



UNIVERSIDAD NACIONAL AUTÓNOMA DE MÉXICO

**MAESTRIA EN CIENCIAS DE LA PRODUCCIÓN Y DE LA SALUD
ANIMAL**

**PARTICIPACIÓN DE LA CERAMIDA EN LA ATRESIA FOLICULAR
DE LA OVEJA**

TESIS

**QUE PARA OBTENER EL GRADO DE
MAESTRA EN CIENCIAS**

P R E S E N T A

VANESSA LÓPEZ MELÉNDEZ

TUTOR:

DRA. ANA MARIA ROSALES TORRES.

COMITÉ TUTORAL:

DR. CARLOS GUTIERREZ AGUILAR.

DR. LUIS ALBERTO ZARCO QUINTERO.

MÉXICO, DF

2008



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.

AGRADECIMIENTOS

Al Consejo Nacional de Ciencia y Tecnología

Por la beca otorgada para la elaboración de esta tesis.

A Facultad de Medicina Veterinaria y Zootecnia de la U.N.A.M.

Por formar en mi una mejor persona.

A mi madre

Por darme la vida, por su paciencia y apoyo incondicional durante todo este tiempo de estudiante.

A mi profesor y asesor el Dr. Román Espinosa Cervantes

Por su guía, paciencia y comprensión (porque esta tesis es de los dos).

A mis sinodales

Por tomar parte de mi vida y enriquecerme con sus conocimientos.

A mis grandes e incondicionales amigos Jessy y Mauricio

Por su gran apoyo durante la maestría.

Y sobre todo a aquellos que no creyeron en mi

Porque gracias a ellos tuve la fuerza para seguir adelante.

*Porque no existe lo imposible,
Solo cuesta más trabajo*

INDICE

TEMA	PÁGINA
1.- INTRODUCCIÓN	1
2.- REVISIÓN DE LITERATURA	2
2.1 Desarrollo Folicular	2
2.2 Reclutamiento Selección y Dominancia	7
2.2.1 Reclutamiento	7
2.2.2 Selección	8
2.2.3 Dominancia	9
2.3 Atresia Folicular	10
2.3.1 Clasificación Histológica y Morfológica de la Atresia	13
2.4 Muerte Celular en la Atresia Folicular	14
2.4.1 Necrosis	15
2.4.2 Apoptosis	16
2.5 La Ceramida en la Muerte Celular	19
2.5.1 Muerte Mediada por Receptores	20
2.5.2 Muerte Inducida por Estímulos Estresantes	21
2.5.3 Muerte por pérdida de factores de crecimiento	22
2.6 La Ceramida en la Atresia Folicular	23
2.7 Técnicas utilizadas en el desarrollo del trabajo	25
2.7.1 Inmunohistoquímica	25
2.7.2 Citometría de flujo	25
2.7.3 Cromatografía en placa fina	26
3.-PLANTEAMIENTO DEL PROBLEMA	27
HIPÓTESIS	28
OBJETIVOS	28
4.- MATERIAL Y MÉTODOS	29
4.1 Diseño experimental	29
4.2 Procesamiento de la muestra para Inmunohistoquímica	30
4.2.1 Clasificación morfológica	31
4.2.2 Conteo de células positivas a ceramida	33
4.2.3 Intensidad en la expresión de ceramida	33
4.2.4 Muestras congeladas	34

4.3 Procesamiento de la muestra para la determinación de Ceramida por citometría de flujo	35
4.4 Procesamiento de las muestras para cromatografía en Placa fina	39
4.4.1 Extracción de lípidos	39
4.4.2 Cuantificación de ceramida	41
4.5 Análisis estadísticos	42
5.- RESULTADOS	43
5.1 Cortes histológicos	43
5.1.1 Inmunohistoquímica	43
5.1.2 Intensidad de tinción	44
5.1.3 Inmunohistoquímica en cortes congelados	45
5.2 Resultados preliminares de citometría de flujo	46
5.3 Resultados preliminares de cromatografía en placa fina	47
6.- DISCUSIÓN	48
7.- CONCLUSIONES	59
8.- BIBLIOGRAFÍA	60

RESUMEN

En la última década se ha destacado la importancia de la ceramida como segundo mensajero en la muerte celular y se ha postulado que la concentración de ceramida en una célula define la vía de muerte que esta seguirá (apoptosis o necrosis). La atresia folicular es un proceso degenerativo paulatino e irreversible que presentan la gran mayoría de los folículos que pueblan los ovarios de mamíferos y no mamíferos. La muerte de las células que conforman los folículos es un evento central en la atresia, por lo cual con este trabajo nos propusimos conocer si la ceramida está presente en la atresia folicular y si se relaciona con el grado de atresia que presentan los folículos pequeños y grandes de oveja. Para determinar la presencia de ceramida folicular, se obtuvieron durante un año ovarios de ovejas criollas sin anomalías reproductivas, sacrificadas en el Rastro "El Rojo" en Texcoco, Estado de México. Durante el desarrollo del trabajo se implementaron tres técnicas: a) Inmunohistoquímica en 40 ovarios incluidos en parafina y 12 ovarios congelados, b) Determinación de ceramida por Citometría de flujo en células de la granulosa de 40 folículos y c) Cromatografía en placa fina en 16 folículos con los cuales se logró estandarizar esta técnica. Durante el estudio inmunohistoquímico, se analizaron 105 folículos (42 folículos menores de 4 mm y 63 folículos mayores de 4 mm), el 25.7% fueron sanos, el 32.4% presentaron atresia inicial y 41.9 atresia avanzada. Los resultados de inmunohistoquímica de ovarios incluidos en parafina muestran un efecto significativo ($p < 0.01$) del grado de atresia sobre el porcentaje de células positivas a ceramida, mientras que no hubo efecto significativo ($p > 0.01$) del tamaño folicular sobre la expresión de ceramida (20% a 52% en folículos menores de 4 mm y de 19% a 50% en folículos mayores de 4 mm). Además se encontró un efecto altamente significativo ($P < 0.001$) del grado de atresia de los folículos con la intensidad de la marca de las células positivas a ceramida (folículos sanos 58% de células con intensidad baja, folículos con atresia inicial 85% de células con intensidad media a alta y folículos con atresia avanzada 73% de células con intensidad alta). Con el estudio inmunohistoquímico con ovarios congelados no pudimos observar la marca positiva a ceramida en ningún folículo. El estudio por citometría de flujo permitió detectar que más del 98% de las células que se mueren en los folículos con diferentes grados de atresia, siguen la vía de la apoptosis y que el porcentaje de células muertas aumenta con el grado de atresia del folículo. Por una tinción tricrómica se pudo saber que del total de células muertas, sólo un porcentaje muy bajo (menor al 9% en todos los casos) se marcaron como positivas a ceramida lo cual significa seguramente que esta técnica solo está detectando la ceramida presente en la membrana plasmática porque se usaron células intactas sin permeabilizar. Por último y con el propósito de tener resultados del total de ceramida que tiene un paquete de células obtenido de un folículo con determinado grado de atresia, se estandarizó la técnica de cromatografía en capa fina. Con este trabajo pudimos demostrar que la ceramida está presente en folículos sanos y atrésicos y que su presencia (tanto en el porcentaje de células positivas como en la intensidad de la marca que adquieren), aumenta con el grado de atresia de los folículos pequeños y grandes. Sin embargo el método de inmunohistoquímica es solo un método semi-cuantitativo que no permite obtener información con mucha precisión por lo que suponemos que con técnicas como la cromatografía en capa fina se podrán obtener resultados más tangibles sobre la relación ceramida-atresia folicular.

Palabras clave: ceramida, atresia folicular, muerte celular.

SUMMARY

In the last decade has stood out the importance of the ceramide like second messenger in the cellular death and it has been postulated that the ceramide concentration in a cell defines the road of death that this it will continue (apoptosis or necrosis). The follicular atresia is a gradual and irreversible degenerative process that they present the majority of the follicles that populate the ovaries of mammals and non mammals. The death of the cells that conform the follicles is a central event in the atresia, reason why with this work we intended to know if the ceramide is present in the follicular atresia and if is related with the atresia degree that present the small and big follicles of sheep. To determine the presence of follicular ceramide were obtained during one year ovaries of Creole sheep without reproductive abnormalities, sacrificed in the Slaughterhouse The Red in Texcoco, Mexico. During the development of the work three techniques were implemented: a) Immunohistochemistry in 40 ovaries included in paraffin and 12 frozen ovaries, b) Ceramide determination for flow Citometry in granulosa cells of 40 follicles and c) Thin layer chromatography in 16 follicles with which it was possible to standardize this technique. During the immunohistochemical study, 105 follicles were analyzed (42 follicles smaller than 4 mm and 63 follicles bigger than 4 mm), 25.7% was healthy, 32.4% presented initial atresia and 41.9 advanced atresia. The immunohistochemical results of ovaries included in paraffin show a significant effect ($p < 0.01$) to atresia degree on the percentage of positive cells to ceramide, while there was not significant effect ($p > 0.01$) of follicular size on the ceramide expression (20% to 52% of follicles small than 4 mm and 19% to 50% of follicles bigger than 4 mm). Was also a highly significant effect ($P < 0.001$) the degree atresia of the follicles with the intensity of the mark positive cells to ceramide (healthy follicles 58% of cells with low intensity, follicles with initial atresia 85% of cells with half to high intensity and follicles with advanced atresia 73% of cells with high intensity). From immunohistochemistry study with frozen ovaries we could not observe the positive mark to ceramide in any follicle. The study for flow citometry allowed to detect that more than 98% of the cells that die in the follicles with different atresia degrees, they follow the road of the apoptosis and that the percentage of dead cells increases with the degree atresia of the follicle. For a tricrómica tint could know that of the total of dead cells, only a very low percentage (smaller to 9% in all cases) they were marked as positive to ceramide that which surely means that this alone technique is detecting the present ceramide in the plasmatic membrane because intact cells were used without permeabilization. Lastly and with the purpose of having results of the ceramide total that has an obtained package of cells of a follicle with certain atresia degree, the thin layer chromatography technique was standardized. With this work we could demonstrate that the ceramide is present in healthy follicles and atretic follicles and that its presence (so much in the percentage of positive cells as in the intensity of the mark that acquire), it increases with the degree of atresia of the small and big follicles. However the immunohistochemical method is alone a semi-quantitative that doesn't allow to obtain information with a lot of precision for what we suppose that with thin layer chromatography technical will be been able to obtain more tangible results on the relationship ceramide- follicular atresia.

Key Words: ceramide, follicular atresia, cell death.

1.- INTRODUCCIÓN

El crecimiento folicular en el ovario de los mamíferos es iniciado por la proliferación de las células de la granulosa que rodean al ovocito (Zamboni, 1974) y éste continúa con la diferenciación de las células intersticiales del estroma que están cercanas al ovocito para formar la primera capa de células de la teca y con esto dar lugar al desarrollo del folículo (Amsterdam y Rotmensch, 1987). Tanto las células de la granulosa como las de la teca proliferan durante el subsiguiente crecimiento folicular, para generar el grupo de folículos antrales de los cuales surgirán los que serán seleccionados como dominantes (Peters, 1979).

Los folículos que no son seleccionados, se eliminarán por un proceso conocido como atresia (Byskov, 1978). La atresia es un proceso paulatino e irreversible de muerte celular, que sufren los folículos ováricos a lo largo de todo su desarrollo y que les impide alcanzar la ovulación (Guthrie et al., 1995; Jolly et al., 1997; Perez et al., 2005). Hasta el momento no se conocen con precisión las causas que desencadenan o determinan la atresia folicular, sin embargo, su universalidad permite suponer que se trata de un proceso de selección de los gametos el cual está sujeto a una cuidadosa regulación y nunca interfiere con la reproducción normal de las hembras, lo cual permite suponer que se trata de un proceso indispensable para que sólo se realice la maduración de los ovocitos que serán ovulados.

La eliminación de estos folículos es esencial para el mantenimiento de la masa celular y de la homeostasis del ovario adulto. Uno de los eventos fundamentales que presentan los folículos antrales que sufren atresia, es la muerte tanto de las células epiteliales como del ovocito. Este proceso es estrictamente regulado y es el resultado de la rápida pérdida inicial de las células de la granulosa (Hughes y Gorospe, 1991; Tilly et al., 1991) seguida por una pérdida un poco más lenta de las células de la teca (Logothetopoulos et al., 1995; Palumbo y Yeh, 1994).

Aunque varios autores dedicados al estudio de la muerte celular en la atresia han propuesto desde hace más de una década que la apoptosis es el único tipo de muerte que ocurre en la atresia (Tepper et al., 2000; Abadie et al., 2001; Guimaraes y Linden 2004,), existen evidencias que sustentan que en la atresia participa más de un tipo de muerte (Kovacs et al., 1992; D'Herde et al., 1996; Rosales-Torres et al., 2000; Alonso-Pozos et al., 2003). Trabajos recientes proponen que en la oveja, la atresia involucra a la apoptosis y a la necrosis y que la participación preponderante de uno de los dos tipos de muerte se da dependiendo del tamaño del folículo (Rosales-Torres et al., 2000; Alonso-Pozos et al., 2003;)

Un evento temprano en la muerte celular es el cambio en la distribución de los fosfolípidos de la membrana, lo cual ocasiona que algunos de ellos que normalmente están en la cara interna se expongan en la cara externa, lo que las hace fácilmente reconocibles por las células fagocitarias (Cutler y Mattson, 2001). La muerte celular es acompañada por la pérdida de la asimetría de la membrana, caracterizada por la presencia en la cara externa de fosfolípidos como la fosfatidilserina y la fosfatidiletanolamina, que normalmente se encuentran en la cara interna de la membrana (Abadie y Levade., 2002). Recientemente se ha postulado que la presencia de fosfatidilserina al inicio de la muerte ocurre especialmente

por la hidrólisis de la esfingomielina, la cual normalmente se encuentra localizada en la cara externa de la membrana celular y al hidrolizarse pasa a la cara interna por acción de las esfingomielinasas (Smasas) ácidas o neutras y la fosfatidilserina a la cara externa (Tepper et al., 2000). La exposición de fosfatidilserina es funcionalmente importante para que los fagocitos la detecten rápidamente (Cuvillier, 2002) de manera que las células que exponen este fosfolípido son reconocidas y removidas por células con función fagocitaria. Varios de los estímulos de muerte (radiaciones UV, drogas anticancer, especies reactivas a oxígeno) pueden inducir la hidrólisis de esfingomielina con la consecuente producción de ceramida, lo cual ocurre antes de que haya cambios morfológicos en la célula. (Hannun y Luberto, 2000; Cuvillier, 2002)

Dentro de los lípidos que intervienen en la pérdida de la asimetría de la membrana durante la muerte celular, principalmente la ceramida ha recibido mucha atención por su participación como un importante mediador endógeno de la muerte celular en respuesta a citocinas, antígenos e inductores de estrés medioambientales (Kolesnick y Hannun, 1999).

Algunos grupos de investigación han propuesto que en la oveja, la muerte celular que ocurre durante la atresia, depende del tamaño del folículo (Alonso-Pozos et al., 2003; Rosales-Torres et al., 2000; D'Herde et al., 1996; Kovacs et al., 1992). De igual manera, en los últimos años se ha propuesto que la cantidad de ceramida que se produce en una célula, puede ser un importante indicador de la vía de muerte (Hetz, 2002). Con los antecedentes antes mencionados, el principal objetivo del proyecto es detectar la presencia y participación de la ceramida en folículos de oveja sanos y atrésicos de diferente tamaño.

2.- REVISIÓN DE LITERATURA

2.1.-Desarrollo folicular.

La foliculogénesis ovárica es un proceso dinámico caracterizado por una marcada proliferación y diferenciación de las células somáticas componentes del folículo (Armstrong y Web., 1997). Los ovocitos presentes en el ovario de los mamíferos, se originan de un número definitivo de células germinales primordiales derivadas de la masa celular interna del embrión en crecimiento. Las hembras de los mamíferos, desde su nacimiento cuentan con una reserva de ovocitos específica de cada especie. En el caso de la oveja adulta, sus ovarios contienen (dependiendo de la raza), entre 12.000 y 86.000 folículos primordiales y de 100 a 400 folículos en crecimiento, de los cuales aproximadamente 10 a 40 son visibles en la superficie ovárica (Ginther et al., 1995; Evans et al., 2000). Desde el nacimiento hasta que comienzan a madurar (pubertad) los ovocitos (folículos primordiales) se encuentran rodeados por una capa de células aplanadas llamadas pregranulosa y forman parte de una reserva de ovocitos en reposo. Estos ovocitos constituyen la única fuente de ovulación a lo largo de la vida reproductiva de la hembra. (Espinoza et al., 2007).

En esta misma etapa el proceso de división meiótica se ha detenido en estas estructuras, el núcleo y el citoplasma del ovocito continúan creciendo hasta que la célula adquiere un tamaño grande y queda dotado de un núcleo grande y vesiculoso llamado vesícula germinal (Rosales y Rosado, 1989). En un futuro, mediante un proceso de selección, algunos de estos folículos abandonaran periódicamente el estado de reposo para formar parte del grupo de folículos en crecimiento (Rosado y Rosales., 1991). La meiosis se reinicia mediante la oleada ovulatoria de gonadotropinas, que se da por primera vez cuando la hembra llega a la pubertad (Roche, 1996). Una vez que los folículos salen de la reserva ovárica, pasan de ser folículos primordiales a folículos primarios en transición y las células escamosas pregranulosa que los rodean se transforma en células cuboidales llamada granulosa e inicia su proliferación (Espinoza et al., 2007). El siguiente crecimiento folicular en el ovario, inicia con la proliferación de las células que rodean al ovocito, esto es seguido por la diferenciación del estroma de las células intersticiales de folículos en

desarrollo, para formar la capa inicial de la teca. Estas dos poblaciones celulares, teca y granulosa proliferan durante el subsiguiente crecimiento folicular hasta generar una poza de folículos antrales, de los cuales solo uno de ellos va a ser seleccionado como dominante y cuyo desarrollo lo llevará inevitablemente a la ovulación o eliminación (Yoghi, 1998). Por otra parte, los folículos que no son seleccionados, se van a eliminar por un proceso denominado atresia folicular (Rosado y Rosales, 1991).

El camino que sigue el desarrollo de un folículo primordial a un folículo primario está regulado por factores de crecimiento y hormonas que actúan localmente dentro del ovario (Nilsson y Skinner, 2002), los cuales tienen influencia en la regulación endocrina de la foliculogénesis, dicha regulación involucra a las gonadotropinas, (Fortune et al., 2004).

Diversas evidencia señalan que durante el inicio de la foliculogénesis (folículos primordiales, primarios y pre antrales) el crecimiento es independiente de gonadotropinas y es estimulado principalmente por factores de crecimiento (Hafez, 2000), mientras que desde la etapa de folículo antral estos se vuelven dependientes de gonadotropinas, principalmente FSH (Eppig, 2001).

El periodo de tiempo de crecimiento del folículo primordial hasta el estado preantral y multicapa es relativamente largo y varia según la especie. (Picton, 2001). Después de la activación, este sufre un incremento de tamaño en el ovocito, aunque en el folículo humano esto es seguido de una hipertrofia de las células de la pre granulosa para entrar en el ciclo celular después de un largo periodo en la etapa G0 del ciclo celular. (Picton et al., 2003)

Como se menciona anteriormente durante el periodo preantral, el crecimiento folicular es independiente de gonadotropinas (Ortega et al., 1997) y ocurre en respuesta a diversos factores de crecimiento. Hunter et al., (2004) y Picton et al., (2003), han considerado que algunos de estos factores actúan como reguladores paracrinos y autocrinos en el crecimiento de los folículos preantrales. En folículos primordiales y primarios han sido localizados de 15 o 20 de estos factores (Picton, 2001), los que se han encontrado en folículos primordiales incluyen al factor de crecimiento epidermal (EGF) y su receptor y

miembros del factor de crecimiento transformante β (TGF β), factor de diferenciación del crecimiento 9 (GDF9) y proteínas morfogénicas del hueso (BMPs), especialmente BMP-4, BMP-7 y BMP-15/GDF9B (Hunter et al., 2004).

Por otro lado, conforme las células de la granulosa se desarrollan y sintetizan receptores para gonadotropinas (LH y FSH) se desarrolla el estadio preantral. A lo largo de este estadio se forma la zona pelúcida que rodea al ovocito, las células de la granulosa adquieren apariencia multifocal y la capa de la teca comienza a formarse a partir de las células estromales. Desde este momento las células de la granulosa ya han adquirido la capacidad para sintetizar las tres clases principales de esteroides: progesterona, testosterona y por la activación del sistema de aromatasas, estradiol (Fortune et al., 2001).

La FSH junto con los estrógenos tiene un efecto mitogénico, que estimula la proliferación de las células de la granulosa, lo cual promueve a su vez una rápida acumulación de receptores a FSH. El reinicio de la meiosis en el ovocito, la luteinización de las células de la granulosa y la síntesis de prostaglandinas, esenciales para la ruptura del folículo, son cambios que ocurren entre el pico de LH y la ovulación (Ortega et al., 1997). Durante la fase folicular del ciclo estral, el estradiol (E_2) ejerce un efecto de retroalimentación positiva a nivel hipotalámico, aumenta la frecuencia de secreción de pulsos de GnRH/LH y genera el pico preovulatorio de ambas hormonas (Mc Neilly et al., 2003).

Mientras que en la fase lútea, la progesterona (P_4) ejerce un potente efecto inhibitor de la secreción pulsátil de GnRH/LH. Al final de esta fase, al iniciarse la lúteolisis por efecto de la acción de las prostaglandinas liberadas por el endometrio uterino, las concentraciones de P_4 descienden y dan lugar a la acumulación de E_2 que producirá el pico preovulatorio de LH el cual precede a la ovulación en aproximadamente 24 hrs y se asocia con la conducta de estro (Ledezma et al., 2006).

Se ha demostrado que la inhibina, activina, factor de crecimiento semejante a insulina y algunas proteínas adaptadoras pueden causar efectos directos e indirectos sobre las células de la granulosa y teca afectando el desarrollo folicular y la esteroidogénesis. La inhibina

puede ejercer efectos autócrinos y parácrinos. El incremento de LH induce la síntesis de andrógenos en la teca y esta producción es estimulada por esteroides y FSH. Las bajas concentraciones de progesterona al final de la fase lútea resultan en un incremento en la frecuencia de pulsos de LH, supresión de la producción de ondas foliculares, incrementos secuenciales de FSH y la formación del folículo dominante (Foghi et al., 1998).

En la hembra, durante la foliculogénesis, se llevan a cabo una serie de procesos recurrentes de reclutamiento, selección, crecimiento, maduración y ovulación en el ciclo estral, regulados por una combinación de interacciones entre hormonas, factores de crecimiento, sistemas de comunicación celular y algunos genes (Foghi et al., 1998). La población de folículos que emergen en los ovarios durante el ciclo estral se caracterizan por una fase de crecimiento, seguida de una fase estática y finalmente por la generación de un grupo de folículos antrales de los cuales solo unos serán seleccionados como dominantes y tendrán la capacidad de ser ovulados, mientras que los demás, se eliminarán por un proceso conocido como atresia folicular (Perez et al., 2005).

A lo largo del ciclo estral en la oveja, existen en el ovario folículos en diferentes etapas de crecimiento. Evans., (2003) ha clasificado las etapas del desarrollo folicular de acuerdo a sus características morfológicas describiendo a los folículos de la siguiente manera:

- * Folículos primordiales: son aquellos folículos en los cuales el ovocito se encuentra rodeado por una sola capa de células aplanadas denominadas pregranulosa.
- * Folículos primarios: se encuentran conformados por una o dos capas de células de la granulosa.
- * Folículos pre antrales o secundarios: se encuentran rodeados ya por varias capas de la granulosa que varían entre tres y seis
- * Y por último los folículos antrales o de Graff: los cuales se encuentran rodeados por más de cinco capas de células de la granulosa con evidencia de un antro.

Evans et al., (2000) y Ginther et al., (1995) demostraron en el ciclo estral de la oveja, que la emergencia de los folículos que crecen desde 3 hasta 5 mm ocurre en ondas de crecimiento

(ondas foliculares). Una onda folicular es caracterizada por el crecimiento sincronizado de una cohorte de folículos, en donde continúa su crecimiento mientras que los otros regresan en intervalos variables, por lo que se ha estimado un rango de 2-5 ondas foliculares que ocurren en cada ciclo interovulatorio pero el patrón predominante es de 3 ondas que emergen respectivamente alrededor de los días 0, 6 y 11 (Villavicencio et al., 2007). Algunos autores han reportado la emergencia de una cuarta onda y mencionan que de ser el caso, la onda 3 emerge anticipadamente y la onda 4 emerge el día 14 (Ginther et al, 1995). Con respecto a los diversos factores endocrinológicos que intervienen en el transcurso del ciclo se sabe que un aumento de la FSH precede la emergencia de cada onda folicular. Esto es precedido por un descenso que está correlacionado negativamente con las concentraciones séricas de estradiol, el cual es producido principalmente por el folículo más grande de la onda folicular (Rubianes, 2000).

2.2.-Reclutamiento, Selección y Dominancia.

Independientemente de la especie animal de que se trate y del número de oleadas, cada una tiene tres fases: 1.- reclutamiento, en la que un grupo de folículos adquiere la habilidad para responder a las gonadotropinas y empieza a crecer rápidamente 2.- selección, en la que un grupo de folículos es escogido para escapar del proceso de atresia y continuar creciendo y 3.- dominancia en la que un folículo (en especies monótopas) se desarrolla en forma más rápida que el resto, suprimiendo el crecimiento de los folículos subordinados e impidiendo el reclutamiento de un nuevo grupo de estructuras foliculares (Villavicencio et al., 2007) las tres fases se describirán más detalladamente a continuación.

2.2.1.-Reclutamiento

El reclutamiento folicular es usado a menudo como sinónimo de la emergencia de las ondas foliculares, pero es más preciso definirlo como el crecimiento de folículos que se pueden volver dependientes de gonadotropinas (Evans, 2003).

McGee y Hsueh, (2000), describen dos tipos de reclutamiento durante el desarrollo folicular, el inicial y el cíclico. Durante el reclutamiento inicial factores intraováricos (c-kit y GDF-9) estimulan algunos folículos primordiales para iniciar el crecimiento, en tanto que,

el resto de los folículos permanecen inactivos por meses o años. Se cree que el reclutamiento inicial puede ser un proceso continuo que comienza justo después de la formación del folículo, poco antes de iniciar la pubertad. Después del reclutamiento inicial, el crecimiento del ovocito, es una característica prominente de los folículos en crecimiento, pero estos ovocitos se mantienen arrestados en la profase I de la meiosis (Roche, 1996). Los folículos primordiales que inician su crecimiento en respuesta a factores de crecimiento tales como c-kit y GDF-9 para llegar a la etapa de folículos preantrales permanecen en reposo hasta ser estimulados por la FSH o hasta entrar en un reclutamiento cíclico (Armstrong y Web, 1997)

El reclutamiento cíclico empieza después del inicio de la pubertad y es resultado del incremento en la secreción de FSH durante cada ciclo reproductivo que rescata una cohorte de folículos antrales de la atresia. Los ovocitos en estos folículos ya han completado su crecimiento, adquieren la zona pelúcida, y son competentes para reiniciar la meiosis. (McGee y Hsueh, 2000).

Los folículos que reinician su crecimiento durante el reclutamiento cíclico, son folículos preantrales o antrales tempranos, los cuales están constituidos por el ovocito, la zona pelúcida, células de granulosa (más de cinco capas), la membrana basal, la teca interna y la teca externa (Senger, 2003; McNatty et al., 1999). Los folículos antrales mayores a 4 mm en la oveja (McNelly et al., 1991) y 5 mm en la vaca son calificados como dependientes de gonadotropinas; el número de folículos en desarrollo son dependientes tanto de la cantidad como del tiempo de exposición a FSH (Picton et al., 1990).

2.2.2.- Selección

El mecanismo de selección del folículo dominante está basado en la respuesta diferencial de los folículos a una onda de FSH y LH (Ginther et al., 1996). El mecanismo involucra en primera instancia la disminución en el pico de FSH. El tiempo de selección (definido como la divergencia en los niveles de crecimiento del folículo dominante contra los folículos subordinados) coincide con el primer decremento significativo en las concentraciones de FSH (Adams et al., 1992) y la respuesta podría ser retrasada con FSH exógena (Adams et

al., 1993). El segundo aspecto importante en la selección del folículo dominante es un cambio en la sensibilidad a LH. El aumento transitorio de FSH permite un crecimiento folicular suficiente para que algunos folículos adquieran sensibilidad a LH. Esta respuesta le da al folículo la habilidad para sobrevivir sin FSH. En el tiempo que los perfiles de crecimiento del dominante y los folículos subordinados empiezan a divergir, alrededor de 2 días después de la emergencia de la onda, el folículo destinado para volverse dominante aparentemente tiene más receptores a LH y la ventaja competitiva sobre los folículos subordinados.

Sin embargo, los folículos subordinados pueden adquirir dominancia si el folículo dominante original es removido (Adams et al., 1993; Gibson et al., 1997) o si se aplica FSH exógena (Adams et al., 1993).

2.2.3.-Dominancia

La dominancia folicular al parecer puede ser controlada por un número de mecanismos que actúan acopladamente. Estos incluyen alteraciones en la concentración periférica de FSH por los estrógenos (E_2) y la inhibina secretada por el folículo dominante, lo cual puede inducir la producción de factores ováricos locales que inhiben el desarrollo de los folículos subordinados directamente (Armstrong y Web, 1997).

En la dominancia folicular una onda folicular se caracteriza por dos fenómenos:

- a) La divergencia en el crecimiento entre el folículo mayor y los subordinados y
- b) Una disminución del número de receptores de FSH, que es la hormona que permite que crezcan los folículos hasta ser ovulatorios (Rubianes, 2000).

La razón por la cual el folículo dominante puede crecer con bajos niveles de FSH, mientras que los subordinados se vuelven atrésicos, puede estar relacionada con la síntesis de receptores para LH en las células de la granulosa del folículo dominante. Todos los folículos poseen receptores a LH en las células de la teca y de FSH en las células de la granulosa pero sólo el folículo dominante adquiere receptores para LH en células de

granulosa. La LH se unirá a sus receptores de las células de la granulosa estimulando una mayor producción de estradiol que le permitirá al folículo seguir creciendo aunque disminuyan los niveles de FSH circulante (Bo, 2002).

Los mecanismos que regulan el proceso de selección y dominancia han sido estudiados ampliamente aunque no se tienen completamente entendidos. Se sabe actualmente que la capacidad de respuesta a gonadotropinas, la capacidad de producir estradiol (Webb et al., 1999), la participación del sistema de factor de crecimiento semejante a la insulina (IGF) (Rivera y Fortune, 2003) y el medio endocrinológico en el que se desarrollan (Webb et al., 1999), son factores importantes que determinan el destino de los folículos; esto debido a que todos los folículos que no son seleccionados sufren un proceso degenerativo conocido como atresia folicular mediante el cual son eliminados del ovario (Rosales, 1998). Por otro lado, si la lisis del CL coincide con la dominancia folicular en una de las olas, el folículo dominante podrá ovular, si esto no sucede, este folículo al igual que sus contemporáneos será eliminado del ovario por el proceso de atresia (Fortune et al., 2001).

2.3.-Atresia Folicular.

La atresia folicular es un fenómeno característico en la vida de los mamíferos, durante la vida reproductiva la mayoría de los ovocitos antes de llegar a la ovulación son eliminados mediante este proceso. El concepto atresia es un término griego que significa *a* = no, *tresos* = perforación. En el ovario se distinguen diversas fases de degeneración celular, como la degeneración de células germinales, que ocasiona la mayor parte de las pérdidas de ovocitos que se da en el ovario antes del nacimiento y de la degeneración folicular (atresia) en la etapa posnatal (Rosado y Rosales, 1991).

El conocimiento de los cambios y fenómenos fisiológicos relacionados con el crecimiento y degeneración de los folículos ováricos de varias especies (aves, bovinos, ratones, conejos y humanos), durante el ciclo estral ha tomado gran importancia en las dos últimas décadas. (Espinoza et al., 2007).

Se estima que al nacimiento, el número de ovocitos en ambos ovarios varía (60 000 a 80 000) de acuerdo con la especie y la raza. Sin embargo, no todos estos ovocitos serán capaces de alcanzar el estado maduro. Por cada ovocito que madura y es ovulado, varios inician su desarrollo pero nunca llegan a la maduración, por tal motivo cualquier ovario normal contiene un gran número de ovocitos en degeneración dentro de los folículos que no pudieron alcanzar su desarrollo total (Kaipia y Hsueh., 1997; Markström et al., 2002).

Hasta el momento no se conocen con precisión las causas que desencadenan o determinan la atresia folicular, sin embargo, su universalidad permite suponer que se trata de un proceso de selección de los gametos el cual está sujeto a una cuidadosa regulación y nunca interfiere con la reproducción normal de las hembras, lo cual permite suponer que se trata de un proceso indispensable para que sólo se realice la maduración de los ovocitos que serán ovulados (Guthrie et al., 1994; Guthrie et al., 1995; Jolly et al., 1997).

En la degeneración folicular del ovario, mejor conocida como atresia, se ha involucrado un proceso muy importante llamado apoptosis, siendo la degeneración de las células de la granulosa la más estudiada (Flores-Pérez et al., 2005). En la atresia folicular se encuentran implicados diversos factores reguladores locales, como las hormonas esteroides sexuales, factores de crecimiento, las citocinas y las gonadotropinas hipofisarias FSH y LH.

En la presentación del fenómeno de muerte celular programada, las hormonas son de gran importancia al participar como factores inhibidores o promotores de 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 (Markström et al., 2002; Flores-Pérez et al., 2005).

Como se mencionó, la atresia ocurre durante todos los estadios del desarrollo folicular; pero en folículos antrales es en los que se da el mayor punto de pérdida de cohortes de folículos en crecimiento. Aun así, algunos autores mencionan que una suficiente exposición del folículo antral a FSH es el mejor estímulo para escapar de la atresia y alcanzar el estado preovulatorio (Hurwitz y Hadái., 1992, Kaipia y Hsueh., 1997).

Atresia Folicular durante el desarrollo folicular

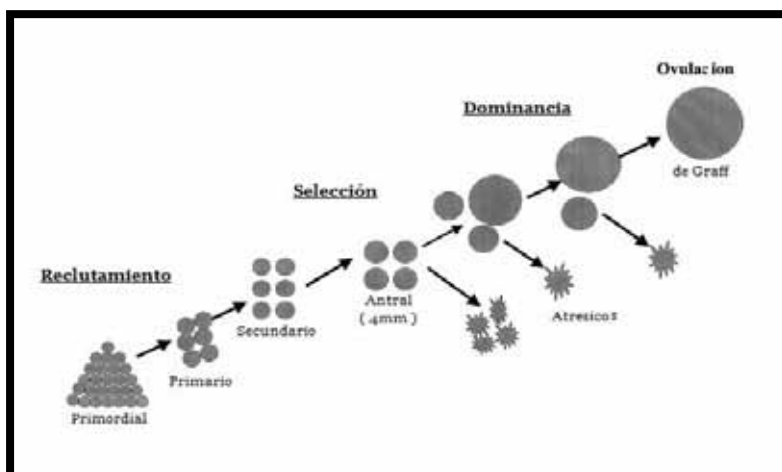


Figura 1.- Durante la vida fetal, las células germinales migran del epitelio de la bolsa vitelina a la cresta genital. Durante la migración los folículos primordiales proliferan y su supervivencia es dependiente de factores de sobrevivencia. En el ovario fetal, las ovogonias continúan proliferando. Las primeras fases de proliferación son caracterizadas por una masiva apoptosis de células germinales (muerte celular). Cerca del nacimiento, la mitosis cesa cuando las células entran en la meiosis. Durante la vida postnatal temprana, el ovocito se rodea por células somáticas foliculares, y el ovario es dotado de un número fijo de folículos primordiales. Pequeños grupos de folículos primordiales de la reserva original se reclutan a lo largo de la vida reproductiva, considerando que la mayoría de estos folículos permanecen arrestados en la fase inicial del desarrollo. Una vez que se reclutan cohortes de folículos para reiniciar su crecimiento, en la etapa preantral se encuentran destinados a sufrir apoptosis a menos que sean rescatados por factores de supervivencia y lleguen hasta la ovulación. Los folículos seleccionados maduran y ovulan en respuesta a la ola de gonadotropinas preovulatorias. Los ciclos de reclutamiento, atresia y/u ovulación siguen repitiéndose continuamente hasta que la reserva folicular se agota, así la señalización desencadena la senescencia reproductiva. (Kaipia y Hsueh, 1997).

En condiciones naturales, la atresia es un proceso paulatino e irreversible de degeneración folicular. Rosado y Rosales, (1991), han propuesto que las alteraciones morfológicas de un folículo en degeneración dependen del grado de atresia alcanzado. En la atresia, destacan diversos cambios morfológicos e histológicos, como son: núcleos picnóticos y/o fragmentación nuclear en las células de la granulosa, desprendimiento de las células de la granulosa por la pérdida de la matriz extracelular, desprendimiento del complejo cumulus-ovocito y en algunos casos hipertrofia en las células de la teca (Sharma., Además, ocurren procesos bioquímicos como la reducción en la síntesis y cantidad de ADN en células de la granulosa (Greenwald 1989; Rosales et al., 2000), pérdida de uniones comunicantes, así como la disminución de receptores a gonadotropinas (Tilly et al., 1992).

Es importante resaltar que durante la atresia se produce el aumento en la expresión de varios genes, entre ellos, el de las proteínas unidoras del factor de crecimiento semejante a

la insulina (IGBPs), el de la catepsina-D y el del receptor para la angiotensina II (Murdoch.,1992). Además, en la atresia participan enzimas lisosomales (fosfatasa ácida y glucosaminidasa) (Rosales et al., 2000), las involucradas en la remodelación tisular como colagenasas, Pz-peptidasa (García et al., 1997) y el activador del plasminógeno entre otras (Froment et al., 2003). Se han realizado diversos estudios bioquímicos, moleculares e inmunológicos, en los que se ha demostrado la fragmentación inter nucleosomal del ADN en las células foliculares, lo cual ha permitido conocer que la apoptosis es el tipo de muerte preponderante en la atresia, aunque no el único (Alonso- Pozos et al., 2004).

2.3.1.-Clasificación Histológica y Morfológica de la Atresia.

En estudios histológicos, se han propuesto varias maneras de clasificar la atresia folicular. Una de las más usadas es la descrita por Hsueh et al., (1994), quienes proponen la clasificación en tres grupos:

Sanos:

Se refiere a los folículos no atrésicos o sanos, que presentan una capa granulosa íntegra y uniforme. Las células de la teca son completamente evidentes y están en contacto con la granulosa, la membrana basal está intacta.

Atresia inicial:

Se encuentran algunas áreas discontinuas en la capa granulosa, provocadas por el desprendimiento de algunas células, la membrana basal se conserva intacta.

Atresia avanzada:

Se observa una gran región de perforaciones de la capa granulosa, existe un menor número de células de la granulosa seguramente porque han sido fagocitadas por macrófagos, el ovocito comienza a separarse de la pared folicular, se presenta una separación parcial de la teca interna.

Otros autores han clasificado a los folículos dentro de tres categorías dependiendo de sus características morfológicas (Rosales et al., 1997, Alonso-Pozos 2003):

Sanos:

En este grupo se incluyen los folículos con apariencia translúcida, buena vascularización y capa granulosa regular.

Atresia inicial:

Se incluyen los folículos que presentan apariencia grisácea o que han perdido su apariencia translúcida, pero que todavía presentan circulación sanguínea y escasos desprendimientos de la capa granulosa.

Atresia avanzada:

Se incluyen los folículos claramente atrésicos, cuya apariencia opaca obedece a que la mayor parte de los vasos sanguíneos se encuentran vacíos, así como la presencia de grandes desprendimientos de la granulosa y en casos severos desprendimiento del ovocito.

Uno de los eventos fundamentales que presentan los folículos antrales que sufren atresia, es la muerte tanto de las células epiteliales como del ovocito. Aunque algunos autores han propuesto desde hace más de una década, que la apoptosis es el único tipo de muerte que ocurre en la atresia (Hughes y Gorospe, 1991; Tilly et al., 1991), existen resultados que sustentan que en la atresia participa más de un tipo de muerte (Alonso-Pozos et al., 2003; Rosales-Torres et al., 2000; D'Herde et al., 1996; Kovacs et al., 1992).

2.4.-Muerte celular en la Atresia Folicular.

La muerte celular tiene un papel muy importante en los eventos biológicos de los organismos. Existen principalmente dos formas de muerte celular que son habituales en el organismo: necrosis y apoptosis, las características morfológicas de ambas, permiten, en la mayoría de los tejidos establecer claras diferencias.

La apoptosis y la necrosis frecuentemente ocurren simultáneamente en una amplia variedad de condiciones patológicas, como en los cultivos celulares expuestos a activadores

fisiológicos, traumas físicos o toxinas y químicos. Algunos tipos de daños pueden inducir apoptosis o necrosis, por lo que si un modo de muerte celular es preferido sobre el otro usualmente depende de la severidad del daño y de las características de la célula blanco. La percepción de que la apoptosis y la necrosis son una forma funcionalmente opuesta de muerte celular está debilitándose; un acuerdo general es que ambas formas de muerte celular están constituidas por características divergentes, sin embargo ambos procesos forman parte de uno mismo (Padanilam, 2002).

La morfología de una célula necrótica es muy diferente a una célula que sufre apoptosis clásica, tanto en cambios estructurales en el citoplasma como en el núcleo. Los principales rasgos característicos de la necrosis son condensación de la cromatina, hinchazón y degeneración del citoplasma y la matriz mitocondrial, rompimiento de la membrana plasmática y eventual expulsión del contenido citoplasmático en el espacio extracelular.

Al contrario, en la apoptosis el ADN se fragmenta, se forman vesículas en la superficie celular, las caspasas se activan permitiendo la permeabilidad de la mitocondria y liberando así elementos proapoptóticos (Kerr et al., 1995).

A continuación se describen con mayor detalle las características de cada uno de los dos tipos de muerte celular.

2.4.1.-Necrosis

La necrosis es el modo prominente de muerte celular que ocurre en diversas condiciones neurodegenerativas y como una consecuencia a la lesión isquémica en diversos órganos incluso el cerebro y corazón. Se ha pensado que la necrosis es un proceso "pasivo" que ocurre como consecuencia de una aguda falta de ATP. Muchos canales iónicos dependientes de ATP se vuelven inefectivos, llevando a la pérdida de la homeostasis, ruptura del citoesqueleto de actina, hinchazón celular, y eventualmente el colapso de la célula. Informes recientes sugieren que además de los mecanismos pasivos, existen mecanismos "activos" que pueden participar también en el proceso de necrosis (Carini et al., 1995).

En la isquemia o en el daño hipóxico, la falta de energía ocurre por la carencia de producción de ATP, combinada con el rápido consumo de ATP por la bomba de iones o a través de la hidrólisis y pérdida a través de la membrana celular. El incremento en las causas que provocan la necrosis se inicia por la entrada de Na^+ y liberación de ATP debido a la filtración de la membrana. El incremento de los niveles de sodio en el citosol activa la ATPasa de Na^+/K^+ , produciendo la disipación del ATP. En el estado inicial de la lesión, una salida de K^+ mantiene la homeostasis del ion. La falta de ATP produce falla en la bomba y por consecuencia la pérdida del mecanismo regulador, produciendo una entrada de Na^+ y agua resultando en el hinchamiento y colapso de la célula. Así la carga excesiva de Na^+ , concomitantemente con la pérdida severa de ATP, parecen ser el mayor determinante del desbalance necrótico. (Carini et al., 1995).

Se sabe que la mitocondria participa en la muerte necrótica y en la apoptótica provocando la permeabilidad de los poros. Actualmente se ha reportado que algunos segundos mensajeros como la ceramida y proteínas proapoptóticas como el Bcl2 pueden inducir la permeabilidad de la mitocondria (Padanilam, 2002).

2.4.2.-Apoptosis

Por el contrario la apoptosis o muerte celular programada, es un proceso genéticamente regulado, que juega un papel esencial en el desarrollo y la homeostasis de organismos mayores. Este proceso puede ser disparado por una gran variedad de señales de muerte, tales como ligandos y la interacción con sus receptores, problemas en el metabolismo de energía y potencial redox, generación de ceramidas, movilización de Ca^{++} y activación o inactivación de proteínas de la familia de Bcl-2 (Chen et al., 2003). La señal de muerte dispara el proceso de apoptosis, alterando el balance entre factores pro y anti-apoptóticos (Lu et al., 2005).

Los cambios morfológicos durante la apoptosis han sido bien caracterizados e incluyen, encogimiento celular, desaparición de microvellosidades, formación de vesículas en la superficie celular que contienen organelos, condensación de la cromatina nuclear y

fragmentación nuclear. La fragmentación internucleosomal del DNA genómico produce fragmentos de 185-pb o múltiplos a lo que se les denomina oligonucleosomas (Arends et al., 1990; Rosales et al., 2000). Finalmente, las células se separan en pequeños cuerpos envueltos en membrana a los que se les denomina cuerpos apoptóticos (Kerr et al., 1972; Jones y Gores, 1997; Willingham, 1999; Lu et al., 2005). Estos cuerpos apoptóticos, son fagocitados por macrófagos o células vecinas para eliminar del cuerpo a las células muertas y así evitar una respuesta inflamatoria (Qin et al., 2005). La apoptosis es difícil de detectar *in vivo* debido a que los cambios morfológicos ocurren rápidamente (entre 2 y 4 h) y los cuerpos apoptóticos son rápidamente fagocitados y removidos del tejido. Los cuerpos apoptóticos presentes en la membrana plasmática exponen constituyentes intracelulares hacia el espacio extracelular para favorecer la fagocitosis (Blake y Gores, 1997).

Histológicamente durante la apoptosis se pueden observar, vacuolización citoplasmática, condensación de cromatina y aparición de cuerpos apoptóticos rodeados por una masa de citoplasma (Hussein et al., 2005).

Las características bioquímicas de la apoptosis incluyen, cambios en la orientación de los fosfolípidos de membrana (pérdida de la asimetría), alteraciones en la homeostasis de los iones intracelulares, activación de proteasas y endonucleasas que degradan proteínas y DNA respectivamente y generación de ceramidas (Blake y Gores, 1997).

En células de mamíferos la cascada de señales que culminan con la muerte celular por apoptosis puede ser dividida en dos grandes vías: la intrínseca o mediada por la mitocondria y la extrínseca o mediada por señales extracelulares que disparan los mecanismos de muerte (Putchá et al., 2002; Zacks et al., 2004). Aunque los mecanismos que disparan una u otra vía son diferentes, el objetivo en ambos casos es la activación de pro-caspasas y la desestabilización de la función mitocondrial. La cascada de las caspasas (por sus siglas en inglés: **C**itosolic **A**spartate-**S**pecific **P**rote**ASAS**), es el centro de la progresión de la apoptosis. Estas enzimas, son una subclase de proteasas que rompen a su sustrato después de un residuo de ácido aspártico. Estas proteasas, son sintetizadas como enzimas inactivas

(pro-caspasa). En mamíferos, al menos 13 caspasas han sido identificadas y se han clasificado en iniciadoras y efectoras (Ho y Hawkins, 2005).

Las caspasas iniciadoras (caspasas 8, 9 y 10), son activadas por autoproteólisis en respuesta a señales de muerte, las caspasas efectoras (caspasas 3, 6 y 7), son activadas por las caspasas iniciadoras e inician la digestión proteolítica de la célula para finalizar con la muerte de la misma. Dentro de las proteínas que son sustrato de las caspasas, se encuentran, proteínas inhibidoras de caspasas de DNA activas, ADN polimerasa, Bcl-2, laminina y varias proteínas de unión al citoesqueleto (Affar et al., 2001). El rompimiento de estas proteínas ocasiona: fragmentación del DNA, inhibición de la síntesis y reparación del DNA, daño de la membrana nuclear, condensación de la cromatina y colapso del citoesqueleto (Crow et al., 2004; Lu et al., 2005).

La participación simultánea de apoptosis y necrosis en la maduración y atresia folicular de la oveja (Rosales-Torres et al., 2000; Alonso-Pozos et al., 2003) y en otras especies como la gansa (Kovacs et al., 1992) y la codorniz (D'Herde et al., 1996), es el resultado de la intensidad y del tipo de estímulo que reciben las células foliculares.

Estudios realizados en la oveja, han encontrado que la participación preponderante de uno o de otro tipo está relacionada con el tamaño folicular. (En los folículos de mayor tamaño > 6 mm) se encontró que la actividad de las enzimas lisosomales, fosfatasa ácida y glucosaminidasa aumentan con el grado de atresia, mientras que en folículos pequeños (3-6 mm), en los que el tipo primario de muerte era apoptosis, la concentración de estas enzimas se encontraba significativamente baja comparada con los folículos grandes y sólo existían cambios importantes en atresias muy avanzadas (Alonso-Pozos et al., 2003). Esta diferencia en el comportamiento de las enzimas lisosomales, probablemente es debida a la existencia de diferentes estímulos para cada tamaño folicular o a la intensidad con la que cada folículo recibe un mismo estímulo como ocurre en otros sistemas (Columbano, 1995 ; Zamzami et al., 1995; Lemasters et al., 1998; Renvoize et al., 1998).

Otros autores también han demostrado que un evento temprano en la muerte celular independientemente del tipo de ésta, es el cambio en la distribución de los fosfolípidos de

la membrana (Tepper et al., 2005). En los últimos años se ha propuesto que la cantidad de ceramida que se produce en una célula puede ser un importante indicador de la vía de muerte que seguirá (Hetz, 2002).

2.5.-La Ceramida en la Muerte Celular.

Las ceramidas son lípidos biológicamente importantes, derivados de la formación de la unión entre un péptido, una esfingosina y un ácido graso. Las ceramidas están implicadas en la apoptosis de dos maneras. Primero, ellas transmiten la señal apoptótica hacia los receptores de señalización apoptótica, como el receptor 1 del factor de necrosis tumoral (TNFR1), caspasas, cinasas dependientes de ciclinas, telomerasas y la membrana mitocondrial. Segundo, ellas pueden participar directamente en la apoptosis formando grandes canales (proteína-permeables) que habilitan la liberación del citocromo *c* de la mitocondria el cual dispara la activación de las caspasas. Adicionalmente, las ceramidas pueden formar balsas de lípidos en la membrana plasmática que lleva al agrupamiento de los receptores Fas y TRAIL (ligando relacionado al TNF que induce apoptosis) reforzando la señalización apoptótica (Dicker et al., 2005).

Un gran número de enzimas están involucradas en el metabolismo de las ceramidas. La esfingomielinasa neutra y la ácida (nSMases y aSMases que convierten esfingomielina a ceramida), la ceramidasa ácida (que convierte la ceramida a esfingosina) y enzimas como la dihidroceramida desaturasa (DHCD), las cuales median la síntesis *de novo* de las ceramidas de dihidroceramida, han sido específicamente implicadas en el bloqueo de la apoptosis dependiente de ceramida. Es conocido, desde hace mucho tiempo que los ovocitos sin fertilizar están programados para sufrir apoptosis después varias horas y que la concentración de ceramida en los ovocitos es superior a la reportada en células circundantes. Además se han reportado incrementos en los niveles de ceramida en los ovocitos viejos que sufren apoptosis (Eliyahu et al., 2007; Savtchouk et al., 2007).

La ceramida induce la apoptosis por tres mecanismos generales. Primero, receptores de muerte como CD95, DR5, o TNF son activados y disparan la apoptosis. Segundo, los estímulos no atribuibles a los receptores, como la irradiación, choque calórico, drogas

citotóxicas, especies reactivas a oxígeno, toxinas, luz UV, bacterias, y virus, participan en la muerte. Finalmente, el tercer mecanismo, es la carencia de factores de crecimiento en las células o la ruptura del contacto celular con su matriz, induce la muerte celular. Se ha reportado que la ceramida tiene un papel importante en los tres mecanismos (Gulbins y Li., 2006).

2.5.1.-Muerte mediada por receptores.

Los receptores CD95 pueden servir como un paradigma para la apoptosis mediada por receptores. Se ha mostrado que la esfingomielinasa ácida activa la liberación de ceramida y la formación de balsas enriquecidas en ceramida en la membrana que median la agrupación del receptor. La estimulación de CD95 activa la translocación de esfingomielinasa ácida (almacenada intracelularmente), a la cara externa de la membrana celular (Grassmé et al., 2002). La agrupación de receptores en balsas de ceramida, fue descrita recientemente en seis grupos independientes y que ocurre en segundos en células Jurkat, SKW 6.4 y células de linfoma JY B, células de linfoma, epiteliales y células de granulosa de ratona y esplenocitos y hepatocitos.

Los estudios demuestran que el agrupamiento de los CD95 va desde segundos a minutos en todos los tipos de células mencionadas anteriormente. Además, el agrupamiento de los CD95 fue detectado después de la estimulación de las células usando como agonistas anticuerpos anti-CD95 (CH11, APO-1-3 y JO2) (Fanzo et al., 2003). Los CD95 agrupan las balsas enriquecidas de ceramida en la membrana y son esenciales para inducir la apoptosis, la cual ha sido evidenciada en estudios *in vivo* como *in vitro*. Estudios genéticos han demostrado que las células deficientes en esfingomielinasa ácida presentan defectos en la liberación de ceramida cuando los CD95 son estimulados y dichas células son resistentes a la apoptosis; la adición de C16-ceramida natural a una concentración nanomolar (nm), a este tipo de células induce la apoptosis disparada por el receptor CD95 (Cremestri et al., 2001).

En estudios *in vivo* con ratones knock-out deficientes en esfingomielinasa ácida revelaron una reducción de más de 10-veces de la apoptosis en los hepatocitos y linfocitos periféricos, cuando fueron estimulados vía CD95. Estos resultados demostraron alta susceptibilidad en los ratones normales y proveen evidencias de la importancia fisiológica de esfingomielinasa ácida en la apoptosis inducida por CD95 (Kirschnek et al., 2000). Además, se ha reportado que la neutralización de ceramida a nivel de los dominios membranales enriquecidos con ceramida, empleando anticuerpos anti-ceramida o proteínas que se unen a la ceramida o que destruyen las balsas, utilizando reactivos que interfieren con el colesterol celular previenen la apoptosis inducida por el receptor CD95 (Grassmé et al., 2001).

Igualmente, los animales deficientes de esfingomielinasa ácida fueron protegidos de la apoptosis inducida por el TNF- α en hepatocitos, de falla hepática y de la muerte (García-Ruiz et al., 2003). Este modelo esboza la función de los dominios membranales enriquecidos con ceramida para que CD95-dispare la apoptosis. Las moléculas de CD95 parecen incluso existir en la célula antes de unirse al ligando en un estado pretrimerizado (Siegel et al., 2000). El Ligando que se une a las moléculas de CD95 pretrimerizado inician un débil reclutamiento de FADD y estimulación de caspasa 8 (aproximadamente de 1% de máxima actividad) pero suficiente para translocar y activar la esfingomielinasa ácida, pero insuficiente para activar la apoptosis. La generación de dominios membranales enriquecidos con ceramida para agrupar al receptor permite tener una alta densidad de los mismos dentro de un área pequeña de la membrana celular y activar completamente la caspasa 8. El agrupamiento mediado por la ceramida de los trímeros dispersos de receptores CD95, es un prerrequisito para la transactivación de caspasa 8 y finalmente, inducir la apoptosis por el CD95 (Grassmé et al., 2003).

2.5.2.-Muerte inducida por estímulos estresantes.

La función de la esfingomielinasa ácida y los dominios membranales enriquecidos con ceramida no solo están restringidos a la muerte por apoptosis inducida por receptores, también aplica a la muerte celular disparada por estímulos-estresantes. En particular, la

esfingomielinasa ácida ha mostrado tener un papel importante para la inducción de la muerte celular por radiación gamma (Santana et al., 1996) y luz UV-A y UV-C (Charruyer et al., 2005).

Algunos estudios han demostrado que la radiación gamma induce una activación muy rápida de la esfingomielinasa ácida y liberación de ceramida. Por ejemplo, linfocitos T y B, fibroblastos de embrión, ovocitos y células endoteliales deficientes en esfingomielinasa ácida no fueron capaces de liberar ceramida cuando fueron irradiadas mostrando ser resistente a la radiación gamma para inducir la muerte celular. Estos hallazgos fueron demostrados en ratones deficientes en esfingomielinasa ácida, los cuales al ser sometidos a radiación gamma, no generaron ceramida en las células endoteliales del pulmón, intestino delgado y cerebro demostrando resistencia al daño. En células U87-W E6, el SR33557 que es un inhibidor de esfingomielinasa ácida, suprimió la activación de las caspasas inducidas por la radiación de las células, por lo que las células presentaron apoptosis (Hara et al., 2004).

Finalmente, algunas sustancias quimioterapéuticas matan las células tumorales mediante la activación de la esfingomielinasa ácida y la formación de dominios membranales enriquecidos con ceramida, en particular la cisplatina y doxorubicina. El cisplatina ha mostrado estimular la esfingomielinasa ácida que activa la liberación de ceramida y la formación de los dominios membranales enriquecidos con ceramida que sirven para la acumulación del CD95 y ejecutar la muerte. Por otra parte, la nistatina es un agente secuestrador de colesterol previene el agrupamiento de CD95 inducido por la cisplatina disminuyendo la sensibilidad en células HT29 a la apoptosis inducida por la cisplatina o por la sinergia entre cisplatina y anticuerpos agonistas anti-CD95 (Lacour et al., 2004).

2.5.3.- Muerte mediada por pérdida de factores de crecimiento.

La separación de células de la matriz extracelular e interrupción de señalización por las integrinas produce apoptosis, dicha interrupción recibe el nombre de anoikosis (apoptosis inducida por separación celular). Recientemente se determinó que la inhibición de integrinas $\alpha_v\beta_3$ y $\alpha_v\beta_5$ (esenciales para la sobrevivencia endotelial y la angiogénesis)

produce la activación de la esfingomielinasa ácida y liberación de ceramida, la cual fue revertida por la inhibición farmacológica de la esfingomielinasa ácida utilizando desipramina e imipramina. Ambas drogas también inhiben la apoptosis inducida por la inhibición de integrinas, indicador de que la activación de integrinas protege a las células de la muerte al inhibir a la esfingomielinasa ácida y por lo tanto la liberación de ceramida (Erdreich-Epstein et al., 2005).

2.6.-La Ceramida en la Atresia Folicular.

La primera evidencia del papel que juega la esfingomielinasa ácida en el desarrollo de la muerte celular del folículo, la proporcionó Morita et al., 2000, quienes mostraron que folículos de ratonas deficientes en esfingomielinasa ácida eran protegidos de la muerte celular. En las ratonas alrededor del 80% de todas las células foliculares sufren muerte celular y un proceso similar ocurre en las mujeres. La deficiencia genética de esfingomielinasa ácida previno y retardó el desarrollo de la apoptosis en folículos produciendo hiperplasia del ovocito al nacimiento, lo cual demuestra una función fundamental de esta enzima en la apoptosis del (Morita et al., 2000). Estudios recientes han demostrado que las células del cúmulus que rodean al ovocito son las productoras de ceramida que es transferida al ovocito vía las uniones comunicantes (Pérez et al., 2005).

Un evento común en la muerte celular es la alteración de lípidos y fosfolípidos en la membrana celular. El movimiento transmembranal de la esfingomielina durante la apoptosis determina la disponibilidad del sustrato y así controla la formación de ceramida. La producción de altos niveles celulares de ceramida produce la movilización de fosfatidilserina hacia la cara externa de la membrana, que normalmente se encuentra en la cara interna. La exposición de fosfatidilserina es una consecuencia directa de la pérdida de la asimetría de la membrana plasmática. Otra característica importante en la exposición de la fosfatidilserina en la cara externa de la membrana celular es que sirve de reconocimiento para la fagocitosis por los macrófagos. Además, se ha mostrado que el rompimiento de esfingomielina causa liberación de colesterol y que esto significa alteración de las propiedades físicas de la membrana plasmática, la cual es un prerequisite para la vesiculación en la superficie de la célula apoptótica (Tepper et al., 2000).

En la necrosis este movimiento de fosfolípidos es acompañado por cambios en la permeabilidad de la membrana que le ocasionan un desequilibrio hídrico e hinchamiento celular. La ceramida dependiendo del nivel de concentración que alcance dentro de una célula, puede ocasionar la muerte por apoptosis o necrosis (Garcia-Ruiz et al., 1997). Este lípido, modula la activación de un gran número de proteínas que pueden promover la muerte celular. Las modificaciones intracelulares de la concentración de ATP pueden servir como un posible mecanismo que induce la muerte por apoptosis o necrosis. La ceramida además, pueden modular directamente la función mitocondrial, inhibiendo el complejo respiratorio III, por lo tanto se ha propuesto que si la concentración de ceramida en una célula es lo suficientemente alta para producir un daño importante en la mitocondria que disminuya los niveles de ATP disponibles, entonces la célula morirá por necrosis mientras que cuando los niveles de ceramida no son suficientes para producir la catástrofe energética, la muerte ocurrirá por apoptosis (Garcia-Ruiz et al., 1997; Hetz et al., 2002).

Estas observaciones han llevado a proponer que las ceramidas podrían jugar un papel importante en la atresia folicular. La muerte celular en los ovarios, inducida por ceramida puede estar regulada en diversos puntos del proceso, dependiendo del estímulo o inductor de muerte. Las ceramidas pueden ser metabolizadas por ceramidasa y generar esfingosina, la cual también se ha propuesto que se produce durante los estadios tempranos de la apoptosis y que la esfingosina es capaz de inducir apoptosis cuando es administrada de forma exógena a muchos tipos de células. La esfingosina, a su vez, puede ser fosforilada por la esfingosina cinasa para formar S-1P. Por el contrario, S-1P ha sido involucrada como molécula de señalización que antagoniza los efectos de la ceramida en la apoptosis mediada por este lípido. Se ha propuesto un modelo en el cual el balance entre el nivel intracelular de ceramida y S-1P (el “equilibrio ceramida/S-1P”), podría determinar si una célula sobrevive o muere (Cuvillier et al., 1996). De acuerdo con este modelo, la regulación de las actividades de ceramidasa, esfingosina cinasa y la fosfatasa S-1P que determinaran la proporción intracelular de ceramida, esfingosina y S-1P, puede jugar un papel importante en la regulación de la apoptosis (Cuvillier, 2002).

2.7.-Técnicas utilizadas en el desarrollo de este trabajo.

Durante la realización de este trabajo se llevaron a cabo tres metodologías para determinar la presencia de la ceramida en folículos de oveja sanos y atrésicos. A continuación se describe el fundamento de cada una para conocer sus beneficios.

2.7.1.-Inmunohistoquímica

La Inmunohistoquímica (IHQ) es una técnica integral que tiene como fundamento el uso de anticuerpos para localizar epítopes (os) específicos en secciones de tejido. Desde la década pasada se ha mejorado la habilidad para detectar antígenos (Ag) en secciones de tejido principalmente para tratar de evitar los efectos nocivos del formaldehído e incrementar la sensibilidad de los sistemas de detección.

La IHQ se basa en la utilización de un anticuerpo específico, previamente marcado mediante un enlace químico con una enzima que hace visible el complejo antígeno-anticuerpo. El complejo antígeno anticuerpo, mediante la utilización de alguna de las técnicas específicas (peroxidasa antiperoxidas, fluoresceína, etc) permite ser localizado e identificado dentro de la muestra a estudiar (Ramos-Vara., 2005)

2.7.2.-Citometría de Flujo

La citometría de flujo es una metodología con gran potencial para el estudio de poblaciones celulares y actualmente es una herramienta para la investigación básica y clínica. Consiste en la cuantificación de células individuales a través de colocarlas en un sistema de fluidos exponiéndolas a un haz de luz laser excitada que al sufrir desviación, proporciona a través de su registro, información cuantitativa sobre sus características particulares.

El citómetro de flujo por lo tanto utiliza una combinación de componentes fluidicos, ópticos y eléctricos. La información que se puede obtener es, tamaño celular relativo, granularidad o complejidad interna e intensidad relativa de emisión de hasta cinco fluorescencias a la vez, dependiendo del equipo, cada uno de estos fluorocromos puede estar unido a anticuerpos , además se pueden intercalar a ácidos nucleicos o bien pueden estar unidos a moléculas que al interactuar con otras emiten fluorescencia , estas

características son detectadas usando un sistema óptico-electrónico acoplado que registra como las células desvían la luz del láser y como emiten fluorescencia. Las señales eléctricas generadas son digitalizadas y almacenadas en la memoria de una computadora y pueden ser analizadas con diferentes programas o software.

2.7.3. Cromatografía en Placa Fina

La cromatografía en capa fina es un caso de cromatografía de reparto en la que los componentes de una mezcla se separan por diferencias en su solubilidad entre dos sistemas disolventes. Los elementos del sistema cromatográfico son: soporte, fase estacionaria (disolvente A), y fase móvil o eluyente (disolvente B). El parámetro experimental asociado a la técnica es el R_f (coeficiente de reparto), relacionado con la solubilidad relativa de un compuesto entre la fase estacionaria y la fase móvil, lo que depende de su estructura química y su hidrosolubilidad/liposolubilidad.

En la cromatografía en capa fina, CCF o TLC ("thin-layer chromatography, en la terminología inglesa) se puede utilizar como soporte cualquier sustancia que pueda dividirse en partículas finas y distribuirse uniformemente en forma de láminas. Esto incluye sustancias inorgánicas (gel de sílice, óxido de aluminio, silicato de magnesio, etc) y orgánicas (celulosa, poliamida, polietileno, etc). La utilización de soportes hidrófobos facilita la separación de compuestos no polares (lípidos) (Jorrín et al., 2000).

3.- PLANTEAMIENTO DEL PROBLEMA.

En los últimos años se ha destacado la importancia de la ceramida como segundo mensajero en la muerte celular y según los reportes de la literatura el nivel de concentración que esta pueda alcanzar dentro de la célula decidirá la vía de muerte por apoptosis o necrosis que seguirá una célula (Foghi et al., 1998).

Las ceramidas, pueden modular directamente la función mitocondrial, inhibiendo el complejo respiratorio III, por lo tanto si la concentración de ceramidas en una célula es lo suficientemente alto para producir un daño importante en la mitocondria que disminuya los niveles de ATP disponibles, entonces la célula morirá por necrosis mientras que cuando el nivel de ceramida no es suficiente para producir daño severo en la mitocondria, la muerte ocurrirá por apoptosis (Hetz et al., 2002).

La atresia folicular es el proceso por el cual desaparecen sin alcanzar la ovulación la gran mayoría de los folículos que pueblan un ovario, la muerte de las células foliculares es un evento fundamental dentro de este proceso degenerativo de los folículos. Aunque hay autores que proponen que la apoptosis es el único tipo de muerte que ocurre en la atresia folicular, resultados previos de nuestro grupo de investigación han presentado evidencias de la participación simultánea de apoptosis y necrosis y que la preponderancia de un tipo de muerte u otro dependen del tamaño del folículo, siendo la necrosis el tipo predominante en los folículos de 3 a 6 mm y la apoptosis en los mayores de 6 mm (Rosales-Torres A et al 2000; Alonso-Pozos et al 2003)

De acuerdo a lo anterior en este proyecto nos proponemos conocer las diferencias que existen en cuanto al porcentaje de células positivas a ceramida con respecto al grado de atresia y al tamaño folicular (menores de 4 mm y mayores de 4 mm) en la oveja.

HIPOTESIS

La presencia de ceramida aumentará con el grado de atresia en los folículos de la oveja y será mayor en folículos mayores de 4 mm que en los folículos menores de 4 mm de diámetro.

OBJETIVO GENERAL

Conocer el nivel de ceramida en folículos de ovejas sanos y atrésicos, pequeños y grandes

OBJETIVOS ESPECIFICOS

- Identificar la presencia de ceramida en folículos de oveja menores de 4 mm sanos, con atresia inicial y con atresia avanzada.
- Identificar la presencia de ceramida en folículos de oveja mayores de 4 mm sanos, con atresia inicial y con atresia avanzada.
- Evaluar las diferencias en concentración de ceramida entre tamaños y grados de atresia de folículos de ovejas.

4.- MATERIAL Y MÉTODOS

Este trabajo se realizó en el Laboratorio Bioquímica de la Reproducción de la Universidad Autónoma Metropolitana-Xochimilco (UAM-X), Laboratorio de Biología Celular (UAM-I), Laboratorio de Embriones de la Facultad de Medicina Veterinaria y Zootecnia (FMVZ) de la UNAM, así como en el Laboratorio de Patología del Instituto Nacional de Pediatría (INP).

Se implementaron tres técnicas cada una de ellas con diferentes alcances para conocer la participación de la ceramida en la atresia folicular. Las técnicas usadas fueron: 1) Inmunohistoquímica, que permitió la identificación *in situ* de ceramida a través del uso de un anticuerpo, para esta técnica además se usaron dos procedimientos de fijación del tejido, con paraformaldehído e inclusión en parafina y por congelación, 2) Citometría de Flujo, el análisis citométrico con el uso de tres fluorocromos a la vez, dos contenidos en el estuche comercial FAM-FLICA (Apoptosis Detection Kit Caspase Assay con Ioduro de Propidio) y el anticuerpo monoclonal contra ceramida utilizado en la Inmunohistoquímica y un anticuerpo secundario monoclonal IgM anti ratón marcado con Alofococianina (APC) permite conocer el contenido de ceramida de cuatro poblaciones celulares: células vivas, células apoptóticas, células con apoptosis tardía y células necróticas. 3) Posteriormente se determinó ceramida por Cromatografía en capa fina para lo cual se realizó la extracción de lípidos a partir de células de la granulosa y en el líquido folicular, utilizando como marcador de lípidos N-Octanoyl- Esfingosina y como marcador de ceramida Ácido piredodecanoico (P12), para calcular la concentración de ceramida contenida en cada muestra, se realizó la lectura en un espectrofluorómetro y se realizó una curva estándar.

4.1. Diseño experimental

Durante un año, se obtuvieron semanalmente ovarios de ovejas criollas adultas sin anomalías reproductivas aparentes, sacrificadas en el rastro “El Rojo” ubicado en Texcoco Estado de México, de las cuales se utilizaron 40 ovarios para cortes histológicos en parafina y 12 para cortes histológicos congelados (Inmunohistoquímica), 16 ovarios para la extracción de lípidos y determinación de ceramida por cromatografía en placa fina y 40 ovarios para la determinación de ceramida por citometría de flujo.

4.2. Procesamiento de la muestra para Inmunohistoquímica

Inmediatamente después de la obtención de cada ovario, se identificó y se hizo un esquema para localizar al folículo de mayor diámetro y los que le seguían en tamaño, esto con el propósito de orientar la inclusión y los cortes histológicos. De inmediato, los ovarios se fijaron en paraformaldehído al 10% a temperatura ambiente durante 48 horas, posteriormente se procesaron de acuerdo a lo siguiente: Los ovarios fueron colocados dentro de cassetes histológicos para deshidratarlos en concentraciones ascendentes de etanol (60%, 70%, 79%, 80%, 80%, 96%, 96%, 100%, 100%, xilol, xilol) y posteriormente embebidos en parafina (60 - 65°C) para formar bloques.

Los cortes histológicos de los bloques (4 cortes secuenciales de cada bloque) se realizaron en un micrótopo con un grosor de 2 micras y se montaron en laminillas con poli-l-lisina, identificándolas con el número del ovario correspondiente.

En la parte superior de cada laminilla se colocó el corte de ovario con el folículo de interés y en la parte inferior una biopsia de corazón de humano que sirvió como control positivo, debido a que se ha visto que este tejido tiene un alto contenido de ceramida (El Bawab, 2000) . Como testigo negativo se usó la biopsia de corazón sin segundo anticuerpo. Las laminillas se pusieron en una canastilla de acero inoxidable y se colocaron en la estufa a 60 °C por 30 min, ó el tiempo necesario para fundir la parafina.

Una vez fundida la parafina, se procedió a hidratar los cortes con 2 lavados de 5 min, en diferentes concentraciones de etanol (xilol, 100%, 96%, 80%, 70%, 60%, 50%) hasta llegar a agua destilada (H₂O destilada), de esta forma también fue eliminando el exceso de parafina.

Las laminillas con los cortes 1 y 3, se tiñeron con hematoxilina y eosina (HyE) con el objetivo de verificar si se encontraba la estructura deseable (folículos de mayor y menor tamaño) y asegurar la integridad del tejido.

4.2.1 Clasificación folicular morfológica

Los folículos fueron clasificados por su tamaño en dos grupos: folículos menores de 4mm y folículos mayores de 4mm.

El grado de atresia se determinó por el número e integridad de las capas de granulosa: 1) folículos sanos, con capa multilaminar de células de granulosa intacta y bien organizada; 2) folículos con atresia inicial, la capa de las células de granulosa delgada y en algunos casos llega parcial o completamente separada de la membrana basal, y 3) folículos con atresia avanzada, con una capa de células de granulosa desorganizada o con pérdida por completo de la capa de células de granulosa (Yang y Rajamahendran, 2000).

Clasificación histológica de la atresia en cortes histológicos de tejido en parafina

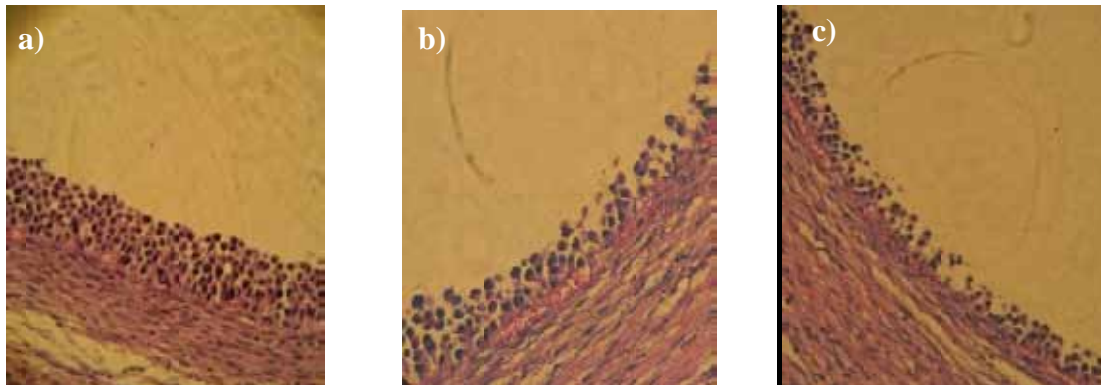


Figura 2. Tinción de hematoxilina-eosina, de los cortes histológicos en bloques de parafina mostrando su integridad de acuerdo a sus capas de granulosa, observada en microscopio de luz, con un aumento de 40x. a) Folículo sano; b) folículo con atresia inicial; c) folículo con atresia avanzada.

En las laminillas con los cortes 2 y 4 se realizó el desenmascaramiento del epítipo, que consiste en sumergir las laminillas en una solución de citrato de sodio la cual provoca que las proteínas que rodean al epítipo se desdoblén y este quede expuesto para ser reconocido con mayor facilidad por el anticuerpo.

Las laminillas se colocaron en un vaso de coplin que contenía 7 ml de una solución de citrato de sodio al 10 % pH6.5 (Bio SB 20X immuno/DNA retriever # catálogo. BSB 0021), el cual se introdujo en una olla de presión y se calentó en un microondas durante 5 min. (Para que la acción del citrato sea efectiva se debe de controlar 3 factores que son presión, temperatura y tiempo, es por eso que se utiliza este método de la olla de presión y

el microondas). El siguiente paso fue dar dos lavados a las laminillas con H₂O destilada para retirar el citrato de sodio.

Posteriormente las laminillas se colocaron en un sistema de capilaridad para Inmunohistoquímica (Shandon coverplates # catálogo 72110017, 73310017) con PBS (0.13 M) durante 4 minutos para permitir la aplicación de los reactivos por capilaridad. Una vez colocada cada laminilla en su soporte, se agregó peróxido de hidrógeno al 3 % por 5 min con la finalidad de bloquear la peroxidasa endógena del tejido y evitar alteraciones en la acción de los reactivos que contiene el sistema de detección. Se realizaron dos lavados con PBS para limpiar el tejido, cuando el PBS bajó completamente por capilaridad, se aplicaron a cada laminilla 10 µl de una dilución 1:25 de un anticuerpo monoclonal anti-ceramida producido en ratón clona MID 15B4, (ALEXIS Biochemical # de catálogo ALX-804-196) que tiene una concentración de 200µg/ml (Chi et al., 2004). Las laminillas se incubaron a temperatura ambiente durante 45 min. Al terminar la incubación, las laminillas se lavaron dos veces con PBS para retirar el exceso de anticuerpo. A continuación se aplicaron 10 µl de un anticuerpo secundario biotinilado (Biogenex, # cat. 94583, contra la región Fc de la inmunoglobulina de cuatro especies (ratón, conejo, cabra y hámster) desarrollado en cabra) por 30 minutos; se lavó nuevamente con PBS y se agregaron 100 µl del complejo HRP (estreptavidina-peroxidasa) durante 30 minutos (Biogenex # cat 945883).

Las laminillas se lavaron otras dos veces con PBS para realizar el revelado, se agregó un cromógeno, en este caso diaminobencidina DAB a una concentración de 1mg/ ml (Bio SB # cat BSB 0017) durante 2 minutos para que reaccionara con el complejo estreptavidina-peroxidasa expresando una coloración café en las células positivas a ceramida.

Al finalizar, las laminillas se deshidrataron sumergiéndolas en concentraciones descendientes de alcohol 2 veces (60%, 70%, 79%, 80%, 80%, 96%, 96%, 100%, 100%, xilol, xilol), se dejaron secar y se montaron con entelan.

La observación de cada una de las laminillas se realizó en microscopio óptico y se identificaron las células positivas en granulosa con la siguiente estrategia:

4.2.2. Conteo de células positivas a ceramida

De cada uno de los folículos seleccionados, se contaron 100 células de cuatro campos ópticos a 40X, elegidos tomando como referencia los cuatro puntos cardinales (norte, sur, este y oeste) en dirección a las manecillas del reloj. Una vez contados los cuatro campos de cada laminilla, se sacó un promedio de células positivas a ceramida de cada uno de los cuadrantes y este número fue tomado como valor de células positivas a Ceramida por folículo.

Campos contados de cada folículo

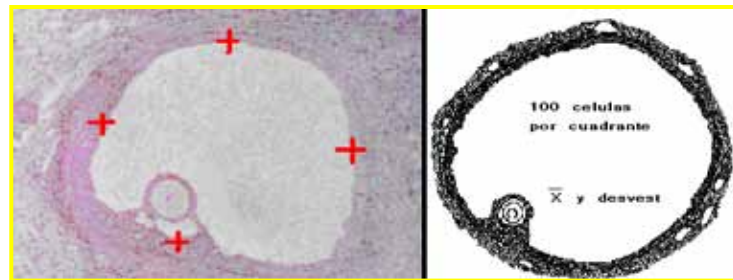


Figura 3. Esquematación de los cuatro puntos tomados por folículo para realizar conteo de células positivas a ceramida bajo microscopio de luz a 40x.

4.2.3. Intensidad en la expresión de Ceramida

La intensidad de tinción en la expresión de ceramida se clasificó de acuerdo a la intensidad del color presente en el citoplasma de las células de granulosa positivas a ceramida de cada folículo quedando de la siguiente manera: intensidad baja.- aquellas células de granulosa que en su citoplasma mostraran una tinción clara; intensidad media.- moderado, aquellas células de granulosa que en su citoplasma mostraran una tinción más fuerte que en la intensidad 1; e intensidad alta.- intenso, aquellas células de granulosa que en su citoplasma mostraran una tinción oscura. Este análisis se realizó por dos observadores y después se sacó el promedio de cada nivel de intensidad por folículo.

Intensidad de la expresión de ceramida en células de la granulosa.

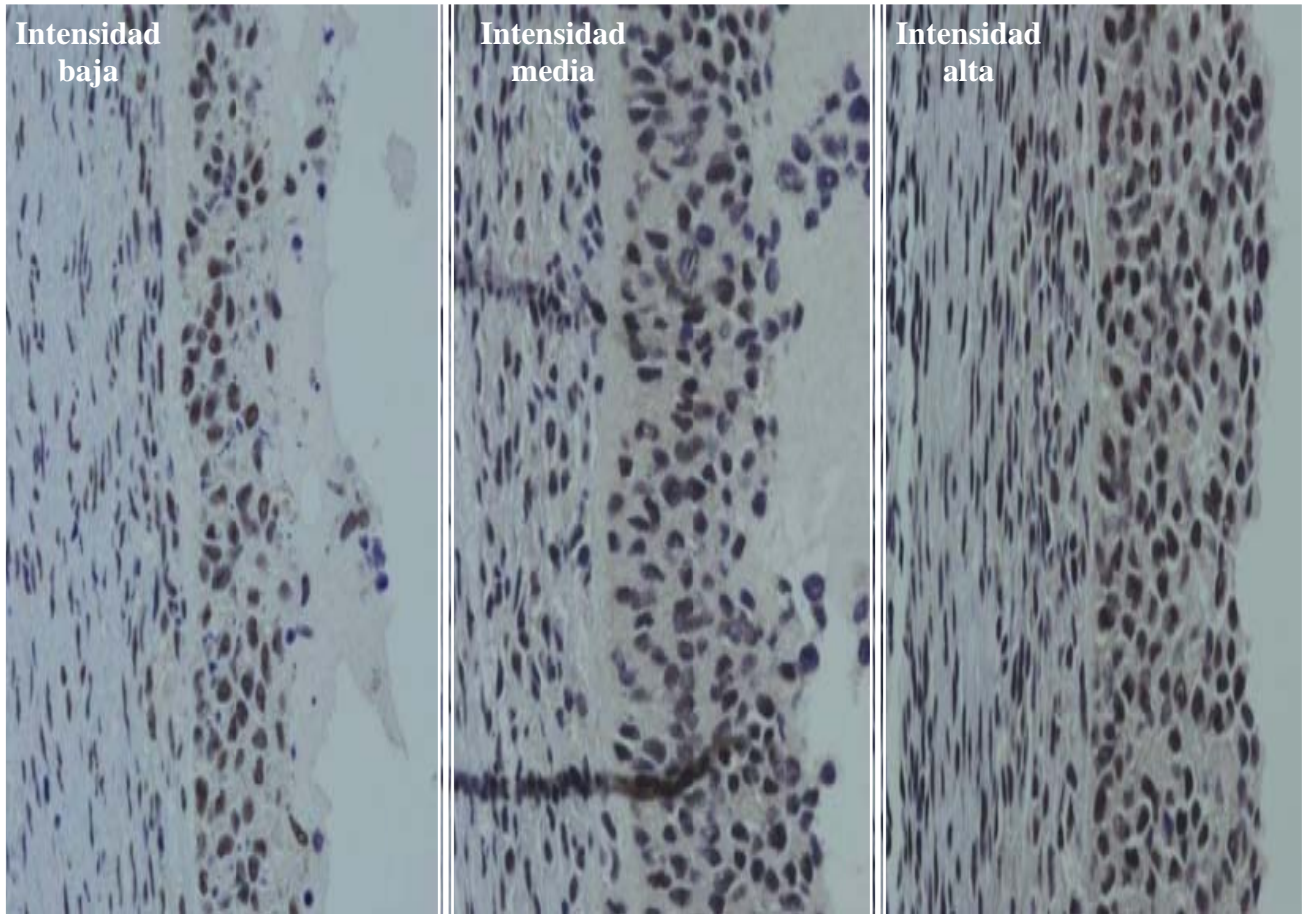


Figura 4. Niveles de intensidad dados a los folículos dependiendo de la expresión de la marca de las células positivas a ceramida observadas al microscopio de luz a 40x.

Muestras congeladas.

Para la determinación Inmunohistoquímica de ceramida en tejido congelado, se obtuvieron 12 ovarios de oveja, los cuales inmediatamente después de ser recuperados de los animales sacrificados se cubrieron con un crioprotector (Tissue-Tek) y se guardaron en nitrógeno líquido hasta su procesamiento.

Se realizaron 3 cortes de 5 micras cada uno por muestra en un criostato (36 laminillas). Los cortes se colocaron en laminillas con poli-l-lisina y se deslizaron rápidamente por una platina caliente para fijar el tejido.

Se realizó el mismo procedimiento empleado para la clasificación y localización de ceramida por Inmunohistoquímica en los ovarios no congelados.

Después de revelar las muestras con el cromógeno (diaminobencidina), 12 de las muestras se contra tiñeron con hematoxilina, se deshidrataron y se montaron con entelan, mientras que las otras 12 no se contra tiñeron, sólo se deshidrataron y se montaron. La inspección de las muestras se realizó en un microscopio de luz a 40X.

4.3. Procesamiento de la muestra para la determinación de Ceramida por Citometría de Flujo.

Los ovarios obtenidos de rastro, se transportaron al laboratorio, en un buffer de fosfatos (PBS) a pH de 7.4. Los ovarios se disecaron y se obtuvieron folículos menores y mayores de 4mm los cuales se clasificaron por su grado de atresia, basados en los criterios morfológicos propuestos por (Rosales et al., 1997 y Alonso-Pozos et al., 2003) el cual se clasifica de la siguiente manera (figura 5):

Sanos.- folículos con apariencia translúcida, buena vascularización y capa granulosa regular.

Atresia Inicial: folículos con apariencia grisácea o que han perdido su apariencia translúcida, pero que todavía presentan circulación sanguínea y escasos desprendimientos de la capa granulosa.

Atresia avanzada: folículos claramente atrésicos, con apariencia opaca y la presencia de grandes desprendimientos de la granulosa y en casos severos desprendimiento del ovocito

Clasificación morfológica de los folículos por su grado de atresia



Figura 5.-clasificación macroscópica de la atresia en folículos de oveja mostrando su integridad morfológica, observados en microscopio de luz, con un aumento de 40x. 1) Folículo sano; 2) folículo con atresia inicial; 3) folículo con atresia avanzada.

De cada folículo se obtuvieron solamente las células de la granulosa de la siguiente manera:

Los folículos se abrieron con pinzas de disección sobre un tubo eppendorf con la finalidad de recuperar el líquido folicular y separar las células de la granulosa suspendidas en él. El líquido folicular se centrifugó a 2 500 rpm x 10 min. En los precipitados del líquido se recuperaron las células de la granulosa, las cuales se juntaron con las células de la granulosa que se desprendieron de las tecas haciendo un raspado ligero con pinzas de punta roma y haciendo correr PBS por la pared folicular. El paquete de células de la granulosa se lavó dos veces con PBS por centrifugación a 2500 rpm x 10 min y se mantuvieron en 500µl de PBS hasta su uso.

Posteriormente una alícuota de 5µl de esta solución se utilizó para contar las células en una cámara de Neubauer y posteriormente hacer alícuotas de 200,000 células cada una y con ello agregar la cantidad apropiada de cada fluorocromo (Freshney et al.2000).

Se utilizó el estuche comercial Apoptosis Detection Kit. Caspase Assay (Immunochemistry Technologies, LLC, # de catálogo 92). La metodología se basa en el uso de un péptido inhibidor de caspasas (fluorometyl ketona) marcado con el fluorocromo Carboxifluoresceína (FAM) que junto con el (Fluorochrome Inhibitor of Caspases, FLICA) forman el complejo FAM-FLICA, el cual entra libremente a la célula y es capaz de unirse covalentemente a las caspasas activas-1,-3,-4,-5,-6,-7,-8 y -9 (Ekert et al., 1999) y emite fluorescencia verde o FL1, Este estuche además contiene Ioduro de propidio (IP) (indicador de permeabilidad membranal), el cual entra a las células que tienen daño en la membrana y se intercala en el DNA (Yashuhara et al., 2003) y emite una fluorescencia roja ó FL3.

El análisis por citometría permite con este reactivo distinguir cuatro poblaciones: a) células vivas que no incorporan ninguno de los dos fluorocromos, b) células con apoptosis temprana, positivas a FL1, c) células necróticas que tienen dañada la membrana celular y por lo tanto son positivas a FL3, y d) las células con apoptosis tardía, que son positivas a FL1 y a FL3.(Kumar., 2999).

Además del indicador de apoptosis, se utilizó el anticuerpo monoclonal anti-ceramida utilizado para la técnica de Inmunohistoquímica (Chi et al., 2004) y un segundo anticuerpo monoclonal anti ratón IgG marcado con APC (Alofocianina) marca Becton Dickinson catalogo # 550676.

Antes de realizar experimentos con células de la granulosa de folículos sanos y atrésicos, la técnica se estandarizó con la línea celular K562. Una alícuota de 10^6 se trataron con 25mM de taxol y se incubaron durante 48hrs en una cámara húmeda con un ambiente del 8% de CO₂ para inducirles apoptosis (Gangem et al., 2000). (Estas células fueron donadas por la Dra Adriana Mendoza de la Facultad de Química de la UNAM).

Una vez comprobado que el estuche FAM-FLICA fue capaz de diferenciar células vivas, apoptóticas y necróticas y que con el uso del anticuerpo contra ceramida constatamos que no se unió a células vivas, pero sí a las necróticas y apoptóticas, procedimos a realizar los experimentos con las células de la granulosa, de acuerdo a lo siguiente:

De cada muestra se hicieron cuatro alícuotas de 100,000 células cada una, las cuales se trabajaron con los siguientes procedimientos:

* Ceramida: de una solución concentrada (200µg) se agregaron 5 µl x cada 300,000 células suspendidas en una solución de PBS a pH 7.4

* Indicador de apoptosis: se usó de acuerdo a las indicaciones del fabricante que consistieron en adicionar 10 µl de FAM-FLICA 30X (dilución 1:30) x cada 300,000 células.

* Indicador de permeabilidad membranal: de una solución concentrada (250 µg/mL) se agregaron 3 µl x cada 300,000 células.

Las muestras en suspensión se llevaron a un volumen total de 300 µl con PBS y se incubaron durante 30 min. a 37° C en un ambiente de 5% de bióxido de carbono.

Transcurrido el tiempo, se agregaron 10 µl de una solución concentrada de un segundo anticuerpo para ceramida, el cual contenía el fluorocromo APC la suspensión se llevó a un volumen total de 1 ml y se volvieron a incubar por 30 min. Al terminar la incubación los

tubos se centrifugaron a 2 500 rpm durante 10 min, para que se precipitaran las células y se pudiera retirar el sobrenadante, a continuación se dieron dos lavados con PBS y se volvieron a llevar a un volumen de 1 ml. En ese momento se les agregaron 3 µl del último fluorocromo, el Ioduro de propidio (IP) y se colocaron en los tubos para citometría de flujo y ser leídos.

Para el análisis tricolor, la fluoresceína del Inhibidor de caspasas (FLICA), se leyó en el canal para FL1 (excitación a 490 nm y emisión de 530 nm), la fluorescencia roja del Ioduro de Propidio (IP) en el canal para FL3 (excitación de 490 nm y emisión a 635 nm) y el APC unido al segundo anticuerpo que identifica al complejo ceramida-primer anticuerpo, se leyó en el canal de FL4 (excitación de 650 nm y emisión de 670 nm).

Las células se leyeron en un citómetro de flujo FACSCalibur (Becton Dickinson System, San José, CA). El valor de FSC-H fue de 00 (que es un parámetro que mide el tamaño celular) y el de SSC fue de 437 (parámetro que mide la complejidad celular). La compensación para FL1-FL3 y FL1-FL4 fue de 0% y del 1.8% para FL3-FL4.

La intensidad de fluorescencia emitida a 530 nm (FL1) a 635 nm (FL3) y a 670 nm (FL4) fue medida en 10 000 células de la granulosa (Alonso-Pozos et al., 2003) y analizadas con el programa Lysis II. Los datos de fluorescencia de las células se obtuvieron en una gráfica en la que se registró el logaritmo de la FL3 en el eje de las “y” y de la FL1 en el de las “x”. De esta manera se formaron 4 cuadrantes en la gráfica: inferior izquierdo, células vivas (negativo para ambas fluorescencias); inferior derecho, células apoptóticas (positivo a FL1, negativo a FL3); superior izquierdo, células necróticas (negativo a FL1, positivo a FL3) y en el cuadrante superior derecho, células apoptóticas tardías (positivas a FL1 y FL3). Así mismo se analizaron cuatro cuadrantes poniendo en el eje de las “x” la FL1 o bien la FL3 y en el de las “y” la fluorescencia 4 (FL4), estos gráficos nos permitieron conocer las células positivas a ceramida en cada uno de los tipos de muerte celular (necrosis ó apoptosis).

4.4. Procesamiento de las muestras para Cromatografía en Placa Fina

Para estandarizar la técnica de cromatografía en placa fina, primero se usaron cerebro e hígado de rata y posteriormente se implementó en células de la granulosa y líquido folicular, hasta encontrar las condiciones apropiadas.

Para lograr la estandarización de esta técnica fue necesario el uso del siguiente tejido:

Descripción de las muestras utilizadas en la extracción de lípidos de células de la granulosa, líquido folicular, hígado de (rata) y cerebro (rata), para la identificación de ceramida.

Grupo	Atresia	Células Granulosa	Líquido Folicular	Hígado	Cerebro
> 4mm	Sanos	4	1		
	Atresia inicial	5	1	4	3
	Atresia avanzada	6	1		
< 4 mm	Sanos	-	-		
	Atresia inicial	1	1	4	3
	Atresia avanzada	3	1		

Tabla 1. Extracción de lípidos de diferentes estructuras foliculares (células de la granulosa y líquido folicular) y 11 muestras de cerebro e hígado de rata (donde se asegura la presencia de lípidos). El número mayor de muestras corresponde a folículos > 4 mm. El marcador utilizado en la extracción de los lípidos fue N-octanoylsphingosine (5 µl por cada experimento).

4.4.1 Extracción de Lípidos

Los ovarios se procesaron de la misma manera que para la técnica de citometría de flujo. Se clasificaron por su tamaño en dos grupos y en tres grados de atresia.

De cada folículo se obtuvieron células de la granulosa con el mismo procedimiento que para la citometría de flujo y líquido folicular, el cual se centrifugó a 2 500 rpm x 10 min. En los precipitados se recuperaron las células de la granulosa, y el líquido se volvió a centrifugar a 2 500 rpm x 10 min, para descartar los precipitados y obtener líquido libre de células. El líquido folicular libre de células y las células de la granulosa se congelaron a 20 °C hasta su uso.

Para extraer los lípidos de las células de la granulosa, se resuspendieron en 500 µl de PBS más 500 µl de una solución de cloroformo:metanol 1 : 1 (250 µl : 250 µl). Posteriormente, se homogenizaron (12v) en un homogenizador vidrio teflón (Potter-Elvehjem), en alícuotas de 500 µl de PBS y 500 µl de la solución de los solventes y se centrifugaron a 12 000 rpm x 10 min para separar dos fases, obteniendo así, la parte baja que es cloroformo y la superior que es metanol (esta última se descartó).

La parte que contenía cloroformo se dejó evaporar a temperatura ambiente y al día siguiente los residuos se disolvieron en una solución de cloroformo:metanol (2 ml: 2 ml), agregando a cada tubo 25 µl de la solución.

Los residuos diluidos de cada muestras y el marcador de lípidos N-octanoyl esfingosina se aplicaron cada uno en un carril de la placa de sílica gel para cromatografía de capa fina (TLC Wathmann #de catálogo 4865-621), dentro de una cámara de vidrio que contenía una solución con 170:30:30 ml de cloroformo, metanol y agua respectivamente, hasta que el solvente se desplazó a través del soporte por capilaridad.

Una vez que el solvente alcanzó un punto próximo al otro extremo de la placa, ésta se sacó de la cámara y se secó a temperatura ambiente. Las placas ya secas, se observaron en un analizador de imágenes para detectar la fluorescencia de los lípidos de las marcas respectivas.

4.4.2. Cuantificación de Ceramida.

Una vez detectadas las marcas de cada carril correspondientes a cada muestra se rasparon y se diluyeron en 2 ml de diclorometano/metanol 1:1 y se centrifugaron a 600rpm.

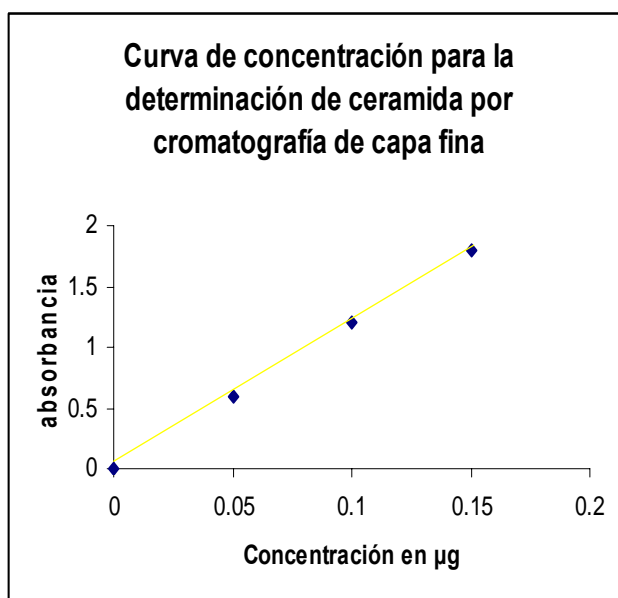
La fase baja fue colectada y la fase alta fue tratada nuevamente con 2 ml de cloroformo, se centrifugó nuevamente a 600rpm para separar dos fases obteniendo así, la parte baja que es cloroformo y la superior que es metanol (esta última se descartó).

Las dos fases orgánicas fueron combinadas y el solvente evaporado y secado a medio ambiente. Los residuos fueron disueltos en cloroformo /metanol 1:1 y aplicados en una placa de silica gel Whatman TLC, utilizando como referencia un análogo de ceramida (ácido piredodecanoico P12 ceramida).

Las muestras que corrieron a la misma distancia que el análogo de ceramida usado como referencia, se rasparon y disolvieron en 1 ml de una solución de 666 μl de cloroformo y 333 μl de metanol 2:1 respectivamente, se calentaron por 5 minutos a 50°C y se centrifugaron a $600\text{g} \times 10$ minutos. La fluorescencia de ceramida se determinó en un espectrofluorómetro (de la marca Turner Modelo 450) a una excitación de 339 nm y una emisión de 377 nm.

La curva estándar se realizó tomando tres puntos de concentración del ácido piredodecanoico (p12-ceramida) (0.05, 0.1 y 0.15 μg), para después calcular la concentración de cada una de las muestras mediante la interpolación en la línea antes mencionada (Gráfica 1)

Curva de calibración de ceramida



Grafica 1. En el cálculo de la concentración de ceramida por cromatografía de capa fina, se utilizó como marcador el ácido 1-piredodecanoico en una mezcla (cloroformo: metanol 2:1) y se leyó en un espectrofluorómetro a una λ_{ex} 339 y λ_{em} 377 nm.

4.5 Análisis Estadístico.

Se realizó un análisis de varianza para determinar las significancias entre grados de atresia, tamaño folicular y expresión de ceramida y una prueba de Duncan para la comparación de medias, con una significancia de ($\alpha = .05$), con el paquete estadístico PROC MEANS de SAS. Con el mismo propósito se realizó una prueba de χ^2 en los resultados obtenidos de la intensidad de la tinción de las células positivas a ceramida. Estos análisis se realizaron solo con los resultados de la técnica de Inmunohistoquímica en cortes de parafina. Para las pruebas de cromatografía en placa fina y citometría de flujo no se hizo análisis estadístico porque aun no se tienen las repeticiones que lo permitan, por lo cual, en adelante, nos referiremos a ellos como resultados preliminares.

5.- RESULTADOS

5.1. Cortes Histológicos.

De los 105 folículos analizados (42 folículos menores de 4 mm y 63 folículos mayores de 4 mm), el 25.7% fueron sanos, el 32.4% presentaron atresia inicial y 41.9 atresia avanzada. La distribución por grado de atresia fue diferente entre tamaños foliculares. Encontrando que en los folículos menores de 4 mm la mayoría de los folículos analizados fueron sanos, siguiendo los de atresia avanzada y en menor proporción los de atresia inicial, mientras que en los mayores de 4 mm la mayoría de los folículos analizados presentaron atresia avanzada, luego atresia inicial y por último folículos sanos (Cuadro 1).

Folículos clasificados histológicamente.

Tamaño	Grados de Atresia folicular		
	Sanos	Atresia inicial	Atresia Avanzada
<4mm	(n 17) 40%	(n 11) 26.2%	(n 14) 33.3%
>4mm	(n 10) 16%	(n 22) 36.5%	(n 30) 46.7%
TOTAL	(n 27) 25.7%	(n 34) 32.4%	(n 44) 41%

Cuadro 1. Se muestran los porcentajes de la cantidad de folículos ubicados por su grado de atresia en dos grupos de tamaño (<4mm y >4mm).

5.1.1. Inmunohistoquímica

De acuerdo al análisis de varianza, hubo un efecto significativo del grado de atresia sobre el porcentaje de células positivas a ceramida ($p < 0.01$), el tamaño folicular no tuvo efecto significativo del sobre la expresión de ceramida ($p > 0.01$).

La ubicación de la marca positiva a ceramida se observó en el citoplasma de las células tanto de corazón como en las de la granulosa. El análisis de los datos indica que el porcentaje de células positivas a ceramida aumenta conforme avanza el grado de atresia que presentan los folículos. Los folículos sanos de ambos tamaños tuvieron el menor porcentaje

de células positivas a ceramida en comparación con la atresia inicial y con atresia Avanzada (Cuadro 2). Solo hubo efecto del tamaño para las células positivas a ceramida en los grupos de atresia inicial, la mayor cantidad de células positivas a ceramida en este grado de atresia, se encontró en el grupo mayor a 4mm (cuadro 2).

Porcentaje de células positivas a ceramida en folículos ováricos de la oveja.

Categoría	Grados de Atresia folicular		
	Sanos	Atresia Inicial	Atresia avanzada
(<4mm)	(n 17) d 20.70 ± 2.83	(n 11) c 33.38 ± 3.43	(n 14) a 52.33 ± 4.34
(>4mm)	(n 10) d 19.7 ± 2.78	(n 22) b 37.03 ± 3.01	(n 30) a 50.75 ± 4.15

Cuadro 2. Letras diferentes indican que existe diferencias significativa (p > 0.05)

Los resultados indican el porcentaje de células positivas a ceramida

5.1.2. Intensidad de la Tinción.

Se encontró un efecto del grado de atresia de los folículos sobre la intensidad de la marca de las células positivas a ceramida. El análisis de χ^2 reveló que existió una diferencia estadística altamente significativa ($P < 0.01$) de folículos sanos y atrésicos con respecto a la intensidad que presentaron las células positivas a ceramida en ambos tamaños, los resultados de este análisis se presenta en el cuadro 3. Los folículos sanos presentan una mayor cantidad de células positivas a ceramida con intensidad baja, mientras que folículos con atresia avanzada presentan la mayor proporción de células positivas a ceramida ubicadas en el nivel de intensidad alta. Lo cual expresa que conforme avanza el grado de atresia, las células positivas a ceramida presentan mayor intensidad en la marca de su tinción.

Intensidad de tinción de ceramida en células de la granulosa.

Atresia /Tamaño	Intensidad						Total	
	baja		media		alta		N	%
< 4 mm	N	%	N	%	N	%		
Sanos	10	(75.00)	7	(16.67)	0	(8.33)	17	(100%)
Atresia inicial	2	(57.14)	4	(21.43)	5	(21.43)	11	(100%)
Atresia avanzada	1	(0.00)	5	(37.50)	8	(62.50)	14	(100%)
> 4 mm								
Sanos	7	(60.00)	2	(40.00)	1	(0.00)	10	(100%)
Atresia inicial	5	(10.53)	14	(57.89)	3	(31.58)	22	(100%)
Atresia avanzada	0	(5.88)	8	(23.53)	22	(70.59)	30	(100%)

Cuadro 3. Los datos representan el porcentaje de intensidad de las células positivas a ceramida de folículos sanos y atrésicos de dos diferentes tamaños obtenidos de la prueba de χ^2 .

5.1.3. Inmunohistoquímica en cortes congelados.

En los cortes congelados no se pudo observar la presencia de ceramida en las células de la granulosa, debido tal vez a la poca sensibilidad de la prueba.

Cortes histológicos congelados con y sin contra tinción

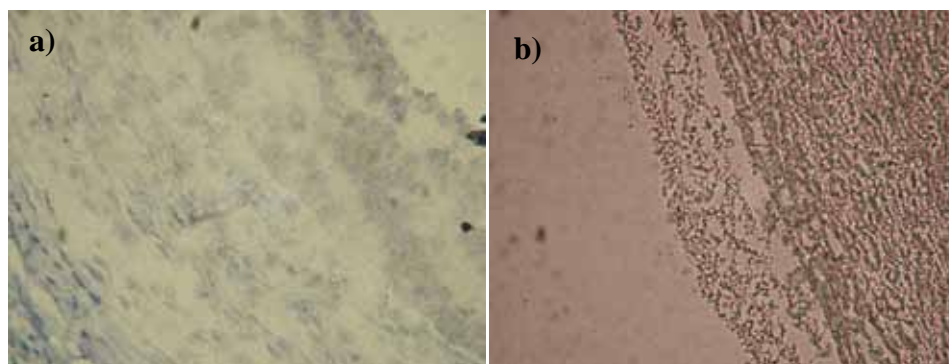


Figura 6 se muestran cortes histológicos de ovarios congelados en los que se observa en la (figura a: sin contra tinción) una muestra casi transparente a la inspección con microscopio de luz a 40 X, esto debido a la falta de contra tinción con hematoxilina, , mientras que en cortes en donde se realizo la contra tinción (figura b: con contra tinción) no se pudo hacer la distinción de las células positivas a ceramida para realizar su conteo, ya que las células teñidas se aglomeraron y tornaron borrosas a la inspección al microscopio de luz a 40X.

5.2. Resultados preliminares de la Citometría de flujo en células de la granulosa

El estudio citométrico de la línea celular K5321, inducida a apoptosis con Taxol (Gangem et al., 2000) la cual se usó como referencia para el estudio citométrico de las células de la granulosa permitió identificar cuatro poblaciones celulares.

Distribución de las células de la línea (K5321) en los cuatro cuadrantes.

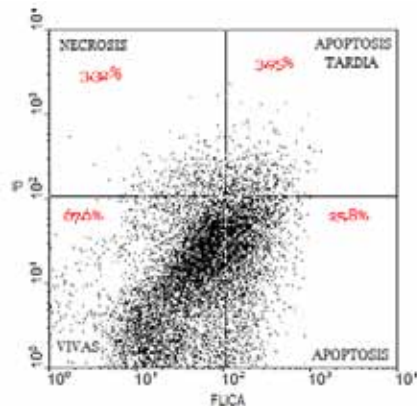


Figura 7. Determinación de cuatro poblaciones de la línea celular K5321, y porcentaje de células en cada cuadrante.

En el primer experimento se hizo una relación del indicador de apoptosis “Flica” (eje de las X) vs el indicador de permeabilidad membranal “IP” (eje de las Y) en donde se observa (figura 7) que dentro de las células con permeabilidad membranal el mayor porcentaje lo ocupan las células apoptóticas, lo cual quiere decir que el tratamiento con taxol permite identificar claramente las células que sufren este tipo de muerte y distinguir las otras poblaciones.

Cuando se analizó la relación Ceramida (FL4) vs el indicador de apoptosis (FL1) se pudo ver que muy pocas células marcadas con el indicador de apoptosis fueron positivas a Ceramida y lo mismo ocurrió con la relación ceramida vs el indicador de permeabilidad membranal.

Una vez establecidas las condiciones adecuadas para el citómetro, se analizaron las células de la granulosa de 12 folículos con diferentes grados de atresia. Obteniendo resultados del número de células vivas, apoptóticas, apoptóticas tardías y necróticas de acuerdo a la

relación indicador de apoptosis vs indicador de permeabilidad y la marca de ceramida aproximada en cada una de estas poblaciones, calculada por la relación ceramida vs indicador de apoptosis y ceramida vs indicador de permeabilidad.

En el Cuadro 4 se puede ver que el tipo de muerte que predomina en todos los folículos de ambos tamaños es la apoptosis y que la necrosis detectada en todos los casos fue muy baja (menor al 0.2%). Este cuadro también muestran que el porcentaje de células muertas aumenta bruscamente conforme avanza el grado de atresia. Cabe destacar que del total de células muertas sólo un porcentaje muy bajo (menor al 9% en todos los casos) se marcaron como positivas a ceramida.

Porcentaje de células positivas a ceramida de acuerdo al tipo de muerte.

Clasificación de folículos	% de células muertas por apoptosis	% de células muertas por necrosis	% de células muertas (Suma de los dos tipos de muerte)	% de células positivas a ceramida
< 4mm				
sanos	47.24	0.18	47.42	0.67
Atresia inicial	92.37	0.13	92.51	1.40
Atresia avanzada	97.78	0.10	97.88	8.22
> 4mm				
Sanos	48.04	0.11	48.16	0.94
Atresia inicial	95.03	0.10	95.12	1.87
Atresia avanzada	98.46	0.17	98.63	6.72

Cuadro 4. Los porcentajes son promedios de dos casos por atresia y tamaño por lo cual no se hizo análisis estadístico.

5.3. Resultados preliminares de Cromatografía en Placa Fina.

La extracción de lípidos se realizó en células de la granulosa, líquido folicular de oveja, hígado y cerebro de rata hasta estandarizar la técnica. Sin embargo no se pudo determinar otro parámetro más exacto que nos permitiera distinguir si existen diferencias entre cantidad y tipo de lípidos.

Hasta el momento, solamente en una de las muestras en la que se realizó la extracción de lípidos se ha determinado la presencia de ceramida por cromatografía, tomando como referencia la curva estándar de ácido piredodecanoico (p12) ceramida. La concentración

de ceramida de acuerdo a la lectura obtenida en el espectrofluorometro en un folículo con atresia avanzada es de 0.0125 μ g,

Identificación de ceramida por cromatografía en placa fina de acuerdo al marcador de peso molecular.

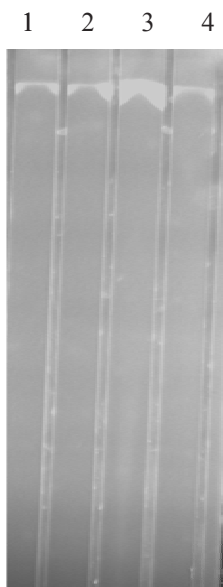


Figura 8.- La marca de la parte superior indica la presencia de esfingolípidos con un peso molecular similar al del marcador de ceramida ácido piredodecanoico (p12) (carril uno - atresia avanzada < 4 mm; carril dos - atresia avanzada > 4 mm; carril tres - hígado y carril cuatro con el marcador análogo de ceramida (ácido 1-piredodecanoico-(P-12 ceramida).

6.- DISCUSIÓN

La prueba de inmunohistoquímica se demostró que los folículos menores y mayores a 4 mm incrementaron el número de células positivas a ceramida y la intensidad con la que se tiñen las células positivas a ceramida de acuerdo al grado de atresia de los folículos de ovejas y no se encontraron diferencias por efecto del tamaño en el porcentaje de células positivas a ceramida ($p>0.05$)

En el estudio inmunohistoquímico, se encontró que el porcentaje de células positivas a ceramida aumentó con el grado de atresia (19.7 %, 33.3 y 51.9%) (20.7 %, 37% y 52.3%) para folículos sanos con atresia inicial y folículos con atresia avanzada menores y mayores de 4 mm respectivamente. La atresia folicular es un proceso degenerativo y paulatino en el cual la muerte de las células que conforman el folículo es un evento fundamental (Kaipia y Hsueh 1997). Se ha demostrado que la muerte de las células foliculares durante la atresia en

ovarios de ovejas, cerdos, gallinas, vacas y roedores es causada por apoptosis, un proceso activo, fisiológico y genéticamente programado por medio del cual la muerte celular ocurre en una forma controlada producida por cambios en los niveles de algún estímulo fisiológico específico (Hughes y Gorospe., 1991; Yang y Rajamahendran 2000, Vickers et al., 2000). Algunos autores han encontrado que la cantidad de muerte en las células de la granulosa va aumentando conforme avanza el grado de atresia en diferentes especies como ovinos (atresia inicial 20 % y atresia avanzada 41%), vacas (atresia inicial 10% y atresia avanzada 25% de células muertas) y en gallinas (atresia inicial 40% y atresia avanzada 80%), (Kitamura et al., 2002; Clark et al., 2004; Sangrador., 2007). Un estudio realizado en células de la granulosa de bovino por inmunohistoquímica, presentó un porcentaje de células apoptóticas de hasta un 50 % (Hu et al., 2001). En otro estudio en bovinos donde se determinó el porcentaje de células de la granulosa apoptóticas por la prueba de TUNEL que mide la fragmentación internucleosomal del DNA por la unión en sus extremo 3' de nucleótidos marcados, se reporta que en folículos sanos hubo apoptosis en 4 a 6 % de las células de la granulosa, mientras que los folículos con atresia inicial y atresia avanzada los porcentajes fueron de 42% y 90% (Greenaway et al., 2004). Con el uso de una técnica por citometría de flujo con la cual se detecta la presencia de fosfatidilserina en la cara externa de la membrana, como signo temprano de muerte celular Rosales et al (2000), reportaron entre 11y 15% de células con exposición de fosfatidilserina en folículos sanos de 3-6 y mayores de 6 mm respectivamente y este porcentaje aumentó significativamente con el grado de atresia en ambos tamaños, alcanzando valores de 30 y 70% en atresia inicial y avanzada.

Algunos estudios proveen evidencias de que la activación de la vía de señalización de la esfingomielina (SM) puede inducir apoptosis en una variedad de tipos celulares (hepatocitos, linfocitos, células epidermales) debido a la alteración de la función mitocondrial e inducir la activación de las caspasas (García- Ruiz et al., 1997; Hofmann and Dixit., 1998; Hetz et al., 2002). En la literatura se menciona que cuando se produce una señal de muerte por la unión de Fas con su ligando, se produce la activación de las esfingomielinasas (ASMasas), enzimas localizadas en la membrana plasmática, encargadas de la degradación de esfingolípidos estructurales de la bicapa lipídica como la

esfingomielina y como consecuencia inducen la producción de ceramida, la cual se conoce que actúa como una señal o inductor de muerte celular (Gulbins y Li., 2006). Santana et al (1996), encontraron que el daño causado a células pulmonares por medio de radiación producía una marcada reducción del daño celular en ratones knockout a ASMasa y que esta resistencia a la muerte celular se encontró asociada con la falta de un incremento en los niveles de ceramida en el tejido pulmonar después de la irradiación, lo cual también fue propuesto en otro estudio donde se encontró que la baja concentración de ceramida C₂ promovió la sobrevivencia de neuronas de embriones de rata en cultivos, mientras que al aplicar altas concentraciones de este lípido se indujo la apoptosis de las neuronas (Goodman y Mattson, 1996). Es probable entonces que la cantidad de ceramida que se produzca en una célula es un determinante para el camino que ésta seguirá. Considerando que la presencia de ceramida y sus subproductos como dihidroesfingosina y glucosilceramida han sido considerados inductores esenciales y generadores de muerte (Hannun and Obeid, 2002), es claro el porqué en los resultados de este trabajo se encontró un alto porcentaje de ceramida aun en folículos sanos. Es decir, aunque aproximadamente el 20% de los folículos fueron positivos a ceramida no quiere decir que sus células estén muertas sino que tienen la señal o la presencia de un mensajero (ceramida) para la muerte, aún cuando se trate de células vivas. Estos resultados serían comparables con los descritos con anterioridad en los que se detecta la exposición de fosfatidilserina como un signo temprano de muerte celular. El porcentaje de células positivas a fosfatidilserina en folículos sanos (Rosales et al., 2000), es similar al de células positivas a ceramida reportado en este trabajo (15% positivas a fosfatidilserina vs 20% positivas a ceramida para folículos grandes) y en folículos con atresia inicial (32% positivas a fosfatidilserina vs 37% positivas a ceramida para folículos grandes). Esta comparación es válida porque tanto la exposición de fosfatidilserina como de ceramida son señales o indicadores muy tempranos de muerte. Como se mencionó, cuando existe la activación de una vía de muerte como es la unión de Fas con su ligando, se produce la activación de las esfingomielinasas (ASMAsas) enzimas localizadas en la membrana plasmática, encargadas de la degradación de esfingolípidos estructurales de la bicapa lipídica como la esfingomielina y como consecuencia inducen la producción de ceramida, la cual se ha mencionado que actúa como un indicador temprano de muerte celular (Gulbins y Li., 2006). De hecho, la activación de la esfingomielinasa

produce la translocación de los fosfolípidos de la membrana, permitiendo la exposición de la fosfatidilserina a la cara externa de la membrana sirviendo como un indicador inicial de la muerte celular (Cutler y Mattson, 2001). Con los argumentos anteriormente descritos y apoyados por Thon et al., (2005), se puede confirmar que los resultados obtenidos en este trabajo, en donde se muestra un aumento de la ceramida conforme avanza la atresia de los folículos son correctos, ya que en ambos estudios se plantea que los porcentajes de ceramida se incrementan conforme aumenta el daño celular.

Adicionalmente los porcentajes ligeramente superiores de células positivas a ceramida en comparación con los de células de la granulosa de folículos sanos y con atresia inicial positivas a fosfatidilserina pueden deberse a que el anticuerpo utilizado para la realización de la inmunohistoquímica (único disponible en el mercado en México) es una inmunoglobulina de tipo M (IgM) monoclonal decavalente, de manera que solo se pega a un epítipo del antígeno y quedan valencias libres del anticuerpo, que se pueden unir a otros antígenos diferente de manera inespecífica o a compuestos hidrofóbicos. (Ramos-Vara, 2005). Muchos antígenos son multivalentes, cada epítipo de un antígeno es un determinante antigénico (epítipo) con una configuración completamente diferente de todas las otras valencias (e.g., un anticuerpo monoclonal puede reaccionar sólo con una valencia de un antígeno) (Ramos-Vara, 2005). En un trabajo realizado recientemente (Cowart et al., 2002), se analizó la especificidad de dos anticuerpos disponibles comercialmente en Estados Unidos y Europa para la determinación de ceramida, uno monoclonal y otro policlonal. Los autores reportaron que el antisuero policlonal tiene un fuerte reconocimiento de C₁₆-ceramida mientras que este fue muy débil con el anticuerpo monoclonal. Además, aunque ningún anticuerpo reconoció fosfatidilinositol, el anticuerpo monoclonal reconoció fuertemente la fosfatidilcolina (PC), mientras que el reconocimiento de PC por el antisuero policlonal fue escasamente perceptible. En conclusión, se puede confirmar que el anticuerpo policlonal es selectivo a ceramida, mientras que el anticuerpo anti-ceramida monoclonal es más reactivo a PC que a ceramida (Cowart et al., 2002).

La intensidad de la marca en las células positivas a ceramida puede ser un indicador de mayor cantidad de ceramida dentro de una célula positiva, por lo cual en los resultados de este trabajo, podemos decir que con el grado de atresia no solo se incrementa el porcentaje de células positivas a ceramida sino que también aumenta la concentración de este esfingolípido dentro de cada célula. En este trabajo, los folículos sanos tuvieron el menor número de células positivas a ceramida y más del 58% de sus células tuvieron una intensidad baja para este lípido en ambos tamaños, en la atresia inicial, más del 85% de las células positivas a ceramida tuvieron una intensidad de marca entre media y alta, mientras que los folículos con atresia avanzada (entre 57-73%) tuvieron la mayor cantidad de células positivas a ceramida con intensidad alta y solo 7% o menos con intensidad baja en ambos tamaños de folículos. Estos cambios en la cantidad de ceramida (intensidad) conforme aumenta el grado de atresia se pueden explicar porque en la medida que el folículo avanza en la muerte celular, la presencia de ceramida se presenta en un mayor número de espacios intercelulares u organelos (Futerman y Hannun., 2004; Van IJzendoorn et al, 2004) y como las células utilizadas para esta técnica en el presente trabajo sufrieron permeabilización, la detección de la ceramida en las diferentes regiones de la célula, permitió que la marca de las células positivas a ceramida fuera mas visible.

La técnica de inmunohistoquímica en cortes congelados se realizó con la finalidad de confirmar los resultados obtenidos con el tejido en parafina, sin embargo como estos cortes se procesaron sin contra tinción no se pudieron diferenciar claramente las células positivas y negativas a ceramida, esto pudo ser en parte a que la falta de contra tinción impidió la formación de uniones cruzadas obtener muestras sin contar tinción de donde se obtuvieran resultados claros. Ramos-Vara., (2005), en un estudio de inmunohistoquímica demuestra que la reacción antígeno anticuerpo no es visible bajo el microscopio a menos que se utilice un marcador. Los antígenos pueden ser visualizados por medio de anticuerpos específicos, estos anticuerpos una vez unidos a su epítopo en el tejido son identificados por medios enzimáticos como la peroxidasa y la fosfatasa alcalina (PA); la reacción química generada por esta unión puede ser citoplasmática, nuclear o membranal. Posteriormente se debe realizar una contra tinción en donde un substrato permita revelar la reacción por medio de un colorante (cromógeno), la elección de la enzima y el cromógeno depende de varios

factores (intensidad o reacción, situación del anticuerpo, presencia o ausencia de pigmentos endógenos y el medio de montaje usado) pero a menudo es una cuestión de preferencia personal (Cuello y Ciocca., 1999).

La 3,3'-diaminobenzidina tetracloride (DAB) es el cromógeno más utilizado, con un color café y presentando insolubilidad en solventes orgánicos. Las contra tinciones frecuentemente más utilizadas son la hematoxilina (azul), verde metilo (verde) y rojo rápido nuclear (rojo) (Van Hecke., 2002). La contra tinción deben marcar los tejidos ligeramente, sin interferir con el precipitado del cromógeno, en algunas ocasiones, particularmente con anticuerpos nucleares presentes en cantidades pequeñas, la contra tinción no es muy recomendada, mientras que para anticuerpos membranales y citoplasmáticos se puede utilizar obteniendo un resultado satisfactorio (Boenisch., 2001, Ramos-Vara., 2005; Taylor et al., 2002). De tal manera que los resultados obtenidos en los cortes congelados se debieron en parte a la falta de contra tinción para observar una marca deseable, de igual forma tomando como referencia lo mencionado en la literatura, se puede proponer que la tinción tan marcada que presentaron los folículos de los bloques de parafina pudo deberse a que como las células eran permeabilizadas a lo largo de la realización de la técnica, el anticuerpo reconoció la ceramida de todos los compartimentos celulares. De igual forma es posible que no se hayan visto células positivas a ceramida en los cortes congelados debido a la pérdida de componentes celulares por la congelación de los tejidos, ya que se ha reportado un aumento de los cristales de hielo en tejidos, lo cual degrada la membrana plasmática y desnaturalizar macromoléculas y lípidos (Wolfe y Bryan, 1999).

Los experimentos con citometría de flujo permitieron detectar en las células de la granulosa de folículos sanos, con atresia inicial y atresia avanzada mayores y menores de 4 mm, células vivas, apoptóticas, con apoptosis tardía y necróticas. En ambos tamaños de folículos se observó que conforme avanza el grado de atresia, disminuyó el porcentaje de células vivas y aumentó el de células muertas tanto apoptóticas como necróticas, sin embargo en todos los casos el principal tipo de muerte fue la apoptosis, lo cual apoya lo sustentado por otros autores ((Hseuh et al., 1994 Tilly et al., 1995; Morita et al., 1999; Pedersen et al., 2000).), que indican que la apoptosis es el único tipo de muerte en la atresia folicular y que

ésta aumenta de acuerdo al grado de atresia, sin embargo otros autores que han realizado estudios con citometría de flujo (Murdoch et al., 1999; Rosales-Torres et al 2000, Alonso-Pozos et al 2003) han reportado que en la oveja ocurre apoptosis y necrosis en el proceso de la atresia folicular y que la preponderancia de uno u otro tipo de muerte depende del tamaño del folículo. Esta discrepancia puede deberse al tipo de reactivos y técnicas que cada autor utilizó. En los resultados del presente trabajo, se usó un reactivo que detecta la presencia de caspasas, combinado con Yoduro de propidio como indicador de permeabilidad de la membrana celular, lo cual permite identificar con mucha precisión, células vivas, apoptóticas y necróticas. En el estudio realizado por (Rosales et al 2000), usaron Anexina V la cual identifica la presencia de fosfatidilserina en la cara externa de la membrana de las células muertas y diferencia el tipo de muerte por la incorporación que hagan de Ioduro de propidio. Los rasgos morfológicos que caracterizan a la apoptosis celular, son el resultado de los cambios bioquímicos que inducen las caspasas, dichos cambios incluyen la destrucción proteolítica del citoesqueleto y las proteínas metabólicas. En el caso de la necrosis la liberación del citocromo *c* y la ruptura en el transporte de electrones, como resultado del descenso en la producción de ATP y la generación de especies reactivas, pueden contribuir a la muerte celular en ausencia de caspasas (Zeiss, 2003). Por ello, todo indicaría que el uso de inhibidores de caspasas que detectan caspasas activas puede ser un buen recurso técnico.

Cabe señalar que cuando se indagó si las células de la granulosa muertas en los folículos con atresia mostraban ser positivas a ceramida, encontramos que solo un porcentaje muy pequeño de ellas fue positivo en todos los casos de atresia y en ambos tamaños de folículos. Incluso en la línea celular K 5321 que se usó como referencia se detectó esta misma situación. En muerte celular en las células de la granulosa de los folículos analizados el porcentaje de células muertas fluctuó entre 47 y 98 dependiendo del grado de atresia, sin embargo el porcentaje de células muertas positivas a ceramida no rebasó el 9%, lo cual indica que la gran mayoría de las células muertas no están siendo detectadas por el anticuerpo anticeramida. Perry., (2000), muestra datos contundentes de que solo una pequeña cantidad de ceramida se encuentra en la membrana celular, mientras que la mayor cantidad se encuentra localizada en la membrana de los organelos y el citoplasma de la

célula. La razón de esto es que la ceramida se sintetiza de *ново* en el retículo endoplásmico y es transportada al complejo de Golgi donde es incorporada en varios complejos de esfingolípidos. Cabe mencionar que los anticuerpos se ligan a grandes complejos que son organizados en distintos micro dominios membranales. Principalmente las protrusiones de la membrana plasmática que son fuertemente teñidas por la ceramida.

La literatura indica que los efectos de la ceramida son en parte dependientes de su formación y localización subcelular. Como se mencionó, la ceramida *de novo* es generada en el retículo endoplásmico mientras que las ceramidas derivadas de las esfingomielinasas (SMase) se generan en compartimientos intracelulares donde la esfingomielina (SM) y SMase son localizadas, particularmente en los lisosomas, la membrana plasmática y posiblemente la mitocondria. (Coward et al., 2002).

En un estudio desarrollado por Krishnamurthy y colaboradores (2007), usando un anti suero anti ceramida IgG reportaron la distribución de ceramida en la membrana plasmática de células permeabilizadas y dentro de estas. Además, mostraron que la ceramida se encontró en protrusiones de la membrana celular y fue abundante en una región perinuclear que fue identificada como el aparato de Golgi. Estos mismos resultados indican que la IgG específicamente reconoce ceramida en células fijadas por lo que es ideal para la inmunohistoquímica (Krishnamurthy et al., 2007).

Existen reportes del uso de anticuerpos anticeramida entre los cuales destacan anticuerpos IgG de conejo, e IgM de ratón (Krishnamurthy et al., 2007), en su mayoría los protocolos utilizados son en células (permeabilizadas) de diferentes tipos, como linfocitos B, eritrocitos y fibroblastos de la enfermedad de Niemann Pick tipo A. En particular Grassmé et al., (2002), usando el anticuerpo anticeramida MID15B4 con linfocitos B y muy recientemente, Lang et al., (2005) usando un anticuerpo IgG anti ratón (Pharmingen, Hamburg, Germany) dilución 1:50 en PBS, conjugado con isotiocianato de fluoresceína (FICT), lograron demostrar que la presencia de ceramida en la superficie celular estimulan las escramblasas que provocan la exposición de la fosfatidilserina en los eritrocitos.

En otro estudio realizado con linfocitos T Jurkat, utilizaron el mismo anticuerpo monoclonal MID15B4, en donde los linfocitos fueron permeabilizados con Triton X-100 al 0.1 % y 0.1% de citrato de sodio 4 °C durante 5 min, y encontraron concentraciones de 128 ± 5 a 181 ± 10 pmol/ 10^6 de ceramida celular cuando fueron sometidos a 1 min de 200 J/m^2 de radiación ultravioleta (Rotolo et al., 2005).

Se ha visto que estos anticuerpos se ligan a grandes complejos que son organizados en distintos micro dominios membranales. De particular interés son las protrusiones de la membrana plasmática que son fuertemente teñidas por la ceramida. A esta protrusión se le ha llamado "esfingopodia" (distribución polarizada de ceramida en micro sitios), ya que ellas pueden estar involucradas funcionalmente formando la membrana plasmática o iniciando lamelipodia o procesos como la migración celular. Actualmente algunos grupos de investigación han desarrollado un nuevo anticuerpo IgG, anti ceramida, el cual nos puede proporcionar una herramienta muy importante, para visualizar la generación de ceramida en respuesta a diversos estímulos y para identificar proteínas que actúan recíprocamente con la ceramida, en vista de que los anticuerpos IgM solo detectan la ceramida de la membrana celular (Krishnamurthy et al., 2007).

Es importante mencionar que en nuestro estudio las muestras de folículos ováricos no fueron permeabilizadas y con eso permitir que el anticuerpo penetrara e identificara la ceramida intracelular, esto debido a que el principal parámetro a estudiar fue la muerte celular. Apoyados en la literatura científica, donde se explica que uno de los acontecimientos principales que tienen lugar en la mitocondria durante la muerte celular, es la alteración de la permeabilidad de la membrana debido a la formación de un complejo multiproteico (poro de permeabilidad transitoria mitocondrial) que conduce a la liberación del contenido intra mitocondrial como el citocromo *c*, el factor inductor de apoptosis y miembros de la familia de las caspasas (Jordan 2003). En otros trabajos las evidencias experimentales indican que usando análogos de ceramida en células permeabilizadas, es posible producir un efecto directo sobre la mitocondria, actuando como inhibidor de la cadena respiratoria e incrementando la producción de especies reactivas a oxígeno, lo cual sucede de forma natural en células intactas (Abadie y Levade, 2001). Por tal motivo es coherente suponer que los bajos porcentajes de ceramida obtenidos, sean debidos a que el

anticuerpo utilizado solo reconoció la ceramida de la membrana celular y no la que se encuentra en el interior de la célula. Por lo que se puede concluir que la utilización de anticuerpos para detectar ceramida con citometría de flujo en folículos ováricos que presentan muerte celular, no produce resultados satisfactorios debido a la falta de permeabilización previa de las células que necesita el anticuerpo para penetrar en la membrana y reconocer la ceramida endógena de la célula.

Con la técnica de inmunohistoquímica, no se encontró un efecto significativo ($p > 0.01$) del tamaño folicular con respecto al porcentaje de células positivas a ceramida. Si combinamos este resultado con las observaciones realizadas por citometría de flujo, donde vimos que la apoptosis es por mucho el principal tipo de muerte, podemos pensar que las células de la granulosa de los folículos pequeños y grandes que se vuelven atrésicos siguen la ruta de la apoptosis hacia la muerte. En estudios realizados con células musculares lisas de la rata, se ha observado que altas concentraciones de C_2 ceramida causan muerte celular por necrosis en lugar de apoptosis, estos reportes fueron confirmados por medio de criterios morfológicos y bioquímicos (Guo et al., 1999).

Comparando nuestros resultados con lo anteriormente dicho podemos decir que en nuestro trabajo, el tamaño del folículo no presentó relación con la cantidad de células positivas a ceramida y por ende con el tipo de muerte, lo cual contradice lo propuesto en algunas publicaciones realizadas por miembros de nuestro grupo de investigación (Rosales-Torres et al., 2000; Alonso-Pozos et al., 2003), que proponen que en la oveja, la muerte celular que ocurre durante la atresia, depende del tamaño folicular. Los autores sugieren la hipótesis de que la ruta de muerte de las células de la granulosa durante la atresia folicular depende del estado y el metabolismo energético o de las condiciones hipóxicas relacionadas con el tamaño folicular. Cambios en el potencial de la membrana mitocondrial y permeabilidad de la misma, fueron los principales cambios encontrados en los folículos pequeños. Mientras que la desestabilización de la función lisosomal fue observada en células de la granulosa durante la atresia en los folículos grandes. Cabe mencionar que tampoco se encontraron cambios importantes con respecto al tamaño, grado de atresia y a la cantidad de células positivas a ceramida en los resultados de la intensidad de la marca de ceramida ni en los

resultados obtenidos en la citometría de flujo. Otros autores también proponen que el mecanismo de atresia tiene diferencias en las diferentes estaciones del proceso o durante el desarrollo de la atresia en folículos de diferentes dimensiones (Luciano et al., 1994; Li et al., 1998). Alonso-Pozos (2006) determino con su estudio que la incidencia de la atresia en folículos de ovejas es altamente dependiente del diámetro folicular, encontrando que 21% de folículos pequeños (3mm) eran atrésicos, mientras que un 63% de folículos grandes (6mm) eran atrésicos. Esta relación de atresia y tamaño también ha sido encontrada en otras especies como el humano y el mono (Hsueh et al., 1994).

De acuerdo a las limitaciones que presentaron las técnicas así como la dificultad de conseguir el anticuerpo adecuado (IgG de conejo) para su correcta realización y localización de la ceramida, tomando en cuenta lo anteriormente descrito en la literatura de que la mayor cantidad de ceramida es producida intracelularmente y que una de sus funciones es provocar cambios en la sobrevivencia celular/decisión de muerte, debido a que la ceramida endógena es considerada un mediador en la muerte celular, mas que solo ser considerada como un segundo mensajero (Blázquez et al., 2000), se procedió a buscar una técnica alternativa para solucionar estos problemas, con lo cual se llego a la conclusión de realizar la cromatografía en placa fina, metodología que considera la permeabilización de la membrana, así como la extracción de los esfingolípidos y determinar el total de ceramida en las células de la granulosa. Esta técnica se estandarizó durante la realización de este trabajo y se pudo obtener la concentración de ceramida en uno de los folículos, lo cual nos permitirá posteriormente la determinación de las concentraciones de ceramida en folículos de diferentes tamaños y grados de atresia. La metodología utilizada en la cromatografía de capa fina fue previamente descritas por otros autores y apoyadas en observaciones realizadas en células HL60, una línea celular de leucemia en humanos (Dagan et al., 2003).

En este estudio la presencia de ceramida se expreso como 0.0125 μ g, en una muestra folicular de oveja con atresia avanzada (aproximadamente 600 000 células, con un porcentaje de viabilidad de 30% y con un diámetro > 4mm). Otros autores reportan la ceramida por contenido total de proteínas, mientras que otros expresan la ceramida por fosfolípidos-fosfato (Bielawska et al., 1996), usando la prueba de diacilglicerol cinasa

[método radioactivo] (Bielawska et al., 2001), o usando serina o ácido palmítico ^3H como precursor (Charles et al., 2001).

Durante el desarrollo del trabajo de tesis, usamos uno de los métodos más comunes para determinar el contenido de ceramida celular, como es la TLC. Sin embargo, no se usaron precursores radiactivos. Otros de los métodos disponibles son la prueba de diacilglicerol cinasa o la espectrometría de masas y la cromatografía de líquidos de alta presión (HPLC), que solo reflejan cambios globales en el contenido de ceramida en la población celular. Estos métodos, no dan una información precisa sobre la localización subcelular de la ceramida ni revelan su interacción con otras proteínas celulares (Krishnamurthy et al., 2007).

7. CONCLUSIONES

1. La ceramida se expresa en células de granulosa de folículos de ovejas sanos y atrésicos menores y mayores de 4 mm.
2. Los niveles de ceramida se incrementan conforme avanza el grado de atresia.
3. La permeabilización momentánea de las células para permitir el paso del anticuerpo al interior de la célula, sería un método recomendable para determinar los niveles totales de ceramida por citometría de flujo y poder diferenciar el tipo de muerte.
4. Los anticuerpos IgM, son poco eficientes para la detección de la ceramida total ya que solo detectan la ceramida de la membrana celular, a comparación de los anticuerpos IgG que son capaces de detectar la ceramida exógena y endógena.
5. La cromatografía en placa fina fue una técnica adecuada para determinar los niveles totales de ceramida de los folículos y con ella se podría observar las diferencias de los niveles de este lípido conforme avanza el grado de atresia.
6. De acuerdo a los resultados, se rechaza la hipótesis ya que no se encontró diferencia del tamaño folicular con respecto a los niveles de ceramida.

8. BIBLIOGRAFÍA.

- 1) Abadie, N.A y Levade, T. (2002). Sphingomyelin hydrolysis during apoptosis. *Biochimica et Biophysica* 158: 126– 134.
- 2) Abadie, N.A, Gouaze, V. Salvayre, R. Levade, T. (2001). Ceramide in apoptosis signaling: relationship with oxidative stress. *Free Radic. Biol. Med.* 31 717– 728.
- 3) Adams, G.P, Kot, K. Smith, C.A. Ginther, O.J. (1993). Selection of a dominant follicle and suppression of follicular growth in heifers. *Anim Reprod Sci* 1993; 30:259–271.
- 4) Alonso-Pozos, I. Rosales-Torres, A.M. Avalos Rodríguez, A. and Vergara-Onofre, M.V. (2003). Mechanism of granulosa cell death during follicular atresia depends on follicular size. *Theriogenology* 60:1071-1081.
- 5) Bielawska, A. Greenberg, M. S. Perry, D. Jayadev, S. Shayman, J. A. McKay, C. and Hannun, Y. A. (1996). (1S,2R)-D-erythro-2-(N-Myristoylamino)-1-phenyl-1-propanol: An inhibitor of ceramide. *J Biol. Chem.* 271, 12646–12654.
- 6) Bielawska, A. Perry, D.K, Hannun, Y.A (2001). Determination of ceramides and diglycerides by the diglyceride kinase assay, *Anal.Biochem.* 298 141–150.
- 7) Blázquez, C. Galve-Roperh, I. Guzmán, M. (2000). De novo-synthesized ceramide signals apoptosis in astrocytes via extracellular signal-regulated kinase. *FASEB J.* 14, 2315–2322.
- 8) Bo GA, Baruselli PS, Martinez MF, 2003: Pattern and manipulation of follicular development in *Bos indicus* cattle. *Anim Reprod Sci* 78, 307–326.
- 9) Boenisch, T. (2001). *Handbook on Immunohistochemical Staining Methods*, 3rd ed. DAKO Corporation, Carpinteria, CA.
- 10) Byskov, A.G. (1978). Follicular atresia. IN: Jones, R.E (ed). *The Vertebrate Ovary*. Plenum Press, NY, pp 533-562.
- 11) Carini, R. Autelli, R. Bellomo, G. Dianzani, M.U. and Albano, E. (1995). Sodium-mediated cell swelling is associated with irreversible damage in isolated hepatocytes exposed to hypoxia or mitochondrial toxins. *Biochem Biophys Res Commun* 206: 180–185. *Cell Biol.* 10: 73–80.
- 12) Charruyer, A. Gradize, S. Bezombes, C. Muller, S. Laurent, G. and Jaffrezou, J.P. (2005). UV-C induces raft-associated acid sphingomyelinase and JNK activation and translocation independently on a nuclear signal. *J Biol Chem* 280: 19196–19204.
- 13) Chi, F.L. Yuan, Y.A. Wang, S.I. Wang, Z.M: (2004). Study on Ceramide Expression and DNA Content in Patients With Healthy Mucosa, Leukoplakia, and Carcinoma of the Larynx. *Arch Otolaryngol Head Neck Surg.* 130: 307-310.
- 14) Clark, L.J. Irving-Rodgers, H.I. Dharmarajan, A.M. and Rodgers, R.J. (2004). Theca Interna: The Other Side of Bovine Follicular Atresia. *Biology of Reproduction* 71: 1071–1078.

- 15) Columbano, A. (1995). Cell death: current difficulties in discriminating apoptosis from necrosis in the context of pathological processes in vivo. *J Cell Biochem* 58:181-90.
- 16) Cowart, L.A. Szulc, Z. Bielawska, A. and Hannun, Y.A. (2002). Structural determinants of sphingolipid recognition by commercially available anti-ceramide antibodies *J. Lipid Res.*43: 2042–2048.
- 17) Cremesti, A. Paris, F. Grassme, H. Holler, N. Tschopp, J. Fuks, Z. Gulbins, E. and Kolesnick, R. (2001). Ceramide enables fas to cap and kill. *J Biol Chem* 276: 23954–23961.
- 18) Cutler, R. G. and Mattson, M. P. (2001) Sphingomyelin and ceramide as regulators of development and lifespan. *Mech. Ageing Dev.* 122, 895–908
- 19) Cuvillier, O. Pirianov, G. Kleuser, R. Vanek P.J. Coso O.A. Gutkind J.S. Spiegel S. (1996). Suppression of ceramide-mediated programmed cell death by sphingosine-1-phosphate. *Nature* 381 (1996) 800– 803.
- 20) Cuvillier, O. (2002). Sphingosine in apoptosis signaling. *Biochim Biophys Acta* 1585:153-62.
- 21) Dagan, A. Wang, C. Fibach, E. and Gatt, S. (2003). Synthetic, non-natural sphingolipid analogs inhibit the biosynthesis of cellular sphingolipids, elevate ceramide and induce apoptotic cell death. *Biochim Biophys Acta.* 1633:161-9.
- 22) D'Herde, K. De Prest, B. and Roels, F. (1996). Subtypes of active cell death in the granulosa of ovarian atretic follicles in the quail (*Coturnix coturnix japonica*). *Reprod Nutr Dev* 36:175-89.
- 23) Dicker, F. Kater, A.P. Fukuda, T. and Kipps, T.J. (2005). Fas-ligand (CD178) and TRAIL synergistically induce apoptosis of CD40-activated chronic lymphocytic leukemia B cells. *Blood.*105: 3193 - 3198.
- 24) El Bawab, S. Roddy, P. Qian, T. Bielawska, A, Lemasters, J.J. Hannun, Y.A. (2000). Molecular cloning and characterization of a human mitochondrial ceramidase. *Biol. Chem.* 275 21508–21513.
- 25) Erdreich-Epstein, A. Tran, L.B. Cox, O.T. Huang, E. Laug, W.E. Shimada, H. and Millard, M. (2005). Endothelial apoptosis induced by inhibition of integrins $\alpha_v\beta_3$ y $\alpha_v\beta_5$ involves ceramide metabolic pathways. *Blood* 105: 4353–4361.
- 26) Espinoza V J.L.. Ortega P.R. Palacios E.A. Valencia.M.J. Aréchiga F.C.F (2007). Crecimiento folicular ovárico en animales domésticos: una revisión. *Interciencia.* 32 (02): 93-99.

- 27) Evans, A.C. (2003). Characteristics of Ovarian Follicle Development in Domestic Animals. *Reproduction Dom. Animal* 38: 240-246.
- 28) Fanzo, J.C. Lynch, M.P. Phee, H. Hyer, M. Cremesti, A. Grassme, H. Norris, J.S. Coggeshall, K.M. Rueda, B.R. Pernis, A.B. Kolesnick, R. and Gulbins, E. (2003). CD95 rapidly clusters in cells of diverse origins. *Cancer Biol Ther* 2: 392–395.
- 29) Flores-Pérez, F.I. Rosas-Velasco, C. Romano-Pardo, M.C. Pérez-Martínez, M. (2005). Apoptosis y atresia folicular: Un binomio esencial en el desarrollo Ovárico. *Vet. Méx.*, 36 (1) 87-103.
- 30) Foghi, A.R. A. Teerds, K.J. van der Donk, H. Kuksis, A. and Dorrington, J. (1998). Fas-Induced Apoptosis in Rat Thecal/Interstitial Cells Signals Through Sphingomyelin-Ceramide Pathway. *Endocrinology* Vol. 139, No. 4 2041-2047.
- 31) Fortune JE, Rivera GM, Evans ACO, Turzillo AM, 2001: Differentiation of dominant versus subordinate follicles in cattle. *Biol Reprod* 65, 648–654.
- 32) Froment, P. Fabre S, Dupont J, Pisselet C, Chesneau D, Staels B and Monget P. (2003). Expression and Functional Role of Peroxisome Proliferator-Activated Receptor-g in Ovarian Folliculogenesis in the Sheep. *Biology of Reproduction*. 69, 1665–1674.
- 33) Futerman, A. H. and Hannun, Y. A (2004). The complex life of simple sphingolipids. *EMBO reports*. 5 : 8
- 34) Garcia-Ruiz, C. Colell, A. Mari, M. Morales, A. Calvo, M. Enrich, C. and Fernandez-Checa. JC. (2003). Defective TNF- α -mediated hepatocellular apoptosis and liver damage in acidic sphingomyelinase knockout mice. *J Clin Invest* 111: 197–208.
- 35) Garcia-Ruiz, C. Colell, A. Mari, M. Morales, A. and Fernandez-Checa, J. C. (1997). Direct effect of ceramide on the mitochondrial electron transport chain leads to generation of reactive oxygen species. Role of mitochondrial glutathione. *J. Biol. Chem.* 272, 11369-11377.
- 36) Ginther OJ. Kot K. Wiltbank MC. (1995). Associations between emergence of follicular waves and fluctuations in FSH concentrations during the estrous cycle in ewes. *Theriogenology*; 43:689–703.
- 37) Grassme, H. Jendrossek, V. Bock, J. Riehle, A. and Gulbins, E. (2002). Ceramide-rich membrane rafts mediate CD40 clustering. *J. Immunol.* 168:298–307.
- 38) Guimara G and Linden R. (2004) Programmed cell death Apoptosis and alternative death styles. *Eur. J. Biochem.* 271, 1638–1650.
- 39) Guthrie, H.D. Grimes, R.W. Cooper, B.S. and Hammond, J.M. (1995). Follicular atresia in pigs: measurement and physiology. *J Anim Sci* 73:2834-44.
- 40) Hannun, Y.A., and Luberto, C. (2000). Ceramide in the eukaryotic stress response. *Trends*.

- 41) Hannun, Y. A. and Obeid, L. M. (2002). The ceramide-centric universe of lipid-mediated cell regulation: stress encounters of the lipid kind. *J. Biol. Chem.* 277, 25487-25850.
- 42) Hetz, C.A.H., M. Rojas, P. Torres, V. Leyton, L. and Quest, A.F. (2002). Caspase-dependent initiation of apoptosis and necrosis by the Fas receptor in lymphoid cells: onset of necrosis is associated with delayed ceramide increase. *J Cell Sci.* 2002 Dec 1;115(Pt 23):4671-83. Related Articles, Links 115.
- 43) Hofmann K, Dixit V.M. (1998). Ceramide in apoptosis—does it really matter?, *Trends Biochem. Sci.* 23 374–377.
- 44) Hsueh, A.J. Eisenhauer, K. Chun, S.Y. Hsu, S.Y.A. and Billing, H. (1996). Gonadal cell apoptosis. *Recent Prog. Horm. Res.* 51: 433-455.
- 45) Hu, C-L. Cowan, R.G. Harman, R.M. Porter, D.A. and Quirk, S.M. (2001). Apoptosis of Bovine Granulosa Cells After Serum Withdrawal Is Mediated by Fas Antigen (CD95) and Fas Ligand. *Biol Reprod*, 64: 518 - 526.
- 46) Hughes, F.M., Jr., and Gorospe, W.C. (1991). Biochemical identification of apoptosis (programmed cell death) in granulosa cells: evidence for a potential mechanism underlying follicular atresia. *Endocrinology* 129:2415-22.
- 47) Jennings, R.B., and Reimer, K.A. (1981). Lethal myocardial ischemic injury. *Am J Pathol* 102: 241-255.
- 48) Jolly, P.D. Smith, P.R. Heath, D.A. Hudson, N.L. Lun, S. Still, L.A. Watts, C.H. and McNatty, K.P. (1997). Morphological evidence of apoptosis and the prevalence of apoptotic versus mitotic cells in the membrana granulosa of ovarian follicles during spontaneous and induced atresia in ewes. *Biol Reprod* 56:837-46.
- 49) Jórdan J. (2003). Apoptosis: Muerte celular programada. *OFFARM.* 22(6): 100-105
- 50) Kerr, J.F. Gobe, G.C. Winterford, C.M. and Harmon, B.V. (1995). Anatomical methods in cell death. *Methods Cell Biol* 46: 1–27.
- 51) Kaipia A, Hsueh AJW. Regulation of ovarian follicle atresia. *Annu Rev Physiol* 1997; 59:349–363.
- 52) Kitamura, A. Yoshimura, Y. and Okamoto, T. (2002). follicles during atresia in hens T.Poult. *Sci.* 81: 408 - 413.
- 53) Kolesnick, R., and Hannun, Y.A. (1999). Ceramide and apoptosis. *Trends Biochem Sci* 24:224-5; author reply 227.
- 54) Kovacs, J. Forgo, V. and Peczely, P. (1992). The fine structure of the follicular cells in growing and atretic ovarian follicles of the domestic goose. *Cell Tissue Res* 267:561-9.
- 55) Krishnamurthy, K. Dasgupta, S. and Bieberich1, E. (2007). Development and characterization of a novel anti-ceramide antibody. *Journal of Lipid Research.* 48: 968-975.

- 56) Kumar S. (1999) Mechanisms mediating caspase activation in cell death. *Cell Death Differ*; 6,1060-1066.
- 57) Kyprianou, N. and Isaacs, J.T. (1988). Activation of programmed cell death in the rat ventral prostate after castration. *Endocrinology* 122:552-62.
- 58) Lacour, S. Hammann, A. Grazide, S. Lagadic-Gossmann, D. Athias, A. Sergent, O. Laurent, G. Gambert, P. Solary, E. and Dimanche-Boitrel, M.T. (2004). Cisplatin-induced CD95 redistribution into membrane lipid rafts of HT29 human colon cancer cells. *Cancer Res* 64: 3593–3598.
- 59) Ledezma AJ, Gallegos SJ, Villa GG y Valencia MJ (2006). Sistemas neurales de retroalimentación durante el ciclo reproductivo anual de la oveja: Una revisión. *Interciencia*.31 (1); 8-15
- 60) Lemasters, J.J. Nieminen, A.L. Qian, T. Trost, L.C. Elmore, S.P. Nishimura, Y. Crowe, D.A. Cascio, W.E. Bradham, C.A. Brenner, D.A. and Herman, B. (1998). The mitochondrial permeability transition in cell death: a common mechanism in necrosis, apoptosis and autophagy. *Biochim Biophys Acta* 1366:177-96.
- 61) Logothetopoulos, J., Dorrington, J. Bailey, D and Stratis, M. (1995). Dynamics of follicular growth and atresia of large follicles during the ovarian cycle of the guinea pig: fate of the degenerating follicles, a quantitative study. *Anat Rec* 243:37-48.
- 62) Markstrom E, Svensson Ch, Shao R, Svanderg B (2002). Survival factor regulating ovarian apoptosis dependence on follicle differentiation. *Reproduction* 123: 23-30.
- 63) Mc Neilly A S, Crawford J L, Taragnata C, Nicol L and Mc Neilly J L. (2003). The differential secretion of FSH and LH: regulation through genes, Feedback and Packaging. *Reproduction Supplement* 61: 463-476.
- 64) Morita, Y.a.T., J. L. (2000). Sphingolipid Regulation of Female Gonadal Cell Apoptosis. *Annals of the New York Academy of Sciences* 905:209-220.
- 65) Murdoch, W.J. Wilken, C. and Young, D.A. (1999). Sequence of apoptosis and inflammatory necrosis within the formative ovulatory site of sheep follicles. *J. Reprod. Fertil.* 117: 325 – 329.
- 66) Palumbo, A., and J. Yeh. (1994). In situ localization of apoptosis in the rat ovary during follicular atresia. *Biol Reprod* 51:888-95.
- 67) Padanilam, B.J. (2002). Cell death induced by acute renal injury: a perspective on the contributions of apoptosis and necrosis *Am J Physiol Renal Physiol* 284: F608–F627.
- 68) Pedersen HG, Watson ED and Telfer EE. (2000). Apoptosis in equine granulosa cells and its relationship to cumulus expansion and oocyte chromatin configuration in ovarian follicles *Journal of Reproduction and Fertility Supplement* 56 455–462.
- 69) Perez FFG, Velasco RC, Romano PM, Pérez MM. (2005). Apoptosis y atresia folicular: Un binomio esencial en el desarrollo ovárico. *Veterinaria México* 36 1:

- 70) Perez G.I, Jurisicova A, Matikainen T, Moriyama T, Kim M.R, Takay Y, Pru J.K, Kolesnick R.N y Tilly J.T. (2005). A central role for ceramide in the age-related acceleration of apoptosis in the female germline. *The FASEB Journal* 2:3-23.
- 71) Perry D.K, Carton J, Shah A.K, Meredith F, Uhlinger D.J, Hannun Y.A, (2000) *J. Biol. Chem.* 275 9078– 9084.
- 72) Picton HM. Activation of follicle development: the primordial follicle. *Theriogenology* 2001; 55:1193–1210.
- 73) Ramos-Vara (2005). Technical aspect of Immunochimistry. *Vet Pathol* 42:405–426.
- 74) Roche JF, Sunderland SJ, Knight PG, Boland MP, Ireland JJ, (1996). Alterations in intrafollicular levels of different molecular mass forms of inhibin during development of follicular- and luteal- phase dominant follicles in heifers. *Biol Reprod* 54, 453–462.
- 75) Rosado, A. Rosales, A.M. (1991). Maduración folicular en el mamífero. *Ciencia*; 42:81-97.
- 76) Rosales-Torres, A.M., A. Avalos-Rodríguez, M. Vergara-Onofre, O. Hernandez-Perez, L.M. Ballesteros, R. Garcia-Macedo, V. Ortiz-Navarrete, and A. Rosado. (2000). Multiparametric study of atresia in ewe antral follicles: histology, flow cytometry, internucleosomal DNA fragmentation, and lysosomal enzyme activities in granulosa cells and follicular fluid. *Mol Reprod Dev* 55:270-81.
- 77) Rotolo, J.A. Zhang, J. Donepudi, M. Lee, H. Fuks, Z. and Kolesnick, R. (2005). Caspase-dependent and -independent Activation of Acid Sphingomyelinase Signaling. *J. Biol. Chem.*, 280: 26425 - 26434.
- 78) Rubianes E. (2000). Avances en el conocimiento de la fisiología ovárica de los pequeños ruminantes y su aplicación para el manejo reproductivo. *Actas de Fisiología* 6: 93-103.
- 79) Santana P, Llanes L, Hernandez I, GallardoG, Quintana J, et al. 1995. Ceramide mediates tumor necrosis factor effects on P450-aromatase activity in cultured granulosa cells *Endocrinology* 136:2345–48.
- 80) Taylor CR, Shi S-R, Barr NJ, Wu N (2002). Techniques of immunohistochemistry: principles, pitfalls, and standardization. *Diagnostic Immunohistochemistry*, ed. Dabbs DJ, pp. 3–43.
- 81) Tepper, A.D.R., P. Wiedmer, T. Sims, P. J. Borst, J. and van Blitterswijk, W. J. (2000). Sphingomyelin hydrolysis to ceramide during the execution phase of apoptosis results from phospholipid scrambling and alters cell-surface morphology. *J. Cell Biol.* 150, 155-164.
- 82) Thon, L. Möhlig, H. Mathieu, S. Lange, A. Bulanova, E. Winoto-Morbach, S. Schütze, S. Bulfone-Paus, S. and Adam, D. (2005). Ceramide mediates caspase-independent programmed cell death. *FASEB J.* 19: 1945 - 1956.
- 83) Tilly, J.L., K.I. Kowalski, A.L. Johnson, and A.J. Hsueh. (1991). Involvement of apoptosis in ovarian follicular atresia and postovulatory regression. *Endocrinology* 129:2799-801.
- 84) Van Hecke D (2002). Routine immunohistochemical staining today: choices to make, challenges to take. *J Histotechnol* 25:45–54.

- 85) Van IJzendoorn, S.C.D., J.M. van der Wouden, G. Liebisch, G. Schmitz, and D. Hoekstra. (2004). Polarized Membrane Traffic and Cell Polarity Development Is Dependent on Dihydroceramide Synthase-Regulated Sphinganine Turnover. *Mol. Biol. Cell* 15:4115-4124.
- 86) Vickers S. L, Cowan R. G, Harman R. M, Porter D. A., and Quirk S. M. (2000) Expression and Activity of the Fas Antigen in Bovine Ovarian Follicle Cells. *Biology of reproduction* 62, 54–61
- 87) Wolfe, J.and Bryant, G(1999) Freezing drying and/or vitrification of membrane-solute-water systems. *Cryobiology*.39:103-129.
- 88) Yang M. Y. and Rajamahendran R (2000). Morphological and Biochemical Identification of Apoptosis in Small, Medium,and Large Bovine Follicles and the Effects of Follicle-Stimulating Hormone and Insulin-Like Growth Factor-I on Spontaneous Apoptosis in CulturedBovine Granulosa Cells. *Biology of Reproduction*:62, 1209–1217.
- 89) Yasuhara S, Zhu Y, Matsui T, Tipirneni N, Yasuhar Y, Kaneki M, Rosenzweig A and Martyn J (2003) Comparison of comet Assay, electron microscopy and flow cytometry for detection of apoptosis. *The journal of histochemistry y cytochemistry*. 51(7): 873-885.
- 90) Zamboni, L. (1974). Fine morphology of the follicle wall and follicle cell-oocyte association. *Biol Reprod* 10:125-49.
- 91) Zamzami, N., P. Marchetti, M. Castedo, C. Zanin, J.L. Vayssiere, P.X. Petit, and G. Kroemer. (1995a). Reduction in mitochondrial potential constitutes an early irreversible step of programmed lymphocyte death in vivo. *J Exp Med* 181:1661-72.
- 92) Zeiss, C.J. (2003). The Apoptosis-Necrosis Continuum: Insights from Genetically Altered Mice. *Vet. Pathol.* 40: (5) 481-495.