

Veterinaria México

Volumen 36
Volume

Número 1
Number

Enero-Marzo 2005
January-March

Artículo:

Apoptosis y atresia folicular: Un binomio esencial en el desarrollo ovárico

Derechos reservados, Copyright © 200:
Facultad de Medicina Veterinaria y Zootecnia, UNAM

**Otras secciones de
este sitio:**

- 👉 [Índice de este número](#)
- 👉 [Más revistas](#)
- 👉 [Búsqueda](#)

***Others sections in
this web site:***

- 👉 [Contents of this number](#)
- 👉 [More journals](#)
- 👉 [Search](#)



www.Medigraphic.com

Apoptosis y atresia folicular: Un binomio esencial en el desarrollo ovárico

Apoptosis and follicular atresia: An essential binomial for ovarian development

Fernando Iván Flores-Pérez* César Rosas-Velasco** Martha C. Romano Pardo*** Mario Pérez-Martínez**

Abstract

This study presents current information concerning cellular death through apoptosis, a systematic and genetically programmed form of cell death. Furthermore, the importance of this process in ovarian follicular atresia in various species is discussed, considering it to be an essential reproductive cellular event upon which ovarian function largely depends.

Key words: FOLLICULAR ATRESIA, OVARY DEVELOPMENT, APOPTOSIS.

Resumen

Se presenta información actual en relación con la muerte celular por apoptosis, que es un proceso biológico dependiente de un programa genético sistemático. Se analiza, además, la importancia de este proceso en la atresia folicular ovárica de diversas especies, considerándola como un evento celular reproductivo esencial que determina el funcionamiento ovárico.

Palabras clave: ATRESIA FOLICULAR, DESARROLLO OVÁRICO, APOPTOSIS.

Recibido el 22 de abril de 2004 y aceptado el 8 de octubre de 2004.

*Facultad de Ciencias Agropecuarias, CEDIA, Universidad Autónoma del Estado de Morelos, Av. Universidad 101, Col. Chamilpa, 62210, Cuernavaca, Morelos, México.

**Departamento de Morfología, Laboratorio de Biología Tisular de la Reproducción, "Rosa Emilia Lavielle", Facultad de Medicina Veterinaria y Zootecnia, Universidad Nacional Autónoma de México, 04510, México, D. F.

***Departamento de Fisiología, Biofísica y Neurociencias, Centro de Investigación y Estudios Avanzados, Instituto Politécnico Nacional, Avenida Instituto Politécnico Nacional 2508, Col. Zacatenco, 07360, México, D. F.

Para correspondencia y sobretiros: Mario Pérez-Martínez, Departamento de Morfología, Sección de Histología y Biología Celular, Facultad de Medicina Veterinaria y Zootecnia, Universidad Nacional Autónoma de México, 04510, México, D. F. Tel. 5622.5893. E-mail: perezmtzmario@hotmail.com

Introduction

Cellular death due to apoptosis is considered a vital event in the embryonic development of several species, as well as an essential part in preserving tissue homeostasis. In this sense it constitutes a highly conserved process in the evolution of multicellular organisms.¹⁻⁴

In the embryonic development this type of cellular death is present in organogenesis and in the tissues of adult individuals, it is responsible for preventing alterations in the number of cells that constitute them.^{1,2} In tissues with limited proliferation capacity, such as the nervous system, heart and kidney, apoptosis is almost not observed in physiological conditions.¹ In contrast, this phenomenon is widely observed in physiological conditions in the hematopoietic system, intestinal epithelium and in the gonads.¹

In the ovary, follicular apoptosis happens continuously until the conclusion of the reproductive life, which causes a senescence phase in which the totipotent cells are no longer renewed.³

Cell death due to apoptosis occurs in a great variety of cell types that are already differentiated; this cellular process is regulated by a group of genes.^{1,2} Although the stimuli that can keep a cell alive are diverse and dependent on the cell type in question, the program of cell death by apoptosis is similar in the different tissues.¹⁻⁵

Apoptosis

Cell death by apoptosis is a biological phenomenon that can be morphologically detected; the cells in process of apoptosis have changes in the cytoplasm and nucleus.^{1,2,5}

A very evident change that is observed in the nucleus is the condensation of chromatin with a “half moon” or “horseshoe” pattern that is the result of dense zones of heterochromatin. In this initial stage it is possible to see a decrease in the cellular volume. As the apoptosis process continues the nuclear wall and the nucleus are disintegrated into dense spherical fragments; furthermore, endonucleases that are dependant on calcium and magnesium are activated, and these will degrade the DNA in a ladder or nucleosomal pattern consisting of 180 to 200 bp fragments, as well as their multiples (Figure 1). Fragmentation represents an important indicator of the existence of the apoptosis process and constitutes a specific biochemical indicator for its detection.^{1,2}

In the cytoplasm, organelles are conserved, nevertheless their organization and location are altered. Afterwards, the cytoplasm wall is ruptured forming what are known as apoptotic bodies. These

Introducción

La muerte celular por apoptosis se considera como un evento vital en el desarrollo embrionario de diversas especies, así como una parte esencial en la conservación de la homeostasis tisular; en este sentido, constituye un proceso altamente conservado en la evolución de organismos multicelulares.¹⁻⁴

En el desarrollo embrionario, este tipo de muerte celular está presente en la organogénesis en los tejidos de individuos adultos y es responsable de que éstos no sufran alteraciones en el número de células que los componen.^{1,2} En tejidos con capacidad de proliferación limitada, como el nervioso, corazón y riñón, la apoptosis casi no se observa en condiciones fisiológicas.¹ En contraparte, este fenómeno es ampliamente observado en el sistema hematopoyético, epitelio intestinal y en las gónadas en condiciones fisiológicas.¹

En el ovario, la apoptosis folicular se da continuamente durante la vida reproductiva hasta que ésta concluye, lo que provoca una fase de senescencia en que las células totipotenciales ya no son renovadas.³

La muerte celular por apoptosis ocurre en gran variedad de tipos celulares que, incluso, están ya diferenciados; este proceso celular es regulado por un grupo de genes.^{1,2} Aunque los estímulos que pueden mantener viva a una célula son diversos y dependientes del tipo celular del que se trate, el programa de muerte celular por apoptosis es similar en los distintos tejidos.¹⁻⁵

Apoptosis

La muerte celular por apoptosis es un fenómeno biológico que puede ser detectado morfológicamente, las células en vía de apoptosis presentan cambios en citoplasma y núcleo.^{1,2,5}

Un cambio muy evidente que se observa en el núcleo es la condensación de cromatina con un patrón de “media luna” o “herradura”, que es resultado de zonas densas de heterocromatina. En esta etapa inicial también es posible la visualización de disminución en el volumen celular. Al continuar el proceso de apoptosis, la membrana nuclear y el núcleo serán desintegrados en fragmentos esféricos densos; asimismo, serán activadas endonucleasas dependientes de calcio y magnesio, que degradarán al ADN en un patrón de escalera o nucleosomal, consistente en fragmentos de 180 a 200 pb, aproximadamente, y sus múltiplos (Figura 1). La fragmentación representa un indicador importante de la existencia del proceso de apoptosis y constituye un marcador bioquímico específico para su detección.^{1,2}

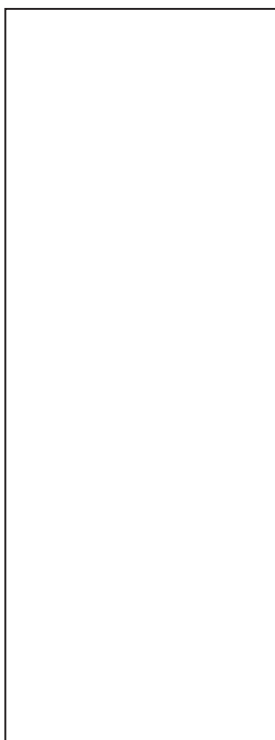


Figura 1. Fragmentación de ADN; Línea 1: ADN obtenido a partir de linfocitos de ratón. Línea 2: ADN obtenido a partir de linfocitos, a los cuales se les indujo el fenómeno de apoptosis con un estímulo térmico (42°C), en el que se observa el patrón de fragmentación en “escalera” o “nucleosomal” típico de la apoptosis (Flores-Pérez, I., 2002).

DNA fragmentation; Lane 1: DNA obtained from mice lymphocytes. Lane 2: DNA obtained from lymphocytes, to which apoptosis process was induced by thermal stimulus (42 °C); a “ladder” or “nucleosomal” pattern typical of apoptosis is observed. (Flores-Perez, I., 2002).

fragments are recognized and phagocytosed by neighboring cells the majority of times, and occasionally by macrophages. In this sense, in this type of death, there is no inflammatory process, and whenever it occurs it is almost imperceptible.

Genetic regulation of apoptosis

The regulation of cell death by apoptosis is complex; there are experimental results with observations carried out in the *Cahnorabditis elegans* nematode.¹⁻⁴ When the apoptosis program is initiated, the execution shall depend on the coordinated action of a group of genes that are systematically activated in a signaling cascade fashion. In general, two gene family groups carry out the process: those genes that code for caspases which are a group of enzymes with proteolytic activity, and the Bcl-2 gene family.¹⁻⁷ Within the Bcl-2 gene family there are both apoptosis induction genes (proapoptotic) as well as those that inhibit apoptosis (antiapoptotic); for example Bcl-2, Bcl-w and Bcl-XL.^{3,6} To the first group belong Bid, Bax, Bik and Bcl-Xs;^{3,6} all the genes of this family modulate the apoptosis process. During this process proteins can form homodimers or heterodimers. It is believed that the genes of the Bcl-2 family regulate the process by which the mitochondria releases into the cytosol specific substances that induce apoptosis such as cytochrome C;^{1,2} it has also been demonstrated that they activate caspases and induce cell death by apoptosis.

En el citoplasma los organelos se conservan; sin embargo, su organización y localización se alteran. Posteriormente la membrana citoplasmática se rompe formando así los denominados cuerpos apoptóticos. Estos fragmentos serán reconocidos y fagocitados por células vecinas, en la mayoría de las veces y ocasionalmente por macrófagos; en este sentido, en este tipo de muerte no se presenta el fenómeno de inflamación; sin embargo, cuando se presenta es casi imperceptible.

Regulación genética de la apoptosis

La regulación de la muerte celular por apoptosis es compleja; se tienen resultados experimentales con observaciones practicadas en el nematodo *Cahnorabditis elegans*.¹⁻⁴ Cuando el programa de apoptosis se inicia, la ejecución dependerá de la acción coordinada de un grupo de genes, que se activarán sistemáticamente en forma de cascada de señalización. Dos grupos de familias de genes, en términos generales, llevan a cabo el proceso: Los genes que codifican para las caspasas, que son un grupo de enzimas con actividad proteolítica, y la familia de genes Bcl-2.¹⁻⁷ Dentro de la familia de genes Bcl-2 existen tanto genes inductores de apoptosis (proapoptóticos) como aquellos que inhiben apoptosis (antiapoptóticos); por ejemplo, Bcl-2, Bcl-w y Bcl-XL.^{3,6} Al primer grupo pertenecen: Bid, Bax, Bik y Bcl-Xs;^{3,6} todos los genes de esta familia modulan el proceso de apoptosis. Durante este proceso las proteínas pueden homodimerizarse o

In the cells of the granular and teca layers the presence of genes such as Bcl-2, BAD (its homologue) which forms heterodimers with Bcl-x and Bcl-2,^{3,6,8} as well as proteins in charge of the progression of the cellular cycle, have been evidenced. It is also known that the BAD gene does not interact with the Bax gene and neither with itself, it rather takes care of activating caspases later.^{3,8} *In vitro* studies on CHO cells and in primary cultures of cells of the granular layer attribute to the BAD gene a proapoptotic role because its expression is correlated with the decrease in the survival of those cells.³ If caspases are inhibited, even if the BAD gene is over expressed, the cells do not die. These findings in relation to the BAD gene promoted further studies in rats with the objective of determining the expression of the RNAm of the BAD gene. It was found practically in all tissues, but in greater amounts in lung, uterus, brain and ovaries;³ especially in the ovary, this gene was found in teca layer and interstitial cells, as well as in cells of the granular layer in the follicles.³

The caspases are found in the form of inactive zymogens and they have to be previously activated in order to function.^{2,7,8} The activation can be carried out through three different routes: a) activation of a caspase by another one; b) union of cofactors or coenzymes; and c) activation of caspases by high pre-existing concentrations of them in conjunction with the activation of cellular death receptors. It is known that for the proteases known as caspases, there are more than 100 substrates within the cellular structures. A relevant activity of the caspases is to carry out the activation of an enzyme whose function is to degrade the DNA, known as CAD^{2,9} (caspase activated DNase).^{8,9}

The DNase is the enzyme responsible for the typical ladder or nucleosomal pattern in which the DNA of a cell in apoptosis is fragmented,² providing one of the characteristic biochemical changes of this process.^{1,2,9}

Differences between apoptosis and necrosis

In cell death by apoptosis there is a genetic program that is indispensable for its occurrence, it is carried out in an organized manner; in contrast, necrosis does not have a genetic program and can be caused by a variety of stimuli such as trauma or cellular lesion, hypoxia and ischemia, among others.^{1,2}

One of the most important differences between apoptosis and necrosis is that the apoptosis process can happen in physiological as well as pathological conditions, and necrosis does not occur under physiological conditions. In other words, apoptosis is an essential part of the embryonic development and it is

heterodimerizarse. Se cree que los genes de la familia Bcl-2 regulan el proceso por el que la mitocondria libera al citosol determinadas sustancias que inducen apoptosis, como el citocromo C;^{1,2} también se ha demostrado que activan a las caspasas e inducen la muerte celular por apoptosis.

En las células de la granulosa y la teca se ha evidenciado presencia de genes, como el Bcl-2, BAD (su homólogo), que heterodimeriza con Bcl-x y Bcl-2,^{3,6,8} así como con proteínas encargadas de la progresión del ciclo celular. También se sabe que el gene BAD no interacciona con el gene Bax ni con él mismo, más bien se encarga de activar posteriormente a las caspasas.^{3,8} Estudios *in vitro*, practicados en células CHO y en cultivos primarios de células de la granulosa, le atribuyen al gen BAD un papel proapoptótico, ya que su expresión se correlaciona con disminución en la sobrevivencia de dichas células.³ Si las caspasas son inhibidas, aunque el gene BAD se sobreexpresa, las células no mueren. Estos hallazgos en relación con el gene BAD, condujeron a realizar estudios en ratas con la finalidad de determinar la expresión del ARNm del gene BAD; se le halló en prácticamente todos los tejidos, pero en mayor cantidad en pulmón, útero, cerebro y ovarios;³ especialmente en ovario se encontró este gen en células de la teca, intersticiales y en células de la granulosa de los folículos.³

Las caspasas se encuentran activadas en forma de zimógenos inactivos y deben activarse previamente para actuar.^{2,7,8} La activación puede efectuarse por por tres distintas rutas: a) Activación de una caspasa por otra; b) unión de cofactores o coenzimas; y c) activación de las caspasas por concentraciones elevadas, preexistentes de las mismas en conjunción con la activación de receptores de muerte celular. Se sabe que para las proteasas denominadas caspasas, existen más de 100 sustratos dentro de las estructuras celulares. Una actividad relevante de las caspasas es llevar a cabo la activación de una enzima cuya función es degradar al ADN, sus siglas en inglés son CAD^{2,9} (ADNasa activada por caspasas o dependiente de la activación de caspasas).^{8,9}

La ADNasa es la enzima responsable de la fragmentación típica en patrón de escalera o patrón nucleosomal, en que el ADN de una célula en apoptosis se fragmenta,² proporcionando uno de los cambios bioquímicos característicos de este proceso.^{1,2,9}

Diferencias entre apoptosis y necrosis

En la muerte celular por apoptosis existe un programa genético que es indispensable para que ésta ocurra, se realiza de manera organizada; por el contrario, en la necrosis no hay programa genético y puede

also vital for conserving tissue homeostasis. Nevertheless, there are pathogens such as virus and bacteria that can induce apoptosis. In the case of necrosis, it occurs through harmful agents either physical, chemical or biological.^{1,2}

From the morphological point of view, necrosis and apoptosis have specific characteristics for each process. In the first one, the changes do not involve compacting of the chromatin in half moon or horse-shoe pattern, as described in apoptotic cells.^{1,2,5} Additionally, in the case of cells in necrosis an increase in cell volume or "swelling" has been described,^{2,3,5} as well as modification of organelles such as the mitochondria, which will carry on until the cell bursts and releases cell contents to the exterior favoring the presence of an inflammatory process. In the case of apoptosis it does not happen as such, what is observed is a decrease in cell volume accompanied by DNA degradation.^{1,2,5} The changes at the mitochondrial level are imperceptible from a structural point of view. Finally vesicles that contain organelles and DNA are formed, these are surrounded by cell wall and are called apoptotic bodies,^{1,2} that later shall be "engulfed" by neighboring cells or macrophages.^{2,10} It is possible to observe a loss of symmetry of the membrane in the apoptotic bodies due to the expression of phosphatidylserine, which favors a rapid phagocytizing of these vesicles; in this way an inflammatory process is avoided.^{10,11}

At the biochemical level it is known that in several cell types that go through apoptosis, the DNA is fragmented into 180-200 bp sections and their multiples, and it is carried out by a specific DNase;^{1,2,12} nevertheless, in necrosis the degradation of DNA happens differently thus generating fragments of diverse sizes that form a sweeping pattern in an agarose gel. In cell death by necrosis, DNA is degraded mainly by lysosomal deoxyribonucleases.^{1,2,11} It is important to point out that, in the follicular atresia phenomenon, both types of cell death have been observed using biochemical and morphological criteria for their detection.^{11,13-15}

The ovary as a model for the study of apoptosis

Diverse stimuli can affect the survival of a cell. In the ovary, there are factors acting such as hormones, growth factors, pro and antiapoptotic genes and cytokines;^{8,9} evaluating apoptosis in *in vivo* models is not always possible because the cells that enter into this process are phagocytized by neighboring cells, practically erasing all trace; nevertheless this type of cell death can be detected in *in vivo* models by using other techniques that identify these early apoptosis stages.

ser ocasionada por gran variedad de estímulos, como trauma o lesión celular, hipoxia e isquemia, entre otros.^{1,2}

Una de las diferencias más importante entre apoptosis y necrosis es que el proceso de apoptosis se puede dar tanto en condiciones fisiológicas como patológicas y la necrosis no ocurre bajo condiciones fisiológicas; es decir, la apoptosis es parte esencial de procesos de desarrollo embrionario y también es vital para la conservación de la homeostasis tisular; sin embargo, también existen patógenos como virus y bacterias que pueden inducir apoptosis. En el caso de la necrosis, se presenta mediante agentes lesivos, de naturaleza física, química y biológica.^{1,2}

Desde el punto de vista morfológico, necrosis y apoptosis tienen características específicas para cada proceso. En la primera, los cambios no involucran una compactación de la cromatina en forma de media luna o herradura, como se ha descrito en células apoptóticas.^{1,2,5} Adicionalmente en el caso de células en necrosis se ha referido un aumento en el volumen celular o "hinchamiento",^{2,3,5} así como la modificación de organelos, tales como las mitocondrias, lo que conducirá al estallamiento de la célula que expulsará el contenido celular al exterior, que favorecerá la presentación de un proceso inflamatorio. En el caso de la apoptosis no sucede así, lo que se observa es disminución del volumen celular acompañado de degradación del ADN;^{1,2,5} los cambios a nivel mitocondrial son imperceptibles desde un punto de vista estructural. Finalmente se forman vesículas que en su interior contienen organelos y ADN, que están rodeadas de membrana citoplasmática y reciben el nombre de cuerpos apoptóticos,^{1,2} que posteriormente serán "engullidos" por células vecinas o macrófagos.^{2,10} En los cuerpos apoptóticos se observa pérdida de la simetría de la membrana debido a la exposición de la fosfatidilserina, lo que favorece que estas vesículas sean rápidamente fagocitadas, de esta manera se evita que exista un proceso inflamatorio.^{10,11}

A nivel bioquímico se sabe que en diversos tipos celulares que sufren apoptosis, el ADN es fragmentado en secciones de 180-200 pb y sus múltiplos, esto ultimo lo realiza una ADNasa específica;^{1,2,12} sin embargo, en la necrosis la degradación del ADN ocurre de manera distinta, generándose fragmentos de diversos tamaños que conforman en los geles de agarosa un patrón de barrido. En la muerte celular por necrosis, el ADN es degradado principalmente por desoxirribonucleasas lisosomales.^{1,2,11} Es importante destacar que en el fenómeno de atresia folicular, ambos tipos de muerte celular han sido observados utilizando criterios bioquímicos y morfológicos para su detección.^{11,13-15}

In the ovary there are diverse factors in charge of regulating apoptosis, these vary depending of the phase of ovary follicle development. In this frame of mind, so that observations are comparable, the model that is chosen for its study shall have homogeneous cell populations in their development within the established times.⁹ It has been observed that even ovary follicles and isolated teca layer cells present spontaneous apoptosis, if they are cultured in the absence of serum.

There is a model for the study of pre-antl follicles and others in intermediate developmental stages that consists in administering diethyl-estilbestrol to hypophysectomized rats.⁹ The rabbit can also be considered as a study model of these processes because in this species the ovulation can be easily induced with a physical or hormonal stimulus, event that only occurs in this domestic species. In the rabbit the mature follicles suffer a process of constant regression (or atresia), while another group of follicles grows and matures. These waves of follicular development and regression constitute the normal ovary dynamics.¹⁶

Ovary follicle development

In the normal process of follicular development there are several stages of maturity: primordial, primary, pre-antl and antl follicles. Even in the primordial follicles, constituted only by germ cells, apoptosis is produced.¹⁷⁻²⁵

The primary follicles are structures where the oocyte is surrounded by a layer of cubic granular cells; the cells of the granular layer, when they divide by mitosis, transform the single layer structure that surrounds the follicle so that it gives origin to a multilayer follicle that receives the name of pre-antl follicle.^{11,17}

The pre-antl follicles constitute the second phase of follicular development. This phase starts with the formation of the zona pellucida and the proliferation of the cells of the granular and teca layers. The formation of the antrum and accumulation of follicular fluid are characteristic events which favor the next phase of follicular development known as antl follicles.^{11,17} Well differentiated internal and external teca layers are present in this structure as well as a germ layer that divides the granular layer from the internal teca layer; the antrum is full of fluid and the oocyte is well developed with several granular cell layers.^{11,17}

Later the follicle arrives to the pre-ovulation stage in which it has reached its maximum diameter and is capable of responding to stimulation from the luteinizing hormone for ovulation.^{11,17}

It has been established that in the primordial fol-

El ovario como modelo para el estudio de la apoptosis

Diversos estímulos pueden afectar la sobrevivencia de una célula. En el ovario actúan factores tales como hormonas, factores de crecimiento, genes pro y anti-apoptóticos y citocinas,^{8,9} evaluar la apoptosis en modelos *in vivo* no siempre es posible, ya que las células que entran en el proceso son fagocitadas por células vecinas, borrando prácticamente su rastro; sin embargo, este tipo de muerte celular puede ser detectado en modelos *in vivo* utilizando otras técnicas que identifiquen estadios tempranos de apoptosis. En el ovario existen diversos factores encargados de regular la apoptosis, éstos varían dependiendo de la fase del desarrollo folicular ovárico. En esta tesitura, para que las observaciones sean comparables, el modelo que se elija para su estudio contará con poblaciones celulares homogéneas en su desarrollo dentro de los tiempos establecidos.⁹ Se ha observado que incluso los folículos ováricos y las células de la teca aisladas, presentan una apoptosis espontánea si son cultivados en ausencia de suero.

Existe un modelo para el estudio de folículos preantrales y otros en estadio intermedio de desarrollo, que consiste en administrar dietil estilbestrol a ratas hipofisectomizadas.⁹ La coneja puede considerarse también un modelo de estudio de estos procesos, ya que en esta especie la ovulación puede ser inducida fácilmente con un estímulo físico u hormonal, evento que sólo ocurre en esta especie doméstica. En la coneja los folículos maduros sufren procesos de regresión (o atresia) constante, en tanto que otro grupo de folículos crece y madura. Estas oleadas de desarrollo y regresión folicular constituyen la dinámica habitual del ovario.¹⁶

Desarrollo folicular ovárico

En el proceso normal de desarrollo folicular existen diversos estadios de maduración: folículos primordiales, primarios, preantrales y antrales. Aun en los folículos primordiales, constituidos sólo por células germinales, se produce apoptosis.¹⁷⁻²⁵

Los folículos primarios son estructuras en las que el ovocito está circundado por una capa de células de la granulosa de tipo cuboidal; las células de la granulosa, al dividirse por mitosis, transforman la estructura unilaminar que rodea al folículo en un folículo multilaminar, que recibe el nombre de folículo preantral.^{11,17}

Los folículos preantrales constituyen la segunda fase de desarrollo folicular; esta fase se inicia con la formación de la zona pelúcida y una proliferación de

cles of rodents, the Kit ligand and the EGF bFGF growth factors possess the capacity to prevent the apoptosis phenomenon. Nevertheless, the oocytes collected in fetal stages, after being cultured *in vitro*, have an elevated proportion of cells in apoptosis.⁹ In the case of pre-antral follicles, the existing information in relation to the mechanisms involved in their survival is scarce.

In an *in vitro* study in the rat it was reported that FSH and AMPc did not have an effect on apoptosis;²⁶ nevertheless, this was not due to the lack of FSH receptors but rather on the capacity of this gonadotropin to induce the expression of steroidogenic enzymes in the pre-antral follicles.^{27,28}

In the rat, using several experimental strategies, it has been documented that the keratinocyte growth factor, the fibroblastic growth factor (FGF), GMPc, vitamin C and FSH have the capacity to inhibit apoptosis.^{23,26,29,30}

In the antral follicles, that are found in the early stage, FSH receptors are expressed and they practically become dependent on these receptors in order to be viable. In the case of the rat, FSH is specifically the most important hormone for its survival because it can inhibit apoptosis at values near 57%. In this stage the LH has a more limited effect and it is not a determinant for survival;^{31,32} other factors that inhibit apoptosis have also been mentioned in this species, such as cytokine IL-1B, activin, and EGF.³¹

In bovines and sheep the development of antral follicles has been reported as dependent on gonadotropines.³³

During the pre-ovulatory stage, both the FSH as well as the LH have the capacity to inhibit apoptosis *in vitro*; in the rat, insulin has been reported as an inhibitor of apoptosis,³¹ and EGF and bFGF factors have also been documented as equally effective to inhibit apoptosis, as are gonadotropines, in cells of the granular layer in the rat.³⁴

In 1998 McGee reported that the keratinocyte growth factor also inhibits apoptosis; in this developmental stage the growth hormone also inhibits apoptosis.²³

In cells of the granular layer of the rat it is known that stimulation of the signaling cascades of A and B kinases do not have an effect in apoptosis.³⁴

It has been reported that LH inhibits apoptosis in the development stage of pre-ovulatory follicles. In the other hand, the role of progesterone as a regulator of apoptosis has been described in humans as well as in rats.^{35,36}

Follicular atresia

Follicular atresia is a phenomenon that consists of

las células de la granulosa y de las tecas. La formación del antro y acumulación de líquido folicular son eventos que la caracterizan, propiciando la siguiente fase del desarrollo folicular conocida como folículos antrales.^{11,17} En esta estructura están presentes las capas tecales interna y externa bien diferenciadas, una capa basamental que divide la granulosa de la teca interna, el antro lleno de líquido y el ovocito bien desarrollado con varias capas de células de la granulosa.^{11,17}

Posteriormente el folículo llega al estado preovulatorio en el que ha alcanzado su máximo diámetro y se encuentra capacitado para responder al estímulo de la hormona luteinizante para la ovulación.^{11,17}

Se ha establecido que en los folículos primordiales de roedores el ligando Kit y los factores de crecimiento EGF bFGF, poseen la capacidad de impedir que el fenómeno de apoptosis se lleve a cabo. Sin embargo, los ovocitos colectados en etapas fetales, después de ser cultivados *in vitro*, presentan elevada proporción de células en apoptosis.⁹ En el caso de los folículos preantrales, la información existente al respecto es escasa en relación con los mecanismos involucrados en la supervivencia.

En un estudio realizado *in vitro* en la rata, se informó que la FSH y el AMPC no tuvieron efecto sobre la apoptosis;²⁶ sin embargo, esto último no se debió a la falta de receptores para FSH sino a la capacidad de esta gonadotropina para inducir la expresión de enzimas esteroidogénicas en los folículos preantrales.^{27,28}

En la rata, utilizando diversas estrategias experimentales, se ha documentado que el factor de crecimiento de los queratinocitos, el factor de crecimiento fibroblástico (FGF), el GMPc, la vitamina C y la FSH tiene la capacidad de inhibir la apoptosis.^{23,26,29,30}

En los folículos antrales que se encuentran en la etapa temprana, expresan receptores para FSH y prácticamente se vuelven sus dependientes para sobrevivir; en el caso de la rata, específicamente la FSH es la hormona más importante para su sobrevivencia, ya que puede inhibir la apoptosis en valores cercanos a 57%, en esta etapa la LH posee un efecto más limitado y no es determinante para la sobrevivencia;^{31,32} asimismo, en esta especie se han mencionado otros factores que inhiben la apoptosis, como la citocina IL-1B, activina, EGF.³¹

En bovinos y ovinos se ha referido que el desarrollo de los folículos antrales es dependiente de gonadotropinas.³³

Durante la etapa preovulatoria tanto la FSH como la LH tienen la capacidad de inhibir la apoptosis *in vitro*; en la rata se ha referido que la insulina inhibe la apoptosis,³¹ también se ha documentado que los

the loss or elimination of the majority of the oocytes before ovulation. It is a Greek term that means *a* = no, *tresos* = perforation.¹⁹

In the ovary there are several phases of cellular degeneration such as germ cell degeneration which causes loss of oocytes before birth, and follicular degeneration (atresia)¹⁹ in the postnatal stage.

In the ovary of a woman there are approximately 2 million oocytes at the time of birth; when puberty is reached there are approximately 400,000 follicles. Nevertheless, only 400 shall be ovulated during the reproductive life of a woman.^{11,18,19} This physiological event contravenes the metabolic and energetic principles of the organism in which the body processes and the cells that control it endeavor to save energy and efforts in order to not produce anything unnecessary. Nevertheless the capacity to select 400 follicles from the total number of follicles is a natural selection mechanism in which only some follicles shall be released. The destiny of the majority of the follicles is atresia.^{19,37}

Follicular atresia and apoptosis

As mentioned before, the process of programmed cell death is essential in several differentiation processes. In the case of the ovary, the perinatal and reproductive stages have a fundamental role in poultry, bovines, mice, rabbits and humans.^{14,15-25} The majority of the studies that give evidence on the importance of apoptosis in the ovary have centered in follicular atresia, specifically, on the degeneration of the granular layer cells.¹⁹⁻²⁵

In the follicular development and atresia phenomena local regulating factors are implicated, such as sexual steroid hormones, growth factors and cytokines, but also the pituitary gland gonadotropins FSH and LH.³⁸ Hormones are important in the presentation of the programmed cell death phenomenon as they participate as factors that inhibit or promote the presentation of apoptosis which will contribute to the presence or absence of follicular atresia and is a systematic cyclic cell death process controlled by hormones.^{3,9,23}

In bovines, it has been described that follicles that present similar morphological appearance have variable degrees of apoptosis in the granular and theca layer cells. In these studies, flow cytometry and TUNEL technique were used to quantify apoptosis; simultaneously an immunoassay (ELISA) was used to detect indirectly the fragmentation of DNA.³⁹ It is known that, in bovines, the signalling pathway for the induction of apoptosis in the cells of the granular layer includes Fas.³⁹ In the mouse it has been reported that caspase 3 apparently does not have a relevant

factores EGF y bFGF son igual de efectivos para inhibir apoptosis, como las gonadotropinas en células de la granulosa de rata.³⁴

En 1998 MCGee documentó que el factor de crecimiento de queratinocitos también inhibe la apoptosis, en esta etapa del desarrollo de igual manera la hormona del crecimiento inhibe la apoptosis.²³

En las células de la granulosa de rata se sabe que la estimulación de las cascadas de señalización de las cinasas A y B no poseen efecto en la apoptosis.³⁴

Se ha documentado que en los folículos preovulatorios la LH inhibe la apoptosis en esta etapa del desarrollo. Por otra parte, el papel de la progesterona como reguladora de apoptosis hasta el momento ha sido descrito tanto en humanos como en ratas.^{35,36}

Atresia folicular

La atresia folicular es un fenómeno consistente en la pérdida o eliminación de la mayoría de los ovocitos antes de llegar a la ovulación, es un término griego que significa *a* = no, *tresos* = perforación.¹⁹

En el ovario se distinguen diversas fases de degeneración celular, como la degeneración de células germinales, que ocasiona gran pérdida de ovocitos que se da en el ovario antes del nacimiento y de la degeneración folicular (atresia)¹⁹ en la etapa posnatal.

En el ovario de la mujer existen aproximadamente dos millones de ovocitos en el momento del nacimiento; cuando llega el momento de la pubertad se encuentran aproximadamente 400 000 folículos. Sin embargo, tan sólo 400 folículos serán ovulados durante la vida reproductiva de la mujer.^{11,18,19} Este suceso fisiológico contraviene los principios metabólicos y energéticos del organismo, en los que se procura que los procesos corporales y las células que lo controlan ahorren energía y esfuerzos para no producir nada innecesario. Sin embargo, la capacidad de seleccionar del total de folículos sólo 400, es un mecanismo de selección natural en el que sólo algunos folículos serán liberados. El destino de la mayoría de los folículos es la atresia.^{19,37}

Atresia folicular y apoptosis

Como ya se mencionó, el proceso de muerte celular programada es esencial en diversos procesos de diferenciación. En el caso del ovario, tienen un papel fundamental las etapas perinatales y reproductivas en aves, bovinos, ratones, conejos y humanos.^{14,15-25} En la atresia folicular se han centrado la mayoría de los estudios que aportan evidencias de la importancia de la apoptosis en el ovario, siendo la degeneración

function in the induction of apoptosis in immature follicles and in cells of the teca layer; nevertheless in several oocytes of pre-antl follicles active caspase 3 was detected. It is also suggested that those follicles that have few cells that express caspase 3 should be in the early stages of atresia; furthermore caspase 3 positive cells were detected in corpora lutea in degeneration. In this sense it has been suggested that the mechanism by which immature follicles experiment the atresia process is independent of the activation of caspase 3 or that possibly they are resistant to physiological stimuli that induce apoptosis.⁴⁰

The advance achieved in the knowledge about the molecular mechanisms that induce apoptosis in the ovary has shown differences in the signaling cascades involved in the apoptosis of the different cell types that are part of the ovary. In the primordial follicle to pre-antl follicular stages the apoptosis route is dependant on caspase 2 and the apoptosis process in this stage can be inhibited by interleukin 1 α and 1 β , retinoic acid or by the modulation of two receptors called gp 30 and kit which attach to the leukaemia inhibiting factor (LIF) and to the stem cell factor (SCF) respectively, as well as to the insulin-like growth factors (IGF I and IGF II).⁸ It is important to point out that the death of the oocyte is an event that will induce apoptosis in cells of the granular layer resulting in the phenomenon of follicular atresia. This effect is achieved through a dialogue between the oocyte and the somatic cells of the ovary such as the granular layer cells. Certain factors participate in this dialogue such as GDF-9, the homeodimeric protein of the TGF α /activin family that is produced by the oocyte and that has been found in species such as the rat, mouse, human and bovines.

The effect of GDF-9 consists in promoting the differentiation and growth of primary follicles, it is worth emphasizing that it's not the only factor because there are hormones such as FSH that in an endocrine manner also possess the same function, and paracrine factors such as the granulocyte growth factor (kGF) released by the cells of the teca layer.⁴¹

It has also been reported that in the stages between the antl follicles up to pre-ovulation follicles, apoptosis is dependant on caspase 3. In this period of development survival factors which prevent the cells of the granular layer from entering apoptosis have been identified such as FSH and LH hormones, the insulin-like growth factor (IGF-1) and the epidermal growth factor (EGF).⁸

In the pre-ovulation follicles of the rabbit, the cells of the teca layer and steroids perform an important role in the regulation of apoptosis of the granular layer cells. From *in vitro* experiments, where it was observed that the apoptosis phenomenon could be

específica que ocurre en las células de la granulosa la más estudiada.¹⁹⁻²⁵

En los fenómenos de desarrollo y atresia folicular se encuentran implicados factores reguladores locales, como las hormonas esteroides sexuales, factores de crecimiento y las citocinas, pero también las gonadotropinas hipofisiarias FSH y LH.³⁸ En la presentación del fenómeno de muerte celular programada, las hormonas son de importancia al participar como factores que inhiben o promueven la presentación de apoptosis que contribuirá a la presentación o ausencia de atresia folicular y es un proceso sistemático de tipo cíclico de muerte celular controlado hormonalmente.^{3,9,23}

En los bovinos se ha descrito que el grado de apoptosis en las células de la granulosa y de la teca es variable en folículos que presentan apariencia morfológica similar. En estos estudios se empleó citometría de flujo y la técnica de TUNEL para cuantificar apoptosis, simultáneamente se empleó un inmunoensayo (ELISA) para detectar fragmentación de ADN de manera indirecta.³⁹ Se sabe que en bovinos la vía de señalización para la inducción de apoptosis en las células de la granulosa incluye a Fas.³⁹ En el ratón se ha referido que la caspasa 3 aparentemente no tiene una función relevante en la inducción de apoptosis en folículos inmaduros y en las células de la teca; sin embargo, en varios ovocitos de folículos preantrales se detectó caspasa 3 activa. También se sugiere que aquellos folículos que tienen pocas células que expresan caspasa 3, estarían en estadios tempranos de atresia; además se detectaron células positivas a caspasa 3 en los cuerpos lúteos en degeneración. Al respecto, se ha sugerido que el mecanismo por el cual los folículos inmaduros experimentan el proceso de atresia es independiente de la activación de caspasa 3, o que posiblemente éstos serán resistentes a los estímulos fisiológicos que inducen apoptosis.⁴⁰

El avance alcanzado en el conocimiento de los mecanismos moleculares que inducen apoptosis en el ovario, ha mostrado diferencias en las cascadas de señalización involucradas en apoptosis de los diversos tipos celulares que componen el ovario. En los estadios de folículo primordial a folículo preantral, la ruta de apoptosis es dependiente de caspasa 2 y el proceso de apoptosis en este estadio puede ser inhibido por la interleucina 1 α y 1 β , ácido retinoico o por la modulación de dos receptores denominados gp 30 y kit, que se unen al factor inhibidor de leucemia (LIF) y al factor estimulante de células troncales (SCF), respectivamente, así como a los factores similares a la insulina (IGF I e IGF II).⁸ Es importante destacar que la muerte del ovocito es un evento que inducirá la apoptosis de células de la granulosa, lo que resulta en

induced and regulated in cells of the teca layer, it was possible to demonstrate that the cells of the teca layer can reduce the number of cells of the granular layer in apoptosis, and that this protecting effect is independent of the secretion of steroids.^{14,42} These data suggest that others are the factors for survival of the cells of the granular layer and that they have not yet been characterized up to this date.⁴²

In the case of the goat, it has been reported that the follicles that present an accumulation of 17 α -hydroxyprogesterone, poor levels of estrogens and an elevated production of androgens possess morphological characteristics of atresia.⁴³ It has also been reported that in goats FSH requires the insulin-like growth factor to inhibit apoptosis, follicular development and steroid synthesis, and it is mentioned that the probable mechanism by which this effect is achieved involves the protein kinase A dependant cascade.⁴⁴

It has been demonstrated in *in vitro* experiments that in species such as the rat, pig, and bovines, the FSH and the insulin-like growth factor inhibit apoptosis in the granular layer cells.⁴⁴

In a study done in the mare, several methods of apoptosis detection were compared such as histology, DNA fragmentation in agarose gels and detection of 3' DNA fragments with the purpose of getting to know how much the biochemical criteria correlate with the histological criteria for the identification of apoptosis and atresia. It was concluded that the detection of apoptosis through histology correlates well with the detection by methodologies based in the DNA fragmentation pattern, and that even the histological method has less limitations than the biochemical and cytological ones.⁴⁵

Prenatal ovary follicular apoptosis

In the follicles that are in the fetal ovary, the apoptosis phenomenon also happens. Nevertheless, in this stage it has not been well studied, therefore there is little known on the whole of the mechanisms that regulate apoptosis in fetal development. The importance of some factors in the fetal stage of the ovary is known, such as the kit ligand, the fetal growth factors FGF and LIF, which function as follicular survival factors because they inhibit the apoptosis process.²¹ It has been proposed that within the oocyte the union of the Fas ligand activates caspase 8, which can be considered as the initial stage of apoptosis. Later, caspase 8 will activate other executing caspases. Caspase 8 also favors the activation of the gene that codifies for the Bid protein, which when activated is transported to the interior of the mitochondria, causing the release of cytochrome C into the cytosol. The Bid gene also possesses the capability to inactivate antiapoptotic

el fenómeno de atresia folicular; este efecto se logra mediante un diálogo entre el ovocito y las células somáticas del ovario, como las células de la granulosa; en este diálogo participan ciertos factores, como el GDF-9, proteína homeodimérica de la familia TGF β /activina, que es producida por el ovocito, y que ha sido encontrada en especies como la rata, el ratón, humano, bovinos.

El efecto de GDF-9 consiste en promover la diferenciación y crecimiento de folículos primarios, se destaca que no es el único factor ya que existen hormonas como la FSH que de manera endocrina también poseen la misma función, factores paracrinos como el factor de crecimiento de los granulocitos (kGF) liberado por las células de la teca.⁴¹

Asimismo, se ha documentado que en los estadios entre los folículos antrales hasta la fase de folículos preovulatorios, la apoptosis es dependiente de la caspasa 3. En este periodo del desarrollo se han identificado factores de sobrevivencia que evitan que las células de la granulosa entren a apoptosis, como las hormonas FSH y LH, el factor similar a la insulina (IGF-1) y el factor de crecimiento epidérmico (EGF).⁸

En los folículos preovulatorios de la coneja las células de la teca y los esteroides desempeñan un papel importante en la regulación de apoptosis de las células de la granulosa. A partir de experimentos *in vitro*, en los que se observó que el fenómeno de apoptosis puede ser inducido y regulado en células de la teca, fue posible demostrar que a su vez las células de la teca pueden reducir el número de células de la granulosa que experimentan apoptosis, y que este efecto protector sería independiente de la secreción de esteroides.^{14,42} Estos datos sugieren que otros son los factores de sobrevivencia de las células de la granulosa que se requieren, que hasta la fecha no han sido caracterizados.⁴²

En el caso de la cabra, se ha informado que los folículos que presentan acumulación de 17 α -hidroxiprogesterona, malos niveles de estrógenos y una producción elevada de andrógenos, poseen características morfológicas de atresia.⁴³ Se ha referido también en la especie caprina que la FSH requiere del factor semejante a la insulina para inhibir apoptosis, desarrollo folicular y síntesis de esteroides, y se menciona que el posible mecanismo por el que se logra este efecto involucra a la cascada dependiente de proteína cinasa A.⁴⁴

Se ha demostrado en experimentos *in vitro* que en especies como la rata, cerdo y ganado bovino, la FSH y el factor semejante a insulina inhiben apoptosis en las células de la granulosa.⁴⁴

En un estudio efectuado en la yegua se compararon diversos métodos de detección de apoptosis, como la

genes of the bcl2 family, in particular bclxl, by forming dimers.²¹

The consequence of cytochrome C being released from the mitochondria into the cytosol is the activation of caspases 9 and 3, which finally execute the apoptosis program inducing the fragmentation of DNA in a typical ladder pattern. It will also cause the degradation of a DNA repairing enzyme, known as nuclear poly (ADP-ribose) polymerase favoring the disintegration and loss of cell architecture, therefore diverse organelles that constitute it shall be affected.²¹ The apoptosis induction mechanism that has been described in this section is up to this time a proposal because there are no experimental data in relation to the presence of Bid and caspase 8 in oocytes.²¹

Regulatory mechanisms of follicular apoptosis

Until this point, three apoptosis regulation mechanisms have been considered: a) apoptosis regulated by hormones and trophic factors, b) apoptosis dependant on p53, and c) apoptosis induced by Fas (Figure 2).

Apoptosis regulated by hormones and trophic factors

It constitutes a group of hormones and factors that are produced locally and are determinant for initiating the apoptosis program. They have a very important role because they function as survival factors that prevent apoptosis. The FSH and LH gonadotropins are found in this group, as well as steroid hormones, factors such as EGF, FGF and insulin.^{9,23} The response to these molecules necessarily depends on the receptors to such factors that in that moment are being expressed in the cell. Nevertheless, the cell not always responds to the stimulus even if it possesses the receptor.^{9,23}

The estrogen (ER) and progesterone (PR) receptors have reciprocal changes in the granular layer cells because the first ones disappear and the second ones reappear at the time of the LH peak in humans,²⁵ or during the induction of ovulation by sequential administration of FSH and hCG in rabbits.⁴⁶ In small follicles, as well as those in growth and pre-ovulation, the LH peak before ovulation reduces the expression of REβ.⁴⁷ In relation to isoforms A and B of the PR, these are under study, therefore the functional correlation between the different ER and PR isoforms with the follicular atresia processes is not yet well understood.

Apoptosis is determined by cellular interaction

histología, fragmentación de ADN en geles de agarosa y detección de fragmentos 3' de ADN, con el fin de conocer qué tanto correlaciona los criterios bioquímicos con los histológicos para la identificación de apoptosis y atresia. Se concluyó que la detección de apoptosis mediante la histología correlaciona bastante bien con la detección por metodologías basadas en el patrón de fragmentación de ADN, y que incluso el método histológico posee menos limitaciones que los bioquímicos y citológicos.⁴⁵

Apoptosis folicular ovárica prenatal

En los folículos que se encuentran en el ovario fetal se da también el fenómeno de apoptosis. Sin embargo, en esta etapa ha sido poco estudiado, por lo que se conoce muy poco sobre la totalidad de los mecanismos que regulan la apoptosis en el desarrollo fetal. Se conoce la importancia de algunos factores, como el ligando kit y los factores de crecimiento fetales FGF y LIF, en el periodo fetal del ovario. Éstos funcionan como factores de supervivencia folicular, ya que inhiben el proceso de apoptosis.²¹ Se ha propuesto que dentro del ovocito la unión del ligando Fas activa a la caspasa 8, lo cual se puede considerar como etapa inicial de la apoptosis; posteriormente la caspasa 8 activará a otras caspasas ejecutoras. Asimismo, la caspasa 8 favorece la activación del gen que codifica para la proteína denominada Bid, que al activarse se transporta al interior de la mitocondria, provocando que el citocromo C sea liberado al citosol. El gen Bid también posee la capacidad de inactivar genes antiapoptóticos de la familia bcl2, en particular bclxl por dimerización.²¹

La consecuencia de que el citocromo C sea liberado de la mitocondria al citosol es la activación de las caspasas 9 y 3 que finalmente ejecutarán el programa de apoptosis induciendo una fragmentación del ADN en un patrón típico de escalera. También ocasionará la degradación de una enzima de reparación de ADN, denominada poli (ADP-ribose) polimerasa nuclear, que propiciará que exista desintegración y pérdida de la citoarquitectura, por lo que serán afectados los diversos organelos que la constituyen.²¹ El mecanismo de inducción de apoptosis que ha sido descrito en este apartado es hasta el momento una propuesta, ya que no existen datos experimentales respecto de la existencia de la presencia de Bid y caspasa 8 en los ovocitos.²¹

Mecanismos reguladores de apoptosis folicular

Se han considerado hasta el momento tres mecanismos reguladores de apoptosis: a) Apoptosis regulada por hormonas y factores tróficos; b) apoptosis dependiente de p53; c) apoptosis inducida mediante Fas (Figura 2).

Figura 2: Esquema general de las vías de apoptosis: El proceso apoptótico de las células de la granulosa participan hormonas y factores cuya acción es promover la sobrevivencia, éstos funcionan acoplándose a sus receptores específicos, la ejecución de apoptosis converge en la mitocondria, donde, dependiendo de la expresión de genes pro apoptóticos y antiapoptóticos, se continuará formando el complejo conocido como apoptosoma; otra ruta para apoptosis se inicia por daño a ADN, en la cual el gen p53 induce apoptosis; la otra ruta es dependiente de Fas, en la cual también se induce apoptosis.^{2,3,6,11,15,22,32,49}

General schematic of the apoptosis pathways: in the apoptosis process of the cells of the granular layer, participate hormones and factors whose action is to promote survival, these function by coupling to their specific receptors; the execution of apoptosis converges in the mitochondria, where, depending on the expression of proapoptotic and antiapoptotic genes it shall continue forming the complex known as apoptosome; another pathway for apoptosis is initiated by DNA damage where the p53 gene induces apoptosis; the other pathway is dependant on Fas, where apoptosis is also induced.^{2,3,6,11,15,22,32,49}

because cell to cell adhesion is essential in the survival signals of the follicles.

The “N” cadherin is an adhesion protein dependant on calcium that is expressed in the granular layer cells of follicles in growth and in antral follicles. In follicles in degeneration there is a loss of expression of “N” cadherin.⁴⁸ It has been proposed that the down regulation or absence of expression of N-cadherin is a signal that contributes to the initiation of apoptosis in the granular layer cells.⁴⁸

The specific stage of execution of the apoptosis program, independently of the receptor and stimulus, shall converge in the mitochondria where the Bcl-2 gene family shall practically have the decision of “live or die”. Said decision at the cellular level shall depend on the expression of the genes of this family because some of them have antiapoptotic properties and others have proapoptotic properties. In the end, what will determine if the cell dies or not shall be the concentration of each of these genes; in other words if there is a greater concentration of the proapoptotic family genes the cell shall inevitably die; if the case is

Apoptosis regulada por hormonas y factores tróficos

Constituye un conjunto de hormonas y factores que se producen de manera local y son determinantes para iniciar el programa de apoptosis. Tienen un papel muy importante, ya que funcionan como factores de sobrevivencia que evita la apoptosis. En este grupo se encuentran las gonadotropinas FSH y LH, hormonas esteroidales, factores como EGF, FGF e insulina.^{9,23} La respuesta a estas moléculas dependerá necesariamente de los receptores a dichos factores que en ese momento se estén expresando en la célula. Sin embargo, no siempre la célula responderá al estímulo aunque posea el receptor.^{9,23}

Los receptores a estrógenos (RE) y a progesterona (RP) sufren cambios recíprocos en las células de la granulosa, ya que los primeros desaparecen y los segundos reaparecen en el momento del pico de LH en humanos,²⁵ o bien durante la inducción de la ovulación por la administración secuencial de FSH y hCG en conejas.⁴⁶ En folículos pequeños, en

reversed and there is a greater concentration of the antiapoptotic family genes the cell shall live.^{6,9,23}

When in the environment there is a greater proapoptotic activity, the mitochondria shall release into the cytoplasm substances such as cytochrome C, which in association with the apoptotic protease activating factor 1 (APAF-1) and procaspase 9, shall form the protein complex known as apoptosome.^{3,8,9} This complex shall be capable of activating the transcription of DNA sequences that codify for downstream caspases, for example caspase 3. In this way, a series of events associated with apoptosis shall be initiated, such as the loss of symmetry of the cell wall which implies the outward expression of phosphatidylserine and the degradation by caspases of the caspase dependent DNase inhibitor (CDDI);^{2,9} allowing the action of the DNase thus generating the 200 bp fragments and its multiples that are observed in the apoptosis process.^{1,2}

Recent *in vitro* studies in cells of the granular layer of the rabbit show that FSH reduces the appearance of apoptosis provided that all the structures belonging to the follicle are present and not only the cells of the granular layer,^{14,42} suggesting that the regulation mechanism is paracrine. The cyclic AMP dibutyl presents a two-phase behaviour on cells of the granular layer; on one hand when there are large quantities of cyclic AMP apoptosis is induced, and on the other when there are small quantities of cyclic AMP, DNA synthesis is induced. In other words, AMPc participates directly or indirectly in apoptosis because it is a second messenger in the action of peptide hormones such as gonadotropines.^{14,42}

Apoptosis dependant on p53

When for some reason DNA has been damaged, as in the case of atresia produced by the accumulation of free radicals, these compounds shall induce the expression of a gene known as p53, which has two relevant biological functions: the induction of cell death due to apoptosis and interruption of the progression of the cell cycle.⁴⁹⁻⁵¹ When p53 is over expressed it promotes an increase in the expression of Bax, which is a proapoptotic gene, thus coming together with the mitochondrial events described before, such as the liberation of cytochrome C. The expression of P53 has been demonstrated by immunocytochemistry in rat, in cells of the granular layer which are in atresia.⁵¹

Apoptosis induced by the Fas pathway

This pathway of cell death by apoptosis has been described in immunological processes,¹ it can be acti-

crecimiento y preovulatorios, el pico de LH antes de la ovulación regula a la baja del REβ.⁴⁷ En cuanto a las isoformas A y B de los RP se encuentran en estudio, por lo que la correlación funcional entre las diferentes isoformas de los RE y RP con los procesos de atresia folicular no están bien entendidos.

La apoptosis está determinada por la interacción celular, ya que la adhesión célula-célula es esencial en las señales de sobrevivencia de los folículos.

La "N" cadherina es una proteína de adhesión dependiente de calcio que se expresa en las células de la granulosa de folículos en crecimiento y folículos antrales. En los folículos en degeneración hay pérdida de la expresión de la "N" cadherina.⁴⁸ Se ha propuesto que la regulación a la baja o la ausencia de la expresión de N-cadherina sea una señal que contribuya a iniciar la apoptosis en las células de la granulosa.⁴⁸

La etapa específica de ejecución del programa de apoptosis, independientemente del receptor y el estímulo, convergerán en la mitocondria en donde la familia de genes Bcl-2 tendrá prácticamente la "decisión de vivir o morir". Dicha decisión a nivel celular dependerá de la expresión de los genes de esta familia, ya que algunos poseen propiedades antiapoptóticas y otras propiedades proapoptóticas. Finalmente, lo que determinará si la célula muere o no será la concentración de cada uno de estos genes; es decir, si existe mayor concentración de los genes de la familia proapoptótica la célula inevitablemente morirá; si el caso es contrario y hay mayor concentración de genes anti-apoptóticos la célula vivirá.^{6,9,23}

Cuando en el medio exista mayor actividad proapoptótica, la mitocondria liberará al citoplasma sustancias como son el citocromo C, que en asociación con el factor apoptótico 1 activador de proteasas (cuyas siglas en inglés son APAF-1) y la procaspasa 9, formará el complejo proteínico conocido como apoptosoma.^{3,8,9} Este complejo será capaz de activar la transcripción de secuencias de ADN que codifican para las caspasas que están situadas "río abajo"; como ejemplo se encuentra la caspasa 3. Así se iniciarán una serie de eventos asociados con apoptosis, como es la pérdida de simetría de la membrana plasmática, que implica la exteriorización de la fosfatidilserina y la degradación por parte de las caspasas del inhibidor de ADNasa dependiente de caspasas (ICAD),^{2,9} lo cual permitirá que la ADNasa actúe generando los fragmentos de DNA de 200 pb y sus múltiplos que se observan en el proceso de apoptosis.^{1,2}

Estudios recientes realizados *in vitro* en células de la granulosa del conejo muestran que la FSH reduce la presentación de apoptosis, siempre y cuando se encuentren todas las estructuras propias del folículo y no exclusivamente las células de la granulosa,^{14,42} que

vated when there is Fas ligand and its corresponding receptor is present in the wall.^{2,9,15}

Currently it is known that both the Fas ligand and its receptor are expressed in the ovary, and that the cells of several species like human, mouse, rat and bovine can suffer apoptosis through the Fas pathway.^{1,15} This pathway in particular happens in an order very similar to the one explained in the pre-natal ovary apoptosis section. Briefly, the Bcl-2 gene family shall be responsible of initiating or preventing the apoptosis process, which in itself shall depend on the balance within the expression of proapoptotic and antiapoptotic genes. Afterwards, the activity of caspases shall be initiated, as well as the release of substances to the exterior by the mitochondria, such as cytochrome C, which will be responsible of biochemical and morphological changes such as DNA fragmentation in a nucleosomal pattern and formation of apoptotic bodies.^{1,2,8,9}

Perspectives

Despite the fact that apoptosis is a highly conserved biological process in several species, there is still need for characterization of the signaling cascades involved in its induction, besides characterizing the factors involved in the survival of the cells of the granular layer.

The majority of the information currently available is directed towards the study of apoptosis in cells of the granular layer and little information has been generated in relation to the biological mechanisms involved in the induction and inhibition of apoptosis in cells of the teca layer. As a consequence of this we propose that studies be carried out to elucidate the molecular mechanisms of apoptosis in cells of the teca layer. It is important to mention that the majority of the studies have been carried out in rat or mice and that many of them are carried out in *in vitro* systems, therefore it is necessary to carry out studies *in vivo* in several animal species, as well as make use of transgenic and *knockout* animals in order to know the biological mechanisms of apoptosis and the action of hormones and several cytokines in its regulation.

Currently the details of how the communication between the cells of the teca and granular layers is carried out, in the early stages of follicular atresia, are not known. Also, the evaluation of the role of certain apoptosis inhibiting proteins in somatic cells of the ovary, such as the survival protein, as well as the identification and characterization of proteins that inhibit apoptosis, is still pending.

It is necessary to characterize in cells of the granular layer the mechanisms of the kinase B protein, which is a family of proteins that contain three iso-

sugiere que el mecanismo de regulación es parácrino. El dibutiril AMP cíclico presenta un comportamiento bifásico sobre células de la granulosa, que cuando existen grandes cantidades de AMP cíclico se induce la apoptosis, mientras que en pequeñas concentraciones induce la síntesis de ADN; es decir, el AMPc participa directa o indirectamente de la apoptosis, ya que es un segundo mensajero en la acción de hormonas peptídicas como las gonadotropinas.^{14,42}

Apoptosis dependiente de p53

Cuando por alguna causa se ha dañado el ADN, como en el caso de atresia, producto de la acumulación de los radicales libres, estos compuestos inducirán la expresión de un gen denominado p53, que tiene dos funciones biológicas relevantes: La inducción de muerte celular por apoptosis e interrumpir la progresión del ciclo celular.⁴⁹⁻⁵¹ Al sobreexpresarse p53, este gen promoverá que la expresión de Bax, que es un gen proapoptótico, se incremente, confluyendo así en los eventos mitocondriales anteriormente descritos, como la liberación del citocromo C. La expresión de p53 ya se demostró por métodos de inmunocitoquímica en células de la granulosa de rata que están en atresia.⁵¹

Apoptosis inducida por la vía de Fas

Esta ruta de muerte celular por apoptosis ha sido descrita en fenómenos de carácter inmunológico,¹ puede ser activada cuando exista el ligando Fas y su respectivo receptor presente en la membrana.^{2,9,15}

En la actualidad se sabe que tanto el ligando Fas como su receptor se expresan en el ovario, y que las células de diversas especies como humano, ratón, rata y bovino pueden sufrir apoptosis por la vía de Fas.^{1,15} Esta vía en particular se dará en un orden muy similar al explicado en el apartado de apoptosis prenatal ovárica. De manera breve, la familia de genes Bcl-2 será la responsable de iniciar o bien de impedir que se lleve a cabo un proceso apoptótico, lo cual dependerá del balance dentro de la expresión de genes proapoptóticos y antiapoptóticos. Posteriormente se iniciará la actividad de caspasas y liberación de sustancias al exterior por parte de la mitocondria, como es el caso del citocromo c, que serán las responsables de cambios bioquímicos y morfológicos, como la fragmentación de ADN en un patrón nucleosomal y la formación de cuerpos apoptóticos.^{1,2,8,9}

Perspectivas

No obstante que la apoptosis aunque es un proceso biológico altamente conservado en diversas especies,

forms and whose function is inhibiting apoptosis, targeting these studies on the characterization of the components of the signaling cascade and their effects, as well as how do these modulate the transcription of certain factors such as NFkB.

Great development in this field of knowledge is expected because there are already molecular methodologies that facilitate its study.

Getting to know the details as how the apoptosis is regulated during ovary follicular development shall allow in the future the design of effective contraceptive methods that have less adverse effects and prolong the reproductive life in several species; for example in species that are in danger of extinction or productive species, as well as treat several infertility diseases in animals of great economic value.

Acknowledgments

The authors thank the financing provided by the General Direction of the Academic Staff UNAM, for the development of the PAPIIT ES212101 project; this revision was carried out during the validity of this support to the project.

Referencias

1. Kaufmann HS. Apoptosis: pharmacological implications and therapeutic opportunities. San Diego: Academic Press, 1997.
2. Flores-Pérez FI ¿Es la Muerte importante para la vida? Vet.Mex 2002; 33:161-171.
3. Hsu SY, Hsueh AJ. Intracellular mechanisms of ovarian cell apoptosis. Mol Cell Endocrinol 1998;145: 21-25.
4. Zachary J, Xue D. Functional genomic analysis of apoptotic DNA degradation in *C. elegans*. Mol Cell 2003;11:987-996.
5. Hacker G. The morphology of apoptosis. Cell Tissue Res 2000;301:5-17.
6. Coultas L, Pellegrin M, Visvader JE, Lindeman GJ, Chen L, Adams JM, *et al*. Bfk: a novel weakly proapoptotic member of Bcl-2 protein family with a Bh3 and Bh2 region. Cell Death Differ 2003; 10:185-192.
7. Johnson AL, Bridgham JT. Caspase-mediated apoptosis in the vertebrate ovary. Reproduction 2002;124:19-27.
8. Johnson AL. Intracellular mechanisms regulating cell survival in ovarian follicles. Anim Reprod Sci 2003;78:185-201.
9. Markstrom E, Svensson E Ch, Shao R, Svanderg B, Billig H. Survival factors regulating ovarian apoptosis-dependence on follicle differentiation. Reproduction 2002 ;123:23-30.
10. Henson PM, Bratton DL, Fadok V. Apoptotic cell removal. Curr Biol 2001;11:795-805.
11. Hsueh AJ, Billing H, Tsafri A. Ovarian follicle atresia: a hormonally controlled apoptotic process. Endocrinol. Rev 1994; 6:707-724.

aun hace falta caracterizar completamente las cascadas de señalización involucradas en su inducción, además de caracterizar los factores involucrados en la sobrevivencia de las células de la granulosa.

La mayoría de la información disponible hasta la fecha está dirigida al estudio de la apoptosis en células de la granulosa, y poca información se ha generado con respecto a los mecanismos biológicos involucrados en la inducción e inhibición de apoptosis en células de la teca. Como consecuencia de lo anterior, se propone llevar a cabo estudios que eluciden los mecanismos moleculares de apoptosis en células de la teca. Es necesario mencionar que la mayoría de los estudios están hechos en rata o ratón y muchos de ellos están realizados en sistemas *in vitro*, por lo que es necesario efectuar estudios *in vivo* en diversas especies animales y también hacer uso de animales transgénicos y *knockout*, para conocer los mecanismos biológicos de apoptosis y la acción tanto de hormonas como de diversas citocinas en su regulación.

Hasta la fecha no se conoce en detalle cómo pudiera ser la comunicación entre las células del teca y la granulosa, en los estadios tempranos de atresia folicular. Asimismo, queda pendiente por evaluar en las células somáticas del ovario el papel de ciertas proteínas inhibidoras de apoptosis, como la proteína de sobrevivencia, así como la identificación y caracterización de proteínas cuya función es inhibir apoptosis.

En células de la granulosa es necesario caracterizar los mecanismos de la proteinacinas B, que es una familia de proteínas que contienen tres isoformas y cuya función es inhibir la apoptosis, orientando los estudios en caracterizar los componentes de la cascada de señalización y su efecto y cómo éstos modulan la transcripción de ciertos factores como NFkB.

Se espera gran desarrollo en este campo del conocimiento, dado que ya se cuenta con metodologías moleculares que facilitarán abordar su estudio.

El conocer en detalle cómo se regula la apoptosis durante el desarrollo folicular ovárico permitirá en un futuro diseñar métodos anticonceptivos eficaces que tengan menos efectos adversos y alargar la vida reproductiva en diversas especies; por ejemplo, las que se encuentran en peligro de extinción o las especies productivas, así como tratar diversos padecimientos de infertilidad en animales de gran valor económico.

Agradecimientos

Los autores agradecen el financiamiento otorgado por la Dirección General de Asuntos del Personal Académico de la UNAM, para el desarrollo del proyecto PAPIIT ES212101; durante la vigencia de apoyo al proyecto se llevó a cabo esta revisión.

12. Shiota M, Sugai N, Tamura M, Yamaguchi R, Fukushima N, Miyano T, *et al.* Correlation of mitogen-activated protein kinase activities with cells survival and apoptosis in porcine granulosa cells. *Zoolog Sci* 2003;20:193-201.
13. Rosales-Torres AM, Avalos-Rodriguez A, Vergara-Onofre M, Hernandez-Perez O, Ballesteros LM, Garcia-Macedo R, *et al.* Multiparametric study of atresia in ewe antral follicles: histology, flowcytometry, internucleosomal DNA fragmentation, and lysosomal enzyme activities in granulosa cells and follicular fluid. *Mol Reprod Dev* 2000;55:270-281.
14. Maillet G, Bréard E, Benhaim A, Leymarie P, Féral L. Hormonal regulation of apoptosis in rabbit granulosa cells *in vitro*: evaluation by flow cytometric detection of plasma membrane phosphatidylserine externalization. *Reproduction* 2002;123:243-251.
15. Porter DA, Harman RM, Cowan RG, Quirk SM. Relationship of fas ligand expression and atresia during bovine follicle development. *Reproduction* 2001;121:561-566.
16. Asdell SA. Patterns of mammalian reproduction 2nd ed. New York. Cornell: University Press, 1964.
17. Rosales TA, Atresia folicular. En : Velazques MJ editor. *Biología de la reproducción*. México D.F. Universidad Autónoma Metropolitana. 1998:223-261.
18. Sang-Young C, Hsueh JWA. Paracrine mechanisms of ovarian follicle apoptosis. *J Reprod Immunol* 1998;32:63-75.
19. Rosado A, Rosales AM, Maduración folicular en el mamífero. *Ciencia* 1991; 42:81-97.
20. Kaipia A, Hsueh AJ. Regulation of ovarian follicle atresia. *Annu Rev Physiol* 1997;59:349-363.
21. Reynaud K, Driancourt MA. Oocyte attrition. *Mol Cell Endocrinol* 2000;163:101-108.
22. Tilly J. Apoptosis and ovarian function. *Rev Reprod* 1996;1:162-172.
23. McGee EA, Hsu S, Kaipia A, Hsueh AJ. Cell death and survival during ovarian follicle development. *Mol Cell Endocrinol* 1998;140:15-18.
24. Mikkelsen AL, Hopstand E, Lindenber G. Incidence of apoptosis in granulosa cells from immature human follicles. *Reproduction* 2001; 122:481-486.
25. Richards JS. Hormonal control of gene expression in the ovary. *Endocrinol Rev* 1994 ;6:725-751.
26. McGee EA, Chun SY, Lai S, He Y, Hsueh AJ. Keratinocyte growth factor promotes the survival, growth and differentiation of prenatal ovarian follicles. *Fertil Steroid* 1999; 71:732-738.
27. Dunkel L, Tilly JL, Shikone T, Nishimori K, Hsueh AJ. Follicle-stimulating hormone receptor expression in the rat ovary: increases during prepubertal development and regulation by the opposing actions of transforming growth factors beta and alpha. *Biol Reprod* 1994;50:940-948.
28. Ranikki AS, Zang FP, Huhtaniemi IT. Ontogeny of follicle stimulating hormone receptor gene expression in the rat testis and ovary. *Molec Cell Endocr* 1995;107:199-208.
29. Billing h, Furuta I, Hsueh AJ. Estrogens inhibit and androgens enhance ovarian granulosa cell apoptosis. *Endocrinology* 1993;133:2204-2212.
30. Murray AA, Molinek MD, Baker SJ, Kojima FN, Smith MF, Hillier SG, *et al.* Role of ascorbic acid in promoting follicle integrity and survival in intact mouse ovarian follicles *in vitro*. *Reproduction* 2001;121:89-96.
31. Chun SY, Billing H, Tilly JL, Furuta I, Tsafiriri A, Hsueh AJ. Gonadotropin suppression of apoptosis in cultured preovulatory follicles: mediatory role of endogenous insulin-like growth factor. *Endocrinology* 1994;135:1845-1853.
32. Chun Sy, Hsueh AJW. Paracrine Mechanisms of ovarian follicle apoptosis, *J Reprod Immunol* 1998;39:63-75.
33. Weeb R, Nicholas B, Gong JG, Campbell BK, Gutierrez CG, Garverik HA, *et al.* Mechanisms regulating follicular development and selection of the dominant follicle. *Reproduction suppl* 2003;61:71-79.
34. Tilly L, Billing H, Kowalski KI, Hsueh AJ. Epidermal growth factor and basic fibroblast growth factor suppress the spontaneous onset of apoptosis in cultured rat ovarian granulosa cells and follicles by atyrosine kinase-dependent mechanism. *Mol Endocrinol* 1992;6:1942-1950.
35. Svensson EC, Markstrom E, Andersson M, Billing H. Progesterone receptor-mediated inhibition of apoptosis in granulosa cells isolated from rats treated with human chorionic gonadotropin. *Biol Reprod* 2000;63:1457-1464.
36. Markigiannakis A, Coukos G, Christofidou-Solamidou M, Montas S, C. Progesterone is an autocrine/paracrine regulator of human granulosa cell survival *in vitro*. *Ann NY Acad Sci* 2000;900: 16-25.
37. Ronghao Li, Phillips MD, Morre A, Mather J. Follicle-stimulating hormone induces terminal differentiation in apredifferentiated rat granulosa cell line (ROG). *Endocrinology* 1997;138:2648-2657.
38. Asselin E, Xia CW, Wong FE, Tsang BK. Mammalian follicular development and atresia: role of apoptosis. *Biol Signals Recept* 2000;9: 874-895.
39. Zeuner A, Muller K, Reguszynski K, Jewgenow K. Apoptosis within bovine follicular cells and its effect on oocyte development during *in vitro* maturation. *Theriogenology* 2003;59,1421-1433.
40. Fenwick MA, Hurst P.R. Immunohistochemical localization of active caspase-3 in the mouse ovary: growth and atresia of small follicles. *Reproduction* 2002;124:659-665.
41. Hsueh AJW, McGee EA, Hayasi M, Hsu S.Y. Hormonal regulation of early follicle development in the rat ovary. *Mol Cell Endocrinol*. 2000;163:95-100.
42. Maillet G, Benhaïm A, Mittre H, Féral C. Involvement of theca cells and steroids in the regulation of granulosa cells apoptosis in rabbit preovulatory follicles. *Reproduction* 2003;125:709-716.
43. Bobes RJ, Perez-Martinez M, Gomez Y, Romano MC. Metabolism of progesterone to estrogens and androgens by individual follicles of the goat ovary. *Small Rum Res* 2003;47:233-242.
44. Yu Y, Li W, Han Z, Lou M, Chang Z, Tan J. The

- effect of follicle-stimulating hormone on follicular development, granulosa cell apoptosis and steroidogenesis and its mediation by insulin-like growth factor-I in the goat ovary. *Theriogenology* 2003;60:1691-1704.
45. Pedersen HG, Watson ED, Telfer E. Analysis of atresia in equine follicles using histology, fresh granulosa cell morphology, and detection of DNA fragmentation. *Reproduction* 2003;125:417-423.
 46. Iway T, Fujii S, Nabuy Y, Nonogak H, Konishi I, Mori T, *et al.* Effect of human chorionic gonadotropin on the expression of progesterone receptor and estrogen receptor in rabbit ovarian granulosa cells and the uterus. *Endocrinology* 1991;129:1840-1848.
 47. Byers M, Kiuper GG, Gustafsson JA, Park -Sarge OK. Estrogen-receptor- b mRNA expression in rat ovary: down regulation by gonadotropins. *Mol Endocrinol* 1997;11:172-182.
 48. Makrigianna A, Coukos G, Blaschuk O, Coutifaris C. Follicular atresia and luteolysis. Evidence of a role for N-cadherin. *Ann NY Acad Sci* 2000;900:46-55.
 49. Arowsmith CH. Structure and function in the p53 family. *Cell Death Differ* 1999;94:514-519.
 50. Bendi A, Mookerje B. Biological significance and molecular mechanisms of p-53 induced apoptosis. *Apoptosis* 1988;3:224-237.
 51. Burns Ft, El-Deiry WS. The p53 pathway and apoptosis. *J Cell Phys* 1999; 181:231-239