin embargo los mecanismos moleculares aún no son claros (Clark *et al*, 2004).

Se ha sugerido que en los folículos de ratones, la administración de VEGF disminuye la apoptosis de las células endoteliales (Quintana *et al*, 2004). Los capilares de la red interna degeneran cuando disminuye la acumulación de VEGF en el líquido folicular (Moor and Seamark, 1986). Resultados tempranos muestran que VEGF es un factor de supervivencia clave para la célula endotelial (Alon *et al*, 1995; Benjamin *et al*, 1999) e induce la expresión de proteínas antiapoptóticas como Bcl-2 y A1 en las células endoteliales (Gerber *et al*, 1998). Además, Greenaway *et al* (2004), han indicado que VEGF tiene un efecto citoprotector en las células de la granulosa de bovinos. La expresión tanto de VEGF como Flk-1/KDR en las células de la granulosa de bovino las protege del proceso de muerte e inhibe la atresia folicular. Los folículos sanos en las células de la granulosa exhiben un bajo índice de

apoptosis y una alta expresión de Flk-1/KDR. En los folículos atrésicos tempranos significativamente aumenta las células de la granulosa con apoptosis es y tiene una reducida expresión de Flk-1/KDR. Adicionalmente, al bloquear Flk-1/KDR significativamente se inhibe la habilidad de las células de la granulosa para responder a VEGF endógeno y exógeno (Greenaway *et al*, 2004).

Planteamiento del problema

La atresia folicular es un proceso degenerativo extenso que se propaga en todo el folículo y por la cual éste pierde su integridad (Sharma, 2000; Chedrese, 2003). La incidencia de atresia en la oveja igual que en otras especies es directamente proporcional al diámetro folicular, el 21% de los folículos pequeños son atrésicos, mientras que el 93% en los folículos mayores de 6 mm son atrésicos (Carson *et al*, 1979; Hsueh, *et al*, 1994). La alta incidencia de atresia en los folículos grandes se explica principalmente por la demanda metabólica que implica la tasa alta de proliferación celular que los hace más sensibles al estrés oxidativo (Van Blerkom *et al*, 1997; Neeman *et al*, 1997). La atresia folicular en folículos antrales es iniciada y propagada por la muerte de las células que lo conforman (Clark *et al*, 2004), principalmente de la granulosa y del endotelio de la teca (Makrigiannakis *et al*, 1999; Clark *et al*, 2004).

En el folículo, el crecimiento y la reorganización de las células endotelial para formar estructuras vasculares depende de una interacción entre diversos factores de crecimiento producidos por las células de la granulosa y de la teca que pueden actuar en diferentes momentos sobre las células endoteliales. La expresión y acción de estos factores en la atresia y desarrollo del folículo es aún incierta (Tamanini and Ambrogi, 2004).

La participación de VEGF durante el desarrollo y atresia folicular se ha demostrado por una serie de pruebas en las que administran VEGF para estimular la angiogénesis y el desarrollo folicular o donde la falta de VEGF o el bloqueo de sus receptores inhiben la angiogénesis folicular y desencadenan la atresia (Wulff *et al*, 2001; Shimizu *et al*, 2003b;

Gomez *et al*, 2003; Zimmermann *et al*, 2003; Kaczmarek *et al*, 2005). La transcripción del gen *vegf*, genera un pre-mRNA de VEGF que por el proceso de maduración alternativa, incluye o excluyen diferentes exones para formar 8 mRNA de VEGF conocidos como VEGF121, VEGF145, VEGF148, VEGF165, VEGF183, VEGF189, VEGF206, VEGF165b (Cui *et al*, 2003). Existe una gran controversia sobre el papel que tienen las diferentes isoformas de VEGF en el proceso de la angiogénesis (Gou *et al*, 2001; Jensen *et al*, 2004).

La muerte de las células de la granulosa en la atresia de oveja ha sido reconocida como apoptótica (Jolly *et al*, 1996) y por nuestro grupo además de la apoptosis se ha demostrado la participación de necrosis en las células de la granulosa. La participación preponderante del tipo de muerte depende del tamaño folicular, en los folículos pequeños (3-6 mm) participa principalmente la apoptosis mientras que en los folículos grandes (>6 mm), es la necrosis (Rosales-Torres *et al*, 2000).

La opción entre necrosis y apoptosis puede depender de la intensidad del estímulo que está provocando la agresión, por ejemplo en células leucémicas L1210 que se trataron con el agente fotosensible clororin 6 triacetoximentil éster, a dosis baja causó permeabilidad de la membrana mitocondrial y desencadenó la apoptosis, mientras que a dosis altas provocó permeabilidad de la membrana lisosomal y la muerte por necrosis (Kessel and Poretz, 2000). Con el propósito de conocer si la expresión de VEGF o alguna de sus isoforma están relacionadas con la vía de muerte que siguen las células de un folículo en el proceso de la atresia, se realizó un estudio citométrico con el cual se conoció el grado de permeabilidad lisosomal como indicador de necrosis y de la mitocondria como indicador de apoptosis. Además se realizaron experimentos de RT-PCR para conocer la expresión de VEGF y sus

isoformas en cada uno de ellos y relacionarlo con el tipo de muerte dominante en cada folículo atrésico.

Hipótesis

La expresión del factor de crecimiento endotelio vascular (VEGF) en los folículos de oveja será modificada por el tamaño del folículo, el grado de atresia y tipo de muerte celular.

Objetivo general

Conocer la relación entre la expresión de VEGF en folículos pequeños (3-6 mm) y grandes (>6 mm) en relación al grado de atresia folicular y tipo de muerte celular en la oveja.

Objetivos particulares

1. Conocer los cambios que ocurren en la permeabilidad transitoria de las mitocondrias y la permeabilidad de los lisosomas relacionada con el grado de avance de la atresia y el tamaño de los folículos ováricos de ovejas.
2. Medir la expresión génica de VEGF en las células de la granulosa y teca de folículos pequeños y grandes sanos y atrésicos.
3. Relacionar la expresión génica de VEGF con los cambios en la permeabilidad mitocondrial y/o lisosomal y conocer la combinación que existe entre estos eventos y el grado de atresia de los folículos de pequeños (3-6 mm) y grandes (>6 mm).

Material y métodos

Se recuperaron ovarios de ovejas criollas no gestantes sacrificadas en un rastro local, los ovarios se lavaron dos veces con solución salina amortiguadora de fosfatos (PBS 0.01M pH 7.4) y se trasladaron en hielo, hasta el laboratorio, en un lapso no mayor a 60 minutos. Los ovarios se disecaron con unas pinzas de microcirugía con punta roma, para obtener folículos antrales, los cuales fueron clasificados en dos grupos de acuerdo con su diámetro: Pequeños de 3 a 6 mm y grandes, mayores de 6 mm. Basados en los criterios morfológicos propuestos por Rosales *et al* (1990), Ballesteros *et al*, (1992) y Alonso-Pozos *et al*, (2003), los folículos libres de estroma, se clasificaron de acuerdo a su apariencia en tres grupos: Atresia 1 (sanos), se incluyeron folículos con apariencia traslúcida, con la capa granulosa íntegra y con buena irrigación sanguínea; Atresia 2 (atresia inicial), en este grupo se incluyeron folículos con atresia inicial, que presentaban una apariencia opaca con ligeros desprendimientos en la capa granulosa y disminución de la irrigación sanguínea; Atresia 3 (atresia avanzada), se incluyeron los folículos con atresia avanzada, los cuales mostraban una apariencia grisácea por la pérdida de irrigación y con abundantes desprendimientos en la granulosa.

Después de clasificados, los folículos se lavaron dos veces con PBS (0.01 M pH 7.4). Se recuperó el líquido folicular por aspiración con la ayuda de una jeringa con aguja del número 25 y el saco folicular (células de la granulosa y teca).

La expresión de VEGF se analizó en los sacos foliculares (tecas más granulosas) y en sacos sin células de granulosa. Para el análisis de este factor en los sacos, se obtuvieron además las células de la granulosa que iban suspendidas en el líquido folicular, para lo cual

éste se centrifugó a 500 x g por 10 minutos, las células de la granulosa que se precipitaron se juntaron con su respectivo saco. Los sacos sin células de granulosa se obtuvieron, abriendo los sacos con tijeras de microcirugía y desprendiendo las células de la granulosa por un ligero raspado con pinzas de punta roma sobre las paredes del folículo y dejando correr sobre ellas 200 µl de PBS, posteriormente los sacos se lavaron dos veces más con 200 µl de PBS (0.01 M pH 7.4), uno con agitación vigorosa en un vortex y el otro al salir del vortex. Finalmente los tejidos: saco con y sin células de granulosa se almacenaron a -70 °C hasta su uso.

Obtención de RNA total por la técnica cloroformo, fenol y tiocinato de guanidina (Chomczynski and Sacchi, 1987)

Para la obtención del RNA total, fue necesario disponer de 100 mg de tejido, para ello se juntaron de 4 a 5 folículos y 10 a 20 sacos y sacos sin granulosa respectivamente, dependiendo del tamaño de los folículos. Los tejidos se homogenizaron en un homogeneizador vidrio teflón (Potter-Elvehjem), agregando 1 ml de una solución de fenol y guanidina (triPure Solation reagent, Boehringer Mannheim Corp.) por cada 100 mg de tejido. A los homogenizados se les adicionaron 200 µl de cloroformo y se mezclaron en un vortex, posteriormente se incubaron a 4°C por 15 min y se centrifugaron a 12 000 x g por 15 min a 4°C. Se recuperó la fase acuosa de cada muestra y se le adicionaron 500 µl de isopropanol, se incubaron por 10 min e inmediatamente se centrifugaron a 12 000 x g por 15 min a 4°C. El RNA total se disolvió en etanol al 75% y se agitó en un vortex, finalmente se centrifugó a 7 500 x g por 5 min a 4 °C.

El RNA se disolvió en 100 μ l de H₂O bidestilada tratada con dietil pirocarbonata (DEPC) (Lab. Promega). Se tomó una alícuota de 5 μ l de RNA y se adicionaron 495 μ l de H₂O tratada con DEPC, se incubó a 55-60 °C por 10 min e inmediatamente se enfrió. La concentración de RNA total se determinó en un espectrofotómetro (Beckman DV530). Con base en su absorbancia (ABS a 260 nm y se verificó su calidad por la relación de ABS a 260/280 nm) y también por electroforesis.

Para la electroforesis del RNA total, se tomaron 2 μ g del RNA y se le adicionaron 2 μ l de bromuro de etidio (0.5 μ g/ml) y 13 μ l de solución de cargado (0.1250 g de azul de bromofenol; 7.5 g de ficol tipo 400) y se hicieron correr en un gel de agarosa al 2% disuelto con TAE (4.84 g de Tris base, 1.14 ml de ácido acético glacial, y 2 ml de EDTA 0.5 M pH 8.0) a 50 mV/min por 1 h.

Reacción de la transcriptasa reversa (RT-PCR)

La RT-PCR para VEGF se realizó en un sólo paso, para ello, se utilizaron: 1 μ g de RNA total, 1 μ l del cebador sentido 10 μ M (5'-TCACCGCCTCGGCTTGTCACA-3'), 1 μ l de cebador antisentido 10 μ M (5'-TGTAATGACGAAAGTCTGCAG-3') (Cheung *et al*, 1995) a lo anterior se adicionaron los siguientes reactivos del producto "SuperScrip™" One-Step RT-PCR with platinum R Taq (Invitrogen, life technologies, NY, USA): 25 μ l de una mezcla de nucleótidos (solución amortiguadora con 0.4 mM de cada desoxirribonucleótido trifosfato y 2.4 mM de MgSO₄), 1 μ l de RT/Platinum R Taq (0.22 U/ μ l de Taq-DNA polimerasa y 200 U/ μ l de transcriptasa reversa H-II). Finalmente a cada muestra se le adicionó la cantidad

necesaria de H₂O tratada con DEPC para tener un volumen final de 50 µl. La RT-PCR se realizó en un termociclador de gradiente (Mastercycler gradiente, Eppendorff AG). La reacción de transcripción reversa se realizó a 42 °C por 15 min y para detener la reacción se pasó a 94 °C por 2 min. El DNA complementario (cDNA) producido se amplificó por 35 ciclos de PCR que incluyeron por cada ciclo una desnaturalización a 94 °C por 15 s, un anclaje a 57 °C por 30 s y una extensión a 70 °C por 1 min. Al terminar con la amplificación se realizó una extensión a 72 °C por 10 min. La reacción se finalizó incubando a 4 °C (Cheung *et al*, 1995).

Se utilizó un cebador antisentido para el exon 8 y una cebador sentido para el exón 3. Como estos exones son comunes a todas las formas del cDNA de VEGF-A permitió que se amplificaran todas las formas del cDNA de VEGF. Con estos cebadores hay un producto de amplificación de 186 pb para el cDNA de VEGF121; 318 pb para el cDNA de VEGF165, 390 pb para el cDNA de VEGF189 y 441 pb para el cDNA de VEGF206 (Cheung *et al*, 1995).

El mRNA de β-actina se ha encontrado en las células foliculares con niveles de expresión independiente del estado y tamaño del folículo, su expresión no es afectada por factores de crecimiento o gonadotropinas por lo que los niveles de mRNA de VEGF se normalizaron con base al contenido del mRNA de esta proteína (Barboni *et al*, 2000).

Para la RT-PCR de la β-actina de ovino se utilizó 1 µg de RNA total, 1 µl del cebador sentido 10 µM (5'-ATGGATCCGCCAACACAGTGCTGTCTGG-3') y 1 µl del cebador antisentido 10 µM (5'-GCGAATTCTACTACTGCTTGCTGATTCCA-3') (Bacich *et al*, 1994). El procedimiento utilizado en la RT-PCR de β-actina es similar al que se describió arriba para la RT-PCR de VEGF.

El producto de RT-PCR se separó por electroforesis, para lo cual se tomaron 2 μ g de cDNA, se le adicionaron 2 μ l de bromuro de etidio (0.5 μ g/ml) y 13 μ l de solución de cargado (0.125 g de azul de bromofenol; 7.5 g de Focoll tipo 400) se colocaron en un gel de agarosa al 3 % disuelto con TAE y se corrió a 100 mV/min por 1 h. Todos los geles se corrieron junto con un marcador de peso molecular de 100 pb (Labber, Promega USA) (Cheung *et al*, 1995). Cuando finalizó la electroferesis, los geles fueron analizados en un transiluminador (ApiChemi, Biochemi System UVP Biologing Systems Bioselec), el nivel de expresión de los diferentes cDNA de VEGF se realizó individualmente estimando por densitometría. El análisis de densidad óptica se realizó con el programa LabWorks 4.0, el análisis se realizó a las bandas individuales que estuvieron en el área comprenda de 600 a 100 pb del carril. De cada banda localizada se tomó el valor que le correspondió en pares de bases y la máxima intensidad óptica (maxIOD) de cada banda de cDNA y de β -actina. Los resultados se presentaron como promedio y desviación estándar (DS) de la relación maxIDO de la isoforma de VEGF/ β -actina (Yuan *et al*, 2001).

Determinación de la concentración de esteroides

Se determinó la concentración de estradiol y progesterona en el líquido folicular por la prueba quimioluminiscente de ligando marcado competitivo inmunoenzimaática (EIA), para determinar la concentración del estradiol en líquido folicular se utilizó el producto comercial Estradiol EIA (DSL-10-4300) y para la concentración de progesterona el producto comercial 17 α -OH Progesterona EIA (BSL-10-6800) (Cañez *et al*, 1988). Los límites de sensibilidad

para el estradiol fueron de 7 pg/ml mientras que para la progesterona fueron de 0.03 ng/ml. El coeficiente de variación para el estradiol fue de 4.8% para el intraensayo y de 6.5 % para el interensayo. El coeficiente de variación para la progesterona fue del 4.9 % para el intraensayo y de 6.7 % para el interensayo.

Se removieron todas las células y restos celulares del líquido folicular (LF) cuando se centrifugó a 12 000 x g por 20 min, posteriormente se tomaron 5 µl de LF y se diluyeron con 495 µl de PBS (Mattioli *et al*, 2001). Se utilizó una placa microtítulo de 96 pozos que tenían unido un anticuerpos contra estradiol o progesterona, a cada pozo se le adicionaron 50 µl de LF diluido o 50 µl del estandar, además se adicionaron 100 µl de una solución de estradiol marcado con biotina, se centrifugó a 600 x g por una hora a temperatura ambiente. Se retiró el sobrenadante y se adicionaron 200 µl de una solución de estreptavidina-peroxidasa de rábano (HRPO) , se centrifugó a 600 x g por 30 min a temperatura ambiente, se retiró el sobrenadante y se adicionaron 100 µl de solución con tetrametilbenzidina (TMB) que es un sustrato para HRPO se centrifugó a 600 x g por 30 min a 25 °C. No se expuso a la luz directa. Finalmente se adicionaron 100 µl de de ácido sulfúrico (0.2 M) para detener la reacción. Se realizó el estudio quimioluminiscente en un espectofotómetro microwell (Biomek 1000; Beckman Instruments, Fullerton, CA) todas las lecturas de absorbancia se obtuvieron a una longitud de onda de 450 nm.

Determinación de la permeabilidad membranal de los lisosomas (LMP) (Traganos and Darzynkiewicz, 1994)

Para medir la permeabilidad de la membrana lisosomal (LPM), fue necesario disponer de 10^6 de células de la granulosa, a las cuales se les adicionaron 999 μ l de PBS 0.01m pH 7.4 y 1 μ l de solución concentrada de naranja de acridina (AO) (1mg de AO en 1 ml de PBS 0.01m pH 7.4) (Laboratorio Polysciences Inc, Warrinton, PA) posteriormente se incubo a 37 °C por 30 min. Después de este tiempo se analizaron 10 000 células de la granulosa en un citómetro de flujo FACSort (Becton Dickinson, San Jose Ca) equipado con un laser de argón. La suspensión celular fue excitada a una longitud de onda de 488 nm y emitió en el espectro infrarojo >620 nm. La complejidad celular (FSC-H) fue de 44 y FSC en grupos de E00. La intensidad de fluorescencia en la parte rojas del espectro se midió en 10000 células usando un filtro dicrómico que reflejó a menos de 610 nm y permitió el paso de longitudes de onda superiores. La referencia de fluorescencia intrínseca se estableció con una muestra sin el fluorocromo. La intensidad de fluorescencia se registró como logaritmo con base 10 y se dividió en 4 secciones baja (1-10), regular (10-100), alta (100-1000) y muy alta (1000-10000) (de acuerdo a la intensidad de fluorescencia). Los resultados obtenidos de las 10 000 células fue analizado por el programa PC-Lysys II, se obtuvo el porcentaje de células de la granulosa en cada uno de los cuatro cuadrantes de fluorescencia.

Determinación de la permeabilidad de la membrana mitocondrial (Johnson et al, 1980, Darzinkiewicz et al, 1994)

Se tomaron 5 μ l de una solución concentrada de rodamina 123 (Rh123) (1 mg de Rh123 diluida en 1 ml de agua destilada. Eastman Organic Chemicals) y se le adicionó a una alícuota de 10^6 células de la granulosa suspendidas en 1 ml de PBS 0.01 M pH 7.4, la suspensión se incubó a 37 °C por 30 min en una cámara de incubación con CO₂ (Johnson et al, 1980). Posteriormente las células se lavaron dos veces con PBS 0.01 M pH 7.4 antes de realizar la medición en el citómetro de flujo (Darzinkiewicz *et al*, 1994). La suspensión de células marcadas con Rh123 se excitó a 486 nm y emitió en el espectro verde a 540 nm. Las mitocondrias emiten una intensidad alta cuando sus membranas están intactas y dicha intensidad disminuye conforme se da el daño a la membrana. Los resultados obtenidos de la intensidad de fluorescencia verde de 10 000 células fueron analizados por el programa PC-Lysis II, obteniendo el porcentaje de células de la granulosa en cada uno de los cuatro cuadrantes de fluorescencia. La clasificación de la intensidad de fluorescencia se hizo igual que en el caso de permeabilidad lisosomas.

Análisis estadísticos

El análisis estadístico se realizó utilizando el programa SPSS (Versión 8.0, SPSS inc, Chicago, II) se utilizó un ANOVA de dos vías y la prueba de Tukey. Los resultados de VEGF se presentan como promedio y desviación estándar (DS) de la concentración y abundancia

relativa de cada isoforma de VEGF; los resultados de Rh123 y AO se presentan como promedio y DS del porcentaje de células de la granulosa en cada uno de los cuatro niveles de intensidad de fluorescencia. Se realizó la comparación entre folículos de diferente tamaño y grado de atresia (Yuan *et al*, 2001). Las variables de respuesta fueron Rh123, AO y los mRNA de VEGF120, VEGF164, VEGF188; las variables fijas tamaño y grado de atresia.

Resultados

Clasificación del grado de atresia

En todos los casos se confirmó la clasificación microscópica que se hizo de la atresia folicular con la concentración de estradiol (E2) y progesterona (P4) en el líquido folicular. La relación de la concentración de E2/P4, como se puede ver en el cuadro 1, disminuyó de acuerdo al grado de atresia de los folículos de los dos tamaños. En ambos tamaños de folículos que se clasificaron morfológicamente como sanos (atresia 1), tuvieron una concentración de estradiol mucho más alta que la progesterona, por lo cual la relación E2/P4 fue muy superior a 1. En los folículos con atresia inicial (atresia 2) también se mantuvo una mayor producción de estradiol que de progesterona aunque con una marcada y significativa disminución en la relación E2/P4 con respecto a los folículos sanos., mientras que en los folículos con atresia avanzada (atresia 3) la relación E2/P4 fue menor a 1.

Cuadro 1. Relación estradiol/progesterona en el líquido folicular de los folículos de oveja en diferentes tamaños y etapas del proceso de atresia.

Tamaño en mm	Atresia	n	Concentración ng/ml		E2/P4
			Estradiol (E2)	Progesterona (P4)	
3-6	1	3	0.3993±0.0044 ^a	0.0700±0.0011 ^a	5.1833±0.0592 ^a
	2	3	0.32887±0.0145 ^b	0.1423±0.0012 ^b	2.3067±0.1040 ^b
	3	3	0.3117±0.0069 ^b	0.3733±0.0040 ^c	0.8300±0.0200 ^c
>6	1	3	0.4490±0.0005 ^c	0.0736±0.0014 ^a	6.0933±0.1281 ^d
	2	3	0.3823±0.0091 ^a	0.1340±0.0015 ^b	2.8500±0.0450 ^c
	3	3	0.3033±0.0023 ^b	0.3373±0.0008 ^d	0.8933±0.0033 ^c

Expresión de diferentes isoformas de mRNA de VEGF

El cuadro 2 muestra la concentración relativa de VEGF para los sacos con granulosa y sacos sin granulosa durante la atresia folicular. La concentración relativa de VEGF para los sacos con granulosa de folículos de 3-6 mm y >6 mm fue significativamente ($P<0.05$) más alta en folículos con atresia inicial (atresia 2) (0.86 ± 0.047 vs 0.99 ± 0.045 $P<0.05$) y (1.12 ± 0.052 vs 1.55 ± 0.102 $P<0.05$) que en los sanos (atresia 1). En la atresia avanzada (atresia 3) el comportamiento de la concentración relativa del mRNA de VEGF fue diferente; en los folículos pequeños se observó un ligero aunque significativo incremento en la concentración

mientras que en los folículos de mayor tamaño se apreció una disminución de la expresión. La concentración relativa del VEGF en los sacos sin granulosa de ambos tamaños de folículos siempre fue mayor en los folículos sanos que en los atrésicos y hubo una disminución significativa ($P < 0.05$) en la medida que se avanzó en el grado de atresia.

Por la técnica de RT-PCR se detectó la expresión de los mRNA de las isoformas de VEGF120, VEGF164 y VEGF188 en los folículos de ovejas, como se aprecia en la figura 4 y cuadro 2.

Cuadro 2. Concentración relativa de VEGF/ β -actina durante el desarrollo y atresia folicular de las ovejas.

Tejido	Tamaño en mm	Atresia	n	Concentración relativa del VEGF/ β -actina
Saco con granulosa	3-6	1	3	0.86 \pm 0.047 ^a
		2	3	0.99 \pm 0.045 ^b
		3	3	1.03 \pm 0.055 ^c
	> 6	1	3	1.12 \pm 0.052 ^d
		2	3	1.55 \pm 0.102 ^e
		3	3	0.84 \pm 0.026 ^a
Saco sin granulosa	3-6	1	3	1.04 \pm 0.043 ^c
		2	3	1.01 \pm 0.025 ^b
		3	3	0.92 \pm 0.040 ^f
	> 6	1	3	0.75 \pm 0.030 ^a
		2	3	0.59 \pm 0.057 ^g
		3	3	0.27 \pm 0.020 ^h

Dentro de la misma columna, letras diferentes indican la presencia de diferencias significativas ($p < 0.05$; prueba de Tukey)

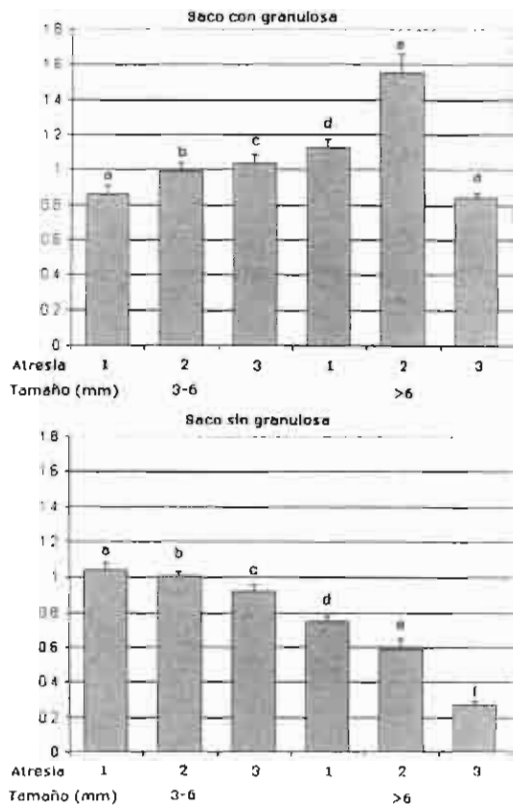
La abundancia relativa de mRNA de las isoformas de VEGF se muestra en el cuadro 3 y figura 5. Se pudieron detectar 3 isoformas de VEGF, la 120, 164 y 188, la más abundante de ellas fue la 120 y la que apareció con menor frecuencia y menos concentración fue la 188. La abundancia realtiva de mRNA de la isoforma VEGF120 en sacos con granulosa tuvo un comportamiento peculiar en los dos tamaños de folículos estudiados, la mayor concentración de esta isoforma se encontró en las estructuras de folículos con atresia inicial, lo cual no ocurre en los sacos sin granulosa de ambos tamaños. En los sacos sin granulosa la concentración del mRNA para VEGF 120 disminuyó de manera directa con el grado de atresia. Para la isoforma 164, la abundancia relativa del mRNA fue significativamente mayor en la atresia inicial de los folículos de >6 mm tanto en sacos con granulosa como en sacos sin granulosa, para los folículos pequeños, la mayor concentración se pudo observar en los folículos sanos de ambas estructuras estudiadas. Finalmente se encontró que mRNA de la isoforma 188 tuvo mayor abundancia en los sacos con granulosa de los folículos de >6 mm y la mayor concentración se observó en la atresia inicial (atresia 2) (0.36 ± 0.019 atresia 1, 0.65 ± 0.045 en la atresia 2 y 0.44 ± 0.023 en la atresia 3 ($P < 0.05$). Esta isoforma estuvo ausente en sacos con granulosa de todas las atresias de los folículos de 3-6 mm y en sacos sin granulosa de folículos de 3-6 mm con atresia 1 y prácticamente en todas las atresias de los folículos >6 mm.

Cuadro 3. Abundancia relativa (VEGF/ β -actina) de diferentes isoformas de VEGF durante el desarrollo y atresia folicular de la oveja en sacos foliculares con o sin células de granulosa.

Tejido	Tamaño en mm	Grado de atresia	n	Abundancia relativa del mRNA de:		
				VEGF120	VEGF164	VEGF188
Saco con granulosa	3-6	1	3	0.44±0.017 ^a	0.42±0.045 ^a	ND
		2	3	0.75±0.025 ^b	0.23±0.020 ^c	ND
		3	3	0.70±0.052 ^b	0.33±0.005 ^c	ND
	> 6	1	3	0.38±0.030 ^a	0.36±0.041 ^d	0.36±0.019 ^a
		2	3	0.45±0.040 ^c	0.45±0.030 ^a	0.65±0.045 ^b
		3	3	0.24±0.020 ^d	0.15±0.020 ^e	0.44±0.023 ^c
Saco sin granulosa	3-6	1	3	0.69±0.066 ^b	0.34±0.023 ^c	ND
		2	3	0.45±0.020 ^c	0.39±0.005 ^a	0.17±0.011 ^d
		3	3	0.40±0.005 ^a	0.26±0.032 ^f	0.25±0.011 ^c
	> 6	1	3	0.54±0.010 ^c	0.12±0.020 ^g	0.08±0.003 ^f
		2	3	0.33±0.015 ^e	0.21±0.015 ^b	ND
		3	3	0.17±0.015 ^f	0.10±0.015 ^g	ND

Dentro de la misma columna, letras diferentes indican diferencias significativas ($p < 0.01$; prueba de Tukey)

A)



B)

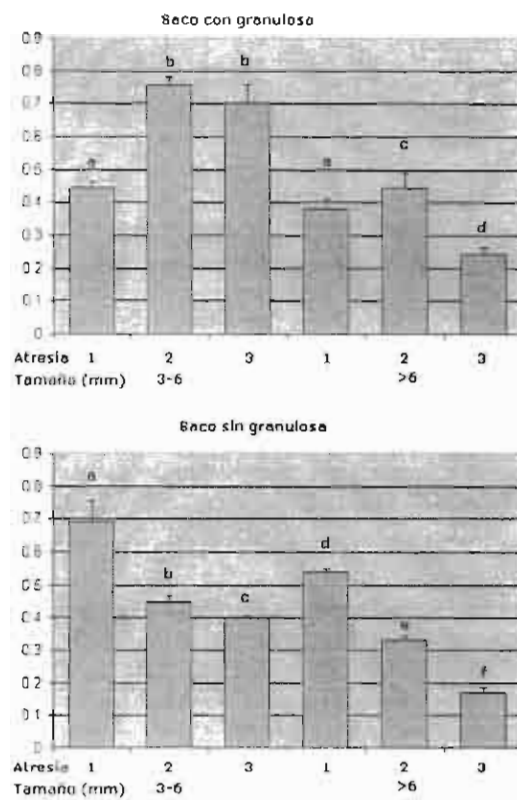
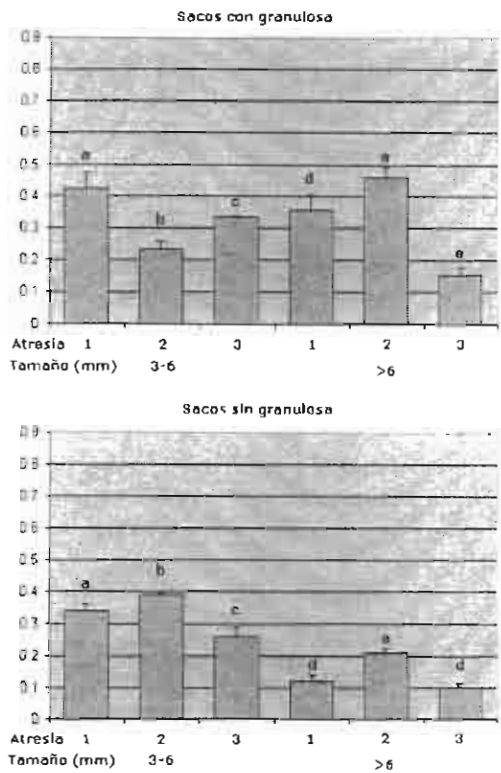


Figura 4: A) Concentración relativa de VEGF durante el desarrollo y atresia folicular de la oveja en saco con granulosa y en saco sin granulosa. Abundancia relativa de diferentes mRNA de isoformas de VEGF durante el desarrollo y atresia folicular de la oveja en sacos con granulosa y en sacos sin granulosa, B) VEGF120, C) VEGF164 y D) VEGF188.

C)



D)

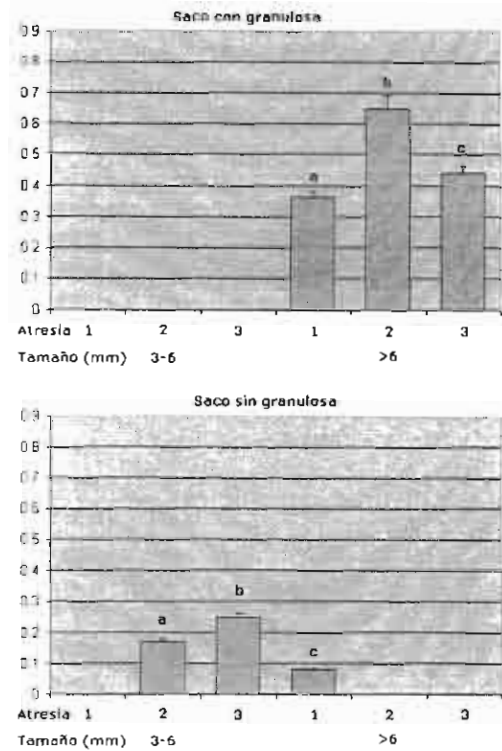


Figura 4: A) Concentración relativa de VEGF durante el desarrollo y atresia folicular de la oveja en saco con granulosa y en saco sin granulosa. Abundancia relativa de diferentes mRNA de isoformas de VEGF durante el desarrollo y atresia folicular de la oveja en sacos con granulosa y en sacos sin granulosa, B) VEGF120, C) VEGF164 y D) VEGF188.

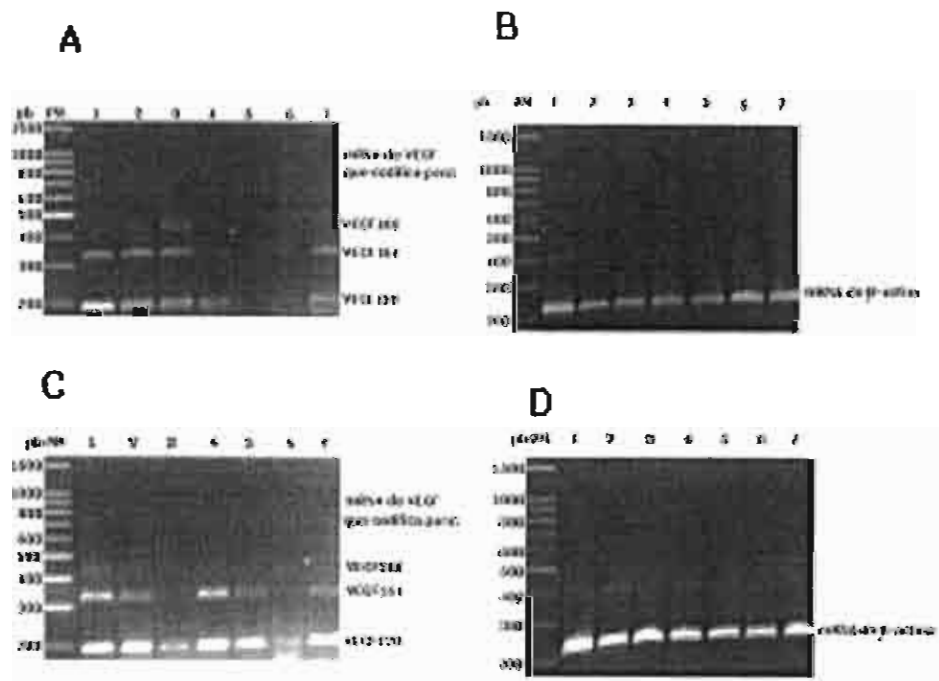


Figura 5. Producto de RT PCR separado por electroforesis donde se muestran las isoformas de VEGF (A y C) en los diferentes tamaños 3-6 mm (carril 1, 2 y 3) y mayores de 6 mm (carril 4, 5, y 6) y grados de atresia (carril 1 y 4, atresia 1; carril 2 y 5, atresia 2; carril 3 y 6 atresia 3) y para β -actina (B y D). El carril 7 pertenece al control positivo (cuerpo lúteo de ovino).

Permeabilidad mitocondrial

El cuadro 4 muestra los cambios en la intensidad de fluorescencia emitida por Rh123 a 530 nm lo cual reflejaron los cambios en la permeabilidad de la membrana de la mitocondria de las células de la granulosa en el proceso de atresia folicular. Los folículos grandes (>6 mm) sanos (atresia 1) tuvieron el mayor porcentaje de células de la granulosa con intensidad de fluorescencia muy alta ($61.5 \pm 9.4\%$) que los folículos pequeños (3-6 mm) ($P < 0.05$) sanos ($14.9 \pm 2.55\%$ de células). El porcentaje de células con fluorescencia alta o intensa declinó significativamente entre folículos de 3-6 mm de acuerdo al grado de atresia ($14.9 \pm 2.5\%$ para la atresia 1; $4.1 \pm 1.4\%$ en la atresia 2 y 1.5 ± 6.3 en la atresia 3 $P < 0.05$). En los folículos pequeños atrésicos (3-6 mm, atresia 3), es significativamente menor el número de células con intensidad de fluorescencia alta comparado con los folículos de la atresia 2 y los sanos de este tamaño ($55.3 \pm 3.8\%$, 77.6 ± 5.7 y $67.6 \pm 8.4\%$ de células, $P < 0.05$). Además, los folículos con atresia 3 muestran un aumento significativo en el número de células de la granulosa que son mediana fluorescentes ($26.4 \pm 5.4\%$), lo cual significa que estas células tienen mitocondrias permeabilizadas. En cuanto a los folículos grandes (>6 mm) el comportamiento en la intensidad de fluorescencia fue totalmente diferente a lo descrito para los folículos pequeños. Los folículos con una atresia avanzada (atresia 3), tuvieron un mínimo porcentaje de células de la granulosa ($3.0 \pm 1.3\%$), con muy alta intensidad mientras que para la atresia moderada y en los folículos sanos alrededor del 60% de las células tuvieron esta intensidad. Llama la atención el porcentaje alto de células con intensidad de fluorescencia baja que mostraron los

folículos con atresia avanzada ($23.5\pm 4.7\%$), lo cual significa el grado alto de daño celular ocasionado por alteración de la mitocondria de estas células.

Cuadro 4. Porcentaje de células de la granulosa incubadas con Rodamina 123 en diferentes intensidades de fluorescencia verde (530 nm).

Tamaño (mm)	Grado de atresia	n	Intensidad de fluorescencia			
			1-10 (baja)	10-100 (media)	100-1000 (alta)	1000-10000 (muy alta)
3-6	1	5	§16.6±2.1 ^a	§2.3 ^b	§67.6±8.4 ^c	§14.9±2.5 ^a
	2	5	§15.9±3.5 ^a	§3.1 ^b	§77.6±5.7 ^c	†4.1±1.4 ^b
	3	5	§12.0±3.7 ^a	†26.4±5.4 ^b	†55.3±3.8 ^c	†1.5±6.3 ^d
>6	1	5	†4.8±1.2 ^a	†12.0±3.8 ^b	†21.9±4.1 ^c	†61.5±9.4 ^d
	2	5	†5.0±1.4 ^a	§2.4 ^a	&32.5±4.5 ^b	†59.9±3.8 ^c
	3	5	†23.5±4.7 ^a	§2.0 ^b	§71.3±6.3 ^c	†3.0±1.3 ^b

Las células fueron obtenidas de folículos de 3-6 y >6 mm de diámetro y clasificados en folículos sanos (atresia 1), atresia inicial (atresia 2) y con atresia avanzada (atresia 3). Símbolos diferentes a la izquierda indican diferencias significativas ($P>0.05$) en la intensidad de fluorescencia entre folículos de diferente tamaño y diferente atresia. Letras superscript diferentes a la derecha de cada número indican diferencias significativas ($P>0.05$) entre la intensidad de fluorescencia en los folículos del mismo tamaño y la misma atresia.

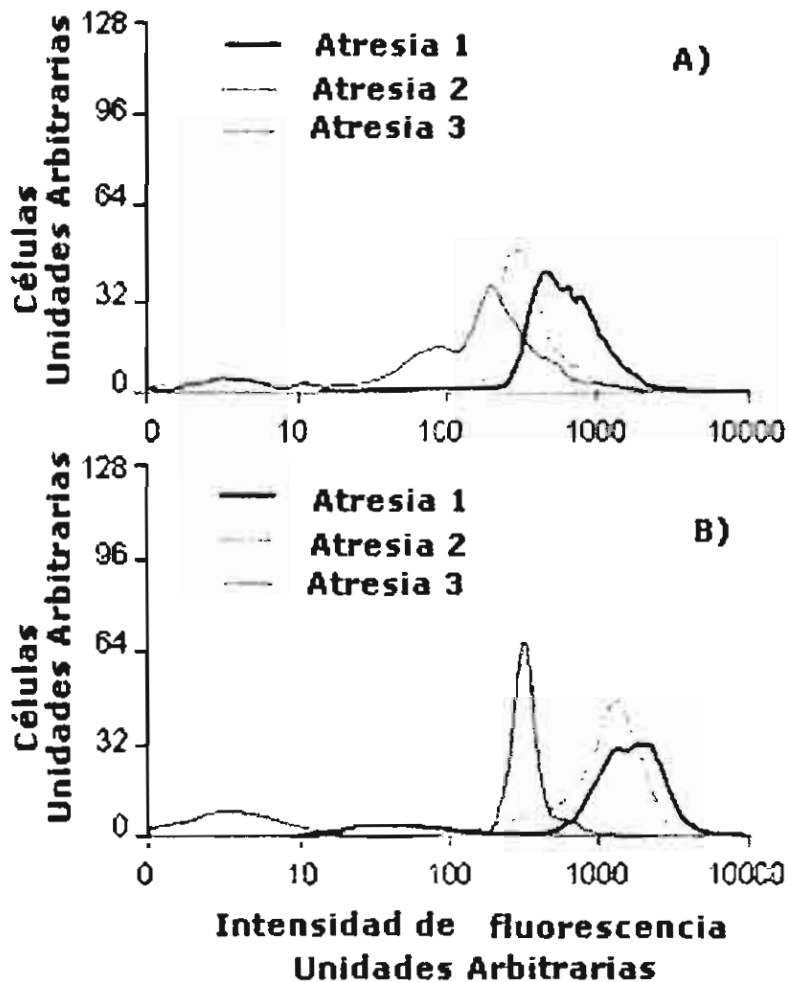


Figura 6. Análisis citofluorométrico de las células de la granulosa incubadas con rodamina 123 (Rh123) excitadas a 488 nm y la emisión se observó a 530 nm usando filtros apropiados. Las células fueron obtenidas de folículos de 3-6 mm de diámetro (A) > de 6 mm (B) y en tres diferentes grados de atresia. Los resultados obtenidos de 10 000 células fue analizado utilizando el programa Lysys II y la intensidad de fluorescencia (en la abcisa) es registrada logarímicamente indicando el porcentaje de células de la granulosa en cada uno de los cuatro

niveles de intensidad. La ordenada indica el número relativo de células. Se muestra un experimento representativo de 5 repeticiones

Permeabilidad lisosomal

El cuadro número 5 presenta los cambios en la intensidad de fluorescencia emitida a 640 nm por células de la granulosa incubadas con AO. La intensidad de fluorescencia es directamente proporcional a la integridad de la membrana lisosomal. El 82.5 ± 12.5 y $94.3 \pm 11.4\%$ de células de la granulosa de los folículos sanos pequeños y grandes respectivamente muestran una alta intensidad de fluorescencia roja. Las células de la granulosa de los folículos pequeños, con atresia inicial, muestran un patrón de intensidad de fluorescencia roja bifásica indicando la presencia de células con diferentes volúmenes de lisosomas funcionales: un número pequeño de células ($24.1 \pm 2.2\%$) con intensidad de fluorescencia roja muy alta y un segundo pico ($69.2 \pm 6.3\%$ de células) con intensidad de fluorescencia alta. Las células de la granulosa de los folículos pequeños con atresia 3 muestra un patrón de fluorescencia en sus células, desplazado hacia la izquierda en la intensidad de fluorescencia. El mayor porcentaje de células se acumuló entre la intensidad alta y media.

En las células de la granulosa obtenidas de los folículos >6 mm sanos, el porcentaje de células con muy alta intensidad de fluorescencia roja es 20 veces mayor que en los folículos con atresia 2 (94.3 ± 11.41 versus $5.3 \pm 1.7\%$ $P < 0.05$). En contraste, entre los folículos grandes, con atresia 2 y 3 el patrón de fluorescencia de sus células analizadas es muy similar, excepto que varía el porcentaje de células en cada región de intensidad. Especialmente llama la

atención que en los folículos con atresia 3, tienen un considerable número de células de la granulosa ($21.5 \pm 4.7\%$) con lisosomas permeabilizados que han perdido la capacidad de retener AO y por lo tanto tienen poca fluorescencia.

Cuadro 5. Intensidad de fluorescencia de 640 nm de las células de la granulosa incubadas con naranja de acridina.

Tamaño (mm)	Grado de Atresia	n	Intensidad de fluorescencia			
			1-10 (baja)	10-100 (media)	100-1000 (alta)	1000-10000 (muy alta)
3-6	1	5	§2.6a	§6.3±2.1b	§8.6±1.4b	§82.5±12.5c
	2	5	†5.9±0.5a	§2.7a	†69.2±6.3b	†24.1±2.2c
	3	5	‡12.0±3.7a	†26.4±5.4b	‡55.3±3.8c	‡5.5±2.1d
>6	1	5	§0.8a	§2.0a	§4.9±4.0a	§94.3±11.4b
	2	5	§2.0a	§0.4a	&92.2±0.5b	‡5.3±0.8c
	3	5	&21.5±4.7a	§2.6b	†68.1±7.3c	‡8.0±1.7d

Las células fueron obtenidas de folículos de 3-6 y >6 mm de diámetro y clasificados como sanos o atresia 1, atresia inicial (atresia 2) y atresia avanzada (atresia3). Símbolos diferentes a la izquierda indican diferencias significativas ($P > 0.05$) en la intensidad de fluorescencia entre folículos de diferente tamaño y diferente atresia. Letras superscript diferentes a la derecha de cada número indica diferencias significativas ($P > 0.05$) entre la intensidad de fluorescencia en los folículos del mismo tamaño y atresia.

En resumen los resultados muestran que en los folículos pequeños que se vuelven atrésicos predominan los cambios en la fluorescencia de rodamina sobre los de AO, mientras que en los folículos grandes , predominan los cambios en la intensidad de AO sobre Rh123.

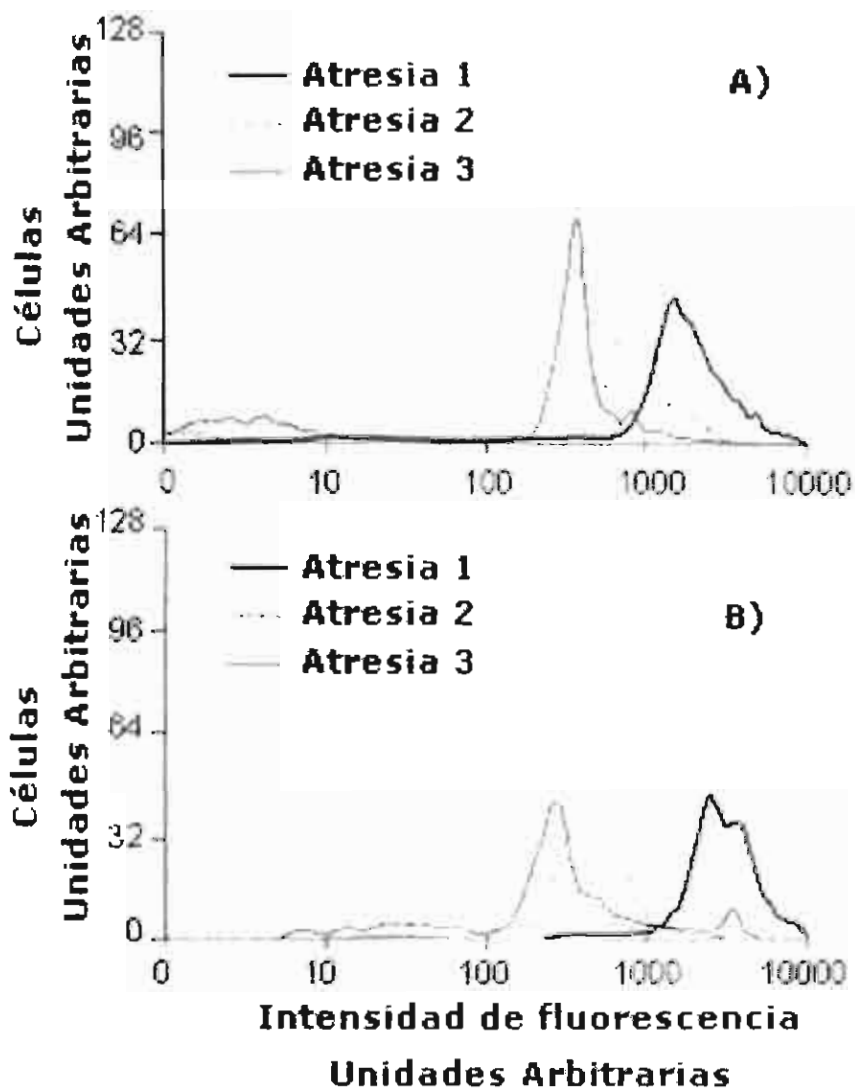


Figura 7. Análisis citofluorométrico de las células de la granulosa obtenidas de folículos de 3-6 mm de diámetro (A) > de 6 mm (B) y en tres diferentes grados de atresia incubadas con naranja de acridina. Las células incubadas fueron excitadas a 488 nm y la emisión es evaluada a 640 nm usando filtros apropiados (ver figura 6).

Discusión

Los estudios del proceso de atresia folicular requieren de una adecuada clasificación del grado de atresia, se realizó una clasificación morfológica del proceso de atresia folicular en la oveja que se ha probado por diversos grupos (Moor *et al*, 1978; Carson *et al*, 1979; Rosales-Torres *et al*, 2000) y se confirmó con la determinación de estradiol y progesterona. En el líquido de los folículos atrésicos se observó un descenso en la concentración del estradiol por la pérdida de aromatasas y mayor concentración de progesterona (Hsueh *et al*, 1994). La relación E2/P4 se ha utilizado para clasificar la salud y la atresia de folículos de oveja y de otras especies. En este trabajo se encontró una disminución muy clara en la relación E2/P4 relacionado con el grado de atresia de los folículos de ambos tamaños, y al igual que otros autores se observó que esta relación fue muy superior a 1 en los folículos sanos y <1 en los de atresia avanzada (Rosales *et al*, 2000; Jiang *et al*, 2003). La acción de los estrógenos sobre la expresión del mRNA de VEGF es controversial, mientras que en la rata se reporta una acción directa de éstos sobre la expresión de mRNA VEGF en el ovario (Danforth *et al*, 2003), en cerdas, los estrógenos no estimulan la producción de mRNA VEGF en folículos *in toto* cultivados (Mattioli *et al*, 2001, Acosta *et al*, 2003). Por lo tanto, hasta ahora la demostración de la relación entre estrógenos y la expresión de VEGF requiere de más estudios en diferentes especies (Kaczmarek *et al*, 2005). Nosotros encontramos que en el inicio del proceso de atresia (atresia 2), hubo un aumento en la expresión del mRNA de VEGF acompañado de la disminución en la concentración de E2 en el líquido folicular de estos folículos, en

comparación con los folículos sanos (atresia 1) por lo que podríamos pensar que en la oveja el estradiol no tiene un efecto directo en la expresión mRNA VEGF.

La atresia folicular es desencadenada por la muerte de las células endoteliales de los vasos sanguíneos que irrigan al folículo (Jiang *et al*, 2003). Al contrario, el desarrollo folicular depende de la supervivencia de la célula endotelial y de la angiogénesis (Zelevnik *et al*, 1981; Alon *et al*, 1995; Neeman *et al*, 1997; Benjamin *et al*, 1999; Davis *et al*, 2003). Claramente se ha demostrado que VEGF modula la angiogénesis en el folículo ovárico (Hay *et al*, 1976; Moor and Seamark, 1986; Barboni *et al*, 2000; Shimizu *et al*, 2002). Los resultados de este trabajo, demuestran claramente la presencia del mRNA de VEGF en los sacos con o sin células de la granulosa. Cuando el análisis se hizo con células de las tecas y granulosa, la concentración relativa del mRNA de VEGF aumentó con el grado de atresia, mientras que cuando el estudio se realizó sólo con las tecas hubo una disminución significativa del mRNA de VEGF de acuerdo al grado de atresia. Otros autores han reportado que en el inicio de la atresia disminuye la expresión del mRNA de VEGF en células de la granulosa de roedores, cerdos y primates (Zelevnik *et al*, 1981; Shweiki *et al*, 1993; Shimizu *et al*, 2003); sin cambios en las tecas de folículos atrésicos en cerdos (Mattioli *et al*, 2001). En procesos neurodegenerativos donde ocurre muerte de las células endotelial se produce hipoxia (Storkebaum and Carmeliet, 2004), algo similar puede ocurrir en el folículo ovárico, posiblemente la muerte selectiva de las células endoteliales de los vasos sanguíneos de la red interna del folículo desencadena la hipoxia de las células foliculares y desencadena el proceso de la atresia folicular, tal como lo sugiere Jiang *et al*, (2003). La hipoxia claramente incrementa la expresión del mRNA de VEGF (Enholm *et al*, 1997) y explicaría el aumento del

mRNA VEGF en los sacos con granulosa que nosotros observamos durante el desarrollo e inicio de la atresia folicular de la oveja. Este incremento en el mRNA de VEGF y la expresión de la proteína de VEGF tiene efecto antiapoptótico tanto en las células endoteliales como en las células de la granulosa de bovinos (Gerber *et al*, 1998; Greenaway *et al*, 2004). Se ha sugerido que en los folículos de ratones, la administración de VEGF disminuye la apoptosis de las células endoteliales (Quintana *et al*, 2004). Los capilares de la red interna degeneran cuando disminuye la acumulación de VEGF en el líquido folicular (Moor and Seamark, 1986). VEGF es un factor de supervivencia clave para la célula endotelial (Alon *et al*, 1995; Benjamin *et al*, 1999) e induce la expresión de proteínas antiapoptóticas como Bcl-2 y A1 en las células endoteliales (Gerber *et al*, 1998), por lo cual Greenaway *et al* (2004), han sugerido que probablemente sea esta misma vía por la que se ejerce el efecto citoprotector de VEGF en las células de la granulosa. La expresión tanto de VEGF como del receptor Flk-1/KDR en las células de la granulosa de bovino las protege del proceso de muerte e inhibe la atresia folicular. Los folículos sanos exhiben en las células de la granulosa un bajo índice de apoptosis y una alta expresión de Flk-1/KDR., cuando comienza la atresia se reduce la expresión de Flk-1/KDR. Adicionalmente, al bloquear Flk-1/KDR significativamente se inhibe la habilidad de las células de la granulosa para responder a VEGF endógeno y exógeno (Greenaway *et al*, 2004). De acuerdo a nuestros resultados podemos suponer que si bien es cierto que encontramos que cuando comienza la atresia folicular (atresia 2), hay mayor expresión relativa de VEGF, esta podría no ser acompañada por la mayor expresión del receptor, lo cual lleva al folículo a continuar con el proceso de atresia.

La participación de las isoformas en el efecto citoprotector no se ha investigado por lo que convendría realizar más estudios que permitan esclarecer el papel de éstas en la acción antiapoptótica y angiogénica. Sin embargo con base en nuestros resultados podemos pensar que VEGF120 podría ser la isoforma responsable de la citoprotección de las células de la granulosa porque es la que aumenta en el inicio de la atresia, en los folículos grandes VEGF188 también podría estar involucrada en la protección celular de la granulosa. En otros estudios la expresión de VEGF120 es muy importante para el crecimiento de vasos, mientras que la expresión de VEGF164 es necesaria para el desarrollo de éstos (McColm *et al*, 2004) y VEGF188 modula la permeabilidad capilar (Ancelin *et al*, 2002).

La expresión de los diferentes mRNA de VEGF varía en función al tipo de tejido y si es normal o canceroso. Los mecanismos moleculares involucrados en la adición o eliminación de los exones del 6-8 parecen ser regulados de manera específica al tipo de tejido (Laitinen *et al*, 1997). No obstante, que existe una gran controversia sobre el papel que tienen cada isoforma de VEGF en el proceso de la angiogénesis; se ha observado que cada una de ellas tiene diferente actividad sobre la angiogénesis y una misma isoformas puede actuar diferente en un tejido que en otro, posiblemente el microambiente que rodea a cada sitio anatómico pueden afectar la función de las isoformas de VEGF (Gou *et al*, 2001; Jensen *et al*, 2004). La inducción simultánea de varias isoformas de VEGF pueden ser capaz de equilibrar una respuesta angiogénica de acuerdo a la condición del medio ambiente local de la célula que lo secreta (Uthoff *et al*, 2002). Estudios *in vitro* de células endoteliales de corazón de codorniz cultivadas en un gel de colagena demuestran que VEGF165 favorece la migración de la célula endotelial mientras que VEGF121 no tiene ningún efecto, estudios previos habían propuesto

que VEGF121 puede favorecer la proliferación de las células endoteliales de la membrana coroidal y inducir hipervascularización y cambios en la permeabilidad vascular en el sistema límbico (Yue and Tomanek, 2001). Mientras que en cultivos de células endoteliales y células tipo 293 trasfectadas con mRNA VEGF189 o VEGF206, mostraron poca o nula actividad mitogénica. Cuando las células fueron trasfectadas con el mRNA de VEGF206 sin el exon 6a, esta isoforma fue eficientemente secretada al medio y promovió el crecimiento de las células endoteliales, lo cual deja claro que la ausencia de este exon es indispensable para que VEGF206 se pueda liberar de la célula. También se ha sugerido que VEGF189 y VEGF206 pueden ser más potentes que otras isoformas para inducir la extravasación (Ferrara *et al*, 1992). Las isoformas que permanecen unidas a la superficie de la célula y a la matriz extracelular (ECM) constituyen un reservorio de factores angiogénicos que pueden ser liberados lentamente por la exposición de heparina, heparina sulfato y heparinasas, o puede ser liberado más rápidamente por enzimas proteolíticas como la plasmina y activador del plasminógeno tipo urocinasa (uPA). La pérdida del dominio de unión a heparina resulta en una pérdida significativa de la actividad mitogénica (Hofstaetter, 2004).

La hipoxia es un factor angiogénico de acción indirecta que modula la expresión de mRNA de VEGF (Enholm *et al*, 1997). La hipoxia estimula reversiblemente la expresión de mRNA de VEGF en los folículos de bovinos cultivados *in vitro* a diferentes concentraciones de oxígeno. La concentración de oxígeno en el líquido folicular desciende durante el desarrollo folicular y posiblemente esto provoque que se desencadene la angiogénesis en el folículo. En los folículos preovulatorio de los cerdos, principalmente, aumentan la expresión de VEGF121 y VEGF164 (Bianco *et al*, 2003). La expresión de las isoformas VEGF189 y

VEGF206 se observa en áreas hipoxicas cercanas a donde se implantan las células cancerosas del pulmón (Yuan *et al*, 2001). Se ha demostrado que las isoformas VEGF121, VEGF165, VEGF183 y VEGF189 son expresadas en condiciones de hipoxia en el menisco de conejo (Hofstaetter *et al*, 2004). Varios estudios demuestran que la isoforma VEGF121 es la más expresada en tejido humano y en tumores, mientras que la expresión de VEGF165, VEGF189 y VEGF206 es variable (Yuan *et al*, 2001). En muchos tejidos, VEGF165 y en menos extensión VEGF121 son las isoformas angiogénicas más importantes de VEGF (Jensen *et al*, 2004). La expresión de las isoformas VEGF120 y VEGF164 se incrementa en los días del 1 al 3 en proceso de curación del hueso de roedores, mientras que VEGF188 es detectado alrededor del día 5 (Uchida *et al*, 2003; Hofstaetter *et al*, 2004). En este trabajo, se demostró la expresión de los mRNA de las isoformas VEGF120, VEGF164 y VEGF188 células de los folículos de la oveja. En la granulosa y teca de folículos sanos y atrésicos pequeños hubo expresión del mRNA de las isoformas VEGF 120 y 164 y sólo en las tecas de los atrésicos se demostró la isoforma VEGF188. Mientras que en los folículos > de 6 mm se expresaron la tres isoformas (VEGF120, VEGF164 y VEGF188) en granulosa y teca de folículos sanos, con atresia inicial y con atresia avanzada y en la teca prácticamente sólo se expresaron las isoformas VEGF120 y VEGF164. Durante el desarrollo folicular en cerdos y primates se ha reportado la expresión VEGF120 y VEGF164 en células de la teca y granulosa (Mattioli *et al*, 2001; Stouffer *et al*, 2001; Shimizu *et al*, 2003; Taylor *et al*, 2004), lo cual significa que la presencia del mRNA de VEGF188 puede resultar una importante diferencia en el desarrollo folicular y la atresia entre estas especies y la oveja, tal como otros han encontrado cuando se comparan diferentes sistemas celulares (Uthoff *et al*, 2002). Cabe señalar que las isoformas

encontradas en el tejido lúteo de oveja que sirvió como control positivo para identificar las isoformas en los folículos sanos y atresicos, (VEGF120, VEGF164 y VEGF188) son las mismas que han sido reportadas por Redmer *et al*, (1996) en el mismo tejido y especie. En este trabajo se pudieron identificar las tres isoformas tanto en el cuerpo lúteo como en las células foliculares, lo cual demuestra un mismo origen celular.

Se detectaron grados diferentes de expresión mRNA VEGF durante el desarrollo y atresia folicular en la oveja. Actualmente como se dijo antes, no está claro el papel que juegan cada una de las isoformas de VEGF en el desarrollo y degeneración de órganos y tejidos (McColom *et al*, 2004). Durante el desarrollo folicular en la oveja se encontró que en sacos foliculares conteniendo células de las tecas y granulosa, la expresión del mRNA de la isoforma VEGF120 en ambos tamaños estudiados y de VEGF164 y VEGF188 en los folículos grandes, fue mayor cuando el folículo comenzó la atresia, lo cual sugiere que los factores que llevaron a estos folículos a la atresia estimularon la expresión de estos mensajeros, probablemente como una medida de emergencia ante la hipoxia que seguramente presentaban estos folículos. Sin embargo, esta medida no es tomada por las células de la teca porque su comportamiento fue distinto. En el análisis de tecas el mRNA de la isoforma VEGF164 fue el más estimulado con el comienzo de la atresia en ambos tamaños de folículos, además en este tejido, se registró la expresión de la isoforma VEGF 188 en los folículos pequeños, mientras que la isoforma VEGF 120, en ambos tamaños de folículos disminuyó la expresión directamente relacionado con la atresia.

La incidencia de la atresia en los folículos de ovejas es altamente dependiente del diámetro folicular, el 21% de los folículos pequeños son atrésicos, mientras que en los mayores de 6 mm el 93% son atrésicos (Carson *et al*, 1979). Esta relación de atresia y tamaño folicular también ha sido encontrada en otras especies como el humano y el mono (Hsueh, *et al*, 1994). El oxígeno es absolutamente requerido para la supervivencia de los tejidos en crecimiento y en latencia, la insuficiente provisión de oxígeno aun cuando el déficit sea transitorio puede producir un daño celular irreversible (López-Barneo *et al*, 2001). La distancia a la que el oxígeno puede difundir dentro de un tejido que consume oxígeno es muy corta, típicamente está dentro de un rango de 20-100 μm . Las necesidades de un adecuado suplemento de oxígeno a todas las partes del tejido es un requerimiento funcional que puede ser satisfecho por estructuras del sistema vascular (Zakrzewicz *et al*, 2002). El sistema vascular del folículo preovulatorio se encuentra en las tecas, no invade a la capa basamental ni a las células de la granulosa, se considera como una estructura multicelular libre de sistema vascular (Neeman *et al*, 1997). El medio ambiente intrafolicular es caracterizado por tener una concentración baja de oxígeno, una condición que es muy evidente para los folículos preovulatorios, el gas debe difundir de los vasos presentes en la teca a través de la capa basal hacia la capa de la granulosa y acumularse dentro del líquido folicular. Las células del folículo y el ovocito se han adaptado a este medio ambiente por una extrema sensibilidad al estrés oxidativo (Van Blerkom *et al*, 1997). Al aumentar de tamaño, el folículo aumenta su capacidad esteroideogénica y con ello el estrés oxidativo. Los requerimientos metabólicos para estimular este proceso pueden repercutir en la formación anormal de especies óxido reactivas,

especialmente cuando el NAPH pierde electrones hacia el O_2 para formar O_2^- y éste no es liberado a la P450 reductasa (Cross and Janes, 1991).

Un signo temprano de atresia incluye una desaparición selectiva de la red interna sin cambios sustanciales de los vasos sanguíneos de la teca interna (Moor and Seamark, 1986). Los capilares de la red interna degeneran cuando disminuye la acumulación de VEGF en el líquido folicular (Moor and Seamark, 1986). Se piensa que la hipoxia inicial que sufren los folículos al comienzo de la atresia puede ser responsable del aumento en la expresión de mRNA VEGF120 en las células de la granulosa de los folículos de ambos tamaños y que en la teca responde a la hipoxia con la mayor expresión del mRNA de VEGF164. En un trabajo reciente realizado con menisco de conejo, un tejido que igual que el folículo tiene que adaptarse a la hipoxia, encontraron que en principio expresa las isoformas VEGF121, VEGF165 y VEGF189 y cuando los sometieron a 6 h de hipoxia, primero se incrementó la expresión de mRNA VEGF121 y VEGF165, mientras que después de 24 h de hipoxia se incrementó la expresión de mRNA VEGF188 (Hofstaetter *et al*, 2004). Estas observaciones permiten suponer que algo similar ocurre en el folículo durante la atresia, sin embargo como éste incluye dos tipos celulares distintos, cada uno participa con la mayor expresión de una isoforma y si además se analiza la variable del tamaño folicular se observa que en los folículos más grandes cuya demanda de oxígeno es mayor, en sus células de la granulosa que más sufren la hipoxia por ser una capa avascular, requiere de la expresión adicional de la isoforma VEGF188.

En este trabajo, por primera vez se evidencia el mRNA de VEGF 188, durante la atresia folicular de las ovejas. Como se dijo antes esta isoforma normalmente está en la matriz

extra celular de los tejidos y se puede movilizar por acción de enzimas que digieren la matriz extra celular como es el caso del activador del plasminógeno (Hofstaetter, 2004), o bien se liberan cuando la célula se lisa, esto parece indicar por lo tanto que las células de la granulosa de los folículos atrésicos grandes incrementan su expresión de VEGF188 y muy probablemente la proteína que resulte será liberada cuando se rompan al morir por necrosis.

En el inicio de la atresia en los folículos pequeños se incrementa en mRNA VEGF188 en la teca, mientras que en los folículos grandes, la granulosa expresa más VEGF164 y VEGF188. Por lo que podría existir una interacción entre la granulosa y la teca en la atresia inicial para mantener altos niveles de VEGF.

La mayor expresión del mRNA VEGF y sus isoformas que se observó en este trabajo en el inicio de la atresia como respuesta fisiológica a la hipoxia que sufren estos folículos, seguramente no es acompañada de la mayor expresión de los receptores de VEGF, Flk-1 y Flt-1 y por ello no se tiene la respuesta angiogénica y citoprotectora esperada. En un trabajo muy reciente, se encontró justamente que cuando los folículos dominantes inician la atresia tienen una mayor expresión de la proteína de VEGF en las células de la granulosa y sin embargo la expresión del receptor Flk-1 fue menor (Guzmán *et al*, 2006).

En resume se puede decir que el patrón de expresión de VEGF y sus isoformas es diferente entre folículos pequeños de 3-6 mm y los mayores de 6 mm, lo cual apoya los trabajos anteriores (Rosales-Torres *et al* 2000)

De acuerdo a los resultados del estudio del tipo de muerte predominante en cada grado de atresia y tamaño folicular, el folículo de las ovejas resultó ser un claro ejemplo de la participación simultánea del proceso de muerte celular por apoptosis y por necrosis tal como

se había propuesto (Rosales *et al*, 2000). En el proceso de muerte celular por necrosis uno de los primeros cambios que ocurren es la permeabilidad de la membrana lisosomal (LMP), lo cual libera todo su contenido hacia el citosol, principalmente las Catepsinas y otras enzimas hidrolíticas que son las principales ejecutoras de la muerte (Fukuda *et al*, 1993; Syntichaki and Tavernarakis, 2002). Por estudios donde se daña la membrana lisosomal artificialmente con detergentes (como la esfingosina o Leu-Leu-Ome), estrés oxidativo (usando peróxido de hidrogeno o con daño foto oxidativo) y con antibióticos que se unen a la membrana lisosomal, se ha podido conocer que la LMP puede desencadenar la necrosis (Kroemer and Jäättela, 2005). Otros autores mencionan que existe una relación entre la extensión de la ruptura de la membrana lisosomal y el modo de muerte celular. De acuerdo a este modelo, una limitada liberación del contenido lisosomal puede desencadenar la muerte por apoptosis, mientras que una ruptura generalizada de la membrana lisosomal desencadena la necrosis celular (Kágedal *et al*, 2001).

Utilizando el AO como marcador de permeabilidad lisosomal, nosotros encontramos que los folículos atrésicos mayores de 6 mm presentan cambios importantes en la permeabilidad de la membrana en estos organelos, lo cual refleja que en estos folículos participa además de la apoptosis, la muerte por necrosis tal como se había propuesto por estudios de citometría de flujo y por la presencia y actividad de las enzimas lisosomales fosfatasa ácida y β -glucosaminidasa en el citoplasma en células de la granulosa de ovejas (Rosales-Torres *et al*, 2000)

Mitchell (1961) sugirió que en la membrana mitocondrial interna los electrones son transferidos a través de los complejos de la cadena de fosforilación oxidativa hasta el O_2 en

una serie de reacciones acopladas de óxido-reducción que producen una translocación de protones hacia el espacio intermembranal mitocondrial para generar un diferencial de potencial electroquímico necesario para la síntesis de ATP. Este potencial electroquímico que recibe el nombre de delta Psi ($\Delta\psi$) está constituido por la distribución asimétrica de los protones que generan tanto un gradiente de concentración como un gradiente eléctrico (Chen and Smiley, 1993).

Diversas señales de muerte celular convergen sobre las membranas de la mitocondria para inducir cambios en la permeabilidad de la membrana mitocondrial (MMP) (Ferri and Kroemer 2001). La MMP se ha considerado como un mecanismo fundamental en el proceso de muerte por apoptosis (Crompton, 1999). La MMP implica la apertura de un megacanal mitocondrial que se conoce como poro de permeabilidad mitocondrial de alta conductancia (PT), el cual es un complejo de proteínas que ponen en contacto la membrana externa con la membrana interna (Zanzami and Kroemer, 2001). Los principales componentes de PT son: una proteína de la membrana mitocondrial interna, la adenina nucleótido traslocador (ANT), una proteína de la membrana externa, porin o canal aniónico dependiente de voltaje (VDAC), proteínas del citosol como la hexocinasa, proteínas del espacio intermembranal mitocondrial como la creatin-kinasa y la ciclofilin D que es una proteína de la matriz mitocondrial. La MMP favorece una caída del $\Delta\psi$, una liberación de proteínas desde el espacio intermembranal mitocondrial como las procaspasas 2, 3, 8 y 9 (Van Loo et al 2002).

En este trabajo, se encontró que en los folículos pequeños con atresia inicial predominó la fluorescencia de Rh123 que indica un modificaciones en $\Delta\psi$ sobre la de AO (permeabilidad de la membrana lisosomas), mientras que en los folículos > de 6 mm los cambios en la

función lisosomal fue la que predominó. Los resultados de la intensidad de fluorescencia en las células de la granulosa de folículos pequeños y grandes incubados con AO y Rh123, permiten afirmar que en la atresia, están presentes células de la granulosa apoptóticas y necróticas. En los folículos > de 6 mm la función lisosomas que significa necrosis, es la más alterada, mientras que en los folículos pequeños esta función es secundaria y tiene mayor importancia la mitocondrial (apoptosis)

Con respecto a la integración de resultados de VEGF y el tipo de muerte en los folículos, se puede decir que se encontraron diferencias en el patrón de expresión de las isoformas en la atresia de folículos pequeños y grandes, que en los folículos pequeños en los cuales predomina la muerte por apoptosis, las células de la granulosa aumentan la expresión de VEGF120 y en las células de la granulosa de los folículos grandes donde predomina el daño lisosomal (necrosis) aumenta la expresión de VEGF120, VEGF164 y VEGF188 en el inicio de la atresia (atresia2) comparado con los mRNA de las células de la granulosa de los folículos sanos. Lo anterior parece indicar que la respuesta a la hipoxia en las células de la granulosa de los folículos grandes al comienzo de la atresia, provoca una respuesta (en términos angiogénicos y de protección celular) mayor en la expresión de VEGF de manera que se demanda de la expresión de más isoformas.

Conclusiones

1. La expresión del factor de crecimiento endotelio vascular (VEGF) en los folículos de oveja es claramente modificada por el tamaño del folículo, el grado de atresia y el tipo de muerte celular predominante en las células de la granulosa.
2. Los resultados indican que la participación de las células de la granulosa en el análisis de los mRNA de las isoformas de VEGF hizo diferencias importantes entre los tamaños de los folículos analizados, ya que mientras que en los sacos con granulosa de los folículos pequeños con atresia inicial el mRNA que más se expresó fue el de la isoforma VEGF120, en los folículos grandes fue la VEGF188.; en tanto que la isoforma más expresada fue VEGF 120 y no hubo diferencia entre tamaños.
3. En los folículos pequeños atrésicos, predominó la muerte por apoptosis en la granulosa y coincidió con la mayor expresión de VEGF120 en tecas con granulosa, mientras que en los folículos grandes hubo predominio de muerte por necrosis y la mayor expresión de VEGF188.

Bibliografía

- -Acosta TJ, Hayashi KG, Ontani M, Miyamoto A. 2003. Local changes in blood flow within the preovulatory follicle wall and early corpus luteum in cows. *Reproduction*, 125:759-767.
- -Alon T, Hemo I, Itin A, Pe'er J, Stone J, Keshet E. 1995. Vascular endothelial growth factor acts as a survival factor for newly formed retinal vessel and has implications for retinopathy of prematurity. *Nature Medicine*, 1:1024-1028.
- -Alonso-Pozos I, Rosales-Torres AM, Ávalos-Rodríguez A, Vergara-Onofre M, Rosado-García A. 2003. Mechanism of granulosa cell death during follicular atresia depends on follicular size. *Theriogenology*, 60:1071-1081.
- -Ancelin M, Buteau-Lozano H, Meduri G, Osborne-Pellegrin M, Sordello S, Plouët J, Perrot-Applanat M. 2002. A dynamic shift of VEGF isoforms with a transient and selective progesterone-induced expression of VEGF189 regulates angiogenesis and vascular permeability in human uterus. *PNAS*, 99:6023-6028.
- -Antczak M, Van Blerkom J. 2000. The vascular character of ovarian follicular granulosa cells: phenotypic and functional evidence for an endothelial-like cell population. *Human Reproduction*, 15:2306-2318.
- -Bacich DJ, Rohan RM, Norman RJ, Rodgers RI. 1994. Characterization and relative abundance of alternatively spliced luteinizing hormone receptor messenger ribonucleic acid in the ovine ovary. *Endocrinology*, 135:735-744.
- -Balaban RS. 1990. Regulation of oxidative phosphorylation in the mammalian cell. *Am J Physiol*, 258:C377.

- -Ballesteros LM, Rosales AM, Rosado A, Hernández-Pérez O. 1992. Activity, compartmentation, and subcellular distribution of lysosomal enzymes during follicular maturation in the goat. *Anim Reprod Sci*, 27:129-139.
- -Barboni B, Turriani M, Galeatin G, Spinaci M, Bacci ML, Forni M, Mattioli M. 2000. Vascular endothelial growth factor production in growing pig antral follicles. *Biology of Reproduction*, 63:858-864.
- -Belloc F, Dumain P, Boisseas MR, Jalloustre C, Reiffers J, Bernard P, Lacombe F. 1994. A flow cytometric method using Hoechst 33342 and propidium iodide for simultaneous cell cycle analysis and apoptosis determination in unfixed cells. *Cytometry*, 17:59-65.
- -Benjamin LE, Golijanin D, Itin A, Pode D, Keshet E. 1999. Selective ablation of immature blood vessel in established human tumors follows vascular endothelial growth factor withdrawal. *Journal of Clinical Investigation*. 103:159-165.
- -Berisha B, Schams D, Kosmann M, Amselgruber W, Einspanier R. 2000a. Expression and tissue concentration of vascular endothelial growth factor, its receptors, and localization in the bovine corpus luteum during estrous cycle and pregnancy. *Biol reprod*, 63:1106-1114.
- -Berisha B, Schams D, Kosmann M, Amselgruber W, Einspanier R. 2000b. Expression and localisation of vascular endothelial growth factor and basic fibroblast growth factor during the final growth of bovine ovarian follicles. *Journal of Endocrinology*, 167:371-382.
- -Bianco F, Basini G, Grasselli F, Tamanini C. 2003. PO₂ in swine follicular fluid. *Reproduction (Abstr Series)* 30, P58. 146-52

- -Boonyaparakob U, Gadsby JE, Hedgpeth V, Routh P, Almond GW. 2003. Expression and localization of vascular endothelial growth factor and its receptors in pig corpora lutea during the oestrous cycle. *Reproduction*, 126:393-405.
- -Bouchier-Hayes L, Lartigue L, Newmeyer DD. 2005. Mitochondria: Pharmacological manipulation of cell death. *J Clin Invest*, 115:2640-2647.
- -Brannstrom M, Zackrisson U, Hagstrom HG, Josefsson B, Hellberg P, Cganberg S, Colluns WP, Bourne T. 1998. Preovulatory changes of blood flow in different regions of the human follicle. *Fertil Steril*, 69:435-442.
- -Bratton SB, Walker G, Srinivasula SM, Sun XM, Butterworth M, Alnemri ES, Cohen GM. 2001. Recruitment, activation and retention of caspase-9 and -3 by Apaf-1 apoptosome and associated XIAP complex. *EMBO J*, 20:998-1009.
- -Brunk UT, Svensson I. 1999. Oxidative stress, growth factor starvation and Fas activation may all cause apoptosis through lysosomal leak. *Redox Rep*, 4:3-11.
- -Cahill LP, Mauleon P. 1980. Influences of season, cycle and breed on follicular growth rates in sheep. *Journal of Reproduction and Fertility*, 58:321-328.
- -Cañez MS, Lee KJ, Olive DL, 1988. Progestogens and estrogens. *Infertil Reproduct Med Clin North Amer*, 3:59-78.
- -Carson RS, Findlay JK, Burger HG, Trounson AO. 1979. Gonadotropin receptor of the ovine ovarian follicle during follicular growth and atresia. *Biology of Reproduction*, 21:75-87.
- -Clark LJ, Irving-Rodgers HF, Dharmaraja AM, Rodgers RJ. 2004. Theca interna: the other side of bovine follicular atresia. *Biology of Reproduction*, 71:1071-1078.

- -Crompton M. 1999. The mitochondrial permeability transition pore and its role in cell death. *Biochem J*, 341:233-249.
- -Cross AR, James OTG. 1991. Enzymic mechanisms of superoxide production. *Biochim Biophys Acta*, 1057:281-298.
- -Cuervo AM, Dice JF. 2000. When lysosomes get old. *Experimental Gerontology*, 35:119-131.
- -Cui TG, Foster RR, Saleem M, Mathieson, Gillatt A, Bates DO, Harper SJ. 2003. Differentiated human podocytes endogenously express an inhibitory isoform of vascular endothelial growth factor (VEGF165b) mRNA and protein. *Am J Physiol Renal Physiol*, 286:F767-F773.
- -Charney DD, Didio LJ, Motta P. 1975. The development of rabbit ovarian follicles following copulation. *Fertil Steril*. 26:257-270.
- -Chedrese J. 2003. Regulacion autocrina y paracrina del desarrollo folicular I: efecto de los esteroides. *Rev Col Cienc Pec*, 16:171-182.
- -Chen BL, Smiley ST. 1993. Probing mitochondrial membrane potential in living cell by a J-aggregates-forming dye. In: Manson WT (ed) *Fluorescent and luminescent probes for biological activity*. London: Academic Press:pp 124-132.
- -Chen W, Li N, Chen T, Han Y, Li C, Wang Y, He W, Zhang L, Cao X. 2005. LAPF, representative of novel family of PH and FYVE domain-containing proteins, induces caspase-independent apoptosis via lysosomal-mitochondrial pathway. *JBC*, in press. 60

- -Cheung CY, Singh M, Ebaugh MJ, Brace RA. 1995. Vascular endothelial growth factor gene expression in ovine placenta and fetal membranes. *Am J Obstet Gynecol*, 173:753-759.
- -Chomczynski P, Sachi N. 1987. Single-step method of RNA isolation by acid guanidinium thiocyanate-phenol-chloroform extraction. *Analytical Biochemistry*, 162:156-159.
- -Christenson LK, Stouffer R. 1997. Follicle-stimulating hormone and luteinizing hormone/chorionic gonadotropin stimulation of vascular endothelial growth factor production by macaque granulosa cells from pre and periovulatory follicles. *J Clin Endocrinol Metab*, 82:2135-2142.
- -D'Herde K, De-Prest B, 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.
- -Danforth DR, Arbogast LK, Ghosh S, Dickermann A, Rofagha R, Friedman R, Friedman CI. 2003. Vascular endothelial growth factor stimulates preantral follicle growth in the rat ovary. *Biology of Reproduction*, 68:1736-1741.
- -Darzynkiewicz Z, Juan G, Li X, Gorczyca W, Murakami T, Traganos F. 1997. Cytometry in cell necrobiology: analysis of apoptosis and accidental cell death (necrosis). *Cytometry*, 27:1-20.
- -Darzynkiewicz Z, Li x, Gong J. 1994. Assays of cell viability: Discrimination of cells dying by apoptosis. *Methods in cell biology*, 41:15-38.

- -Davis JS, Rueda BR, Spanel-Borowski K. 2003. Microvascular endothelial cells of the corpus luteum. *Reprod Biol Endocrinol*, 1:89. 108-18
- -de Duve C. 1983. Lysosomes revisited. *Eur J Biochem*, 137:391-397.
- -Denekamp J. 1984. Vasculature as a target for tumour therapy. In *Progress in Applied microcirculation*. (vol.4) Eds. Hammersen F, O Hudlicka, Basel. Pp 28-38.
- -Enholm B, Paavonen K, Ristimaki A, Kumar V, Gunji Y, Klefstrom J, Kivinen L, Laiho M, Olofsson B, Joukov V, Eriksson U, Alitalo K. 1997. Comparison of VEGF, VEGF-B, VEGF-C and Ang-1 mRNA regulation by serum, growth factor, oncoprotein and hypoxia. *Oncogene*, 14:2475-2483.
- -Ferrara N, Houck K, Jakeman L, Leung DW. 1992. Molecular and biological properties of the vascular endothelial growth factor family of proteins. *Endocrine Reviews*, 13:18-32.
- -Ferri K, Kroemer G. 2001. Organelle-specific initiation of cell death pathways. *Nature Cell Biology*, 3:E255-E263.
- -Flores-Pérez FI. 2002. ¿Es la muerte importante para la vida? *Vet Mex*; 33:161-171. 3
- -Fortune JE, Rivera GM, Evans ACO, Turzillo AM. 2001. Differentiation of dominant versus subordinate follicles in cattle. *Biology of Reproduction*, 65:648-654.
- -Frey T. 1995. Nuclei acid dyes for detection of apoptosis in live cells. *Cytometry*, 21:265-274.
- -Fukuda K, Kojiro M, Chiu JF. 1993. Demonstration of extensive chromatin cleavage in trasplanted Morris hepatoma 777 tissue: apoptosis o necrosis? *Am J Pathol*, 142:935-946.

ANA
 MEXICANA
 ARCHIVO HISTÓRICO

- -Gerber HP, Condorelli F, Park J, Ferrara N. 1997. Differential transcriptional regulation of the two vascular endothelial growth factor receptor genes Flt-1, but not flk-1/kdr, is up-regulated by hypoxia. *J Biol Chem*, 272:23659-23667.
- -Gerber HP, Dixit V, Ferrara N. 1998. Vascular endothelial growth factor induces expression of the antiapoptotic proteins Bcl-2 and A1 in vascular endothelial cells. *Journal of Biological Chemistry*, 273:13313-13316.
- -Geva E, Jaffe RB. 2000. Role of vascular endothelial growth factor in ovarian physiology and pathology. *Fertility and Sterility*, 74:429-438.
- -Gobell S, Boucher CC, Nadeau D, Poiriere GG. 2001. Characterization of the necrotic cleavage of poly(ADP-ribose) polymerase (PARP-1): implication of lysosomal proteases. *Cell Death and Differentiation*, 8:588-594.
- -Gomez R, Simon C, Remohi J, Pellicer A. 2003. Administration of moderate and high doses of gonadotropins to female rats increases ovarian vascular endothelial growth factor (VEGF) and VEGF receptor-2 expression that is associated to vascular hyperpermeability. *Biology of Reproduction*, 68:2164-2171.
- -Grasi-Kraupp B, Ruttkay-Nedecky B, Koudeelka H, Bukowska K, Bursch W, Schulte-Herman, R. 1995. In situ detection of fragmented DNA fails to discriminate among apoptosis, necrosis and autolytic death: a cautionary note. *Hepatology*, 21:1465-1468.
- -Grasselli F, Basini G, Bussolati S, Tamanini C. 2002. Effects of VEGF and bFGF on proliferation and production of steroids and nitric oxide in porcine granulosa cells. *Reprod Dom Anim*, 37:362-368.

- -Grasselli F, Basini G, Tirelli M-, Cavalli V, Bussolati S, Tamanini C. 2003. Angiogenic activity of porcine granulosa cells cocultured with endothelial cells in a microcarrier-based three-dimensional fibrin gel. *J Physiol Pharmacol*, 54:361-370.
- -Greenaway J, Connor K, Pedersen HG, Coomber BL, LaMarre J, Petrik J. 2004. Vascular endothelial growth factor and its receptor, Flk-1/KDR, are cytoprotective in the extravascular compartment of the ovarian follicle. *Endocrinology*. 145:2896-2905.
- -Greenwald GS, Roy SK. 1994. Follicular development and its control. In the *Physiology of reproduction*. Sec ed. Edited by Knobil E, Neil JD. Raven Press, Ltd, New York. Pp 629-724.
- -Greenwald GS. 1989. Temporal and topographic changes in DNA synthesis after induced follicular atresia. *Biol Reprod*, 41:175-181.
- -Grützkau A, Krüger-Krasagakes S, Baumeister H, Schwarz C, Kögel H, Welker P, Lippert U, Henz BM, Möller A. Synthesis, storage, and release of vascular endothelial growth factor/vascular permeability Factor (VEGF/VPF) by human mast cells: Implications for the biological significance of VEGF206. *Molecular Biology of the Cell*, 9:875-884.
- -Guicciardi MA, Leist M, Gores GJ. 2004. Lysosomes in cell death. *Oncogene*, 23:2881-2890.
- -Guo P, Xu L, Pan S, Brekken RA, Yang ST, Whitaker GB, Nagane M, Thorpe PE, Rosenbaum JS, Huang HJS, Cavence WK, Cheng SY. 2001. Vascular endothelial growth factor isoforms display distinct activities in promoting tumor angiogenesis at different anatomic sites. *Cancer Research*, 61:8569-8577.

- -Guzmán A, Vergara M, Ávalos A, García FJ, Gutiérrez C, Rosado GA, Rosales AM. 2006. Expresión del factor de crecimiento endotelio vascular (VEGF) y su receptor tipo 2 (Flk-1) en células de la granulosa de folículos dominantes y subordinados de bovinos. En: Anónimo. Trabajos en extenso. XXXI Reunión anual, 11-13 de mayo de 2006; Guerrero (México). México: Academia de Investigación en Biología de la reproducción, AC; 2006.
- -Hay MF, Cran DG, Moor RM. 1976. Structural changes occurring during atresia in sheep ovarian follicles. *Cell Tissue Res*, 169:515-529.
- -He L, Lemasters JJ. 2002. Regulated and unregulated mitochondrial permeability transition pore: a new paradigm of pore structure and function? *FEBS Lett*, 512:1-7.
- -Hofstaetter JG, Saad FA, Samuel RE, Wunderlich L, Choi YH, Glimcher MJ. 2004. Differential expression of VEGF isoforms and receptors in knee joint menisci under systemic hypoxia. *Biochemical and Biophysical Research Communications*, 324:667-672.
- -Hsu CJ, Hammond JM. 1987. Gonadotropins and estradiol stimulate immunoreactive insulin-like growth factor I production by porcine granulosa cells in vitro. *Endocrinology*, 120:198-207.
- -Hsueh AJW, Billig H, Tsafiri A. 1994. Ovarian follicle atresia: a hormonally controlled apoptotic process. *Endocrinology Review*, 707-723.
- -Hussein MR. 2005. Apoptosis in the ovary: molecular mechanisms. *Human Reproduction Update*, 11:162-178.
- -Iijima K, Jiang JY, Shimizu T, Sasada H, Sato E. 2005. Acceleration of follicular development by administration of vascular endothelial growth factor in cycling female rats. *Journal of Reproduction and Development*, 51:161-168.

- -Isobe N, Kawai H, Yoshimura Y, Nakao T. 2001. Changes in the localization of immunoreactive von Willebrand factor in microvascular network of bovine ovarian follicles during atresia. *Anim Sci J*, 72:473-482.
- -Jensen L, Pilegaard H, Neufer PD, Hellsten Y. 2004. Effect of acute exercise and exercise training on VEGF splice variants in human skeletal muscle. *Am J Physiol Regul Comp Physiol*, 287:R397-R402.
- -Jiang JY, Macchiarelli G, Miyabayashi K, Sato E. 2002. Follicular microvasculature in the porcine ovary. *Cell Tissue Res*, 310:93-101.
- -Jiang JY, Macchiarelli G, Tsang BK, Sato E. 2003. Capillary angiogenesis and degeneration in bovine ovarian antral follicles. *Reproduction*, 125:211-223. 18,
- -Jiménez-del Río M, Vélez-Pardo C. 2001 La apoptosis en las enfermedades neurodegenerativas, evidencias y controversia. *Rev Neurol*, 32:851-860.
- -Johnson LV, Waish ML, Chen LB, 1980. Localization of mitochondria in living cells with rhodamine 123. *Proc Natl Acad Sci USA*, 77:990-994.
- -Jolly PD, Smith PR, Heath DA, Hudson NL, Lun S, Still LA, Watts CH, McNatty KP. 1997. Morphological evidence of apoptosis and prevalence of apoptotic versus mitotic cells in the membrana granulosa of ovarian follicles during spontaneous and induced atresia in ewes. *Biology of Reproduction*, 56:837-846.
- -Jolly PD, Tisdall DJ, De'ath G, Heath DA, Lun S, Hudson NL, McNatty KP. 1996. Granulosa cell apoptosis, aromatase activity, cyclic adenosine 3',5'-monophosphate response to follicle-stimulating hormone and luteinizing hormone, and follicular atresia. *Biol Reprod*, 51:934-944.

- -Kaczmarek MM, Schams D, Ziecik AJ. 2005. Role of vascular endothelial growth factor in ovarian physiology- an overview. *Reproductive Biology*, 5:111-136.
- -Kágedal K, Zhao M, Svensson I, Brunk UT. 2001. Sphingosine-induced apoptosis is dependent on lysosomal proteases. *Biochem J*, 359:335-343.
- -Kerr JFR, Winterford CM, Harmon BV. 1994. Apoptosis-its significance in cancer and cancer therapy. *Cancer*, 73:2013-2026.
- -Kerr JFR, Wyllie AH, Currie AR. 1972. Apoptosis a basic biological phenomenon with wide-ranglig implication in tissue kinetics. *Br j Cancer*, 26:239-257.
- -Kessel D, Poretz RD. 2000. Sites of photodamage induced by photodynamic therapy with a chlorin e6 triacetoxymethyl ester (CAME). *Photochem Photobiol*, 71:94-96.
- -Kim JS, He L, Lemasters JJ. 2003. Mitochondrial permeability transition: a common pathway to necrosis and apoptosis. *Biochemical and Biophysical Research Communication*, 304:463-470.
- -Kitana C, Kuchino Y. 1999. Caspase-independent programmed cell death with necrotic morphology. *Cell Death and Differentiation*, 6:508-515.
- -Koopman G, Reutelingsperger CPM, Kuijten GAM, Keehnen RMJ, Pals ST, van Oers MHJ. 1994. Annexin V for flow cytometric detection of phosphatidylserine expression of B cell undergoing apoptosis. *Blood*, 84:1415-1420.
- -Kovacs J, Forgo V, Peczely P. 1992. The fine structure of the follicular cells in growth and atretic ovarian follicles of the domestic goose. *Cell Tissue Res*, 267:561-569.
- -Kroemer G, Dallaporta B, Resche-Rigon M. 1998. The mitochondrial death/life regulator in apoptosis and necrosis. *Annu Rev Physiol*, 60:619-642.

- -Kroemer G, Jäättelä M. 2005. Lysosomes and autophagy in cell death control. *Nature Reviews*, 5:886-897.
- -Kroemer G, Petit P, Zanzami N, Vayssiere JL, Mignotte B. 1995. The Biochemistry of programmed cell death. *FASEB J*, 9:1277-1287.
- -Lai ZC, Wei X, Shimizu T, Ramos E, Rohrbaugh M, Nikolaidis N, Ho LL, Li Y. 2005. Control of cell proliferation and apoptosis by mob as tumor suppressor, mast. *Cell*, 120:675-687.
- -Laitinen M, Ristimäki A, Honkasalo M, Narko K, Paavonen K, Ritvos O. 1997. Differential hormonal regulation of vascular endothelial growth factors VEGF, VEGF-B, and VEGF-C messenger ribonucleic acid levels in cultured human granulosa-luteal cells. *Endocrinology*, 138:4748-4756.
- -Li X, Traganos F, Melamed MR, Darzynkiewicz A. 1995. A single-step procedure for labeling DNA strand breaks with fluorescein or BODIPY conjugated deoxynucleotides: Detection of apoptosis and bromodeoxyuridine incorporation. *Cytometry*, 20:172-182.
- -López-Barneo J, Pardal R, Ortega-Sáenz P. 2001. Cellular mechanisms of oxygen sensing. *Annu Rev Physiol*, 63:259-287.
- -Macchiarelli G, Nottola SA, Vizza E, Familiari G, Kikuta A, Murakami T, Motta PM. 1993. Microvasculature of growing and atretic follicles in the rabbit ovary: a SEM study of corrosion casts. *Arch Histol Cytol*, 56:1-12.
- -Makrigiannakis A, Coukos G, Christophidou-Solomidou M. 1999. N-cadherin-mediated human granulosa cell adhesion prevents apoptosis. A role in follicular atresia and luteolysis? *Am J Pathol*, 154:1391-1406.

- -Makris A, Ryan KJ, Yasymizu T, Hill CL, Zetter BR. 1984. The nonluteal porcine ovary as a source of angiogenic activity. *Endocrinology*, 115:1672-1677.
- -Martinez-Chequer JC, Stouffer RL, Hazzard TM, Patton PE, Molskness TA. 2003. Insulin-like growth factors-1 and -2, but not hypoxia, synergize with gonadotropin hormone to promote vascular endothelial growth factor-A secretion by monkey granulosa cells from preovulatory follicles. *Biol Reprod*, 68:1112-1118.
- -Mattioli M, Barboni B, Turriani M, Galeati G, Zannoni A, Castellani G, Berardinelli P, Scapolo PA. 2001. Follicle activation involves vascular endothelial growth factor production and increased blood vessel extension. *Biology of Reproduction*, 54:1014-1019.
- -McColm JR, Geisen P, Hartnett E. 2004. VEGF isoforms and their expression after a single episode of hypoxia or repeated fluctuations between hyperoxia and hypoxia: Relevance to clinical ROP. *Molecular Vision*, 10:512-520.
- -McGee EA, Hsueh AJW. 2000. Initial and cyclic recruitment of ovarian follicles. *Endocrine Reviews*, 21:200-214.
- -McNatty KP, Hudson N, Gibb M, Ball K, Henderson KN, Heath DA, Lun S, Kieboom LE. 1985. FSH influences follicle viability oestradiol biosynthesis and ovulation rate in Romney ewe. *J Reprod Fertil*, 75:121-131.
- -Minchenko A, Baur T, Saiceda S, Caro J. 1994. Hypoxic stimulation of vascular endothelial growth factor expression in vitro and in vivo. *Lab Invest*, 71:374-379.
- -Mitchell P. 1961. Coupling of phosphorylation to electron and hydrogen transfer by a chemiosmotic type of mechanism. *Nature*, 191:144.

- -Moor RM, Hay MF, Dott HM, Cran DG. 1978. Macroscopic identification and steroidogenic function of atretic follicles in sheep. *J Endocr*, 77:309-318.
- -Moor RM, Seamark RF. 1986. Cell signaling, permeability and microvasculatory changes during antral follicle development in mammals. *J Dairy Sci*, 69:927-943.
- -Morales P. 2005. La muerte que nos permite vivir. *Rev Fac Med UNAM*, 48:69-72.
- -Nakayama M, Manabe N, Nishihara S, Miyamoto H. 2000. Species-specific differences in apoptotic cell localization in granulosa and theca interna cells during follicular atresia in porcine and bovine ovaries. *Reprod Devel*, 46:147-156.
- -Neeman M, Abramovich R, Schiffenbauer YS, Tempel C. 1997. Regulation of angiogenesis by hypoxic stress: from solid tumours to the ovarian follicle. *Int J Exp Pathol*, 78:57-70.
- -Newmeyer DD, Ferguson-Miller S. 2003. Mitochondria: releasing power for life and unleashing the machineries of death. *Cell*, 112:481-490.
- -Nottola SA, Macchiarelli G, Motta PM. 1997. The angioarchitecture of estrus, pseudopregnant and pregnant rabbit ovary as seen by scanning electron microscopy of vascular corrosion casts. *Cell Tissue Res*. 288:353-363.
- -O'sheas JD, Hay MF, Cran DG. 1978. Ultrastructural changes in the theca interna during follicular atresia in sheep. *J Reprod Fertil*, 54:183-187.
- -Ogier-Denis E, Codogno P. 2003. Autophagy: a barrier or an adaptive response to cancer. *Biochimica et Biophysica Acta*; 1603:113-128.

- -Ono K, Kim SO, Han J. 2003. Susceptibility of lysosomes to rupture is a determinant for plasma membrane disruption in tumor necrosis factor alpha-induced cell death. *Molecular and Cellular Biology*, 23:665-676.
- -Ormerod MG, Sun XM, Snowden RT, Davis R, Fearhead H, Chen GM. 1993. Increased membrane permeability of apoptotic thymocytes: a flow cytometric study. *Cytometric*, 14:595-602.
- -Parrott JA, Skinner MK. 2000. Kit ligand action on ovarian stromal cells: Effects on theca cell recruitment and steroid production. *Molecular Reproduction and Development*, 55:55-64.
- -Pepper MS. 2001. Role of the matrix metalloproteinase and plasminogen activator-plasmin systems in angiogenesis. *Arterioscler Thromb Vasc Biol*, 21:1104-1117.
- -Pertovaara L, Kaipainen A, Mustone T, Orpana A, Ferrera N, Saksela O, Alitalo K. 1994. Vascular endothelial growth factor is induced in response to transforming growth factor-beta in fibroblastic and epithelial cells. *J Biol Chem*, 269:6271-6274.
- -Pesce M, De Felici M. 1994. Apoptosis in mouse primordial germ cells: a study by transmission and scanning electron microscope. *Anat Embryol (Berl)*, 189:435-440.
- -Price DL, Sisodia SS, Borchelt DR. 1998. Genetic neurodegenerative diseases: the human illness and transgenic models. *Science*, 282:1079-1083.
- -Quintana R, Kopcow L, Sueldo C, Marconi G, Rueda NG, Baranao RI. 2004. Direct injection of vascular endothelial growth factor into the ovary of mice promotes follicular development. *Fertility and Sterility*, 82:1101-1105.

- -Quirk SM, Cowan R.G. Harman RM, Hu CL and Porter DA. 2004. Ovarian follicular growth and atresia: the relationship between cell proliferation and survival. *J Anim Sci*, 82(suppl E):E40-E52.
- -Ramírez-Chamond R, Carracedo-Añon J, Moreno-Aguilar C, Guerra-Pasadas F. 1999. Apoptosis y enfermedad. *Alergol Inmunol Clin*, 14:367-374.
- Rawlings ND, Tolle DP, Barrett AJ. 2004. MEROPS:the peptidase database. *Nucleic Acid Res*, 32:D160-D164.
- -Redmer DA, Dai Y, Li J, Charnock-Jones DS, Smith SK, Reynolds LP, Moor RM. 1996. Characterization and expression of vascular endothelial growth factor (VEGF in the ovine corpus luteum. *Journal of Reproduction and Fertility*, 108:157-165.
- -Redmer DA, Doraiswamy V, Bortnem BJ, Fisher K, Jablonka-Shariff A, Grazul-Bilska AT, Reynolds LP. 2001. Evidence for a role of capillary pericytes in vascular growth of the developing ovine corpus luteum. *Biol Reprod*, 65:879-889.
- -Reers M, Smith TW, Chen LB. 1991. J-aggregate formation of a carbocyanine as a quantitative fluorescent indicator of membrane potential. *Biochemistry*, 30:4480-4486.
- -Richards JS. 2001. Perspective: The ovarian follicle- A Perspective in 2001. *Endocrinology*, 142:2184-2193.
- -Riedy MC, Muirhead KA, Jensen CP, Stewart CG. 1991. Use of photolabeling technique to identify nonviable cells in fixed homologous or heterologous populations. *Cytometry*, 12:133-139.
- -Risau W. 1997. Mechanism of angiogenesis. *Nature*, 387:671-674.

- -Roberg K, Jahansson U, Öllinger K. 1999. Lysosomal released of cathepsin D precede relocation of citochrome c and loss of mitochondrial trasmembrane potentyial during apoptosis induced by oxidative stress. *Free Radic Biol Med*, 27:1228-1237.
- -Robinson CJ, Stringer SE. 2001. The splice variants of vascular endothelial growth factor (VEGF) and their receptors. *J Cell Sci*, 114:853-865.
- -Rosado A, Mercado E, Gallegos AJ, Wens MA, Aznar R. 1977. Subcellular distribution of lysosomes enzymes in the human endometrium: I. Normal menstrual cycle. *Contraception*, 16:287-297.
- -Rosado A, Rosales AM. 1991. Maduración folicular en el mamífero: Atresia, determiantes bioquímicos. *Ciencia*, 42:81-97.
- -Rosales AM, Hernández-Pérez O, Domínguez R, Mercado E, Rosado A. 1990. Proteolytic and antiprotolytic activities in goat antral follicles. *Anim Reprod Sci*, 23:213-222.
- -Rosales-Torres AM, Avalos-Rodríguez A, Vergara-Onofre M, Hernández-Pérez O, Ballesteros LM, García-Macedo R, Ortíz-Navarrete V, Rosado A. 2000. Multiparametric study of atresia in ewe antral follicles: histology, flow cytometry, internucleosomal DNA fragmentation, and lysosomal enzyme activities in granulosa cells and follicular fluid. *Mol Reprod Dev*, 55:270-281.
- -Sawyer HR, Niswender KD, Braden TD, Niswender GD. 1990. Nuclear changes in ovine luteal cells in response to PGF2a. *Domest Anim Endocrinol*, 7:229-238.
- -Scaramuzzi RJ; Adams NR, Baird DT, Campbell BK, Downing JA, Findlay JK, Henderson KM, Martin GB, McNatty KP, McNeilly AS, Tsonis CG. 1993. A model for

follicle selection and determination of ovulation rate in the ewe. *Reproduction Fertility and Development*, 5:459-478.

- -Schutte B, Ramaekers FCS. 2000. Molecular switches that govern the balance between proliferation and apoptosis. *Prog Cell Cycle Res*, 4:207-217.
- -Sharma RK. 2000. Follicular atresia in goat: A review. *Indian Journal of Animal Sciences*, 70:1035-1046.
- -Shimizu T, Jiang JY, Iijima K, Miyabayashi K, Ogawa Y, Sasada H, Sato E. 2003a. Induction of follicular development by direct single injection of vascular endothelial growth factor gene fragments into the ovary of miniature gilts. *Biology of Reproduction*, 69:1388-1393.
- -Shimizu T, Jiang JY, Sasada H, Sato E. 2002. Changes of messenger RNA expression of angiogenic factor and related receptors during follicular development in gilts. *Biol Reprod*, 67:1846-1852.
- -Shimizu T, Kawahara M, Abe Y, Yokoo M, Sasada H, Sato E. 2003b. Follicular microvasculature and angiogenic factor in the ovaries of domestic animals. *J Reprod Dev*, 49:181-192.
- -Shweiki D, Itin A, Neufeld G, Gitay-Goren H, Keshner E. 1993. Patterns of expression of vascular endothelial growth factor (VEGF) and VEGF receptors in mice suggest a role in hormonally regulated angiogenesis. *Journal of Clinical Investigation*, 91:2235-2243.
- -Sohn J, Khaoustov VI, Xie Q, Chung CC, Krishnan B, Yoffe B. 2003. The effect of ursodeoxycholic acid on the survivin in thapsigargin-induced apoptosis. *Cancer Lett*, 1991:83-92.

- -Soria-González JE, Orea-Solano M. 2002. Apoptosis. *Rev Alerg México*, 49:121-128.
- -Storkebaum E, Carmeliet P. 2004. VEGF: a critical in neurodegeneration. *The Journal Of Clinical Investigation*, 113:14-18.
- -Stouffer RL, Martinez-Chequer JC, Molskness TA, Xu F, Hazzard TM. 2001. Regulation and angiogenic factors in the primate ovary. *Arch Med Res*, 32:567-575.
- -Syntichaki P, Tavernarakis N. 2002. Death by necrosis. *EMBO reports*, 3:604-609.
- -Tamanini C, De Ambrogi M. 2004. Angiogenesis in developing follicle and corpus luteum. *Reprod Dom Anim*. 39:206-216.
- -Taylor PD, Hillier SG, Fraser HM. 2004. Effects of GnRH antagonist treatment on follicular development and angiogenesis in the primate ovary. *Journal of Endocrinology*, 183:1-17.
- -Terman BT, Carrion ME, Kovacs E, Rasmussen BA, Eddy RL, Shows TB. 1991. Identification of a new endothelial cell growth factor tyrosine kinase. *Oncogene*, 6:519-524.
- -Traganos F, darzynkiewicz Z. 1994. Lysosomal proton pump activity: Supravital cell staining with acridine orange differentiates leukocytes subpopulation. *Meth Cell Biol*, 41:185-195.
- -Troyano A, Fernández C, Sancho P, de Blas E, Aller P. 2001. Effect of glutathione depletion on antitumor drug toxicity (apoptosis and necrosis) in U-937 human promonocytic cells. *The Journal of Biological Chemistry*, 276:47107-17115.
- -Uchida S, Sakai A, Kudo H, Otomo H, Watanuki M, Tanaka M, Nagashima M, Nakamura T. 2003. Vascular endothelial growth factor is expressed along with its

receptors during the healing process of bone and bone marrow after drill-hole injury in rats. *Bone*, 32:491-501.

- -Uthoff SMS, Duchrow M, Schmidt MHH, Broll R, Bruch HP, Srik MW, Galandiuk S. 2002. VEGF Isoforms and mutations in human colorectal cancer. *Int J Cancer*, 101:32-36.
- -Van Blerkom J, Antczak M, Schrader R. 1997. The developmental potential of the human oocyte is related to the dissolved oxygen content of follicular fluid: association with vascular endothelial factor levels and perifollicular blood flow characteristics. *Hum Reprod*, 12:1047-1055.
- -Van Loo G, Saelens X, van Gurp M, MacFariane M, Martin SJ, Vandenabeele P. 2002. The role of mitochondrial factors in apoptosis: a Russian roulette with more than one bullet. *Cell Death and Differentiation*, 9:1031-1042.
- -Van Wezel IL, Dharmarajan AM, Lavranos TC, Rodgers RJ. 1999. Evidence for alternative pathways of granulosa cell death in healthy and slightly atretic bovine antral follicles. *Endocrinology*, 140:2602-2612.
- -Verhagen AM, Silke J, Ekert PG, Pakusch M, Kaufmann H, Connolly LM, Day CL, Tikoo A, Burke R, Wrobel C, Moritz RL, Simpson RJ, Vaux DL. 2002. HtrA2 promotes cell death through its serine protease activity and ability to antagonize inhibitor of apoptosis protein. *J Biol Chem*, 277:445-454.
- -Vermes I, Haanen C, Steffens-Nakken H, Reutelingsperger, C. 1995. A novel assay for apoptosis flow cytometry detection of phosphatidylserine expression on early apoptotic cells using fluorescein labelled annexin V. *J Immunol Meth*, 184:39-51.

- -Westhof G, Westhof KF, Braendle WL, diZerega GS. 1991. Differential steroid secretion and gonadotropin response by individual tertiary porcine follicle in vitro. Possible physiologic role of atretic follicles. *Biology of Reproduction*, 11:161-162.
- -Woolard J, Wang WY, Bevan HS, Qiu Y, Morbidelli L, Pritchard-Jones RO, Cui TG, Sugiono M, Waine E, Perrin R, Foster R, Digby-Bell, J, Shields JD, Whittles CE, Mushens RE, Gillatt DA, Ziche M, Harper SJ, Bates DO. 2004. Vegf165b an inhibitory vascular endothelial growth factor splice variant: Mechanism of action, In vivo effect on Angiogenesis and endogenous protein expression. *Cancer Research*, 64:7822-7835.
- -Wulff C, Wiegand SJ, Saunders PTK, Scobie GA, Fraser HM. 2001. Angiogenesis during follicular development in the primate and its inhibition by treatment with truncated Flt-1-Fc (Vascular Endothelial Growth Factor TrapA40). *Endocrinology*, 142:3244-3254.
- -Yamashima, T. 2000. Implication of cysteine protease calpain, cathepsin and caspase in ischemic neuronal death of primates. *Prog Neurobiol.*, 62:273-295.
- -Yasuda M, Okabe T, Itoh J, Takekoshi S, Hasegawa H, Nagata H, Osamura RY, Watanabe K. 2000. Differentiation of necrotic cell death with or without lysosomal activation: application of acute liver injury models induced by carbon tetrachloride (CCL4) and dimethylnitrosamine (DMN). *The Journal of Histochemistry and Cytochemistry*, 48:1331-1339.
- -Yu YS, Sui HS, Han ZB, Li W, Luo MJ, Tan JH. 2004. Apoptosis in granulosa cells during follicular atresia: relationship with steroids and insulin-like growth factors. *Cell Research*, 14:341-346.

- -Yuan A, Yu CJ, Kuo SH, Chen WJ, Lin FY, Luh KT, Yang PC, Lee YC. 2001. Vascular endothelial growth factor 189 mRNA isoform expression specifically correlates with tumor angiogenesis, patients survival, and postoperative Relapse in non-small-cell lung cancer. *J Clin Oncol*, 19:432-441.
- -Yue X, Tamanek RJ. 2001. Effects of VEGF165 and VEGF121 on vasculogenesis and angiogenesis in cultured embryonic quail hearts. *Am J Physiol Heart Circ Physiol*, 288:H2240-H2247.
- -Zakrzewicz A, Secomb TW, Pries AR. 2002. Angioadaptation: Keeping the vascular system in shape. *News Physiol Sci*, 17:197-201.
- -Zamzami N, Kroemer G. 2001. Mitochondria in apoptosis. How Pandora's box. *Nature Rev Mol Cell Biol*, 2:67-71.
- -Zeleznik AJ, Schuler HM, Reichert LE. 1981. Gonadotropin-binding sites in the rhesus monkey ovary: role of the vasculature in the selective distribution of human chorionic gonadotropin to the preovulatory follicle. *Endocrinology*, 109:356-362.
- -Zhao M, Antunes F, Eaton JW, Brunk UT. 2003. Lysosomal enzymes promote mitochondrial oxidant production, cytochrome c release and apoptosis. *Eur J Biochem*, 270:3778-3786.
- -Zhao M, Brunk UT, Eaton JW. 2001. Delay oxidant-induced cell death involves activation of phospholipase A2. *FEBS Lett*, 509:399-404.
- -Zimmerman RC, Hartman T, Kavie S, Pauli SA, Bohlen P, Sauer MV. and Kitajewski, J. 2003. Vascular endothelial growth factor receptor 2-mediated angiogenesis is essential for gonadotropin-dependent follicle development. *J Clin Invest*, 112:659-669.

Publicaciones derivadas del Doctorado del M.C. Aldo Israel Alonso Pozos.

Mechanism of granulosa cell death during follicular atresia depends on follicular size

Israel Alonso-Pozos^a, Ana Maria Rosales-Torres^{a,*},
Alejandro Ávalos-Rodríguez^a, Marcela Vergara-Onofre^a,
Adolfo Rosado-García^b

^a*Departamento de Producción Agrícola y Animal, Laboratorio de Bioquímica de la Reproducción, Universidad Autónoma Metropolitana, Unidad Xochimilco, Calzada del Hueso 1100, Col. Villa Quietud, Delegación Coyocán, México 04960, Mexico DF*

^b*Departamento de Biología de la Reproducción, Universidad Autónoma Metropolitana, Unidad Iztapalapa, Calzada del Hueso 1100, Col. Villa Quietud, Delegación Coyocán, México 04960, Mexico*

Received 2 April 2002; accepted 20 December 2002

Abstract

Changes in granulosa cell lysosomal and mitochondrial functions in relation to follicular size and to the stage of atresia were studied by fluorescent emission spectra and intensity using flow cytometry. Antral follicles were grouped by size in two groups: small, 3–6 mm and large, >6 mm in diameter, and classified into three stages of atresia: non-atretic, initially atretic and advanced atretic. Differences in Rhodamine 123 (Rh123) and Acridine Orange (AO) fluorescent intensity indicated that changes in mitochondrial function are the primary mechanism of granulosa cell death in atretic follicles 3–6 mm in diameter, while its role in granulosa cell death in >6 mm atretic follicles seemed to be less important. However, modifications in lysosomal function (shown by a decrease in fluorometric intensity of AO incubated granulosa cells) were mainly associated with cell death in large atretic follicles. Our results support the hypothesis that the pathway of granulosa cell death during follicular atresia depends on the state of energy metabolism or on the production of hypoxic conditions related to follicular size. Changes in mitochondrial membrane potential and production of permeability transition pores were the main changes found in small follicles, while lysosomal function destabilization seemed to be the major cause of granulosa cell death during atresia in large follicles.

© 2003 Elsevier Science Inc. All rights reserved.

Keywords: Follicular atresia; Necrosis; Apoptosis; Lysosome; Mitochondria

* Corresponding author. Tel.: +52-55-5483-72-31; fax: +52-55-5483-72-38.
E-mail address: anamaria@cueyatlan.uan.mx (A.M. Rosales-Torres).

1. Introduction

Follicular atresia is the process by which most of the follicles present in the ovary at birth are lost during further development. Follicular atresia is apparently initiated by death of the granulosa cells while oocyte degeneration occurs later during the last stages of atresia [1]. Recently, it has been stressed that granulosa cell death during atresia is generally due to apoptosis [2–4]. However, results from several groups of researchers indicate that granulosa cell death during the process of atresia may follow different routes in follicles of different size [5–7]. We have recently presented evidence that necrosis may be the most important cause of granulosa cell death during atresia of large and pre-ovulatory follicles [8]. We have also shown that specific release of lysosomal hydrolytic enzymes [9,10], particularly some proteases including the aspartyl endopeptidase cathepsin D as proposed by Isahara et al. [11], may be involved in the degradation of intracellular structures that accompany the initial stages of apoptosis. It seems therefore appropriate to further characterize granulosa cell death during different stages of atresia by the simultaneous measurement of lysosomal [12] and mitochondrial permeability [13,14], which have been related to the initiation of cell death. Acridine Orange (AO) is a weak lipophilic base capable of crossing biological membranes by a non-selective permeation mechanism [15,16]. Luminescence stimulation of non-aggregated AO in neutral or basic media induces the emission of green fluorescence, but concentrated AO solutions in acidic media produce intense red fluorescence. In the acidic pH of the lysosomal interior, AO becomes positively charged and loses the property of passing freely through the lysosomal membrane. Therefore, under normal physiological conditions, AO will accumulate in the lysosomal space and fluoresce red. Due to these specific properties, AO has been considered as a lysosomotropic agent [17]. Alterations in energy supply, or in lysosomal membrane function, will interfere both with the cell's ability to maintain a low pH [15] and with membrane selectivity, hindering their ability to keep and concentrate AO [18].

Rhodamine 123 (Rh123), can be selectively taken up by normally functioning mitochondria [19]. Alterations in mitochondrial transmembrane potential [20] or inefficient production of energy [21] proportionally decrease the capacity of these organelles to selectively take up and concentrate Rh123. Mitochondrial membrane depolarization is often associated with the opening transition pores [14] which plays a central role in the initiation of apoptosis.

Since fluorescence of individual cells stained with AO or with Rh123 can be easily measured by flow cytometry, these procedures provide valuable information about the functional state of mitochondria and lysosomes in selected cell populations. Therefore, cytofluorometric properties of AO- and Rh123 labelled granulosa cells were studied to obtain information on the changes related to lysosomal and mitochondrial functions that initiate granulosa cell death, particularly in relation to the stage of atresia and follicular size.

2. Materials and methods

Chromatographically purified Acridine Orange (AO) was obtained from Polysciences Inc. (Warrington, PA.). Rhodamine 123 (laser dye purity) was obtained from Sigma

Chemical Co. (St. Louis, MO, USA). Phosphate buffered saline (PBS), Hepes (*N*-[2-hydroxyethyl] piperazine-*N'*-[2-ethanesulfonic acid]), and other inorganic salts of analytical degree were obtained from Merck (Darmstadt, Germany).

Antral follicles from non-pregnant ewes were obtained at a local slaughterhouse and classified by size in two groups: small, 3–6 mm, and large, >6 mm, in diameter. Follicles were dissected free from the ovarian stroma and separately classified following previously proposed criteria [9,10] in to four groups: non-atretic (stage 1), initially atretic (stage 2), atretic (stage 3a) and severely atretic (stage 3b). Since our interest was to focus on the modifications of lysosomal and mitochondrial functions that initiate cell death during follicular atresia, the results obtained with atretic and severely atretic follicles (groups 3a and 3b) were grouped as group 3. (In addition, no significant statistical differences were found between groups 3a and 3b.)

To show that morphological criteria correlated adequately with the histological classification of non-atretic and atretic follicles (see Fig. 1), two or three follicles from each class were randomly selected to be histologically evaluated [4,22] in a double blind study [9,10,22]. Once classified, fluid from each follicle was collected by flushing. After flushing, the follicles were cut open with small iris scissors and gently scraped with a blunt probe to insure the adequate recovery of granulosa cells [8,10,23,24]. Care was taken to avoid contaminating the follicular fluid with blood. Follicular contents were then processed as previously described [10] to recover cell-free follicular fluid and granulosa cells. Samples of cell-free follicular fluid were stored at -20°C and batch-processed to measure estradiol

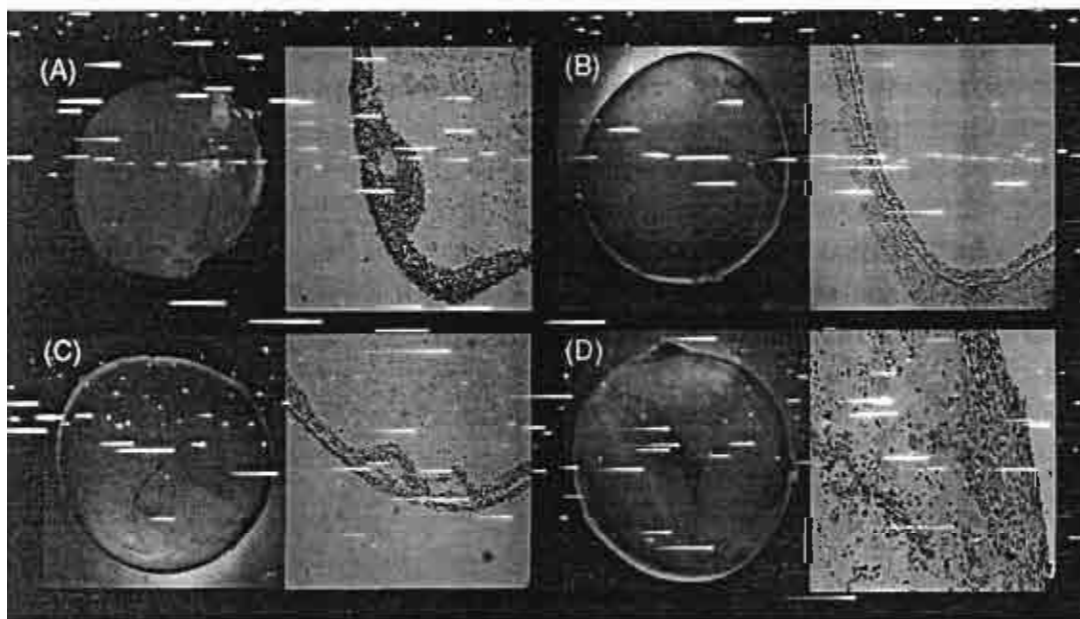


Fig. 1. Comparison of the visual and histological classification of ewe antral follicles. Antral follicles from non-pregnant ewes classified by size in small, 3–6 mm and large, >6 mm in diameter were dissected free from the ovarian stroma and individually classified according to previously proposed morphological criteria [9,10] in four groups: "non-atretic" (stage 1), initially atretic (stage 2), atretic (stage 3a) and severely atretic (stage 3b). Subsequently, the follicles were fixed, stained and observed histologically [22]. Typical results showing that morphological criteria correlate adequately with histological classification of non-atretic and atretic follicles are indicated here: A, stage 1 follicle 3–6 mm in diameter; B, stage 1 follicle >6 mm in diameter; C, stage 2 follicle >6 mm, and D, stage 3b follicle >6 mm.

and progesterone [8] using a non-extraction, solid phase, RIA (Coat-A-Count kit, Diagnostic Products Corporation, Los Angeles, CA).

Granulosa cells were washed twice by centrifugation, at $500 \times g$ for 10 min at 4 °C, using 600 μ l of phosphate buffered (0.01 M) saline solution at pH 7.4 (PBS), and then resuspended in 600 μ l of the same solution and counted using a hemocytometer. Granulosa cell suspensions were divided into appropriate aliquots for the measurement of mitochondrial and lysosomal membrane permeability. All measurements were performed within 60 min after cell harvesting.

Functional status of the mitochondrial was studied by Rh123 uptake as described by Darzynkiewicz et al. [25]. 5 μ l of a Rh123 stock solution (1 mg/ml in distilled water) were added to aliquots of 10^6 filtered granulosa cells suspended in 1 ml of 0.01 M pH 7.4 PBS. After incubation at 37 °C for 20 min in 5% CO₂–air atmosphere [19], they were analyzed by flow cytometry. Analysis was performed using a FACSsort (Becton Dickinson System, San Jose, CA) cytofluorometer. Cell suspensions were excited at 488 nm line and fluorescence emission was studied in the green part of the spectrum (530 ± 20 nm). The results obtained from 10,000 cells were analyzed using PC-Lysys II and current windows. Fluorescence intensity was registered logarithmically indicating the percent of granulosa cells in each of the four fluorescence quadrants.

Lysosomal properties (both membrane permeability and proton pump activity) were determined by the procedure described by Traganos and Darzynkiewicz [16]. Aliquots of 10^6 granulosa cells were passed through a 30 μ m nylon mesh filter to eliminate aggregated cells and then incubated in the dark for 20 min at room temperature (15–22 °C) with AO (1 μ g/ml). Fluorescence analysis was performed using a FACSsort (Becton Dickinson System, San Jose, CA) cytofluorometer. FSC-H (forward scatter-height) value was 44 and FSC was set at E00. The AO was excited by using the 488 nm line of an argon laser. Fluorescent intensity in the red part of the spectrum was measured in a minimum of 10,000 cells by using a dichroic filter reflecting at 610 nm and a long pass filter that eliminates any fluorescence below 640 nm [16]. Fluorescence intensity was registered logarithmically and divided into four sections (according to fluorescence intensity). The results obtained from 10,000 cells were analyzed using the PC-Lysys II and current windows to register the percentage of granulosa cells in each of the four fluorescence quadrants.

Statistical analysis was performed using two-way ANOVA and Tukey's test [26]. Comparison between means of different size follicles was performed by Student's *t*-test. All statistical calculations were done using a PC-computer and a Sigma Stat (Jandel Scientific Corporation, San Rafael, CA) statistical package.

3. Results

Estradiol concentration in follicular fluid decreased from group 1 to group 3 follicles (4.42 ± 0.64 , 4.14 ± 0.58 and 3.32 ± 0.76 , respectively for follicles of 3–6 mm and 5.27 ± 0.47 , 4.34 ± 0.33 and 3.05 ± 0.72 , respectively for follicles >6 mm, expressed as the ln (natural logarithm) of the nanomolar concentration of estradiol in follicular fluid), showing a highly significant determination coefficient ($R^2 = 0.76$; $P < 0.01$) between hormone concentration and the stage of atresia as established by our macroscopic criteria.

Table 1
Fluorescent intensity at 530 nm of granulosa cells incubated with Rhodamine 123

Size (mm)	Stage of atresia	n	Fluorescent intensity			
			1–10	10–100	100–1000	1000–10000
3–6	1	5	§16.6 ± 2.1 ^a	§2.3 ^b	§67.6 ± 8.4 ^c	§14.9 ± 2.5 ^a
	2	5	§15.9 ± 3.5 ^a	§3.1 ^b	§77.6 ± 5.7 ^c	†4.1 ± 1.4 ^b
	3	5	§12.0 ± 3.7 ^a	†26.4 ± 5.4 ^b	†55.3 ± 3.8 ^c	†1.5 ± 6.3 ^d
>6	1	5	†4.8 ± 1.2 ^a	†12.0 ± 3.8 ^b	†21.9 ± 4.1 ^c	†61.5 ± 9.4 ^d
	2	5	†5.0 ± 1.4 ^a	§2.4 ^a	§32.5 ± 4.5 ^b	†59.9 ± 3.8 ^c
	3	5	†23.5 ± 4.7 ^a	§2.0 ^b	§71.3 ± 6.3 ^c	†3.0 ± 1.3 ^b

Cells were obtained from 3–6 and >6 mm diameter follicles and classified into non-atretic, initially atretic and atretic. Different symbols to the left of each number indicate significant differences ($P < 0.05$) in fluorescent intensities between follicles of different size and different stages of atresia. Different superscript letters to the right of each number indicate significant differences ($P < 0.05$) between fluorescent intensities in follicles of the same size and at the same stage of atresia.

Cells exposed to Rh123 accumulated the dye rapidly, reaching a plateau after ~20 min incubation at 37 °C [20]. Table 1 and Fig. 2 show the effect of atresia progression on granulosa cells stained with Rh123. Large (>6 mm) non-atretic follicles had significantly higher numbers of granulosa cells with intense fluorescence ($61.5 \pm 9.4\%$) than small (3–6 mm) non-atretic follicles ($14.9 \pm 2.5\%$ of cells). The decline in the number of cells with intense fluorescence between follicles in stages 1 and 2 was small and only significant in 3–6 mm follicles ($14.9 \pm 2.5\%$ versus $4.1 \pm 1.4\%$, $P < 0.05$). In small (3–6 mm) atretic (stage 3) follicles, the number of cells with high fluorescence was significantly smaller than in stage 2 follicles ($55.3 \pm 3.8\%$ versus $77.6 \pm 5.7\%$ of cells, $P < 0.05$). In addition, a significant number of cells ($26.4 \pm 5.4\%$) was only slightly fluorescent, showing an important decrease in mitochondrial membrane potential. Table 1 and Fig. 2 also demonstrate that in large (>6 mm) atretic (stage 3) follicles, most of the cells ($71.3 \pm 6.3\%$) fell within a narrow band with fluorescence intensities almost 10 times smaller than those observed in cells from follicles in stages 1 and 2. There was also a significant number of cells ($23.5 \pm 4.7\%$) with almost no fluorescence.

Table 2 and Fig. 3 illustrate the changes in AO uptake and fluorescent intensity of granulosa cells obtained from follicles 3–6 and >6 mm in diameter during progression of atresia. The observed red fluorescent intensity is considered to be proportional to lysosomal volume and functionality [16]. 80–94% of granulosa cells from all non-atretic follicles showed a fluorescent intensity higher than 10^3 in our scale. Granulosa cells from small, initially atretic follicles, displayed a biphasic AO fluorescence pattern indicating the presence of cells with different volumes of functional lysosomes: a small number of cells ($24.1 \pm 2.2\%$) with intense red fluorescence similar to that observed in non-atretic follicles and a second peak ($69.2 \pm 6.3\%$ of the cells) with fluorescent intensities lower than those observed in granulosa cells from non-atretic follicles. The staining pattern observed in small, stage 3 follicles was similar to that observed in stage 2 follicles (Fig. 3) but significantly shifted toward less fluorescent regions.

In granulosa cells obtained from follicles >6 mm the percentage of AO labelled cells with high fluorescent intensity was almost 20 times higher in normal, non-atretic follicles

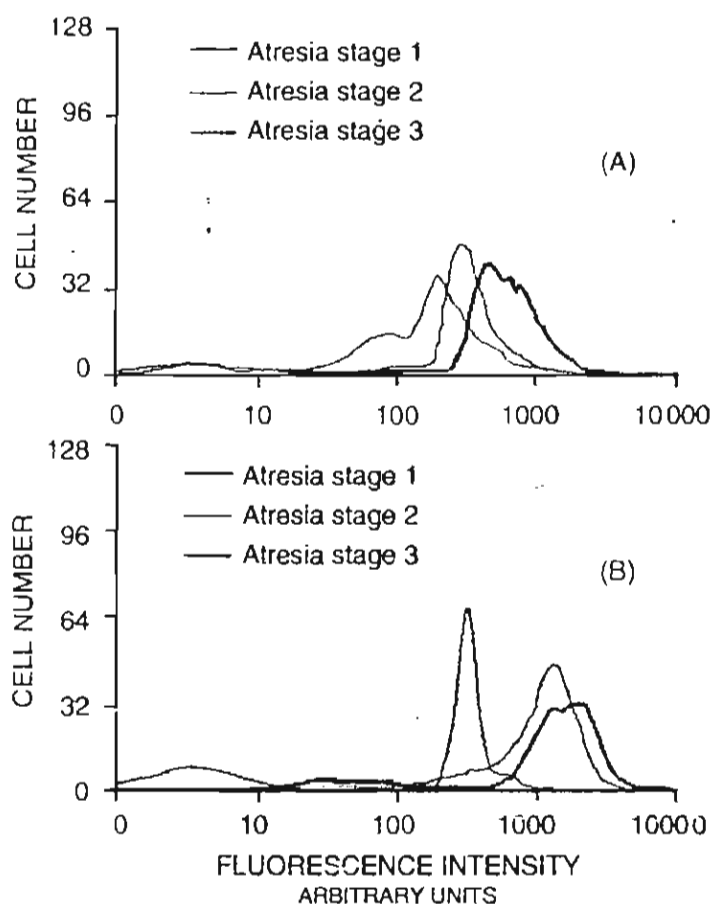


Fig. 2. Cytofluorometric analysis (Becton Dickinson System FACSsort) of granulosa cells stained with Rh123. Stained cells were excited at 488 nm and fluorescent emission was evaluated at 530 nm using appropriate band-pass filters. The cells were obtained from follicles 3–6 mm in diameter (A) and >6 mm (B) in three different stages of atresia: stage 1 normal, non-atretic follicles; stage 2 initially atretic follicles, and stage 3 markedly atretic follicles. The results obtained from 10,000 cells were analyzed using the Lysys II program and fluorescence intensity (in abscissa) was registered logarithmically indicating the percentage of granulosa cells in each of the four fluorescence quadrants. Ordinate indicates relative cell number. One experiment representative of five is shown.

Table 2

Fluorescent intensity at 640 nm of granulosa cells incubated with Acridine Orange

Size (mm)	Stage of atresia	n	Fluorescent intensity			
			1–10	10–100	100–1000	1000–10000
3–6	1	5	§2.6 ^a	§6.3 ± 2.1 ^b	§8.6 ± 1.4 ^b	§82.5 ± 12.5 ^c
	2	5	†5.9 ± 0.5 ^a	§2.7 ^a	†69.2 ± 6.3 ^b	†24.1 ± 2.2 ^c
	3	5	†12.0 ± 3.7 ^a	†26.4 ± 5.4 ^b	†55.3 ± 3.8 ^c	†5.5 ± 2.1 ^d
>6	1	5	§0.8 ^a	§2.0 ^a	§4.9 ± 4 ^a	§94.3 ± 11.4 ^b
	2	5	§2.0 ^a	§0.4 ^a	&92.2 ± 0.5 ^b	†5.3 ± 0.8 ^c
	3	5	&21.5 ± 4.7 ^a	§2.6 ^b	†68.1 ± 7.3 ^c	†8.0 ± 1.7 ^d

Cells were obtained from 3 to 6 and >6 mm diameter follicles and classified into non-atretic, initially atretic and atretic. Different symbols to the left of each number indicate significant differences ($P < 0.05$) in fluorescent intensities between follicles of different size and different stages of atresia. Different superscript letters to the right of each number indicate significant differences ($P < 0.05$) between ranges of fluorescent intensities in follicles of the same size and at the same stage of atresia.

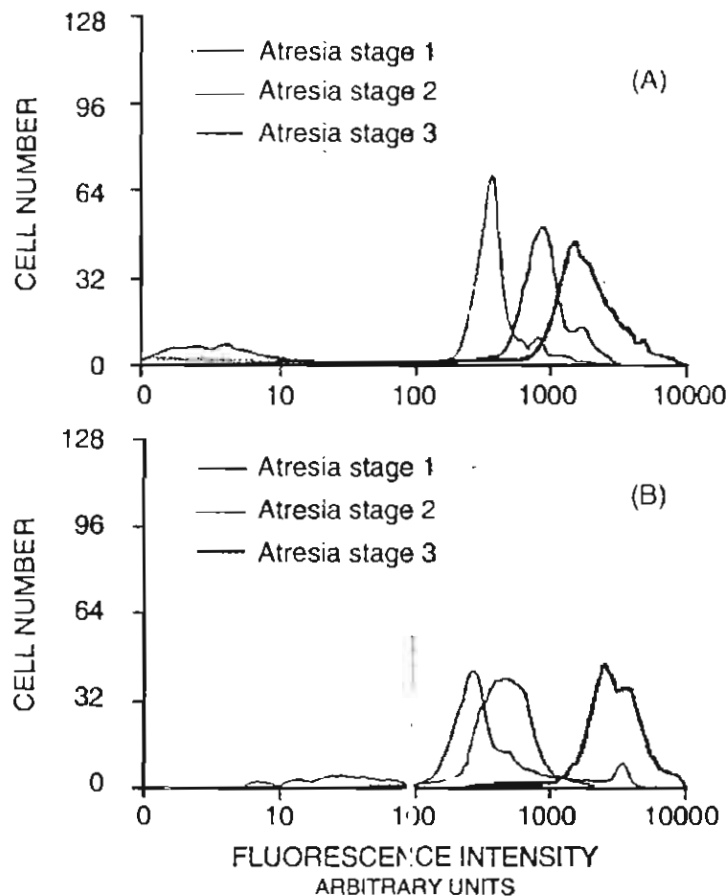


Fig. 3. Cytofluorometric analysis of granulosa cells stained with Acridine Orange. Stained cells were excited at 488 nm and fluorescent emission was evaluated at 640 nm using appropriate band-pass filters. (See Fig. 2.)

than in large, initially atretic (stage 2) follicles ($94.3 \pm 11.4\%$ versus $53 \pm 1.7\%$, $P < 0.01$) (Fig. 3 and Table 2). In contrast, fluorescent intensities in atretic follicles (stages 2 and 3) within the same size category did not differ. Except for the presence markedly atretic follicles, of a considerable number of cells ($21.5 \pm 4.7\%$) whose lysosomes have lost their AO binding capacity and therefore were scarcely fluorescent.

4. Discussion

Apoptosis and necrosis have been considered as two independent types of cell death because on the process is established they readily distinguishable morphological and biochemical properties [27]. However, at the initial stages of death, both types of cell death are difficult to differentiate and can be present simultaneously in cells or tissues exposed to similar stimuli [28,29]. This is particularly true in relation to the events that accompany the early stages of granulosa cell death during atresia [8]. Plasma membrane integrity, blebbing, or more accurately budding, alterations in mitochondrial function or mitochondrial swelling and pyknosis are usually described as characteristic of apoptosis, but their presence has been described during the early stages of both mechanisms of cell death [8,13,30–32]. Thus, it has been proposed that necrosis and apoptosis represent the end result of a common pathway to cell death [28,29,31] which begins with a drastic

alteration of mitochondrial membranes known as mitochondrial permeability transition (MPT) [13,30,31]. This event permits translocation of cytochrome *c* into the cytoplasm. This apoptogenic protein activates proteolytic enzymes known as caspases, which finally initiate the death-driving mechanism. Some of the apoptogenic proteases [33–35] involved in this process may be lysosomal in origin, as has been shown in the case of aspartyl endopeptidase cathepsin D [11,36].

Although many of the early events may be common to apoptosis and necrosis, there must be regulatory mechanisms capable of determining which of them will finally be the main cause of cell death [37,38]. Some studies have shown that one of these mechanisms may be the magnitude of the energy reservoirs of the cell [39,40]. Apoptosis requires energy expenditure and will be dependent on the presence of adequate ATP levels [41,42]. On the contrary, necrosis seems to be independent of energy levels and will be the dominant death path when ATP levels are low [41], particularly during ischemic (hypoxic) or toxic conditions [43].

In this paper, we show the suitability of the stereomicroscope criteria used to classify follicle health, in agreement with our previous report [22]. Gross and histological classification of normal, initial and advanced atretic follicles were in agreement in over 95% of the observations. Our results are also validated by the follicular fluid concentration of estradiol, which showed a highly significant determination coefficient with the stage of atresia established by our macroscopic criteria [2,3,8].

In this paper, we present the results obtained by cytofluorometrical determination of mitochondria and lysosome functions in live granulosa cells during the initial phases of follicular atresia. This methodology presents the advantage of allowing measurements of organelle function in physiologically active single cells. In spite of the possible disadvantages that it may have [20,44], it is generally accepted that Rh123, like some other permeant cationic fluorochromes, is taken up specifically by functional, active mitochondria with adequate transmembrane potential [25]. Under appropriate experimental conditions, the intensity of the red fluorescence produced by lysosomal uptake of AO can be adequately correlated with the number of active lysosomes capable of maintaining membrane selectivity and capacity to keep a pH gradient [16,17,43]. The emission spectrum and fluorescence intensity of the bound fluorochromes appeared to be uniform within cells of the same type. Dead cells failed to stain significantly with either of these dyes [16,17,25].

Earlier factors in atresia may be granulosa cell hypoxia due to an inadequate increase in the required follicular blood flow [45] and deficient oxygen diffusion into the innermost layers of the granulosa cells [46]. Thus, it is conceivable that follicular ischemia will be less important in small than in large follicles [13,31], and that energy production in follicles 3–6 mm in diameter will remain at almost normal levels. According to the proposal that high levels of ATP production are required for the execution phases of apoptosis, it is reasonable to suggest that atresia in small follicles [45] will progress mainly through granulosa cell death by apoptosis [42,47,48]. This hypothesis is supported by our findings, showing that fluorescent changes shown by Rh123 predominate over the shown by in AO fluorescence, especially when the incubated granulosa cells were obtained from initially atretic small follicles. Accordingly, we suggest that deficiencies in ATP production in hypoxic large follicles will shift the death process toward necrosis.

Our results confirm that an early modification in lysosomal function plays an important role in granulosa cell death during atresia [8]. In fact, the differences in Rh123 and AO fluorescent intensity found between small and large follicles experiencing atresia indicate that although apoptosis and necrosis are simultaneously present in atretic follicles, changes in lysosomal function are the dominant mechanism of granulosa cell death in atretic large follicles (>6 mm), while its participation in the cell death of small (3–6 mm) atretic follicles is secondary to the participation of apoptosis.

The prevalence of necrosis over apoptosis in late atretic follicles helps to explain the release of lysosomal enzymes into the cytoplasmic compartment of the cell, and particularly into the cell-free fraction of follicular fluid in these of follicles [8], the presence of inflammatory reactions observed during atresia [45,49] and accumulation of macrophages preferentially in large, advanced atretic follicles [5].

In summary, our results indicate that granulosa cell death during follicular atresia is initiated either by the pathological process referred to as mitochondrial permeability transition [13,30,31] or by lysosomal function destabilization [50]. The preferred route depends on the state of energy metabolism or on hypoxic conditions related to follicular size.

Acknowledgements

This work was supported in part by Grant # 37767-B from CONACYT (Consejo Nacional de Ciencia y Tecnología), México.

References

- [1] Driancourt MA. Follicular dynamics in sheep and cattle. *Theriogenology* 1991;35:55–79.
- [2] Hughes FM, Gorospe WC. Biochemical identification of apoptosis (programmed cell death) in granulosa cells: evidence for a potential mechanism underlying follicular atresia. *Endocrinology* 1991;129:2415–22.
- [3] Tilly JL, Kowalski KI, Shomberg DW, Hsueh AJW. Apoptosis in atretic ovarian follicles is associated with selective decrease in messenger ribonucleic acid transcripts for gonadotropin receptors and cytochrome P450 aromatase. *Endocrinology* 1992;131:1670–6.
- [4] Blodin P, Dufour M, Sirard MA. Analysis of atresia in bovine follicles using different methods: flow cytometry, enzyme-linked immunosorbent assay, and classical histology. *Biol Reprod* 1996;54:631–7.
- [5] Gaytan F, Morales C, Bellido C, Aguilar E, Sánchez-Criado JE. Ovarian follicles macrophages: is follicular atresia in the immature rat a macrophage mediated event? *Biol Reprod* 1998;58:52–9.
- [6] Adhered K, De-Prest B, Roels F. Subtypes of active cell death in the granulosa of ovarian atretic follicles in the quail (*Coturnix coturnix japonica*). *Reprod Nutr Dev* 1996;36:1775–89.
- [7] Van Wezel IL, Dharmarajan AM, Lavreanos TC, Rodgers RJ. Evidence for alternative pathways of granulosa cell death in healthy and slightly atretic bovine antral follicles. *Endocrinology* 1999;140:2602–12.
- [8] Rosales-Torres AM, Ávalos-Rodríguez A, Vergara-Onofre M, Hernández-Pérez O, Ballesteros LM, García-Macedo R, et al. Multiparametric study of atresia in ewe antral follicles: histology, flow cytometry, internucleosomal DNA fragmentation, and lysosomal enzyme activities in granulosa cells and follicular fluid. *Mol Reprod Dev* 2000;55:270–81.
- [9] Rosales AM, Hernández-Pérez O, Domínguez R, Mercado E, Rosado A. Proteolytic and antiproteolytic activities in goat antral follicles. *Anim Reprod Sci* 1990;23:213–22.
- [10] Ballesteros LM, Rosales AM, Rosado A, Hernández-Pérez O. Activity, compartmentation, and subcellular distribution of lysosomal enzymes during follicular maturation in the goat. *Anim Reprod Sci* 1992; 27:129–39.

- [11] Isahara K, Ohsawa Y, Kanamori S, Shibata M, Waguri S, Sato N, et al. Regulation of novel pathway for cell death by lysosomal aspartic and cysteine proteinases. *Neuroscience* 1999;91:233–49.
- [12] Li W, Yuan XM, Nordgren G, Dalen H, Dubowchik GM, Firestone RA, et al. Induction of cell death by lysosomotropic detergent MSDH. *FEBS Lett* 2000;470:35–9.
- [13] Lemasters JJ, Nieminen AL, Qian T, Trost LC, Elmore SP, Nishimura Y, et al. The mitochondrial permeability transition in cell death: a common mechanism in necrosis, apoptosis, and autophagy. *Biochem Biophys Acta* 1998;1366:177–96.
- [14] Adrian C, Martin SJ. The mitochondrial apoptosome: a killer unleashed by the cytochrome seas. *Trends Biochem Sci* 2001;26:390–7.
- [15] deDuve C, deBarsey T, Trouet A, Tulkens R, Van Hoof F. Commentary. Lysosomotropic agents. *Biochem Pharmacol* 1974;23:2495–531.
- [16] Traganos F, Darzynkiewicz Z. Lysosomal proton pump activity: supravital cell staining with Acridine Orange differentiates leukocyte subpopulations. *Methods Cell Biol* 1994;41:185–94.
- [17] Rundquist I, Olsson M, Brunk U. Cytofluorometric quantitation of Acridine Orange uptake by cultured cells. *Acta Pathol Microbiol Immunol Scand* 1984;92:303–10.
- [18] Brunk UT, Zhang H, Roberg K, Öllinger K. Lethal hydrogen peroxide toxicity involves lysosomal iron-catalyzed reaction with membrane damage. *Redox Report* 1995;1:267–77.
- [19] Johnson LV, Walsh ML, Chen LB. Localization of mitochondria in living cells with Rhodamine 123. *Proc Natl Acad Sci USA* 1980;77:990–4.
- [20] Darzynkiewicz Z, Traganos F, Staiano-Coico L, Kapuscinski J, Melamed MR. Interaction of Rhodamine 123 with living cells studied by flow cytometry. *Cancer Res* 1982;42:799–806.
- [21] Shapiro M, Zeri Y, Zeiri Y. Semiempirical potential surfaces for the alkali hydrogenhalide reactions. *J Chem Phys* 1979;70:5264–70.
- [22] García R, Ballesteros LM, Hernández-Pérez O, Rosales AM, Espinosa R, Soto H, et al. Metalloproteinase activity during growth, maturation and atresia in the ovarian follicles of the goat. *Anim Reprod Sci* 1997;47:211–28.
- [23] Hirshfield AN. Size-frequency analysis of atresia in cycling rats. *Biol Reprod* 1988;38:1181–8.
- [24] Guthrie HD, Welch GR, Couper BS, Zakaria AD, Johnson LA. Flow cytometric determination of degraded deoxyribonucleic acid in granulosa cells to identify atretic follicles during preovulatory maturation in the pig. *Biol Reprod* 1994;50:1303–11.
- [25] Darzynkiewicz Z, Li X, Gong J. Assay of cell viability: discrimination of cells dying by apoptosis. *Methods Cell Biol* 1994;41:15–38.
- [26] Sokal RR, Rohlf FJ. *Biometry*. San Francisco: W.H. Freeman & Co.; 1969. p. 299–342.
- [27] Wyllie AH, Kerr JFR, Currie AR. Cell death: the significance of apoptosis. *Int Rev Cytol* 1980;68:251–306.
- [28] Shimizu S, Eguchi Y, Kamiike W, Itoh Y, Hasegawa J, Yamabe K, et al. Induction of apoptosis as well as necrosis by hypoxia and predominant prevention of apoptosis by Bcl-2 and Bcl-xL. *Cancer Res* 1996;56:2161–6.
- [29] Renvoizé C, Biola A, Pallardy M, Bréard J. Apoptosis: identification of dying cells. *Cell Biol Toxicol* 1998;14:111–20.
- [30] Columbano A. Cell death: current difficulties in discriminating apoptosis from necrosis in the context of pathological processes in vivo. *J Cell Biochem* 1995;58:191–90.
- [31] Zamzani N, Hirsch T, Dallaporta B, Petit PX, Kroemer G. Mitochondrial implications in accidental and programmed cell death: apoptosis and necrosis. *J Bioenergy Biomembr* 1997;29:185–93.
- [32] Zamai I, Falcieri E, Marhefka G, Vitaie M. Supravital exposure to propidium iodide identifies apoptotic cells in the absence of internucleosomal DNA fragmentation. *Cytometry* 1996;23:303–11.
- [33] Liu XJ, Kim CN, Yang J, Jemmerson R, Wang X. Induction of apoptotic program in cell-free extracts: requirement for dATP and cytochrome c. *Cell* 1996;86:147–57.
- [34] Anjum R, Khar A. Caspase-mediated apoptosis in AK-5 tumor cells: a cell-free study using peptide inhibitors and antisense strategy. *Exp Cell Res* 1997;236:371–7.
- [35] Besnard N, Pisselet C, Monniaux D, Monget P. Proteolytic activity is involved in changes in intrafollicular insulin-like growth factors-binding protein-2,-3,-4 and 5 in healthy growing and atretic follicles in the pig ovary. *Biol Reprod* 1997;56:1050–8.
- [36] Dhanasekaran N, Moudgal NR. Studies on follicle atresia: Role of gonadotropins and gonadal steroids in regulating cathepsin D activity of preovulatory follicles in the rat. *Endocrinology* 1989;63:133–42.

- [37] Bonfoco E, Kraine D, Ankarcróna M, Nicotera P. Apoptosis and necrosis: two distinct events induced, respectively, by mild and intense insults with *N*-methyl-*D*-aspartate or nitric oxide/superoxide in cortical cell cultures. *Proc Natl Acad Sci USA* 1995;92:7162–76.
- [38] Dypbukt JM, Ankarcróna M, Burkitt M, Sjöholm A, Ström K, Orrenius S, et al. Different prooxidant levels stimulate growth, trigger apoptosis, or produce necrosis of insulin-secreting RINm5F cells. The role of intracellular polyamines. *J Biol Chem* 1994;269:30553–60.
- [39] Vayssière JL, Petit PX, Risler Y, Mignotte B. Commitment to apoptosis is associated with changes in mitochondrial biogenesis and activity in cells conditionally immortalized with simian virus 40. *Proc Natl Acad Sci USA* 1994;91:11752–6.
- [40] Zanzani N, Marchetti P, Castedo M, Zanin C, Vayssière JL, Petit PX, et al. Reduction in mitochondrial potential constitutes an early irreversible step of programmed lymphocytes death in vivo. *J Exp Med* 1995; 181:1661–72.
- [41] Ankarcróna M, Dypbukt JM, Bonfoco E, Zhivotovsky B, Orrenius S, Lipton SA, et al. Glutamate-induced neuronal death: a succession of necrosis or apoptosis depending on mitochondrial function. *Neuron* 1995; 15:961–73.
- [42] Leist M, Single B, Castoldi AF, Kühnle S, Nicotera P. Intracellular adenosine triphosphate (ATP) concentration: a switch in the decision between apoptosis and necrosis. *J Exp Med* 1997;185:1481–6.
- [43] Darzynkiewicz Z, Juan G, Xun L, Gorczyca W, Murakami T, Traganos F. Cytometry in cell necrobiology: analysis of apoptosis and accidental cell death (necrosis). *Cytometry* 1997;27:1–20.
- [44] Cossarizza A, Baccarani-Contri M, Kalashnikova G, Franceschi C. A new method for the cytofluorimetric analysis of mitochondrial membrane potential using the J-aggregate forming lipophilic cation 5,5',6,6'-tetrachloro-1,1',3,3'-tetraethylbenzimidazolcarbocyanine iodide JC-1. *Biochem Biophys Res Commun* 1993;197:40.
- [45] Murdoch WJ. Comparative morphometry and steroidogenic function of antral ovine follicles destined for ovulation or atresia. *Dom Anim Endocrinol* 1992;9:219–24.
- [46] Hirshfield AN. Development of follicles in the mammalian ovary. *Int Rev Cytol* 1991;124:43–101.
- [47] Richter C, Schweizer M, Cossarizza A, Franceschi C. Control of apoptosis by cellular ATP level. *FEBS Lett* 1996;378:107–10.
- [48] Tsujimoto Y. Apoptosis and necrosis: intracellular ATP levels as a determinant for cell death modes. *Cell Death Differ* 1997;4:429–39.
- [49] Bukosky A, Presl J, Zidovsky J. Migration of lymphoid cells into the granulosa of rat ovarian follicles. *IRCS Med Sci* 1979;7:603–4.
- [50] Leist M, Gantner F, Böhlinger I, Tiegs G, Germann PG, Wendel A. Tumor necrosis factor-induced hepatocyte apoptosis precedes liver failure in experimental murin shock models. *Am J Pathol* 1995;146: 1220–34.