

**UNIVERSIDAD NACIONAL AUTONOMA DE MEXICO.
FACULTAD DE MEDICINA.
DIVISIÓN DE ESTUDIOS DE POSTGRADO.**

**INSTITUTO MEXICANO DEL SEGURO SOCIAL
UNIDAD MEDICA DE ALTA ESPECIALIDAD
HOSPITAL DE GINECOBSTETRICIA # 3
CENTRO MEDICO NACIONAL "LA RAZA"**

APOPTOSIS OVÁRICA EN PACIENTES CON BAJA RESERVA OVÁRICA.

TESIS

QUE PARA OBTENER EL GRADO DE DOCTOR EN CIENCIAS MEDICAS

PRESENTA EL:

**MAESTRO EN BIOLOGÍA DE LA REPRODUCCION
VICTOR SAUL VITAL REYES.**

TUTOR:

DR. ALEJANDRO REYES FUENTES

MÉXICO, D.F. NOVIEMBRE 2006



Universidad Nacional
Autónoma de México

Dirección General de Bibliotecas de la UNAM

Biblioteca Central



UNAM – Dirección General de Bibliotecas
Tesis Digitales
Restricciones de uso

DERECHOS RESERVADOS ©
PROHIBIDA SU REPRODUCCIÓN TOTAL O PARCIAL

Todo el material contenido en esta tesis esta protegido por la Ley Federal del Derecho de Autor (LFDA) de los Estados Unidos Mexicanos (México).

El uso de imágenes, fragmentos de videos, y demás material que sea objeto de protección de los derechos de autor, será exclusivamente para fines educativos e informativos y deberá citar la fuente donde la obtuvo mencionando el autor o autores. Cualquier uso distinto como el lucro, reproducción, edición o modificación, será perseguido y sancionado por el respectivo titular de los Derechos de Autor.

Gracias al apoyo brindado por la Coordinación de Investigación Médica en a Salud del Instituto Mexicano del Seguro Social, así como del Consejo Nacional del Ciencia y Tecnología, la parte experimental de este trabajo fue realizada en el Departamento de Patología, University of Alabama at Birmingham, Alabama USA, bajo la asesoría del Dr. William E. Grizzle.

INDICE.

1.- RESUMEN.....	4
2.- INTRODUCCIÓN.....	8
3.- ANTECEDENTES CIENTÍFICOS.....	12
4.- PLANTEAMIENTO DEL PROBLEMA.....	22
5.- HIPÓTESIS.....	24
6.- OBJETIVOS.....	25
7.- MATERIAL Y METODOS.....	26
8.- RESULTADOS.....	34
9.- DISCUSIÓN.....	37
10.- CONCLUSIONES.....	43
11.- BIBLIOGRAFÍA.....	44
12.- CARTA DE CONSENTIMIENTO.....	51
13.- ANEXOS (TABLAS Y FIGURAS).....	52

Resumen

Las alteraciones menstruales son una causa frecuente de consulta ginecológica y la disfunción ovárica se asocia hasta en un 30% a infertilidad. La reserva ovárica esta constituida por el número de folículos primordiales que se establece durante la ovogénesis y que disminuye de manera natural a lo largo de la vida. En el equilibrio proliferación / muerte celular en el ovario, la apoptosis desempeña un papel preponderante. Desde este punto de vista, la apoptosis acelerada podría ser uno de los mecanismos que contribuyen a la disminución prematura de la reserva folicular e insuficiencia ovárica.

Objetivo: Determinar la apoptosis ovárica e identificar algunas moléculas que participan en la regulación celular de la proliferación / apoptosis en pacientes con baja reserva ovárica.

Material y Métodos. Se efectuó un estudio clínico transversal en un grupo de pacientes que fueron sometidas a histerectomía abdominal total y ooforectomía unilateral debido a patología uterina benigna, en las cuales previamente a la cirugía se evaluó la reserva ovárica a través de la prueba del citrato de clomifeno. La apoptosis ovárica se determinó a través del método del TUNEL y la identificación de p53, Bax, caspasas-3.-8-9, FAS-L, Bcl-2, Ki-67, PCNA se realizó a través de inmunohistoquímica. El análisis estadístico comparativo se efectuó utilizando la prueba U- Mann-Whitney (datos no distribuidos normalmente) y la prueba t de Student.

Resultados. Se estudiaron 15 pacientes. El promedio grupal de edad fue de 32 ± 4 años. La edad entre los grupos no mostró diferencias significativas (BRO = 33 ± 3 años vs. Control = 30 ± 4 años). De acuerdo a la definición operacional de baja reserva ovárica, este grupo de pacientes presentó cifras significativamente mayores de FSH sérica (BRO = 23 ± 6 mUI/ml vs. Control = 7 ± 4 mUI/ml, $p < 0.01$).

El número de folículos ováricos en ambos grupos estudiados, no mostró diferencias estadísticamente significativas.

La apoptosis determinada a través del método del TUNEL fue observada en la mayoría de los componentes celulares ováricos de ambos grupos estudiados; sin embargo, no encontramos diferencias significativas. De la misma manera, se encontró la presencia ovárica de Bax, p53, caspasas -3, -8, -9, Fas-L, Bcl-2, Ki-67 y PCNA en ambos grupos estudiados. En el grupo control, la presencia de las caspasas- 3 y -8 en el estroma y vasos ováricos fue significativamente mayor.

Conclusiones: La fragmentación del DNA y la presencia de algunas moléculas que participan en la regulación del ciclo celular, se encuentran presentes de manera indistinta en los ovarios de pacientes con baja reserva y sus controles.

Parecería ser que el mecanismo que conduce a la disminución de la reserva ovárica no involucra alguna alteración fácilmente detectable en la proliferación o apoptosis ovárica.

Palabras Clave: Apoptosis Ovárica. Baja Reserva Ovárica. Proliferación Ovárica.

Abstract

Menstrual disorders are a frequent condition in the gynecological practice, and ovarian dysfunction is associated to 30% of cases with infertility. Ovarian reserve is built by the number of primordial follicles, is established during ovogenesis, and it diminishes throughout the lifespan. Apoptosis plays an essential role in the equilibrium between cell proliferation and death in the ovary. Based on that we propose that accelerated apoptosis may well be one of the mechanisms contributing to a premature decrease in the follicular reserve and ovarian insufficiency.

Objective: To determine ovarian apoptosis and to identify some of the molecules that participates in the regulation of cell proliferation and death, in patients with low ovarian reserve.

Material and Methods: A clinical, cross-sectional study was conducted in a group of women that underwent a total abdominal hysterectomy with unilateral oophorectomy because of benign uterine pathology. Before surgery, ovarian reserve was evaluated by the clomiphene citrate test. Ovarian apoptosis was determined by the TUNEL procedure. Immunohistochemistry was utilized to identify p53; Bax; caspase-3, 8, and -9; FAS-L; Bcl-2; Ki-67 and PCNA. Statistical comparisons were conducted with Mann-Whitney-U test and Student t test.

Results: Fifteen patients were studied. The mean age was 32 ± 4 years; no differences between groups were detected (33 ± 3 years vs 30 ± 4 years in Low Ovarian Reserve and Control groups respectively). In accordance with the operative definition for low ovarian reserve, this group presented significantly higher serum concentrations of FSH than the control group (23 ± 6 mIU/ml vs 7 ± 4 mIU/ml, $p < 0.01$). The number of follicles was not different between groups.

Apoptosis determined by TUNEL was observed in most of the cell components of the ovary in both groups, but no statistical differences between groups were found. Similarly, ovarian Bax; p53; caspase-3, -8, -9; Fas-L; Bcl; Ki-67 and PCNA were detected in both groups; only caspases 3 and 8, in the stroma and vessels, were significantly greater in the Control than in the Low Ovarian Reserve group.

Conclusions: DNA fragmentation and some molecules related to the cell-cycle regulation are found indistinctly in patients with low ovarian reserve and in their counterparts.

Key words: Ovarian Apoptosis, Low Ovarian Reserve, Ovarian Proliferation.

I.- Introducción.

El potencial reproductivo es el resultado de la interacción de una secuencia de eventos orquestados que concluyen con la fertilización y que aseguran la perpetuación de las especies. En la mujer, la reserva ovárica está constituida por una cantidad finita de folículos primordiales los cuales disminuyen de manera gradual a lo largo de la vida, concluyendo con la menopausia que representa el cese programado del funcionamiento ovárico; evento que se presenta cuando el impacto del envejecimiento fisiológico en otros órganos y sistemas es imperceptible.^{1,2}

El número de folículos presentes en el ovario humano alcanza su máximo alrededor de la semana 20 de gestación y decrece de manera gradual a lo largo de la vida reproductiva hasta disminuir de manera importante al momento de la menopausia. Solo una mínima cantidad de folículos presentes en el ovario fetal completará el proceso de crecimiento y desarrollo folicular, ya que gran parte de folículos se perderán a lo largo de la vida a través del proceso de atresia.³

El equilibrio entre proliferación y muerte celular en el ovario está determinado por la interacción de factores endocrinos, paracrinos, autocrinos, y por la expresión de genes de muerte o de supervivencia. La muerte celular en el ovario es uno de los mecanismos básicos de homeostasis celular, ya que mediante este proceso se regula el crecimiento y desarrollo folicular, la selección del folículo dominante y función del cuerpo lúteo.⁴

Recientemente se ha cuestionado la posibilidad de que la ovogénesis ocurra en la etapa postnatal en el ratón; sin embargo en la actualidad se acepta que la reserva folicular en la mujer se establece durante la vida fetal y que durante la ovogénesis la población de células germinales es determinada a través del equilibrio proliferación/apoptosis; y que el crecimiento y desarrollo de los folículos ováricos está determinado por el proceso de atresia folicular, donde la apoptosis participa de manera preponderante.⁵

Básicamente, la muerte celular puede ocurrir a través de dos mecanismos; necrosis y apoptosis. La necrosis o también llamada muerte accidental o patológica, se presenta cuando las células se exponen a condiciones de estrés fisiológico (hipoxia, hipertermia, etc.) o a eventos patológicos que alteran la integridad celular. Durante la necrosis se presentan cambios en la permeabilidad celular, alteraciones en organelos celulares (principalmente mitocondriales) y lisis celular que contribuye a la respuesta inflamatoria y al daño tisular adyacente. En contraparte, la apoptosis es una forma de muerte celular que ocurre habitualmente bajo condiciones fisiológicas, en la cual la célula participa de manera activa en su “propia muerte” (suicidio celular). La apoptosis juega un papel relevante en el recambio celular y homeostasis tisular. Algunas de los eventos que se presentan durante el proceso apoptótico incluyen: agregación cromatínica, condensación citoplasmática y nuclear, fragmentación celular y formación de los cuerpos apoptóticos, que son estructuras vesiculares que contienen organelos celulares morfológicamente intactos y material nuclear. Los cuerpos apoptóticos son rápidamente eliminados por macrófagos. Debido a este eficiente mecanismo de fagocitosis y eliminación del material celular, la respuesta inflamatoria en la apoptosis es regularmente imperceptible. El marcador clásico de la apoptosis es la fragmentación irreversible del DNA, que precede a los cambios en la permeabilidad celular. La fragmentación del DNA resulta de la activación de endonucleasas dependientes de Ca^{2+}/Mg^{2+} , las cuales cortan de manera específica el DNA nucleosomal generando fragmentos múltiples de 180 pares de bases, que forman el patrón clásico en “escalera” evaluado a través de electroforesis en geles de agarosa.^{6,7}

Pocos órganos del cuerpo humano proporcionan de manera espontánea los elementos necesarios para estudiar la apoptosis como lo es el ovario; esto es debido a que la gónada femenina muestra un proceso de remodelamiento cíclico previsible a lo largo de la vida reproductiva, y posee gran heterogeneidad en su composición celular.⁸

Una serie de evidencias científicas apoyan las bases teóricas que señalan que la apoptosis participa de manera específica en la ovogénesis y foliculogénesis.^{9,10} Sin embargo, estas evidencias en su mayoría provienen de estudios realizados en animales, o de diseños efectuados *in vitro*, lo que limita extrapolarlas a lo que ocurre en la fisiología ovárica humana. Desde este contexto, ha sido sumamente difícil el estudio de la apoptosis en el ovario humano bajo condiciones fisiológicas; esto es debido fundamentalmente a limitaciones científicas que incluyen aspectos éticos, restricción en la obtención de tejidos y la manipulación experimental en sujetos sanos.

Teniendo en mente que la apoptosis participa de manera trascendental en la regulación del funcionamiento ovárico a lo largo de la vida y que teóricamente el desequilibrio en la apoptosis en el ovario altera potencialmente el crecimiento y desarrollo folicular, en este estudio nuestra hipótesis de trabajo establece que el incremento de la apoptosis ovárica pudiera ser uno de los eventos fisiopatológicos que contribuyen a la disminución de la reserva ovárica.

Desde este contexto, en este trabajo caracterizamos un grupo de pacientes con baja reserva ovárica a través de la prueba de citrato de clomifeno, y determinamos la apoptosis ovárica e identificamos algunas moléculas que participan en la modulación de la proliferación/apoptosis en el ovario como son Bcl-2, PCNA, Ki-67, p53, BAX, FAS-L y caspasas - 3, -8 y -9.

Todo ello con el fin de contribuir al conocimiento del papel que desempeña la apoptosis en la fisiología ovárica, y en eventos que alteran potencialmente la fertilidad humana como lo es la disfunción ovárica sutil que caracteriza la baja reserva ovárica.

II.- Antecedentes Científicos:

Durante el desarrollo fetal humano, entre la cuarta y quinta semanas de gestación, las células germinales primordiales (CGP) migran del intestino primitivo hacia la pared gonadal. En esta etapa de la vida embrionaria, el primordio gonadal es similar en ambos sexos; y el desarrollo del ovario ocurrirá ante la ausencia del cromosoma Y. Al alcanzar el ovario, las CGP pierden su movilidad, tienden a ser más esféricas, pierden algunos organelos celulares y se diferencian a ovogonias, las cuales a través de mitosis se multiplican y al rodearse de una capa de células de la granulosa forman los folículos primordiales, dentro de los cuáles los ovocitos primarios permanecen en la primera profase meiótica hasta el reinicio de la meiosis, en la vida reproductiva. Las ovogonias que carecen de células somáticas mueren a través de apoptosis. Alrededor de la semana 20 de gestación, el número de ovogonias alcanza un máximo de 7 millones, el cual declina paulatinamente hasta el momento del nacimiento, donde se calcula que la población de folículos primordiales es de alrededor de 500,000 para cada ovario, de los cuales sólo una mínima proporción de estos completará el proceso de crecimiento y desarrollo folicular.¹¹⁻¹⁴

La foliculogénesis comprende cuatro fases: A) Reclutamiento, que se inicia en la fase lutea tardía, en donde una cohorte de folículos primordiales adquiere la capacidad de crecimiento y diferenciación celular, y depende de la modulación apocrina y autocrina, ya que esta fase es independiente de la regulación ejercida por la hormona folículo estimulante (FSH). B) Selección, la cual es dependiente de la estimulación gonadotrófica hipofisaria, en donde uno de los folículos reclutados probablemente al azar, adquiere una circulación perifolicular más eficiente, donde las células tecales captan mayor cantidad de LH circulante y en forma preferencial las células de la granulosa captan cantidades decrecientes de FSH, que va disminuyendo a medida que las concentraciones de estradiol e inhibina que producen los folículos reclutados, especialmente el seleccionado, aumentan. De la misma manera el folículo seleccionado incrementa su tamaño de manera exponencial y la diferenciación de las células

tecales se acompaña por la producción paulatina de esteroides ováricos. C) Dominancia, en la cual el folículo seleccionado, al captar mayor cantidad de FSH circulante que el resto, produce entonces la mayor cantidad de estradiol al final de la fase folicular, ya que el resto de los folículos quedan desprovistos de la cantidad suficiente de FSH para continuar aromatizando andrógenos y sufren atresia debido a su propio ambiente androgénico. El folículo dominante desencadena una ordenada secuencia de eventos en los que de manera sinérgica la FSH y estradiol promueven la proliferación de las células tecales y la granulosa, así como el aumento del líquido folicular en el antro y la promoción de receptores para LH. D) Ovulación, a medida que la parte media del ciclo se acerca, el incremento rápido de estradiol desencadena una secreción aguda de LH y en menor proporción de FSH, estos picos hormonales y particularmente el de LH parecen disparar la ovulación a través de la biosíntesis de prostaglandinas, proteoglicanos y enzimas proteolíticas. Finalmente se restablece la meiosis y la ruptura posterior del folículo da como resultado la expulsión del complejo ovocito-cumulus, terminando así la fase folicular del ciclo. Después de la ruptura folicular, los capilares y fibroblastos que circundan el folículo proliferan y penetran la lámina basal, las células de la granulosa se luteinizan y se convierten en la mayor fuente de progesterona durante la fase postovulatoria del ciclo menstrual. La vida media funcional del cuerpo luteo es de 14 días, el cual ante la ausencia de fertilización, estará inmerso en el proceso de lúteolisis. Gran parte de los folículos ováricos sufre atresia en alguna fase de su desarrollo.¹⁵

Durante la embriogénesis el ovario humano adquiere su capacidad funcional, la cual está representada por una cantidad finita de folículos primordiales inmersos en una red interactiva de elementos celulares somáticos.¹⁶

Por otro lado, el marcador del envejecimiento ovárico en la mujer es la menopausia que se considera como el resultado del agotamiento de los folículos ováricos y se manifiesta clínicamente como un estado de hipogonadismo hipergonadotrófico, cuya máxima expresión es la falla reproductiva.¹⁷ Sin

embargo, la menopausia solo es un marcador de una secuencia de eventos que se inician en la embriogénesis, continúan durante la etapa reproductiva y forman parte del proceso de envejecimiento celular.¹⁸

En el proceso de muerte celular participan la necrosis y/o la apoptosis. En la necrosis la membrana citoplasmática y mitocondrial sufren cambios morfo-funcionales, se altera la síntesis proteica, coexisten agregación y digestión cromatínica; eventos que en su conjunto culminan con la muerte celular.¹⁹ En contraparte, la apoptosis o muerte celular “programada” generalmente se presenta en grupos celulares aislados, a menudo es ajena a la respuesta inflamatoria y está regulada por factores sistémicos y locales. De esta manera, la apoptosis es vista como una forma de muerte celular fisiológica cuyo resultado final es la renovación tisular.²⁰ La apoptosis es un proceso que participa en la regulación de algunos eventos que suceden en la embriogénesis, diferenciación inmunológica y en el crecimiento tumoral.²¹ Algunas características morfológicas de las células apoptóticas incluyen: condensación nuclear y citoplasmática, agregación cromatínica, y la formación de cuerpos apoptóticos, los cuales están formados por vesículas que contienen organelos celulares intactos y material nuclear. Se ha considerado que un indicador bioquímico característico de la apoptosis es la fragmentación del DNA, la cual se presenta como un evento irreversible que sucede previamente a los cambios morfológicos citoplasmáticos y membranales, y que se manifiesta por la formación de fragmentos oligonucleosomales de DNA, los cuales son múltiples de 180-200 pares de bases. Estos fragmentos forman un patrón electroforético clásico en “escalera”, que resulta de la activación de endonucleasas y del corte específico del DNA, en contraste con la fragmentación del DNA que en la necrosis ocurre al azar.²²

Durante el desarrollo, la apoptosis es un evento programado genéticamente tal y como ha sido descrito en los estudios llevados a cabo en el nematodo *Caenorhabditis elegans*, en el que se ha encontrado que el desarrollo es un evento preciso; donde la activación génica específica determina la muerte de 131

células y la sobrevivencia de 959 células, las cuales conformarán al nematodo adulto.²³ En el desarrollo de *C. elegans* se han descrito cuatro fases; (a) inicio del proceso de muerte celular (b) muerte celular desencadenada a través de proteasas intracelulares, (c) digestión de células muertas por células especializadas, y (d) degradación lisosomal de las células muertas por las células fagocíticas.²⁴ Este proceso se encuentra regulado por tres genes; *ced-3* y *ced-4* que promueven la apoptosis y *cd-9* que la previene, a través del bloqueo de la activación de *cd-3* y *cd4*.²⁵ *CED-3* es una cistein-aspartil-proteasa, que a nivel celular regula algunas enzimas reparadoras de DNA, proteínas estructurales citoplasmáticas y endonucleasas responsables de cortar el DNA en las células apoptóticas.²⁶ *CED-4* interactúa directamente con *CED-3* en la fase inicial del proceso de muerte celular al unirse a *pro-CED-3* y así estimular la producción *CED-3-activo*. *CED-9*, es una proteína multifuncional localizada en la membrana mitocondrial externa y en la membrana intracitoplasmática, la cuál se une a *CED-4* bloqueando la activación de *pro-CED-3*, evitando así la apoptosis.²⁷

Los genes que regulan la apoptosis en *C. elegans* están conservados a lo largo de la escala zoológica.²⁸ Por lo que algunas moléculas reguladoras de la apoptosis en los mamíferos presentan similitudes morfológicas y funcionales con *CED-3*, *CED-4* y *CED-9*. Sin embargo el proceso apoptótico en el humano y otros mamíferos es más complejo, ya que la regulación de la apoptosis involucra otras señales celulares, particularmente en los estadios tempranos del evento.²⁹

En los mamíferos el proceso apoptótico se desarrolla a través de la vía del receptor de la muerte y la vía mitocondrial. Estas dos vías en condiciones fisiológicas funcionan de manera independiente y los estímulos que desencadenan cada una de estas vías son tejido-específicos. La vía del receptor de la muerte, se activa a través de la participación de algunas moléculas implicadas en el inicio de la apoptosis que han sido denominadas factores de muerte, entre los que se encuentran el TNF (Factor de Necrosis Tumoral), Fas-L (Fas-Ligando) y TRAF1 (factor inductor de apoptosis relacionado a TNF), así como los receptores de los factores de la muerte celular; Fas, TNFR1 (Receptor del Factor de

Necrosis Tumoral-1), DR3/Wsl-1 (Receptor de muerte 3/Wsl-1) y CAR1 (receptor del virus citopático del sarcoma leucocitario aviario). Cuando Fas se acopla a FasL, se estimula el inicio del proceso apoptótico a través de la interacción con los dominios de muerte (DD), los efectores de muerte celular y reclutamiento de múltiples moléculas de procaspasa-8 a través de la proteína DD relacionada a Fas, que induce la activación de caspasa-8, con lo cual se recluta y activa procaspasa-3 y finalmente se concluye la ejecución de la muerte celular. Esta vía apoptótica esta regulada por Flip (proteína inhibidora de FLICE) la cuál inhibe la cascada de caspasas, y por el factor inhibidor de la apoptosis.³⁰ Por otro lado, la vía mitocondrial de la apoptosis se activa en respuesta a estímulos que alteran potencialmente la funcionalidad de la membrana mitocondrial, lo cuál conlleva la expresión de proteínas pro-apoptóticas (principalmente Bax) y la liberación de citocromo *c* mitocondrial, así como del factor apoptótico activador de proteasas 1 (Apaf-1) hacia el citosol, que al interactuar con moléculas de procaspasa-8 forma un apoptosoma y se reclutan secundariamente moléculas de procaspasa-3 y con ello se estimula la cascada de caspasas y la ejecución de la apoptosis. Otros factores pro-apoptóticos como son Bid, Bad, Noxa y el modulador de la apoptosis regulado a través de p53, también participan en la inducción de la apoptosis a través de la vía mitocondrial e interactúan con otros reguladores que promueven la apoptosis como son Bax y Bak.^{31,32}

Las caspasas son cisteín-proteasas que al ser activadas reconocen sitios específicos de residuos de ácido aspártico. Las caspasas contienen un sitio activo formado por un penta- péptido (QACXG), donde los aminoácidos Cys-285 e His-237 participan en la catálisis enzimática. Asimismo, las caspasas conservan alguna homología con *CED-3* e ICE, son tejido-específicas y sus isoformas regulan la actividad de otras, operando como inhibidores o formando complejos heteroméricos. La expresión y activación de algunas caspasas entre las que se encuentran la caspasas -3 -8 y -9, es determinante para la ejecución de la muerte celular durante el proceso apoptótico.³³

La apoptosis es un proceso activo que es regulado de manera concertada por estímulos externos y moduladores intracelulares. Algunos de los genes que participan en la regulación de la apoptosis pertenecen a la familia Bcl-2; entre los que se encuentran los moduladores anti-apoptóticos Bcl-2 y Bcl-x-long, así como los reguladores pro-apoptóticos Bax y Bad. Las proteínas Bcl-2 anti-apoptóticas, inhiben la cascada de caspasas al unirse directamente a Apaf-1 (factor apoptótico-1 activador de proteasas), y con ello disminuyen la liberación de citocromo c mitocondrial. Bcl-2 se localiza en la membrana mitocondrial externa, retículo endoplásmico y en el núcleo; esta molécula al ser liberada forma homo y/o heterodímeros, forma canales y poros iónicos en las membranas de organelos celulares. También, Bcl-2 ejerce actividades antioxidantes en las vías metabólicas, con lo cual contribuye a la neutralización de la formación de radicales libres. De la misma manera, Bcl-2 modula el flujo intracelular de calcio y la actividad de nucleasas dependientes de calcio. Las proteínas Bcl-2 pro-apoptóticas, actúan a través de la modificación de los canales iónicos y con ello el potencial de membrana, lo que puede conducir finalmente a la activación de la cascada de caspasas. Otras proteínas que participan en la apoptosis son Bcl-x-long y Bcl-x-short; un exceso de bcl-x-short induce la muerte celular a través de un mecanismo que no depende de bcl-2. Los genes involucrados en la regulación proliferación-muerte celular a menudo interactúan; bcl-2 protege de la apoptosis inducida por c-myc. La proteína oncogénica Ras, ostenta un mecanismo regulatorio de la expresión de bcl-2. El supresor tumoral p53 regula la activación de la muerte celular a través de Bax; la expresión de p53 a la vez puede ser bloqueada por bcl-2, y de manera contraria p53 puede ser capaz de inhibir la transcripción de bcl-2. Así mismo, p53 funciona como un regulador negativo del crecimiento celular, la pérdida de la funcionalidad de p53 acarrea un aumento en la proliferación.³⁴⁻³⁵

El equilibrio entre la proliferación y la muerte celular es determinante en la homeostasis tisular; y la apoptosis es un proceso fisiológico de pérdida celular. En el ovario humano, la apoptosis es uno de los principales mecanismos que regula el crecimiento y desarrollo folicular. Entre los factores que regulan la apoptosis en el ovario se encuentran algunas hormonas y citocinas. Algunos de los factores anti-

apoptóticos en el ovario son; la FSH, la hormona luteinizante (LH), el factor de crecimiento epidérmico (EGF), el factor de crecimiento parecido a la insulina (IGF-I) y la interleucina 1 β (IL-1 β). Y de manera contraria se ha descrito que en el ovario la apoptosis puede ser promovida por análogos de hormona liberadora de gonadotropinas (aGnRH) y andrógenos.³⁶⁻³⁸

Evidencias obtenidas de estudios *in vitro* han señalado la existencia de algunos factores autocrinos que participan en la regulación de la apoptosis en el ovario. En primates la administración endovenosa de activina en la fase folicular temprana genera la pérdida del folículo dominante.³⁹ De la misma manera, se ha encontrado que en cultivo de células lúteas, la activina disminuye el número de células esteroideogénicas.⁴⁰ Sin embargo, las hormonas y citocinas involucradas en la apoptosis folicular, también participan en la modulación de otros eventos, como son el crecimiento y diferenciación celular.⁴¹

Otros reguladores intracelulares de la apoptosis que pertenecen a la familia Bcl-2 también juegan un papel importante en el equilibrio proliferación/muerte del folículo ovárico.⁴² Se ha descrito que la supresión de la expresión de bcl-2 en ratones knock out, disminuye el número de ovocitos e incrementa la presencia de folículos primordiales con alteraciones morfológicas.⁴³ La inyección de bcl-2 en gametos de *Xenopus* retarda la aparición de la apoptosis.⁴⁴ La expresión de bax y bcl-2 es regulada por p53; se ha descrito la presencia de p53 en células de la granulosa en la rata, y que la expresión de este supresor tumoral puede ser modificada a través de la manipulación con gonadotropinas en condiciones *in vitro*.⁴⁵ El ovario es uno de los sitios de expresión de WT-1 (gene supresor del tumor de Wilms);⁴⁶ observándose en las células de la granulosa que WT-1 actúa amplificando las acciones de p53.⁴⁷ Además WT-1 es capaz de reprimir la transcripción de algunos genes que codifican para factores y receptores del crecimiento.⁴⁸

Por otra parte, se ha demostrado que algunas moléculas que participan en el inicio del proceso apoptótico como son el TNF y Fas-L, se encuentran también involucradas en la regulación del crecimiento y diferenciación folicular. Las células de la granulosa y los ovocitos de los folículos

atrésicos expresan Fas; y en células luteinizadas de la granulosa humana se ha encontrado que Fas inducido por interferón gamma (IFN- γ) es capaz de iniciar la apoptosis.⁴⁹ Así mismo, la actividad sinérgica ejercida por IFN- γ y TNF- α promueve la muerte en células luteinizadas,⁵⁰ a través de un aumento en la síntesis en la producción de prostaglandinas F_{2 α} ⁵¹ o por medio de un incremento en la liberación de óxido nítrico.⁵²

El envejecimiento reproductivo en la mujer se asocia estrechamente con la disminución genéticamente programada del funcionamiento ovárico. La capacidad para concebir en ausencia de alteraciones patológicas, se conoce como potencial reproductivo; este potencial declina sensiblemente con la edad, lo que contribuye de manera importante en la prevalencia de infertilidad. La disminución del potencial reproductivo se correlaciona temporalmente con la disminución del número de folículos primordiales, así como con alteraciones en la calidad de los ovocitos, eventos que en su conjunto traducen disminución o baja reserva ovárica.^{53,54}

La fertilidad sufre un decremento a partir de los 30 años, una disminución acelerada a partir de los 35 años y una caída dramática después de los 40 años; que concluye con el marcador final de envejecimiento reproductivo en la mujer, la menopausia.⁵⁵

El número total de folículos ováricos disminuye de manera progresiva, desde la ovogénesis hasta la menopausia. La reserva ovárica parece estar regulada por un programa predeterminado y ejecutado a lo largo de la vida reproductiva.⁵⁶ En donde la disminución de los folículos ováricos en la etapa postpuberal esta sujeta a un mecanismo de muerte celular representado por la atresia folicular.⁵⁷

Algunas evidencias de estudios *in vitro*;⁵⁸ de trabajos donde se analizan ovocitos obtenidos de mujeres sometidas a procedimientos de fertilización *in vitro*;⁵⁹ observaciones de pacientes con alteraciones de la reserva ovárica manejadas con esquemas de hiperestimulación ovárica controlada;⁶⁰ así como resultados de estudios efectuados en animales;^{61,62} han apoyado el marco conceptual teórico que señala que en el equilibrio de la proliferación-muerte celular del folículo ovárico, la apoptosis juega un papel

preponderante. Sin embargo, estos hallazgos no pueden ser generalizados, ya que la manipulación farmacológica ovárica por si misma representa una variable de confusión en la génesis de la apoptosis, y de la misma manera las evidencias *in vitro*, así como las obtenidas en animales de experimentación, no pueden ser transpoladas confiablemente a lo que sucede en la fisiología en el ovario humano.

Desde este contexto, y con la meta de contribuir al conocimiento del papel que desempeña la apoptosis en el ovario humano y tomando como modelo natural de estudio un grupo de mujeres con baja reserva ovárica y paridad satisfecha; en el presente trabajo se determinó la apoptosis ovárica e identificamos algunas moléculas que participan en la regulación de la proliferación- apoptosis, y comparamos los hallazgos con los obtenidos en pacientes con adecuada reserva ovárica.

III. Planteamiento del Problema:

Al nacimiento el ovario humano contiene alrededor de 500,000 folículos primordiales, los cuales constituyen la reserva ovárica. De manera inversamente proporcional, el número de folículos primordiales declina al aumentar la edad cronológica en la mujer, encontrándose una disminución folicular significativa al momento de la menopausia. La pérdida folicular que ocurre a lo largo de la vida reproductiva está genéticamente determinada y es resultado del equilibrio entre la proliferación y muerte celular ejecutado a través del proceso de atresia folicular.

La disminución de la reserva folicular altera el potencial reproductivo y clínicamente se manifiesta por disminución de las tasas de fecundidad y aumento de la prevalencia de infertilidad. Sin embargo, la disminución de reserva ovárica es altamente variable, ya que algunas mujeres son incapaces de concebir en etapas tempranas de la vida reproductiva, mientras otras mujeres logran embarazos imprevistos al final de la década de los cuarentas. Además, estos grupos de mujeres son indistinguibles a través de parámetros usuales de diagnóstico, ya que la mayoría de ellas presentan ciclos menstruales regulares, sin evidencias ostensibles de disfunción en algún componente del eje reproductivo neuroendocrino.

En estudios efectuados en poblaciones de mujeres infértiles, se ha encontrado que alrededor del 10% presentan disminución de la reserva ovárica, y que las tasas de embarazo en estas mujeres son marcadamente bajas al contrastarlas con las observadas en pacientes con adecuada reserva ovárica.

La fisiopatogenia de la disminución de la reserva ovárica no ha sido aclarada, sin embargo existen evidencias que señalan que la disminución del número y la calidad de los ovocitos conducen a disminución de la reserva ovárica, y que los folículos ováricos pueden mostrar alteraciones morfológicas y funcionales. Otras observaciones obtenidas de estudios *in vitro* y de trabajos donde analizan ovocitos de mujeres sujetas a programas de fertilización asistida, han señalado que la disminución de la reserva ovárica se asocia a un incremento de la apoptosis folicular. Sin embargo,

estas observaciones no pueden ser transpoladas a lo que sucede *in vivo* en el ovario humano, ya que la manipulación farmacológica de la ovulación por si misma representa una variable de confusión en la inducción de apoptosis.

Desde este punto de vista, el determinar la apoptosis ovárica e identificar algunas moléculas que participan en la regulación de la proliferación- apoptosis en el ovario de pacientes con baja reserva ovárica contribuirá al conocimiento de algunas alteraciones fisiopatológicas que suceden en estas pacientes, y posteriormente diseñar protocolos de investigación que evalúen marcadores diagnósticos y/o tratamientos potenciales que puedan mejorar el futuro reproductivo de estas mujeres, previniendo la aparición de la falla ovárica y sus consecuencias biopsicosociales.

IV. Hipótesis

Hipótesis Verdadera

La apoptosis ovárica en pacientes con baja reserva ovárica es comparativamente mayor a la encontrada en pacientes con adecuada reserva ovárica.

Hipótesis Nula

En pacientes con baja reserva ovárica la presencia ovárica de PCNA, Ki-67, Bcl-2, Bax, p53, Fas-L y caspasas-3-8-9, no es comparativamente diferente a la encontrada en pacientes con adecuada reserva ovárica.

V.- Objetivos.

General

Determinar la apoptosis ovárica e identificar algunas moléculas que participan en la regulación de la proliferación y/o muerte celular en el ovario de pacientes con baja reserva ovárica y comparar los hallazgos con los encontrados en pacientes con adecuada reserva ovárica.

Específicos

Determinar la apoptosis en ovarios de pacientes con baja reserva ovárica y de pacientes con adecuada reserva ovárica a través del método del TUNEL

Identificar la presencia de PCNA, Ki-67, BCL-2, Bax, p53, Fas-L y caspasas-3, -8 y -9 en ovarios de pacientes con baja reserva ovárica y de pacientes con adecuada reserva ovárica a través de inmunohistoquímica.

VI.- Material y Métodos:

Diseño

Se efectuó un estudio clínico transversal comparativo. El universo de estudio consistió de la población de pacientes atendidas en el servicio de Ginecología de la Unidad Médica de Alta Especialidad, Hospital de Ginecología y Obstetricia # 3, Centro Médico “La Raza” del Instituto Mexicano del Seguro Social, en la Ciudad de México durante el período de estudio. Fueron incluidas aquellas pacientes que llenaron los criterios de selección y que aceptaron voluntariamente participar a través de la firma del consentimiento informado (Anexo 1). El protocolo de investigación fue aprobado por el Comité Local de Ética e Investigación del Hospital de Ginecología y Obstetricia # 3. (Numero de registro A18/97)

Fueron incluidas en este estudio pacientes menores de 39 años de edad, en las cuales se realizó histerectomía y ooforectomía unilateral debido a patología uterina benigna. En todas las pacientes estudiadas, previamente al evento quirúrgico se determinó la reserva ovárica a través de la prueba de citrato de clomifeno. A través de venopunción, se tomaron muestras de sangre periférica para la determinación de FSH, LH, estradiol, testosterona y prolactina (PRL) en un día 3 del ciclo menstrual, y en el día 10 del ciclo menstrual, posterior a la administración de 100mg citrato de clomifeno (del día 5° al 9° del ciclo menstrual), nuevamente se tomaron muestras de sangre periférica para la determinación de FSH y estradiol. De acuerdo a los niveles basales de FSH (día 3 del ciclo) y a los obtenidos con la administración de citrato de clomifeno⁶³ (día 10 del ciclo) se formaron dos grupos de estudio:

A).- Pacientes con baja reserva ovárica (BRO) que presentaron FSH basal ≥ 10 mIU/ml y/o FSH ≥ 12 mIU/ml en el día 10 del ciclo (posterior a la administración de citrato de clomifeno).

B).- Grupo control, representado por aquellas pacientes con niveles basales de FSH < 10 mIU/ml o FSH < 12 mIU/ml en el día 10 del ciclo.

Fueron excluidas del estudio pacientes con patología ovárica tumoral, endocrinopatías, enfermedades sistémicas descompensadas o manipulación hormonal farmacológica en los últimos tres meses previos al estudio.

Ovarios.

Los ovarios obtenidos inmediatamente a la histerectomía fueron fijados en etanol al 70% y almacenados a -70° C. Posteriormente, el tejido ovárico fue procesado e incluido en bloques de parafina. Se efectuaron cortes de 5 μ m y las secciones fueron montadas en portaobjetos y teñidas con hematoxilina y eosina. Dos patólogos efectuaron el análisis histológico. Los folículos ováricos fueron clasificados como primordiales, primarios, secundarios o antrales. Los folículos primordiales consistieron del ovocito rodeado de una sola aplanada capa de células de la granulosa descansando en una delgada lámina basal. Los folículos primarios consistieron del ovocito rodeado de una capa columnar de células de la granulosa. Los folículos secundarios consistieron del ovocito rodeado de 3 a 5 capas cuboidales concéntricas de células de la granulosa y varias capas de células de la teca interna y externa. Los folículos antrales consistieron del ovocito rodeado de la cavidad antral, múltiples capas de células de la granulosa y varias capas bien diferenciadas de células de la teca interna y externa.^{64, 65}

Determinaciones Hormonales.

Las concentraciones sanguíneas de FSH, LH, estradiol, testosterona y PRL fueron determinadas a través de quimioinmoluminiscencia usando estuches comerciales (Immunolite Kit. Diagnostic Products Corporation, Los Angeles, CA). Los coeficientes de variación inter e intra ensayo fueron de 7.9% y 7.7% para FSH; 10% y 6.5% para LH; 6.4% y 5.7% para PRL; 8% y 7.5% para testosterona y para estradiol de 6.4% y 6.3% respectivamente.

Apoptosis.

La fragmentación del DNA que ocurre en la apoptosis, fue determinada a través del procedimiento del TUNEL (terminal deoxynucleotidyl transferase biotin-dUTP nick end labeling). Para ello, se utilizó el estuche comercial ApopTag-Peroxidasa (Chemicon Internacional. USA).

Para cada ovario incluido en parafina (BRO y control) se efectuaron 3 cortes de 5µm y las secciones fueron montadas en portaobjetos (Super frost/plus glass slides. Richard-Allan Scientific. USA) e incubadas a 60⁰ C durante 1 hr. Posteriormente, las laminillas fueron desparafinizadas en 3 cambios de xileno (5 minutos cada uno) y rehidratadas a través de alcoholes graduales (absoluto, 95% y 70%) e inmersas en Tris-buffer.

Se agregó proteinasa K (20µg/ml diluida en agua destilada y desionizada) en cada una de las laminillas y estas fueron incubadas a temperatura ambiente durante 15 min. La actividad de la peroxidasa endógena fue bloqueada utilizando una solución acuosa de peroxidasa de hidrógeno al 3% durante 5 min. Inmediatamente, se agregó buffer de equilibrio a cada una de las laminillas y fueron incubadas a temperatura ambiente durante 30 minutos. Posteriormente, las laminillas fueron incubadas con la enzima (TdT, diluida con el buffer mezcla de reacción) durante una hora a 37⁰ C en atmósfera humidificada cubriendo el tejido con parafilm. Inmediatamente, se detuvo la reacción agregando “stop buffer” e incubó a temperatura ambiente durante 10 minutos. Inmediatamente, se agregó el conjugado antidigoxina en cada una de las laminilla y se incubó durante 30 minutos a temperatura ambiente. El cromóforo 3, 3'-diaminobenzidina fue utilizado para visualizar los fragmentos de 3'-OH-DNA marcados. Las laminillas fueron lavadas en agua desionizada y contrateñidas con hematoxilina; posteriormente fueron deshidratadas utilizando alcoholes graduales (70%, 95% y absoluto), 3 cambios de xileno (5 minutos en cada uno) y montadas a los cubreobjetos utilizando resina adherente.

Para los controles negativos se utilizó un corte ovárico adicional en cada paciente, efectuando todo el proceso descrito anteriormente, con excepción de la incubación con la enzima (TdT) la cual fue reemplazada por agua desionizada.

Los controles positivos consistieron de cortes de tejido tumoral de ovario, mama o colon (Tissue Procurement UAB, Birmingham, Al).

Inmunohistoquímica.

El procedimiento de IHQ fue realizado de acuerdo a los lineamientos técnicos estandarizados en el Departamento de Patología de la Universidad de Alabama en Birmingham, USA.⁶⁶⁻⁶⁸ Para cada uno de los ovarios incluidos en parafina (casos y controles) se efectuaron 3 secciones de 5µm y fueron montados en portaobjetos (Super frost/plus glass slides, Richard-Allan Scientific, USA). Cada sección fue cortada 24 horas antes de efectuarse el procedimiento de Inmunohistoquímica. Cada laminilla fue incubada a 60⁰ C durante una hora. Posteriormente, las laminillas fueron desparafinizadas en 3 cambios de xileno (5 minutos cada uno) e hidratadas en alcoholes graduales (absoluto, 95% y 70%) y puestas en Tris-Buffer (TBS; 0.05 mol/L Tris base, 0.15 mol/L NaCl, Triton X-100 4 gotas/L, pH 7.6), previamente al procedimiento de recuperación de antígenos.

Para la determinación de p53, Bax, Bcl-2, Ki-67 y caspasas -3, -8 y -9 las laminillas se colocaron en una caja de plástico compatible con el horno de microondas y llenada con solución 0.01 M ácido cítrico (solución recuperadora de antígenos; 0.01 M ácido cítrico, 1 N NaOH, pH 6.0). Las cajas de plástico se colocaron en el centro de un recipiente que contenía agua precalentada (90⁰C) para asegurar la consistencia del calentamiento y exposición en el horno de microondas (R-3A75, 850 W; Sharp Electronics, Mahwah NJ, USA) por 5 minutos en alto poder. El nivel de la solución recuperadora de antígenos fue checado y el buffer evaporado fue remplazado. Cada laminilla fue expuesta a un ciclo de calentamiento de 5 minutos. Las laminillas fueron enfriadas paulatinamente e inmersas en Tris-buffer.

Para la determinación de la expresión ovárica de PCNA y Fas-L, no fue necesario utilizar ningún procedimiento de recuperación de antígenos.

La actividad de la peroxidasa endógena tisular, fue bloqueada incubando cada una de las laminillas en una solución de peróxido de hidrógeno al 3% durante 5 minutos, seguido de tres lavados (3 minutos

cada uno) con Tris-buffer. Los tejidos fueron incubados con suero de cabra al 1% durante una hora a temperatura ambiente en una atmósfera humidificada con el fin de reducir la unión inespecífica. Posteriormente, cada sección fue incubada con el anticuerpo específico diluido en buffer de fosfatos salino (pH 7.6, 1% albúmina sérica bovina, 1nmol/L ácido tetracético ethilenediamina y NaN_3 1.5 nmol/L) durante una hora a temperatura ambiente en cámara humidificada.

Los anticuerpos monoclonales utilizados fueron: PCNA, clona PC10, concentración 0.05µg/ml (Santa Cruz Biotechnology, Santa Cruz, CA); Ki-67, clona MIB-1, dilución 1:20 (Biogenex, San Ramon, CA); p53, clona 1801, dilución 1:60 (Biogenex Research Products, San Ramon CA); Bax, clona B-9, dilución 1:60 (Santa Cruz Biotechnology, Santa Cruz, CA.); Bcl-2, clona 124, dilución 1:60 (Roche Molecular Biochemicals. Mannheim Germany); y caspasa-3, Clona 3CSP03, dilución 1:200 (NeoMarkers, Inc. Lab., Vision Corporation, Fremont CA). Y los anticuerpos policlonales utilizados fueron: Fas-L, clona N-20, dilución 1:400 (Santa Cruz Biotechnology, Santa Cruz, CA.) y caspasas-8 y -9, clonas Ab-4 y LAP6 respectivamente, con una dilución de 1:200 (NeoMarkers, Inc. Lab., Vision Corporation, Fremont CA). Los anticuerpos primarios fueron detectados utilizando un sistema de detección multiespecies (Signet laboratories, Inc. Dedham, MA). Después de lavar 3 veces con Tris-buffer (5 minutos cada lavado), las laminillas fueron incubadas con un anticuerpo secundario (antiratón/anticonejo) durante 10 minutos a temperatura ambiente y se efectuaron 3 lavados con Tris buffer. Entonces, en cada laminilla se agregó estreptavidina-peroxidasa marcada e incubó durante 10 minutos a temperatura ambiente e inmediatamente se lavó 3 veces con Tris-buffer. Para visualizar el complejo antígeno-anticuerpo se agregó el substrato super sensitivo 3, 3'-diaminobenzidina (Biogenex, San Ramon, CA). Posteriormente, las laminillas fueron lavadas dos veces con agua desionizada y contrateñidas durante un minuto con hematoxilina y posteriormente fueron lavadas gentilmente con agua de la llave. Después, fueron deshidratadas a través de alcoholes graduales (70%, 95% y absoluto) y en 3 cambios de xileno (5 minutos en cada baño) y montadas a los cubreobjetos utilizando permount. Para los controles negativos, se utilizó un corte adicional de tejido ovárico (casos y controles), reemplazando el anticuerpo primario, por suero de cabra al 1%.

Los controles positivos consistieron de tejido tumoral de ovario, mama, y colon y tejido normal de bazo y amígdala. (Tissue Procurement UAB. Birmingham. Al)

Evaluaciones y Análisis Estadístico

Todas las laminillas fueron evaluadas por dos observadores que no conocían el diagnóstico clínico, determinándose el porcentaje de tinción positiva en cada uno de los siguientes componentes celulares del ovario: epitelio de superficie del ovario, estroma ovárico, folículos primordiales, folículos primarios, folículos secundarios, folículos antrales, cuerpos luteos, cuerpos blancos, vasos ováricos y quistes de inclusión.

Para la evaluación de presencia de PCNA, p53, Ki-67 y la fragmentación de DNA se determinó el porcentaje de tinción positiva nuclear. En relación a la identificación de Bax, Bcl-2 y Fas-L, esta fue evaluada a través de la determinación de la tinción positiva observada en el citoplasma. Finalmente, la presencia de caspasa-3, -8 y -9 fue evaluada a través de la determinación del porcentaje de tinción positiva en el núcleo y/o citoplasma.

La intensidad de la inmunolocalización de los diferentes marcadores determinados a través de IHQ, fue evaluada a través de un método semicuantitativo en el cuál la intensidad de la positividad se valora en una escala de +, ++, +++ y ++++. ⁶⁹

La descripción simple de los datos se realizó a través de medidas de tendencia central y dispersión. Para el análisis inferencial de la fragmentación del DNA y de la identificación de los diferentes biomarcadores estudiados entre los dos grupos estudiados, se utilizó la prueba U de Mann-Whitney (datos no distribuidos normalmente) y para las variables paramétricas se utilizó la prueba t de Student, estableciéndose un nivel alfa de ≤ 0.05 . El análisis estadístico se efectuó utilizando el programa computacional SPSS (SPSS 11.5. Inc., Chicago, IL).

VII.- Resultados.

Se estudiaron un total de 15 pacientes que llenaron los criterios de inclusión cuyo promedio de edad fue 32 ± 4 años, las cuales fueron sometidas a histerectomía y ooforectomía unilateral debido a patología uterina benigna; ocho de ellas con el diagnóstico de miomatosis uterina y siete con patología cervical no tumoral. En ninguno de los ovarios obtenidos se encontró patología neoplásica agregada.

De acuerdo a los criterios hormonales de clasificación establecidos (determinación de la reserva ovárica a través de la prueba de citrato de clomifeno), se formaron dos grupos de estudio: pacientes con baja reserva ovárica (BRO, n = 8) y pacientes con adecuada reserva ovárica (C, n = 7). El promedio de edad entre los dos grupos no demostró diferencias significativas (33 ± 3 vs 30 ± 4 años). Las concentraciones basales séricas de estradiol en los dos grupos fueron comparativamente normales (42 ± 10 pg/ml VS 53 ± 11 pg/mL). Acorde a la definición operativa, las concentraciones séricas de FSH al día 10 del ciclo (posterior a la administración de citrato de clomifeno), en las pacientes con BRO fueron significativamente mayores al grupo control (23 ± 6 IU/L vs 7 ± 4 IU/L $p < 0.01$).

A través de los criterios previamente mencionados, se determinaron el número de folículos en tres diferentes cortes de tejido ovárico en cada una de las pacientes estudiadas, encontramos que el numero de folículos ováricos (promedio \pm desviación estándar) fue como sigue: folículos primordiales (BRO = 8 ± 1.4 vs. control = 7 ± 1.8); folículos primarios (BRO = 8 ± 0.75 vs. control = 7 ± 0.48); folículos secundarios (BRO = 5 ± 0.88 vs. control = 4 ± 0.75) y folículos antrales (BRO = 2 ± 0.5 vs. control = 3 ± 0.78). No se encontraron diferencias estadísticamente significativas en las cuentas foliculares entre ambos grupos estudiados. En las Figuras 1-3 se muestran algunos de los folículos ováricos.

La fragmentación del DNA determinada a través del procedimiento del TUNEL fue observada en los folículos primarios, secundarios, antrales, cuerpos luteos, epitelio de superficie, estroma, vasos ováricos y quistes de inclusión. Sin embargo la comparación estadística no reveló diferencias significativas entre ambos grupos estudiados.

La inmunodetección de p53, fue positiva en los folículos primordiales, secundarios, antrales, cuerpos luteos, epitelio ovárico, estroma y vasos ováricos en las pacientes con BRO, sin embargo no se encontraron diferencias estadísticamente significativas. Es de interés señalar que identificamos la presencia de p53 en las células que rodean el cuerpo lúteo. La inmunodetección de Bax, fue positiva en los folículos, cuerpos luteos, epitelio ovárico, vasos y quistes de inclusión. La comparación estadística reveló mayor inmunolocalización de Bax en los vasos ováricos en el grupo control (BRO = 32 ± 13 vs C = -73 ± 7 , $p = 0.03$).

Los resultados de la determinación de la fragmentación del DNA y de la identificación de p53 y Bax en ambos grupos estudiados se muestran en la Tabla I.

La inmunodetección de Fas fue positiva en los folículos, cuerpos luteos, epitelio ovárico, vasos y quistes de inclusión, pero no encontramos diferencias significativas entre los dos grupos estudiados. Las diferentes caspasas determinadas fueron positivas en los folículos, cuerpos luteos, epitelio ovárico, vasos y quistes de inclusión. Con respecto a caspasa-3 (BRO = 27 ± 7 vs C = 74 ± 10 , $p = 0.01$) y caspasa -8 (BRO = 3 ± 2 vs C = 31 ± 16 , $p = 0.05$) observamos valores significativamente altos en el estroma ovárico en el grupo control; y en el mismo grupo la identificación de caspasa-3 fue significativamente mayor en los vasos ováricos (BRO = 3 ± 2 vs C = 22 ± 4 , $p = 0.001$). Los resultados de la determinación de las caspasas -3, -8 y -9 en ambos grupos estudiados se muestra en la Tabla II.

En la figura 4, se muestra la presencia de p53, caspasas-8 y -9 y la fragmentación del DNA observada en algunos componentes celulares de los ovarios estudiados.

La inmunolocalización de Bcl-2 fue positiva en los folículos, cuerpos luteos, epitelio ovárico, vasos y quiste de inclusión del grupo control, sin embargo no se encontraron diferencias estadísticamente significativas. La determinación de PCNA fue positiva en todos los componentes celulares del ovario

del grupo control, sin encontrar diferencias significativas con respecto grupo de BRO. Finalmente, la inmunolocalización de Ki-67 fue positiva en los folículos primarios, secundarios, antrales, epitelio ovárico y estroma de ambos grupos estudiados, sin embargo, no se encontraron diferencias estadísticamente significativas.

Los resultados de la determinación de Bcl-2, Ki-67 y PCNA en ambos grupos estudiados se muestran en la Tabla III.

VIII.- Discusión

La foliculogénesis forma parte del proceso de remodelamiento ovárico, el cual está caracterizado por altas tasas de proliferación y atresia. Con el objetivo de estudiar el papel que desempeña la apoptosis en la fisiopatología de la baja reserva ovárica y con ello contribuir al conocimiento de la dinámica del recambio celular en el ovario humano, en el presente trabajo determinamos la apoptosis ovárica y identificamos algunas moléculas que participan en la modulación de la proliferación y/o muerte celular como son: PCNA, Ki-67, Bcl-2, Bax, Fas-L, p53, y caspasas-3, -8, y -9. La apoptosis e identificación de estos marcadores fueron determinadas en los ovarios de dos grupos de pacientes en edad reproductiva que fueron previamente caracterizadas, a través de la determinación de las concentraciones séricas basales de FSH y de la prueba dinámica de reserva ovárica con citrato de clomifeno. A la fecha, el presente estudio es el primero en evaluar la apoptosis y proliferación en el ovario en pacientes con baja reserva ovárica.

Los resultados presentados señalan que la fragmentación del DNA evaluada a través de procedimiento del TUNEL, se presenta en los folículos primarios, secundarios y antrales; así como en el estroma, epitelio de superficie y vasos ováricos en ambos grupos de pacientes estudiadas. La intensidad de la fragmentación apoptótica del DNA fue mayor en los folículos antrales, epitelio de superficie y vasos ováricos. De manera contraria a lo reportado por otros autores,⁷⁰ en ambos grupos estudiados encontramos que la fragmentación del DNA en los folículos primordiales fue negativa; esta discrepancia pudiera ser explicada parcialmente por el método de fijación tisular utilizado en nuestro estudio. De la misma manera, si bien el procedimiento del TUNEL ha sido ampliamente utilizado para identificar las células apoptóticas, es probable que este procedimiento subestime la verdadera extensión de proceso apoptótico, y se haga necesario utilizar otros métodos complementarios para la evaluación de la apoptosis, como podrían ser el análisis del DNA a través de citometría de flujo y la evaluación de la expresión génica de algunos moduladores de la apoptosis.^{71,72}

Se ha señalado que la apoptosis participa a lo largo de la foliculogénesis y que la apoptosis es mayor en los folículos maduros y que la apoptosis folicular se asocia con la edad de la mujer.^{73,74} En los folículos en desarrollo, la apoptosis está parcialmente modulada por señales endocrinas como es la FSH, la cual es considerada como un importante factor anti-apoptótico.⁷⁵ En el presente trabajo, el grupo de pacientes con baja reserva ovárica fue caracterizado por tener cifras elevadas de FSH sérica, sin embargo la fragmentación de DNA en los folículos y componentes ováricos en estas pacientes, no fue estadísticamente diferente al compararlas con la obtenida en las pacientes control. En los dos grupos estudiados encontramos una mayor intensidad en la fragmentación del DNA en el estroma y vasos ováricos, hallazgo que pudiera apoyar la importancia que guarda la compleja red de comunicación que existe entre el compartimiento somático y gametogénico en el ovario; los cuales en su conjunto determinan la foliculogénesis.⁷⁶

El gene supresor p53 (Tp53), se altera en alrededor del 50% de todos los tumores en el ser humano,⁷⁷ y se sobre-expresa en el 30% de adenocarcinomas en el ovario,⁷⁸ sin embargo, en condiciones fisiológicas la expresión de p53 en el ovario es mínima. En este estudio, para la identificación de p53 a través de inmunohistoquímica, utilizamos un procedimiento de recuperación de antígenos a través del cual se incrementa la sensibilidad de detección de p53 y en algunos casos se identifican altos niveles de la up-regulation de p53 y con ello algunas mutaciones. El uso de este procedimiento probablemente nos permitió identificar la presencia de p53 en folículos primordiales, secundarios, antrales y en el estroma ovárico en las pacientes con baja reserva ovárica, aunque no existieron diferencias significativas al comparar estas observaciones con el grupo control. Estos hallazgos apoyan el papel teórico que p53 desempeña en la modulación del ciclo celular;⁷⁹ y pudieran representar un cambio sutil de la expresión de p53 en la foliculogénesis en el grupo de pacientes con baja reserva ovárica.

Las caspasas pertenecen a la familia de cisteín-proteasas, cuyas acciones están ligadas al inicio y terminación del proceso apoptótico; y su activación da como resultado la ejecución de la muerte celular apoptótica. A través de la vía del receptor de la muerte, la interacción de Fas/Fas-L induce la activación

del complejo de muerte celular, el cual recluta moléculas de pro-caspasa-8; dando como resultado final la activación de las caspasas -3 y -8.⁸¹ Las caspasas juegan un papel trascendente en la apoptosis en el ovario de los vertebrados; y la participación de algunas caspasas en el ovario ha sido reportada en condiciones *in vitro*.⁸² En el presente estudio, la inmunolocalización de las caspasas-3, -8 y -9 fue positiva en los folículos primordiales, secundarios, antrales, cuerpos lúteos y en algunos componentes somáticos del ovario en ambos grupos estudiados. En el grupo de baja reserva ovárica, encontramos diferencias significativas en la identificación de caspasa-3 en el estroma y vasos ováricos; así como de caspasa-8 en el estroma ovárico, desafortunadamente, no contamos con argumentos teóricos para darle sentido biológico a estos hallazgos. De la misma manera, es importante señalar que los anticuerpos que utilizamos para la inmunodetección de las diferentes caspasas estudiadas, reconocen las caspasas totales, y no son específicos para detectar las caspasas activadas, las cuales son consideradas esenciales en la ejecución de la apoptosis.

Fas (APO-1, CD95) pertenece a la familia del factor de necrosis tumoral; cuando Fas se une a su receptor específico, esta activación puede inducir el inicio de la apoptosis celular. Fas puede ser activado a través de su trimerización por Fas-L (Fas-L, CD95L). La activación de Fas puede generar la activación proteolítica de algunas caspasas y con ello la ejecución del proceso apoptótico.⁸³ Con el objetivo de explorar de manera parcial la vía de la apoptosis regulada a través del receptor de la muerte, determinamos la expresión de Fas-L; encontrando que Fas-L se encuentra presente en todos los componentes celulares ováricos de ambos grupos de pacientes estudiadas.

Desde la misma perspectiva, exploramos también la proliferación celular ovárica en ambos grupos de estudio, a través de la determinación de dos marcadores de proliferación celular: Ki-67, que está presente durante todas las fases activas del ciclo celular (G₁, S, G₂ y M),⁸⁴ y PCNA (antígeno nuclear de proliferación celular) que en conjunción con otras moléculas modula la replicación y reparación del DNA, así como una amplia gama de eventos celulares.⁸⁵ Los resultados presentados, señalan que Ki-67 se encuentra presente en gran parte de los componentes celulares ováricos de ambos grupos

estudiados. Con lo que respecta a PCNA, este se encontró presente en los folículos en desarrollo y algunos componentes somáticos ováricos, de ambos grupos estudiados.

Durante el proceso apoptótico, un grupo creciente de moléculas perteneciente a la familia Bcl-2 desempeñan un papel clave. Bcl-2, es un factor anti-apoptótico, el cual promueve la supervivencia celular a través de la inhibición de algunos moduladores de la activación de la cascada de caspasas, de tal manera que esta inhibición no afecta la proliferación celular. En contraste, cuando Bax (una proteína relacionada a Bcl-2), es sobre-expresada, esta puede contrarrestar la habilidad de Bcl-2 para inhibir la apoptosis.⁸⁶ En este sentido, la tasa de la expresión de Bcl-2/Bax ha sido reportada como un índice pronóstico de utilidad en cáncer de ovario.⁸⁷ En este trabajo, Bcl-2 se encontró presente en los folículos primordiales, secundarios, antrales y epitelio ovárico en ambos grupos estudiados; y bax se encontró positivo en todos los componentes celulares de los ovarios de ambos grupos de estudio.

Para contribuir al conocimiento del remodelamiento tisular que ocurre en el ovario humano, determinamos diversos marcadores celulares que participan en la apoptosis o en el control del ciclo celular. Teniendo en mente que la determinación de un marcador específico a través de inmunohistoquímica depende de una serie de factores preanalíticos que abarcan desde la obtención y manejo del tejido hasta el procedimiento técnico.⁸⁸ Los ovarios estudiados fueron fijados en etanol, esto fue debido a que algunos reportes previos se señalan que los tejidos fijados en etanol e incluidos en parafina, producen excelentes resultados histo-morfológicos y que permiten conservar las macromoléculas.⁸⁹ Sin embargo, gran parte de los laboratorios de patología utilizan como fijador universal NBF al 10%.^{90,91} Por esta razón, es importante señalar que los resultados presentados de la identificación de los diferentes biomarcadores determinados a través de IHQ, no pueden ser estrictamente comparados por lo reportado por otros autores, esto es debido fundamentalmente al proceso de fijación tisular utilizado en el presente trabajo.

De la misma manera, el reducido número de sujetos incluidos en cada uno de los grupos estudiados, representa una debilidad metodológica del presente trabajo. No obstante, es importante señalar las

limitaciones que conlleva la realización de pruebas dinámicas y la obtención de tejidos y órganos en sujetos sanos.

En relación a la evaluación reserva ovárica, existen en la actualidad limitaciones conceptuales y diagnósticas; y el estándar de oro para la determinación de reserva ovárica es el conteo de los folículos primordiales en productos de ooforectomía, lo que está fuera del contexto del quehacer clínico. Por lo que en este trabajo se caracterizaron los grupos estudiados a través de la prueba dinámica con citrato de clomifeno; debido a que esta prueba ha sido utilizada ampliamente para evaluar la reserva ovárica en pacientes infértiles y ha demostrado mayor sensibilidad y especificidad que la determinación basal de FSH y la prueba de reserva ovárica con aGNRH.^{92,93} Sin embargo, la evaluación dinámica hormonal el eje hipotálamo-hipófisis-ovario a través de a prueba de citrato de clomifeno, podría resultar insuficiente en la inferencia de la población de folículos primordiales ováricos, pudiendo ser de utilidad para estudios futuros la determinación de otros elementos ováricos locales que participan en la foliculogénesis y son de utilidad en la evaluación de la reserva ovárica, como son la determinación de inhibina y/o hormona antimulleriana.^{94,95}

Nuestros hallazgos resaltan un amplio panorama en la expresión celular de diferentes marcadores moleculares que participan en la progresión del ciclo celular y/o apoptosis en el ovario de mujeres en edad reproductiva⁹⁶. Por lo que se hace necesario diseñar estudios adicionales que contribuyan a aclarar el papel funcional de estas moléculas en la fisiología ovárica, así como en algunos eventos patológicos. Todo ello, con el fin de desarrollar nuevos enfoques diagnósticos y terapéuticos en algunos eventos frecuentes en la patología ovárica como son: el síndrome de ovarios poliquísticos, baja reserva ovárica, falla ovárica prematura y el cáncer ovárico.

IX.- Conclusiones.

- La apoptosis ovárica detectada a través de la fragmentación del DNA mediante el procedimiento del TUNEL no fue estadísticamente diferente entre los grupos estudiados.
- La determinación en los folículos ováricos de algunas moléculas que participan en la regulación del ciclo celular y/o la apoptosis como son; Bcl-2, PCNA, Ki-67, p53, Bax, Fas-L y caspasas-3, -8 y -9 no fue estadísticamente diferente entre los grupos estudiados.
- La inmunolocalización de las caspasas-3 y -8, fue significativamente mayor en el estroma ovárico en el grupo control; y en este mismo grupo la expresión de caspasa-3 fue mayor en los vasos ováricos.
- En el ovario la apoptosis es un proceso dinámico que modula de manera fundamental la ovogénesis, así como el crecimiento y desarrollo folicular a lo largo de la vida reproductiva. En nuestro modelo natural de estudio, que incluyó un grupo de pacientes con baja reserva ovárica caracterizadas a través de los niveles séricos basales y la prueba dinámica con citrato de clomifeno, parece ser que la apoptosis no es uno de los mecanismos que contribuyen a la disminución de la reserva ovárica.

X.- Referencias.

1. Bowles GT. The evolution of aging: a new approach to an old problem of biology. *Med Hypothesis*. 1998; 58:179-221.
2. Nikolaou D, Templeton A. Early ovarian ageing. *Eur J Obstet Gynecol*. 2004; 113:126-133.
3. Yap C. Ontogeny: The evolution of an oocyte. *Obstet Gynecol Surv*. 2000; 55:449-454.
4. Palumbo A, Yeh J. Apoptosis as a basic mechanism in the ovarian cycle: Follicular atresia and luteal regression. *J Soc Gynecol Invest*. 1995; 2:565-573.
5. De Felici M, Klinger FG, Farini D, Scaldaferrri ML, Iona S, Lobascio M. Establishment of oocyte population in the fetal ovary: primordial germ cell proliferation and oocyte programmed cell death. *Reprod Biomed Online*. 2005; 10:182-191.
6. Miller JL, Marx J. Apoptosis. *Science*. 1998; 281:1301-1304.
7. Hengartner MO. The biochemistry of apoptosis. *Nature*. 2000; 407:770-776.
8. Billig H, Chun S-Y, Eisenhauer K, Hsueh AJW. Gonadal cell apoptosis: hormone-regulated cell demise. *Hum Reprod Update*. 1996; 2:103-117.
9. Hussein RM. Apoptosis in the ovary: molecular mechanisms. *Hum Reprod Up*. 2005; 11:162-178.
10. Pangas SA, Rajkovic A. Transcriptional regulation of early oogenesis: in search of masters. *Hum Reprod Up*. 2006; 12:65-76.
11. Baker TG. A quantitative and cytological study of germ cells in human ovaries. *Proc Roy Soc London (Biol)*. 1963; 158:417-433.
12. Hirshfield AN. Development of follicles in the mammalian ovary. *Int Rev Cytol*. 1991; 124:43-101.
13. De Pol A, Vaccina F, Forabosco A, Cavazzuti E, Marzona L. Apoptosis of germ cells during human prenatal oogenesis. *Hum Reprod*. 1997; 12:2235-2241.
14. Adashi EY. Endocrinology of the ovary. *Hum Reprod*. 1994; 9:815-827.
15. Greenwald GS, Roy KS. Follicular development and its control. In: *Physiology of Reproduction*. 2^{da}. ed. Edit by Knobil E. and Neill JD. Raven Press. LTD, N.Y. 1994. pp: 79-122.
16. Jamnongjit M, Hammes SR. Oocyte maturation: The coming of age of a germ cell. *Semin Reprod Med*. 2005; 23:23-241.
17. Richardson SJ, Senikas V, Nelson JF. Follicular depletion during the menopausal transition; evidence for accelerated loss and ultimate exhaustion. *J Clin Endocrinol Metab*. 1987; 65:1231-1237.
18. Vom Saal FS, Finch CE, Nelson FN. Natural history and mechanism of reproductive aging in humans, laboratory rodents, and other selected vertebrates. In *The Physiology of Reproduction*, Second Edition, edited by E. Knobil and J.D. Neill. Raven Press, Ltd., New York, USA. 1994. 1213-1245.
19. Majno G, Joris I. Apoptosis, oncosis, and necrosis. An overview of cell death. *Am J Pathol*. 1995; 146:3-15.

20. Schwartz LM, Osborne BA. Programmed cell death, apoptosis and killer genes. *Inmun Today*. 1993; 14:582-590.
21. Orrenius S. Apoptosis: Molecular mechanism and implications for human disease. *J Int Med*. 1995; 237:529-536.
22. Bortner CD, Oldenburg BE, Cidlowski JA. The role of DNA fragmentation in apoptosis. *Trends Cell Biol*. 1995; 5:21-27.
23. Ellis RE. Methods for the study of cell death in the nematode *Caenorhabditis elegans*, in *Methods in Cell Biology*. 1995. Vol 46. Schwartz LM and Osborne BA eds. Academy, NY. Pp 323-353.
24. Steller H. Mechanism and genes of cellular suicide. *Science*. 1995; 267:1445-1449.
25. Hengartner MO, Ellis RE, Horwitz RH. *Caenorhabditis elegans* gene *cd-9* protects cells from programmed cell death. *Nature*. 1992; 356:494-506.
26. Zhivotovsky B, Burgess DH, Orrenius. Proteases in apoptosis. *Experientia*. 1996; 52:968-978.
27. Wu D, Wallen HD, Nuñez G. Interaction and regulation of subcellular localization of *CED-4* by *CD-9*. *Science*. 1997; 275:1126-1129.
28. Vaux DL, Haecker G, Strasser A. An evolutionary perspective on apoptosis. *Cell*. 1994; 76:777-779.
29. Hale AJ, Smith CA, Sutherland LC, Stoneman VE, Lonthorne VL. Apoptosis: molecular regulation of cell death. *Eur J Biochem*. 1996; 236:1-26.
30. Nagata S. Apoptosis by death factor. *Cell*. 1997; 88:355-365.
31. Nagata S, Goldstein P. The Fas death factor. *Science*. 1995; 267:1449-1456.
32. Kiston J, Raven T, Jiang YP. A death domain-containing receptor that mediated apoptosis. *Nature*. 1996; 384:372-375.
33. Cohen GM. Caspases: the executioners of apoptosis. *Biochem J*. 1997; 326:1-16.
34. Wyllie AH. The genetic regulations of apoptosis. *Current Opinion Gen Develp*. 1995; 5:97-104.
35. Hettis SW. To die or not to die. An overview of apoptosis and its role in disease. *JAMA*. 1998; 279:300-307.
36. Tilly JL, Billig H, Kowalski KI. Epidermal growth factor and basic fibroblast growth factor suppress the spontaneous onset of apoptosis in cultured rat ovarian granulosa cells and follicles by a tyrosine kinase-dependent mechanism. *Mol Endocrin*. 1992; 6:1942-1950.
37. Chun S-Y, Billig H, Tilly JL. Gonadotropin suppression of apoptosis in cultured preovulatory follicles; mediatory role of endogenous insulin-like growth factor I. *Endocrinology*. 1994; 1845-1853.
38. Billig H, Furuta I, Hsueh AJW. Estrogens inhibit and androgens enhance ovarian granulosa cell apoptosis. *Endocrinology*. 1993; 133:2204-2212.
39. Stouffer RL, Woodruff TK, Dahl KD. Human recombinant activin-A, alters pituitary luteinizing hormone and follicle stimulating hormone secretion, follicular development, and steroidogenesis, during the menstrual cycle in rhesus monkeys. *J Clin Endocrinol Metab*. 1993; 77:241-248.

40. Miro F, Hillier SG. Relative effects of activin and inhibin on steroid hormone synthesis in primate granulosa cells. *J Clin Endocrinol Metab.* 1992; 75:1556-1561.
41. Dor J, Kokia E, Bider D. Paracrine mechanism of ovarian regulation. *Eur J Obstet Gynecol.* 1996; 65:25-28.
42. Lee BS, Robinson RD, Best CL. Expression of apoptosis related genes, Bcl-2 and TRPM-2, in human luteinized granulosa cells. *J Soc Gynecol Invest.* 1995; 2:389.
43. Johnson AL, Tilly JL. Expression of bcl-x proto-oncogene mRNA in granulosa cells during follicular development. *Biol Reprod.* 1994; 50:90-94.
44. Newmeyer DD, Farschon DM, Red JC. Cell-free apoptosis in xenopus egg extracts: inhibition by Bcl-2 and requirement for an organelle fraction enriched in mitochondria. *Cell* 1994; 79:353-364.
45. Tilly JL, Tilly KI, Kentom ML, Johnson AL. Expression of member of bcl-2 gene family in the immature rat ovary: equine chorionic gonadotrophin-mediated inhibition of granulosa cell apoptosis is associated with decreased bax and constitutive bcl-2 and bcl-xlong messenger RNA levels. *Endocrinology.* 1995; 136:232-241.
46. Pelletier J, Schalling M, Bucler AJ, Rogers A. Expression of Wilms tumor gene WT-1 in the murine urogenital system. *Genes Dev.* 1991; 5:1345-1356.
47. Maheswaran S, Park S, Bernad A. Physical and functional interaction between WT-1 and p53 proteins. *Proc Natl Aca Sci (USA).* 1993; 90:5100-5104.
48. Rauscher III FJ. The WT-1 Wilms tumour gene product: a developmentally regulated transcription factor as a tumour suppressor. *FASEB J.* 1993; 7:896-903.
49. Quirk SM, Cowan RG, Joshi SG. Fas-antigen-mediated apoptosis in human granulosa-luteal cells. *Biol Reprod.* 1995; 52:279-287.
50. Jo T, Tomiyama T, Ohashi K. Apoptosis of cultured mouse luteal cells induced by tumor necrosis factor- α and interferon- γ . *Anat Rec.* 1995; 241:70-76.
51. Hayakawa M, Ishida N, Takeuchi K. Arachnidonic acid selective cytosolic phospholipase A2 is crucial in the cytotoxic action of tumor necrosis factor. *J Biol Chem.* 1993; 268:11290-11295.
52. Yamada K, Otabe S, Nada N, Takane N. Nitric oxide and nitric oxide synthetasa mRNA induction in mouse islet cells by interferon- γ plus tumor necrosis factor- α . *Biochem Biophys Res Commun.* 1993; 197:22-27.
53. Santoro N, Banwell T, Tortoriello D. Effects of aging and gonadal failure on the hypothalamic-pituitary axis in women. *Am J Obstet.* 1998; 178:732-741.
54. Grenhall E, Vessey M. The prevalence of subfertility: a review of the current confusion and a report of two new studies. *Fertil Steril.* 1990; 54:978-983.
55. Klein NA, Battaglia DE, Miller PB. Ovarian follicular development and the follicular fluid hormones and growth factors in normal women of advanced reproductive age. *J Clin Endocr Metab.* 1996; 81:1046-1051.
56. Gougeon A. Regulation of ovarian follicular development in primates: Facts and Hypotheses. *Endocr Rev.* 1996; 17:121-155.

57. Hurwitz A, Adashi EY. Ovarian follicular atresia as an apoptotic process. In *The Ovary*. Edited by. Eli Y. Adashi and Peter C.K Leung. Raven Press, Ltd. New York. USA. 1993. 473-485.
58. Best CL, Pudney J, Anderson DJ. Modulation of human granulosa cell steroid production in vitro by tumor necrosis factor alpha: implications of white blood cells in culture. *Obstet Gynecol*. 1994; 84:121-127.
59. Heimler I, Hutz RJ, Attarn M. Ovarian follicular granulosa-lutein cells from IVF procedures demonstrate a very low incidence of apoptotic cell death post aspiration. *Proceedings of IX World Congress on In Vitro Fertilization and Assisted Reproduction*. In: Alburumieh A, Bernat E, Dohr G, Feichtinger W, Fischl F, Huber, et, al., Editors. Bologna Italy: Monduzzi Editore S. 1995:743-746.
60. Seifer DB, Gardiner AC, Ferreira KA, Peluso JJ. Apoptosis as a function of ovarian reserve in women undergoing in vitro fertilization. *Fertil Steril*. 1996; 66:593-598.
61. Fujino Y, Ozaki K, Yamamasu S. DNA fragmentation of oocytes in aging mice. *Hum Reprod*. 1996; 11:1480-1483.
62. Billig H, Furuta I, Husej AJW. Gonadotropin-releasing hormone directly induces apoptotic cell death in the rat ovary: biochemical and in situ detection of deoxyribonucleic acid fragmentation in granulosa cells. *Endocrinology* 1994; 134:245-252.
63. Jain T, Soules MR, Collins JA. Comparison of basal follicle-stimulating hormone versus the clomiphene citrate challenge test for ovarian reserve screening. *Fertil Steril* 2004; 82:180-185.
64. Clement PB. Histology of the ovary. In: Stenberg SS, eds. *Histology for the Pathologist*. Second. Ed. Philadelphia: Lippincott-Raven Publishers, 929-955.
65. Funayama Y, Sasano H, Suzuki T, Tamura M, Fuyaka T, Yajima A. Cell turnover in normal cycling human ovary. *J Clin Endocrinol Metab* 1996; 81:828-834.
66. Grizzle WE, Myers RB, Manne U, Stockard CR, Harkins LE, Srivastava S. Factors affecting immunohistochemical evaluation of biomarker expression in neoplasia. In: Hanausek M, Walaszek Z, eds. *Methods in Molecular Medicine-Tumor Marker Protocols*. Totowa, NJ: Humana Press, 1998, 161-179.
67. Poczatek RB, Myers RB, Manne U, Oelschlager D, Weiss HL, Bostwick DG, *et al*. Ep-CAM levels in prostatic adenocarcinoma and prostatic intraepithelial neoplasia. *J Urol* 1999; 162:1462-1466.
68. Frost A, Sparks D, Grizzle WE. Methods of antigen recovery vary in their usefulness in unmasking specific antigens in immunohistochemistry. *Appl Immunohistochem Mol Morphol* 2000; 8:251-258.
69. Grizzle WE, Myers RB, Manne U, Stockard CR, Harkins LE, Srivastava S. Immunohistochemical evaluation of biomarkers in prostatic and colorectal neoplasia. In:

Hanausek M, Walaszek Z, eds. *Methods in Molecular Medicine-Tumor Marker Protocols*. Totowa, NJ: Humana Press Inc., 1998, 143-160.

70. Depalo R, Nappi L, Loverro G, Bettococchi S, Caruso ML, Valentini AM.. Evidence of apoptosis in human primordial and primary follicles. *Hum Reprod* 2003; 18:2678-2862.
71. Huang X, Halicka HD, Traganos F, Tanaka T, Kurose A. Cytometric assessment of DNA damage in relation to cell cycle phase and apoptosis. *Cell Prolif.* 2005. 38; 223-243.
72. Izawa M, Nguyen PH, Kim HH, Yeh J. Expression of the apoptosis-related genes, caspase-1, caspase-3, DNA fragmentation factor, and apoptotic protease activating factor-1, in human granulosa cells. *Fertil Steril* 1998; 70:549-552.
73. Mikkelsen AL, Host E, Lindenberg S. Incidence of apoptosis in granulosa cells from immature follicles. *Reproduction* 2001; 122:481-486.
74. Wu J, Zhang L, Wang X. Maturation and apoptosis of human oocytes *in vitro* are age related. *Fertil Steril* 2000; 74:1137-1141.
75. Markstrom E, Svensson EC, Shao R, Svanberg B, Billig H. Survival factors regulating ovarian apoptosis-dependence on follicle differentiation. *Reproduction* 2002; 123:23-30.
76. McLaren A. Germ and somatic cell lineages in the developing gonad. *Mol Cell End.* 2000; 163:3-9.
77. Hofseth LJ, Hussain SP, Harris CC. p53: 25 years after its discovery. *TIPS* 2004; 25:177-181.
78. Shigemasa K, Tian X, Gu L, Shiroyama Y, Nagai N, Ohama K. Expression of cyclooxygenase-2 and its relationship to p53 accumulation in ovarian adenocarcinomas. *Int J Oncol* 2003; 22:99-105.
79. Sheikh MS, Fornace AJ. Role of p53 family members in apoptosis. *J Cell Physiol* 2000; 182:171-181.
80. Kumar S, Cakourus D. Transcriptional control of the core cell-death machinery. *TIPS* 2004; 29:193-199.
81. Johnson AL, Bridgham JT. Caspase-mediated apoptosis in the vertebrate ovary. *Reproduction* 2002; 124:19-27.
82. Khan SM, Dauffenbach LM, Yeh J. Mitochondria and caspases in induced apoptosis in human luteinized granulosa cells. *Biochem Biophys Res Commun* 2000; 269:542-545.
83. Reed JC. Mechanism of apoptosis. *Am J Pathol* 2000; 157:1415-1430.
84. Scholzen T, Gerdes J. The Ki-67 protein: from the known and the unknown. *J Cell Physiol* 2000; 182:311-322.

85. Kelman Z, Hurwitz J. Protein-PCNA interactions: a DNA-scanting mechanism? *TIBS* 1998; 23:236-238.
86. Gross A, McDonnell JM, Korsmeyer SJ. BCL-2 family members and the mitochondria in apoptosis. *Genes Dev* 1999; 13:1899-1911.
87. Lohmann CM, League AA, Clark WS, Lawson D, DeRose BP, Cohen C. Bcl-2: Bax and Bcl-2: Bcl-x ratios by image cytometric quantification of immunohistochemical expression in ovarian carcinoma: correlation with prognosis. *Cytometry* 2000; 42:61-66.
88. Grizzle WE, Stockard CR, Billings PE. The effects of tissue processing variables other than fixation on histochemical staining and immunohistochemical detection of antigens. *J Histotechnol* 2001; 24:213-219.
89. Ahram M, Flaig MJ, Gillespie JW, Duray PH, Linehan WM, Orntstein DK. Evaluation of ethanol-fixed, paraffin-embedded tissues for proteomic applications. *Proteomics* 2003; 3:413-421.
90. Eltoun I, Fredenburgh J, Myers RB, Grizzle WE. Introduction to the theory and practice of fixation of tissues. *J Histotechnol* 2001; 24:173-190.
91. Eltoun I, Fredenburgh J, Grizzle WE. Advanced concepts in fixation: Effects of fixation on immunohistochemistry, reversibility of fixation and recovery of proteins, nucleic acid and other molecules from fixed and processed tissues, developmental methods of fixation. *J Histotechnol* 2001; 24:201-210.
92. Kwee J, Schats R, McDonnell J, Lambalk CB, Schoemaker J. Intercycle variability of ovarian reserve test: results of a prospective randomized study. *Hum Reprod.* 2004; 19:590-595.
93. Guleki B, Bulbul Y, Onvural, Yorukoglu, Posaci C, Demir M. Accuracy of ovarian reserve test. *Hum Reprod.* 1999; 14:2822-2826.
94. Laven JS, Fauser BC. Inhibins and adult ovarian function. *Moll Cell Endocrin.* 2004; 225:37-44.
95. Feversien E, Mendez Lozano DH, Taieb J, Hersters L, Frydman R, Fanchin R. Anti-Mullerian hormone: clinical insights into a promising biomarker of ovarian follicular status. *Reprod Biomed Online.* 2006; 12:695-703.
96. Vital-Reyes VS, Rodriguez-Burford C, Chhieng DC, Alvarado-Cabrero, Reyes-Fuentes A, Grizzle WE. Ovarian expression of markers associated with proliferation or apoptosis in women with diminished ovarian reserve. *Fertil Steril.* 2006; 86:176-185.

APOPTOSIS OVÁRICA EN PACIENTES CON BAJA RESERVA OVÁRICA.

CARTA DE CONSENTIMIENTO INFORMADO

Acepto libre y voluntariamente participar en este trabajo de investigación. Ya que los estudios que se me efectúen y la cirugía propuesta (histerectomía total abdominal) forman parte de mi estudio y tratamiento de mi enfermedad.

He sido informada que se me tomarán estudios de sangre, así como ultrasonido abdominal.

He sido enterada que este estudio de investigación busca encontrar las causas que generan el malfuncionamiento del ovario en mujeres jóvenes que desean embarazarse y tienen una disminución de los folículos del ovario. Y que para ello es necesario realizar una prueba de función del ovario que consiste en tomar una muestra de sangre durante la menstruación y tomar durante 5 días un medicamento (citrato de clomifeno) que estimula el crecimiento de los folículos del ovario y posterior a ello se me tomara una segunda muestra de sangre. Para lo cual acepto participar voluntariamente.

También estoy de acuerdo y he aceptado que durante la histerectomía total abdominal que es el tratamiento quirúrgico definitivo para la enfermedad que padezco, se tome uno de mis ovarios con el fin de analizarlo y colaborar a encontrar la causa que altera en otras mujeres el número de óvulos y les impide procrear. He sido ampliamente enterada de los riesgos y beneficios que esto trae consigo.

Estoy enterada, que toda la información obtenida de todas las pacientes que participemos en este estudio se mantendrá dentro del anonimato y es enteramente confidencial. De la misma manera el resultado del análisis patológico de los órganos extirpados (útero y ovario) se me comunicara en la primera consulta posterior a la intervención quirúrgica.

También es de mi conocimiento que en caso que quisiera retirarme del estudio, puedo hacerlo en el momento que así lo quiera, sin que esto altere la atención y servicios a los que tengo derecho.

ACEPTO PARTICIPAR

TESTIGOS

Nombre y Firma

Nombre y Firma

Nombre y Firma

	APOPTOSIS		P53		BAX	
	BRO	Control	BRO	Control	BRO	Control
Folículos primordiales	IN ^b	IN	4 ± 4 (0, 35)	IN	17 ± 9 (0, 55)	14 ± 9 (0, 53)
Folículos primarios	1.4 ± 0.9 (0, 6)	3 ± 3 (0, 16)	IN	IN	52 ± 14 (8, 90)	47 ± 10 (0, 80)
Folículos secundarios:						
Células de la granulosa	0.3 ± 0.3 (0, 2.5)	IN	IN	1 ± 1 (0, 7)	33 ± 10 (0, 70)	25 ± 14 (0, 95)
Células de la teca	IN	IN	0.2 ± 0.2 (0, 1)	0.6 ± 0.6 (0, 4)	51 ± 13 (0, 90)	26 ± 14 (0, 95)
Folículos antrales:						
Células de la granulosa	21 ± 11 (0, 80)	6 ± 4 (0, 25)	4 ± 4 (0, 30)	IN	10 ± 6 (0, 90)	10 ± 3 (0, 60)
Células de la teca	22 ± 8 (0, 60)	5 ± 3 (0, 18)	3 ± 2 (0, 20)	0.2 ± 0.1 (0, 1)	35 ± 13 (0, 97)	25 ± 14 (0, 95)
Cuerpo lúteo	1.9 ± 1.4 (0, 10)	6 ± 6 (0, 30)	3 ± 2 (0, 10)	IN	21 ± 13 (0, 95)	11 ± 7 (0, 45)
Epitelio ovárico	13 ± 8 (0, 60)	4 ± 3 (0, 17)	4 ± 4 (0, 35)	IN	22 ± 4 (8, 40)	35 ± 13 (0, 85)
Estroma ovárico	29 ± 10 (0, 80)	23 ± 8 (0, 52)	5 ± 5 (0, 45)	IN	61 ± 9 (18, 90)	67 ± 10 (30, 95)
Vasos ováricos	22 ± 10 (0, 75)	9 ± 6 (0, 38)	3 ± 3 (0, 40)	IN	32 ± 13 (0, 86)	73 ± 7 ^a (45, 96)
Quiestes de inclusión	11 ± 8 (0, 60)	1.8 ± 1.6 (0, 10)	IN	IN	37 ± 19 (0, 95)	29 ± 12 (0, 85)

Tabla I. – Apoptosis e inmunolocalización de p53, y Bax en los diferentes componentes del ovario en pacientes con baja reserva ovárica (n = 8) y grupo control (n = 7). Las cifras expresan el promedio ± el error estándar (valor: mínimo-máximo). El análisis estadístico fue realizado a través de la prueba U de Mann-Whitney ^a p = 0.035. ^b Identificación negativa.

	Caspasa-3		Caspasa-8		Caspasa-9		Fas-L	
	BRO	Control	BRO	Control	BRO	Control	BRO	Control
Folículos primordiales	9 ± 4 (0, 33)	27 ± 11 (0, 60)	IN	8 ± 7 (0, 40)	1 ± 0.8 (0, 7)	16 ± 11 (0, 70)	28 ± 13 (0, 96)	27 ± 8 (0, 50)
Folículos primarios	9 ± 3 (0, 20)	18 ± 9 (0, 50)	0.8 ± 0.8 (0, 7)	9 ± 9 (0, 52)	0.6 ± 0.4 (0, 3)	9 ± 5 (0, 27)	59 ± 14 (0, 95)	50 ± 15 (0, 95)
Folículos secundarios:								
Granulosa	18 ± 8 (0, 57)	13 ± 8 (0, 50)	0.4 ± 0.4 (0, 3)	3 ± 3 (0, 17)	4 ± 3 (0, 23)	13 ± 13 (0, 77)	32 ± 11 (0, 75)	17 ± 10 (0, 70)
Teca	20 ± 8 (0, 50)	20 ± 10 (0, 53)	3 ± 2 (0, 13)	5 ± 5 (0, 30)	11 ± 5 (0, 40)	14 ± 14 (0, 83)	37 ± 14 (0, 90)	20 ± 11 (0, 80)
Folículos antrales:								
Granulosa	32 ± 10 (0, 83)	21 ± 11 (0, 67)	9 ± 6 (0, 42)	6 ± 6 (0, 37)	3 ± 2 (0, 12)	2 ± 2 (0, 10)	46 ± 9 (0, 80)	31 ± 12 (0, 90)
Teca	18 ± 7 (0, 60)	18 ± 13 (0, 80)	7 ± 6 (0, 48)	11 ± 11 (0, 67)	10 ± 4 (0, 37)	12 ± 11 (0, 67)	60 ± 9 (27, 85)	40 ± 13 (0, 90)
Cuerpo lúteo	16 ± 7 (0, 40)	7 ± 7 (0, 40)	10 ± 7 (0, 58)	IN	14 ± 8 (0, 60)	7 ± 7 (0, 40)	9 ± 6 (0, 48)	7 ± 7 (0, 50)
Epitelio ovárico	IN	2 ± 2 (0, 10)	1.2 ± 0.9 (0, 8)	IN	6 ± 4 (0, 30)	2 ± 2 (0, 10)	53 ± 9 (12, 97)	25 ± 10 (0, 70)
Estroma ovárico	27 ± 7 (0, 47)	74 ± 10 ^a (27, 90)	3 ± 2 (0, 15)	31 ± 16 ^c (0, 95)	5 ± 3 (0, 20)	17 ± 9 (0, 50)	84 ± 3 (70, 92)	77 ± 5 (60, 95)
Vasos ováricos	3 ± 2 (0, 12)	22 ± 4 ^b (10, 30)	42 ± 7 (5, 65)	46 ± 14 (0, 90)	8 ± 3 (0, 23)	5 ± 5 (0, 30)	65 ± 6 (34, 93)	70 ± 4 (60, 90)
Quistes de inclusión	IN	IN	0.6 ± 0.6 (0, 5)	3 ± 3 (0, 16)	IN	1 ± 1 (0, 6)	22 ± 10 (0, 65)	15 ± 10 (0, 67)

Tabla II. – Inmunolocalización de caspasas-3-8-9 y Fas-L en los diversos componentes del ovario de pacientes con baja reserva ovárica (n = 8) y grupo control (n = 7). Las cifras expresan el promedio ± el error estándar (mínimo-máximo). El análisis estadístico fue realizado a través de la prueba U de Mann-Whitney. ^a p = 0.01, ^b p = 0.001, ^c p = 0.05
^d Identificación negativa.

	Bcl-2		Ki-67		PCNA	
	BRO	Control	BRO	Control	BRO	Control
Folículos primordiales	0.8 ± 0.6 (0, 5)	5 ± 2 (0, 13)	IN ^b	IN	0.8 ± 0.8 (0, 6)	0.2 ± 0.2 (0, 2)
Folículos primarios	13 ± 7 (0, 50)	5 ± 3 (0, 17)	2 ± 1 (0, 7)	0.6 ± 0.4 (0, 2)	0.9 ± 0.8 (0, 6)	3 ± 3 (0, 15)
Folículos secundarios:						
Células de granulosa	16 ± 5 (0, 42)	14 ± 9 (0, 60)	11 ± 6 (0, 50)	12 ± 9 (0, 53)	6 ± 4 (0, 30)	9 ± 6 (0, 28)
Células de teca	4 ± 2 (0, 20)	0.4 ± 0.4 (0.2, 5)	3 ± 2 (0, 12)	7 ± 6 (0, 37)	2 ± 3 (0, 8)	5 ± 5 (0, 28)
Folículos antrales:						
Células de granulosa	IN	2.5 ± 2.5 (0, 17)	13 ± 7 (0, 50)	8 ± 4 (0, 27)	9 ± 4 (0, 27)	5 ± 3 (0, 17)
Células de teca	IN	0.4 ± 0.4 (0, 2.5)	17 ± 9 (0, 70)	7 ± 5 (0, 30)	10 ± 6 (0, 38)	8 ± 5 (0, 29)
Cuerpo lúteo	0.3 ± 0.3 (0, 2.5)	0.7 ± 0.7 (0, 5)	2 ± 1 (0, 11)	IN	7 ± 4 (0, 23)	2 ± 2 (0, 10)
Epitelio ovárico	3 ± 2 (0, 17)	3.3 ± 3.3 (0, 23)	0.0 ± 0.06 (0, 0.5)	1.5 ± 1 (0, 7)	0.06 ± 0.06 (0, 1)	2 ± 2 (0, 10)
Estroma ovárico	44 ± 9 (3, 75)	38 ± 8 (50, 70)	0.6 ± 0.3 (0, 3)	0.7 ± 0.5 (0, 3)	0.4 ± 0.4 (0, 3)	3 ± 2 (0, 10)
Vasos ováricos	8 ± 4 (0, 36)	6 ± 5 (0, 35)	IN	IN	IN	0.3 ± 0.3 (0, 2)
Quistes de inclusión	4 ± 4 (0, 30)	3 ± 1(0, 8)	2 ± 2 (0, 16)	1.5 ± 1 (0, 8)	IN	0.3 ± 0.3 (0, 2)

Tabla III. – Inmunolocalización de Bcl-2, Ki-67 y PCNA en los diversos componentes del ovario de pacientes con baja reserva ovárica (n = 8) y grupo control (n = 7). Las cifras expresan el promedio ± el error estándar (valor: mínimo-máximo). El análisis estadístico se realizó utilizando la prueba U de Mann-Whitney. ^b Identificación Negativa.