

UNIVERSIDAD AUTÓNOMA METROPOLITANA

UNIDAD IZTAPALAPA



Casa abierta al tiempo

DIVISIÓN DE CIENCIAS BIOLÓGICAS Y DE LA SALUD

**“LA CERAMIDA COMO INDICADOR DE ATRESIA FOLICULAR EN EL
BOVINO”**

T E S I S

**Que para obtener el grado de
Maestra en Biología Experimental**

PRESENTA:

MVZ. Cyndi Gabriela Hernández Coronado

Comité Tutorial

Directora: Dra. Ana María Rosales Torres

Asesores: Dr. José Ramón Verde Calvo

Dra. Marta C. Romano Pardo

México, D.F., NOVIEMBRE DEL 2012

Este trabajo fue realizado en el laboratorio de Bioquímica de la Reproducción del Departamento de Producción Agrícola y Animal de la Universidad Autónoma Metropolitana, Unidad Xochimilco bajo la dirección de la Dra. Ana María Rosales Torres. También se realizó en el laboratorio de Análisis Instrumental en la el mismo Departamento y en la misma unidad. Además del laboratorio de Enología y Alimentos Fermentados del Departamento de Biotecnología de la Unidad Iztapalapa con el apoyo del Dr. José Ramón Verde Calvo. El trabajo de investigación fue patrocinado por el Consejo Nacional de Ciencias y Tecnología (CONACYT por medio del proyecto con clave 50463-2)

“El Programa de Maestría en Biología Experimental de la Universidad Autónoma Metropolitana-Iztapalapa pertenece al Programa Nacional de Posgrado de Calidad (PNCP) del CONACYT, registro 001481, en el Nivel Consolidado y cuenta con el apoyo del mismo consejo, clave DAFCYT-2003IMPTNNN0020”.

Durante el transcurso de la maestría en Biología Experimental en la UAM-Iztapalapa, recibí una beca otorgada por el CONACYT, con número de becario/CVU 248781/367907 durante el periodo 2010-2012.

El jurado designado por la Comisión Académica del Posgrado en Biología Experimental de la División de Ciencias Biológicas y de la Salud de la Universidad Autónoma Metropolitana aprobó la tesis titulada: “**La Ceramida como indicador de Atresia folicular en el Bovino**” que presentó:

MVZ. CYNDI GABRIELA HERNÁNDEZ CORONADO

El día 16 de Noviembre del año 2012

PRESIDENTE

Dr. José Ramón Verde Calvo
Responsable del Laboratorio de Enología y Alimentos Fermentados
Depto. de Biotecnología, UAM-I

SECRETARIO

Dra. Marta C. Romano Pardo
Departamento de Fisiología Biofísica y Neurociencias
Centro de Investigación y Estudios Avanzados del IPN

VOCAL1

Dr. Adrian Guzmán Sánchez
Depto. De Ciencias Biológicas y de la Salud UAM-X

VOCAL2

Dr. Raúl José Bobes Ruíz
Instituto de Investigaciones Biomédicas UNAM

DATOS COMITÉ TUTORAL

Directora de Tesis

Dra. Ana María Rosales Torres

Profesor Titular C

Miembro del Sistema Nacional de Investigadores

Responsable del Laboratorio de Bioquímica de la Reproducción

Jefa del Departamento de Producción Agrícola y Animal

Universidad Autónoma Metropolitana Unidad Xochimilco

Calzada del Hueso 1100, Col. Villa Quietud CP 04960 México D.F.

Tel. 54837000 Ext. 3082

Email: anamexico@gmail.com

Asesor interno

Dr. José Ramón Verde Calvo

Profesor Titular

Responsable del Laboratorio de Enología y Alimentos Fermentados

Miembro del Sistema Nacional de Investigadores

Depto. de Biotecnología

Laboratorio de Enología y alimentos fermentados Lab S-152

Universidad Autónoma Metropolitana Unidad Iztapalapa

Av San Rafael Atlixco No.186, Col. Vicentina C.P.09340 Del. Iztapalapa México

D.F. Tel (01) 58044600

Tel 5804 4722, Fax 5804 4712

Email: jrvc@xanum.uam.mx

Asesor externo

Dra. Marta C. Romano Pardo

Profesor Titular

Miembro del Sistema Nacional de Investigadores

Departamento de Fisiología Biofísica y Neurociencias

Centro de Investigación y Estudios Avanzados del IPN

Av. Instituto Politécnico Nacional 2508, Col. San Pedro Zacatenco, Del. GAM C.P.

07360 México D.F.

Tel 5747 3800 (Oficina 3961 Lab. 5159 y 5160), Fax 5747 3754

Email: mromano@fisio.cinvestav.mx

Dedicatorias.

Dios, porque él es quien me guía y me muestra el camino para continuar creciendo.

A mis padres, Martha y Felipe, por confiar en mí, impulsarme con su apoyo incondicional, por inculcarme esas ganas de salir adelante y por ser un gran ejemplo en mi vida.

A mi hermano, Felipe por estar al pendiente de todo este proceso, preguntando por mi avance y motivándome a continuar hasta el final.

A mi querido **Luis**, por aconsejarme, escucharme, confiar en mí, ser paciente, brindarme todo su cariño, pero sobre todo por apoyarme en esta magnífica experiencia.

Agradecimientos.

A Dios, por haberme permitido vivir esta experiencia.

A la Dra. Ana María Rosales Torres, por confiar en mi para lograr la realización de esta tesis, por ser un ejemplo a seguir, brindándome conocimiento, apoyo, consejos, motivación y sobre todo por ser una persona que me ha inspirado compromiso y seguridad para seguir adelante.

Al Dr. José Ramón, por todo el conocimiento adquirido y los gratos momentos.

A la Maestra Bety Schettino, por tantas horas de dedicación a mi trabajo experimental, por marcar en mí las ganas de ayudar a los demás y por su valioso conocimiento.

Al Dr. Adrian Guzmán, por dedicarme tiempo y compartir conmigo mucha enseñanza.

Al Dr. Arturo Escobar, porque gracias a él pude lograr la culminación de mi trabajo experimental.

A la Dra. Marta Romano y Al Dr. Raúl Bobes por su valiosa orientación y estimulación.

Al Dr. Alejandro Ávalos, porque en los inicios de esta tesis me apoyó incondicionalmente.

A la Universidad Autónoma Metropolitana Unidad Iztapalapa y Xochimilco.

Al laboratorio de Análisis instrumental, al Dr. Rey por permitirme el acceso a sus instalaciones.

Al Dr. Jesús, por sus consejos y apoyo con la utilización del equipo de laboratorio.

A Jorge Alberto (Antonio), por su amistad y apoyo.

A Anita, por su tiempo.

A mi mejor amiga Lily, por escucharme, aconsejarme y porque sin saberlo su apoyo para mí fue muy importante.

A todos mis amigos en general.

A todos mis compañeros del Laboratorio de Bioquímica de la Reproducción.

Y finalmente una vez más sin restar importancia sino todo lo contrario a mis queridos padres, hermano y a mi novio incondicional Luis.

RESUMEN.

El desarrollo folicular ocurre en un patrón de ondas. Cada onda comprende el reclutamiento de una cohorte de folículos que inician su crecimiento gracias a FSH. De esta cohorte de folículos el primero en alcanzar un diámetro de 8 mm es seleccionado como folículo dominante (FD) que ejercerá su dominancia para evitar el desarrollo de los demás folículos. Si existe la presencia de un cuerpo lúteo funcional el FD sufrirá un proceso degenerativo denominado atresia folicular. La atresia folicular es el proceso por el cual ocurre la mayor pérdida de folículos en la vida útil de las hembras de especies domésticas. La muerte celular es el mecanismo fundamental en la eliminación celular ocurrido en la atresia. Un evento temprano en la muerte celular es la producción de esfingolípidos como la ceramida (Cer) a partir de fosfolípidos de la membrana plasmática, la cual actúa como segundo mensajero en la muerte celular, sin embargo en una célula que no recibe el estímulo de muerte, se ponen en marcha mecanismos enzimáticos para convertir Cer en esfingosina 1-fosfato (S1P) como señal de supervivencia por la activación de fosfoinositol 3-Cinasa/proteína cinasa B y las proteínas cinasas activadas por mitógenos (MAPs cinasas). Por lo anterior el objetivo del presente trabajo fue determinar las concentraciones de Cer y S1P así como su relación en folículos dominantes (FD) sanos y atrésicos de bovino. Se recuperaron FD de vacas sacrificadas en un rastro local, usando como criterio de dominancia el diámetro folicular (entre 8-17 mm). De cada folículo se obtuvieron: células de la teca (CT), células de la granulosa (CG) y líquido folicular. En el líquido folicular se determinó la concentración de estradiol (E2) y progesterona (P4) por radioinmunoensayo (COAT-A-COUNT; Diagnostic Products Corporation, los

Angeles CA). Los FD, se clasificaron como atrésicos cuando la relación E2/P4 fue <1 y sanos cuando fue ≥ 1 . En CG y CT se realizó extracción de esfingolípidos y se cuantificó la concentración de Cer y S1P por HPLC (columna XTerra RP-18; $5\mu\text{m}$, $3.0 \times 150\text{mm}$). Los resultados muestran que en CG, la concentración de S1P es mayor ($P < 0.05$) en FD sanos que en atrésicos sin diferencia ($P > 0.05$) en Cer, mientras que en CT tanto la concentración de S1P como de Cer fue mayor ($P < 0.05$) en FD sanos que en atrésicos. Un hallazgo importante es que la relación S1P/Cer en CG y CT fue mayor en FD sanos que en atrésicos ($P < 0.05$) aunque con diferentes proporciones, mientras que en CG la concentración de S1P fue en promedio 40 veces mayor ($P < 0.05$), en CT hay alrededor de 14 veces ($P < 0.05$) más S1P que Cer. Finalmente el análisis de regresión lineal mostró que la relación S1P/Cer en CT se incrementa linealmente ($P < 0.05$ y $= 7.62 + 2.72x$) con el aumento de la relación E2/P4 y que estas relaciones están correlacionadas ($r = 0.43$; $P < 0.05$). Los resultados de este estudio indican que la relación en la concentración de S1P/Cer en CG y CT es un buen indicador de la salud o la atresia folicular.

Palabras clave: *Atresia folicular, Ceramida, Esfingosina 1- Fosfato.*

ABSTRACT.

The follicular development occurs in a wave pattern. Each wave includes the recruitment of a cohort of follicles begin their growth with FSH. In this cohort of follicles the first to reach a diameter of 8 mm is selected as the dominant follicle (DF) to exercise its dominance even prevent the development of other follicles. If there is the presence of a functional corpus luteum, DF undergo a degenerative process called follicular atresia. Follicular atresia is the process by which loss occurs most follicles in the life of female domestic species. Cell death is the fundamental mechanism in cell killing occurred in the atresia. An early event in cell death is the production of sphingolipid ceramide (Cer) from the plasma membrane phospholipids, which acts as a second messenger in cell death, however in a cell that not receive the death stimulus, enzymatic mechanisms are implemented to convert Cer in sphingosine 1-phosphate (S1P) as a survival signal by activation of phosphoinositide kinase 3-Cinasa/proteína B and mitogen-activated protein kinases (MAPs kinases). Therefore the objective of this study was to determine the concentrations of Cer and S1P and their relationship in dominant follicles (DF) healthy and atretic bovine. DF were recovered from cows slaughtered at a local trail, using as dominance criterion follicular diameter (8-17 mm). From each follicle were obtained: theca cells (TC), granulosa cells (GC) and follicular fluid. In the follicular fluid concentration was determined estradiol (E2) and progesterone (P4) by radioimmunoassay (COAT-A-COUNT, Diagnostic Products Corporation, Los Angeles CA). The DF, were classified as atretic when the relationship E2/P4 was <1 and was healthy when ≥ 1 . In CT and CG and sphingolipids extraction was performed and quantified Cer concentration and S1P by HPLC (XTerra RP-18,

5 μ m, 3.0x150mm). The results show that in CG, S1P concentration is greater ($P < 0.05$) in healthy than in atretic FD no difference ($P > 0.05$) in Cer, while in CT both S1P concentration as Cer was higher ($P < 0.05$) in healthy than in atretic FD. An important finding is that the relationship S1P/Cer in CG and CT was higher in healthy than in atretic FD ($P < 0.05$) but with different proportions, while in CG S1P concentration was on average 40 times higher ($P < 0.05$) in CT are about 14 times ($P < 0.05$) more S1P than Cer. Finally, the linear regression analysis showed that the ratio S1P/Cer in CT increases linearly ($P < 0.05$ and $= 7.62 + 2.72x$) with increasing E2/P4 relationship and that these relationships are correlated ($r = 0.43$; $P < 0.05$). The results of this study indicate that the concentration ratio S1P/Cer in CG and CT is a good indicator of health or follicular atresia.

Keywords: *Follicular atresia, Ceramide, Sphingosine 1-Phosphate.*

ÍNDICE GENERAL.

1. INTRODUCCIÓN.	1
2. MARCO TEÓRICO.	4
2.1. DESARROLLO FOLICULAR.	4
2.1.1 <i>Reclutamiento.</i>	5
2.1.2 <i>Selección y Dominancia.</i>	6
2.2. ATRESIA FOLICULAR.	8
2.2.1 <i>Clasificación de la atresia.</i>	11
2.2.2 <i>Teorías sobre la atresia.</i>	17
2.2.3 <i>Muerte celular en la atresia folicular.</i>	18
2.2.4 <i>Mecanismos endócrinos involucrados en la atresia folicular.</i>	21
2.2.4.1 <i>Importancia de FSH, Factor de Crecimiento del Endotelio Vascular (VEGF) y E₂.</i>	22
2.2.4.2 <i>Importancia de LH y P₄.</i>	25
2.2.4.3 <i>Relación estradiol-progesterona (E₂: P₄).</i>	27
2.3. NECROSIS.	29
2.4. APOPTOSIS.	34
2.4.1 <i>Vías de la apoptosis.</i>	37
2.4.1.1 <i>Etrínseca.</i>	37
2.4.1.2 <i>Intrínseca.</i>	38
2.4.1.3 <i>Vía de ejecución.</i>	45
2.5. OTROS TIPOS DE MUERTE CELULAR.	46
2.6. IMPORTANCIA DE LA MEMBRANA PLASMÁTICA EN LA INTEGRIDAD DE LA CÉLULA.	48
2.6.1 <i>Asimetría de la membrana plasmática.</i>	50
2.7. ESFINGOLÍPIDOS Y SU FUNCIÓN COMO MOLÉCULAS DE SEÑALIZACIÓN.	53
2.8. CERAMIDA.	58
2.8.1 <i>Membrana plasmática y Cer.</i>	60
2.8.2 <i>Cer en los componentes celulares.</i>	65
2.9. ESFINGOSINA 1-FOSFATO Y ESFINGOSINA CINASA (SK).	68
2.10. OTROS ESFINGOLÍPIDOS SEÑALIZADORES.	76
3. PLANTEAMIENTO DEL PROBLEMA Y JUSTIFICACIÓN.	78
4. PREGUNTA DE INVESTIGACIÓN.	80
5. HIPÓTESIS.	80
6. OBJETIVO GENERAL.	80
7. OBJETIVOS PARTICULARES.	80
8. METODOLOGÍA.	81
8.1. OBTENCIÓN DE OVARIOS, CLASIFICACIÓN Y RECUPERACIÓN DE CÉLULAS Y LÍQUIDO FOLICULAR.	81
8.1.1 <i>Obtención de ovarios.</i>	81
8.1.2 <i>Líquido folicular (LF).</i>	82
8.1.3 <i>Células de la teca (CT) y granulosa (CG).</i>	82
8.2. DETERMINACIÓN DE HORMONAS ESTEROIDES.	83
8.3. EXTRACCIÓN DE ESFINGOLÍPIDOS DE CG Y CT DE FOLÍCULOS DE BOVINO.	84
8.3.1 <i>Metanólisis alcalina.</i>	85

8.4	DETERMINACIÓN DE ESFINGOSINA 1-FOSFATO (S1P), CERAMIDA (Cer) Y MUESTRAS DE CG Y CT DE FOLÍCULOS DE BOVINO POR CROMATOGRAFÍA DE LÍQUIDOS DE ALTA RESOLUCIÓN (HPLC).	86
	<i>8.4.1 Procesamiento de los estándares.</i>	86
	<i>8.4.2 Derivatización con OPA (O-phtalaldehyde).</i>	88
	<i>8.4.3 Análisis por HPLC.</i>	89
8.5	ANÁLISIS ESTADÍSTICO.	90
9.	RESULTADOS.	91
9.1	OBTENCIÓN DE OVARIOS Y CLASIFICACIÓN.	91
9.2	DETERMINACIÓN DE HORMONAS ESTEROIDES POR RIA.	91
9.3	DETERMINACIÓN DE S1P Y CER POR HPLC.	92
9.4	DETERMINACIÓN DE S1P Y CER EN CT Y CG MEDIANTE HPLC.	95
9.5	CONCENTRACIONES DE S1P Y CER EN CT Y CG DE FOLÍCULOS DOMINANTES SANOS Y ATRÉSICOS.	100
9.6	RELACIÓN S1P/Cer EN CT Y CG.	102
10.	DISCUSIÓN.	105
11.	CONCLUSIONES.	116
12.	REFERENCIAS.	117

ÍNDICE DE FIGURAS.

FIGURA 1. ESTRUCTURA DE UN FOLÍCULO ANTRAL.	4
FIGURA 2. DESARROLLO Y ATRESIA FOLICULAR.	9
FIGURA 3. DESTINO DEL FOLÍCULO DOMINANTE.	14
FIGURA 4. MODELO DEL PROCESO DE ATRESIA ANTRAL Y BASAL EN EL FOLÍCULO DE BOVINO.	16
FIGURA 5. ASPECTOS ENDOCRINOLÓGICOS DURANTE LA ATRESIA FOLICULAR EN CÉLULAS DE LA TECA (CT) Y CÉLULAS DE LA GRANULOSA (CG).	29
FIGURA 6. ESTRUCTURA GENERAL DE UNA MOLÉCULA DE SM.	56
FIGURA 7. ESTRUCTURA Y FORMACIÓN DE LOS PRINCIPALES ESFINGOLÍPIDOS BIOACTIVOS.	60
FIGURA 8. METABOLISMO DE SM EN LA MEMBRANA PLASMÁTICA.	63
FIGURA 9. EFECTOS GENERADOS POR CER Y S1P A NIVEL CELULAR.	69
FIGURA 10. EFECTOS A NIVEL CELULAR DE S1P.	75
FIGURA 11. PROCESAMIENTO DE CÉLULAS Y LÍQUIDO FOLICULAR.	83
FIGURA 12. REACCIÓN DE DERIVATIZACIÓN DEL ESTÁNDAR CE CERAMIDA (Cer).	89
FIGURA 13. CURVA DE CALIBRACIÓN DE S1P.	93
FIGURA 14. CURVA DE CALIBRACIÓN DE Cer.	93
FIGURA 15. CROMATOGRAMA POR HPLC DEL ESTÁNDAR DE S1P.	94
FIGURA 16. CROMATOGRAMA POR HPLC DEL ESTÁNDAR DE Cer.	95
FIGURA 17. CROMATOGRAMA POR HPLC DE CÉLULAS DE LA TECA (CT) DE UN FOLÍCULO SANO DERIVADO CON OPA.	96
FIGURA 18. CROMATOGRAMA POR HPLC DE CÉLULAS DE LA GRANULOSA (CG) DE UN FOLÍCULO SANO DERIVADO CON OPA.	96
FIGURA 19. CROMATOGRAMA POR HPLC DE CÉLULAS DE LA TECA (CT) DE UN FOLÍCULO ATRÉSICO DERIVADO CON OPA.	98
FIGURA 20. CROMATOGRAMA POR HPLC DE CÉLULAS DE LA GRANULOSA (CG) DE UN FOLÍCULO ATRÉSICO DERIVADO CON OPA.	98
FIGURA 21. CROMATOGRAMA POR HPLC DE CÉLULAS DE LA TECA (CT) DE UN FOLÍCULO DOMINANTE ATRÉSICO DERIVADO CON OPA.	99
FIGURA 22. CROMATOGRAMA POR HPLC DE CÉLULAS DE LA GRANULOSA (CG) DE UN FOLÍCULO DOMINANTE SANO DERIVADO CON OPA.	100
FIGURA 23. CONCENTRACIONES DE S1P Y Cer EN CG DE FOLÍCULOS SANOS OBTENIDOS EN RASTRO.	101
FIGURA 24. CONCENTRACIONES DE S1P Y Cer EN CT DE FOLÍCULOS SANOS OBTENIDOS EN RASTRO.	102

ÍNDICE DE TABLAS.

TABLA 1. DIFERENCIAS BÁSICAS ENTRE APOPTOSIS Y NECROSIS.	30
TABLA 2. CLASIFICACIÓN DE FOLÍCULOS MEDIANTE DETERMINACIÓN DE HORMONAS ESTEROIDES.	91
TABLA 3. MEDIA DEL DIÁMETRO FOLICULAR, CONCENTRACIONES DE E ₂ Y P ₄ EN LÍQUIDO FOLICULAR Y LA RELACIÓN E ₂ /P ₄ EN EL BOVINO.	92
TABLA 4. MEDIA DE LAS CONCENTRACIONES DE S1P Y Cer EN CÉLULAS DE LA GRANULOSA (CG) EXPRESADAS EN µg/10 ⁶ CÉLULAS Y LA RELACIÓN S1P/Cer.	103
TABLA 5. MEDIA DE LAS CONCENTRACIONES DE S1P Y Cer EN CÉLULAS DE LA GRANULOSA (CG) EXPRESADAS EN µg/mg TEJIDO Y LA RELACIÓN S1P/Cer.	104
TABLA 6. MEDIA DE LAS CONCENTRACIONES DE S1P Y Cer EN CÉLULAS DE LA TECA (CT) EXPRESADAS EN µg/mg TEJIDO Y LA RELACIÓN S1P/Cer.	104

1. INTRODUCCIÓN

Los ovarios son órganos reproductivos, brindan la principal fuente de hormonas femeninas necesarias para las funciones reproductivas y están formados por una mezcla de células somáticas y germinales (Friberg, 2009). Durante la diferenciación gonadal en el desarrollo embrionario, cada célula germinal (ovocito) es rodeada por una población de células somáticas especializadas (pregranulosa) para formar un folículo que es la unidad funcional de las gónadas femeninas. Muchos de estos folículos presentes en el ovario de neonatos se mantienen en estado de reposo y se les refiere como folículos primordiales. El número de folículos presentes en el ovario al nacimiento varía según la especie, en la mujer se estiman aproximadamente 2×10^6 , en la ratona 2×10^4 y en el bovino 150×10^3 (Morita y Tilly, 2000; Flores *et al.*, 2005; Valdez *et al.*, 2005).

El crecimiento folicular en el ovario de mamíferos es iniciado por la proliferación de las células de la granulosa (CG) alrededor del ovocito y seguido por la diferenciación de células estromales o células intersticiales para conformar las células de la teca (CT). La población de CG y CT proliferan durante el siguiente paso en el crecimiento para generar folículos antrales con un ovocito adecuadamente desarrollado, en esta etapa de crecimiento los folículos responden al estímulo de Hormona luteinizante (LH) y Hormona Folículo Estimulante (FSH) para pasar a la etapa de folículo preovulatorio en el que ha alcanzado su máximo diámetro y se encuentra capacitado para responder al estímulo de LH para la ovulación (Fogui *et al.*, 1998; Flores *et al.*, 2005).

En el ovario ocurren diversos procesos naturales por los cuales hay pérdida de la reserva ovárica. Dentro de los más importantes es la edad en el caso de la mujer

donde aproximadamente a los 50 años presentan senescencia ovárica lo que quiere decir tiene una pobre reserva ovárica que lleva al cese de la etapa fértil (Morita y Tilly, 2000). Otro mecanismo que impacta la reserva ovárica es la atresia folicular, proceso degenerativo paulatino e irreversible que sufren los folículos a lo largo de todo su desarrollo y que les impide alcanzar la ovulación. En los ovarios de los mamíferos, la atresia folicular es un proceso degenerativo extenso que se propaga en todo el folículo y por el cual éste pierde su integridad estructural (Salha *et al.*, 1998). No se conocen con precisión las causas que desencadenan o determinan la atresia, sin embargo su universalidad permite suponer que se trata de un proceso de selección de los gametos el cual nunca interfiere con la reproducción normal de la hembra (Jolly *et al.*, 1997). Se ha estimado tanto en humanos como en la mayoría de las especies, que aproximadamente el 99% de los folículos se volverán atrésicos (Valdez *et al.*; 2005). Actualmente existen evidencias que sustentan que en la atresia participa más de un tipo de muerte celular, estudios indican que en la oveja la atresia involucra a la necrosis y a la apoptosis y que la participación preponderante de uno de los dos tipos de muerte dependerá del tamaño del folículo (Alonso *et al.*, 2003; Rosales *et al.*, 2000). Independientemente del tipo de muerte celular, en la membrana de las células foliculares se ha observado un cambio en la distribución de los fosfolípidos y la generación de un esfingolípido llamado Ceramida (Cer) el cual funciona como un segundo mensajero en el proceso de la muerte celular, sin embargo dependiendo de las condiciones que rodean a las células, a partir de este esfingolípido se puede generar otro llamado esfingosina 1-fosfato (S1P) el cual favorece la sobrevivencia crecimiento y proliferación celular. Considerando lo

anterior, se ha propuesto que la relación entre la concentración de Cer y S1P en una célula puede ser un importante indicador de su destino (sobrevivencia y proliferación o muerte celular; Sterin y Leocata, 2007; Alewijnse y Peters, 2008).

Durante la atresia los folículos van perdiendo la capacidad para producir esteroides, primero estrógenos (E_2) y luego andrógenos y progesterona (P_4). Durante este proceso, las primeras células afectadas son las CG, después las CT y por último el ovocito. Las CG producen estrógenos a partir de los andrógenos que le proporcionan las CT los cuales son sintetizados a partir de P_4 , de allí que la relación que guardan estas hormonas esteroides (E_2 y P_4) en el líquido folicular reflejan el grado de integridad o "salud folicular", cuando E_2/P_4 es mayor o igual a 1 indica el estado saludable de un folículo, mientras que el grado de daño que está ocurriendo en las células de un folículo se traduce en una relación E_2/P_4 menor a 1, (Rosales *et al.*, 2000; Yu *et al.*, 2004; Jayawardana *et al.*, 2006, Shimizu *et al.*, 2007).

Debido a que no se conocen con precisión los mecanismos involucrados en la atresia folicular con este proyecto nos proponemos conocer si en las células que conforman a los folículos de bovino, la relación Cer/S1P es un indicador de atresia y si existe diferencia en esta relación entre CG y CT.

2. MARCO TEÓRICO

2.1. Desarrollo folicular

El folículo es la unidad funcional del ovario, en él se alberga el ovocito. El folículo antral está conformado por CT interna y externa, CG, una membrana basamental la cual separa a las CT de las CG, una cavidad llena de extravasación llamado líquido folicular el cual contiene hormonas, factores de crecimiento entre otros metabolitos producidos en las células foliculares y un cumulus de CG (Fig. 1). Las CT tienen receptores para LH y las CG poseen receptores para la hormona FSH. Éstas dos hormonas le brinda al folículo el aporte de sobrevivencia para su crecimiento y una reducción del estimulos de gonadotropinas puede llevar al folículo a la muerte (Friberg, 2009).

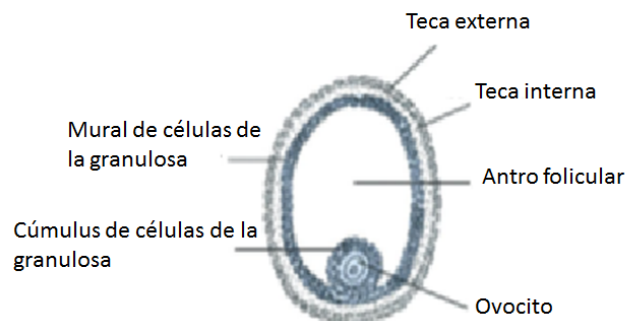


Figura 1. Estructura de un folículo antral. Tomado de Aerts y Bols (2010).

El desarrollo de los folículos es un proceso continuo que finaliza con la ovulación y consta de 2 fases. La primera conocida como desarrollo folicular basal la cual está bajo el control parácrino de los factores de crecimiento. En esta fase la FSH

puede ejercer un efecto mitogénico indirecto sobre las células de la granulosa por aumento en la expresión de los factores de crecimiento o sus receptores. La segunda fase se conoce como desarrollo folicular terminal y depende estrictamente de gonadotropinas (FSH y LH) (Peña *et al.*, 2007)

En la mayoría de las especies de animales domésticos (vaca, búfalo, oveja, cabra, caballos) y en humanos el desarrollo folicular durante el ciclo estral/menstrual ocurre con un patrón de ondas u olas de crecimiento (Rosell, 2004). Durante un ciclo estral pueden ocurrir una o más oleadas. El ciclo estral del bovino se caracteriza por la presencia de 2 a 3 ondas de crecimiento, aunque también se han registrado algunos ciclos con una o cuatro ondas. Ciclos cortos son más visibles en el periodo postparto y durante la pubertad. La primera onda de crecimiento del ciclo emerge aproximadamente en el día 1. En patrones de dos ondas, la segunda ola ocurre en el día 9-10 y en patrones de 3 ondas de desarrollo ocurren en los días 8-9 y posteriormente día 15 y 16 (Kanitz, 2003; Espinoza *et al.*, 2007). Diversos autores dividen la dinámica folicular en 3 fases para cada onda (Reclutamiento, Selección y Dominancia) Rosell, 2004; Espinoza *et al.*, 2007; Vasquez y Olivera, 2010).

2.1.1 Reclutamiento

El concepto de reclutamiento es referido a la entrada de una cohorte de folículos pequeños antrales para iniciar una onda de desarrollo folicular. En el reclutamiento entre 5–10 folículos pudiendo llegar hasta los 24 folículos antrales de un diámetro de entre 4-5mm (Aerts y Bols, 2010) inician su crecimiento. Estos folículos crecen por altos niveles circulantes de FSH iniciando un crecimiento

rápido bajo el estímulo de esta hormona, evidenciándose en ellos un incremento del RNAm para la enzima de clivaje (escisión) del colesterol ($P450_{sc}$) y de la aromatasa P450 ($P450_{arom}$) responsable de la síntesis de estradiol (E_2), mientras que en folículos no reclutados, este incremento no se observa (Kanitz, 2003; Montaña *et al.*, 2005). En contraste en otras enzimas como la citocromo P450, 17α hidroxilasa ($P450_{sc17}$) y la 3β hidroxisteroide deshidrogenasa (3β -HSD) no se observan cambios entre folículos no reclutados y reclutados. Esto indica que la capacidad del folículo para producir E_2 determina su capacidad para responder al pico transitorio de FSH durante el reclutamiento (Rosales *et al.*, 2012).

2.1.2 Selección y Dominancia

La selección o desviación folicular ocurre al final de la fase común de crecimiento cuando uno de los folículos alcanza un diámetro de aproximadamente 8mm y es seleccionado de entre los folículos que fueron reclutados con él (Espinoza *et al.*, 2007). El Foliculo seleccionado continuará creciendo para convertirse en dominante. El folículo dominante, crece a una tasa constante en un ambiente endócrino bajo en FSH y suprimiendo el crecimiento del resto de los folículos (folículos subordinados; FS). Los FS sufrirán un proceso degenerativo de sus células, entrando con ello al proceso de atresia lo cual les impedirá llegar a la ovulación (Fig. 2).

El folículo seleccionado como dominante posee una maquinaria molecular que le permite producir grandes cantidades de E_2 , responder a bajos niveles de FSH y presentar receptores a LH en las células de la granulosa. La síntesis de

receptores a LH por parte de las CG ocasiona que el FD dependa de ésta hormona para su crecimiento. Además responde al estímulo de factores de crecimiento tales como el Factor de crecimiento similar a la insulina tipo I (IGF-1) que actúa de manera sinérgica con gonadotropinas para promover el crecimiento y esteroidogénesis en el folículo y el factor de crecimiento endotelio vascular (VEGF) el cual favorece la formación de vasos sanguíneos en el folículo para favorecer el suministro de oxígeno, nutrientes y las hormonas esenciales para el desarrollo del folículo. La dominancia folicular en vacas se establece cuando el folículo seleccionado alcanza un diámetro de 8 a 8.5mm y produce altas cantidades de E_2 e inhibina lo cual causa una retroalimentación negativa para disminuir las concentraciones de FSH (Rosales *et al.*, 2012).

Dentro de los aspectos funcionales y estructurales que caracterizan a las células del folículo dominante, están los altos niveles de RNAm y de la proteína de los receptores a gonadotropinas, principalmente para la LH (LHR), así como de las enzimas 17 α hidroxilasa (17 α OH), P450 aromatasa (P450), 3 β hidroxisteroide deshidrogenasa (3 β HSD) y de la proteína reguladora de la esteroidogénesis aguda (StAR). El aumento de LHR en las CG del folículo dominante, incrementa la actividad de la aromatasa en respuesta a gonadotropinas y provoca un cambio de dependencia de FSH a LH. Esto aumenta o mantiene la capacidad del folículo dominante para producir más E_2 que los folículos subordinados (Montaño *et al.*, 2005).

Una vez que el folículo ha alcanzado su máximo crecimiento, en ausencia de un cuerpo lúteo el folículo podrá llegar a la ovulación, sin embargo si hay un cuerpo

lúteo, el folículo dominante sufrirá atresia debido a las altas concentraciones de P_4 que impiden la producción de un pico preovulatorio de LH. La atresia del folículo dominante permitirá una nueva elevación transitoria de FSH y la emergencia de una nueva onda de desarrollo folicular (Fig. 2) (Vázquez y Olivera, 2010).

2.2. Atresia folicular

Durante el desarrollo folicular, solo un número limitado de folículos (~1%) son seleccionados para la ovulación (Yang *et al.*, 2000) por lo que la atresia es el destino de la mayoría de ellos. Los folículos que comienzan su desarrollo en un ciclo estral y no son ovulados, se volverán atrésicos. La atresia se presenta en cualquier estadio del desarrollo folicular aunque es más frecuente en folículos antrales, y su incidencia está directamente relacionada con el tamaño de los folículos (Rosales y Guzmán, 2008).

La atresia folicular involucra la muerte de las células foliculares y la reabsorción de los restos celulares (Clark *et al.*, 2004). La muerte celular debe de entenderse como un proceso irreversible que termina con la actividad biológica de la célula. (Darzynkiewicz *et al.*, 1997).

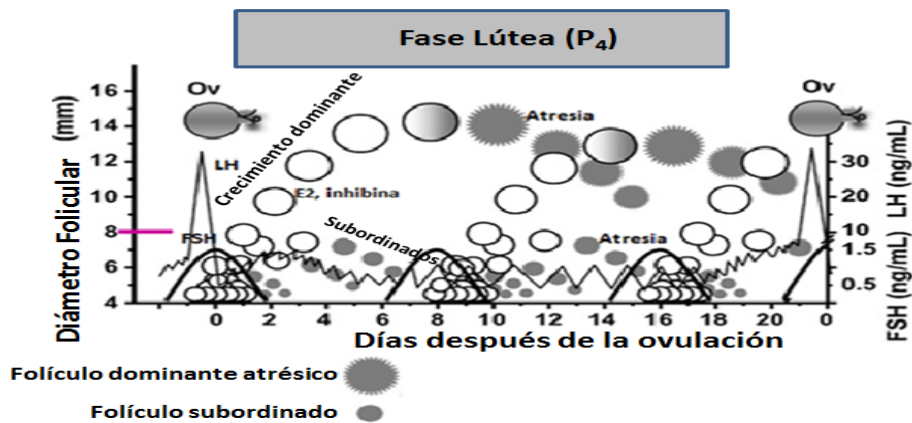


Figura 2. Desarrollo y atresia folicular. El desarrollo de los folículos de bovino ocurre en un patrón de ondas de desarrollo folicular. Su ciclo estral dura 21 días en el cual se presentan de 2 a 3 ondas de desarrollo folicular, cada onda comprende el reclutamiento de una cohorte de folículos que inician su crecimiento gracias a FSH. De esta cohorte de folículos el primero en alcanzar un diámetro de 8 mm es seleccionado como folículos dominante (FD) que ejercerá su dominancia produciendo altas concentraciones de E₂ e inhibina par evitar el desarrollo de los demás folículos (subordinados), dependiendo ahora de LH para su crecimiento. Si existe la presencia de un cuerpo lúteo funcional el FD sufrirá un proceso degenerativo denominado atresia folicular Sin embargo el folículo dominante aunque tiene toda la maquinaria para llegar a la ovulación también puede sufrir la atresia por la P₄ del cuerpo lúteo, por lo que podremos encontrar folículos dominantes sanos y folículos dominantes atrésicos. Tomado de Adams *et al* (2008).

Atresia es un término griego que significa *a*= no, *tresos*= perforación (Rosales, 1999; Flores *et al.*, 2005), literalmente significa clausura u obliteración de un orificio o conducto del cuerpo (Rosales y Guzmán, 2008). La atresia folicular es un fenómeno universal que se presenta no sólo en los mamíferos sino por lo menos en todos los vertebrados. Sin embargo mientras que en los mamíferos los cambios morfológicos que acompañan a la atresia son solo perceptibles en la

escala celular y subcelular, en los vertebrados inferiores el desarrollo de atresia es mucho más perceptible, pues los folículos son obliterados y degenerados por numerosas CG que muestran una actividad fagocítica masiva. (Rosales, 1999)

En el ovario de la mujer existen aproximadamente dos millones de ovocitos al momento del nacimiento: cuando llega la pubertad se encuentran aproximadamente 400 000 folículos. Sin embargo tan solo 400 folículos serán ovulados durante la vida reproductiva de la mujer. Este suceso fisiológico contraviene los principios metabólicos y energéticos del organismo, en los que se procura que los procesos corporales y las células que lo controlan ahorren energía y esfuerzos para no producir nada innecesario. Sin embargo la capacidad de seleccionar solo 400 es un mecanismo de selección natural en el que sólo algunos ovocitos serán liberados (Flores *et al.*, 2005)

En la atresia, se presentan cambios morfológicos, histológicos y procesos bioquímicos como la reducción de la síntesis y por ende en la cantidad de ADN en CG, pérdida de uniones comunicantes, pérdida de receptores a gonadotropinas y otros (Rosales y Guzmán, 2008).

Algunos estudios han sugerido que los cambios degenerativos asociados con la atresia aparecen inicialmente en las CG. En un principio se presentan núcleos picnóticos (retracción del núcleo) en casi toda la capa de CG que rodean al antro, se ha demostrado que la muerte de CG durante la atresia en diferentes especies ocurre por apoptosis (Yang *et al.*, 2000; Rodgers y Rodgers, 2010), aunque existen evidencias que sustentan que en la atresia participa más de un tipo de muerte ya que estudios en la oveja proponen que la atresia involucra necrosis y

apoptosis y que la participación preponderante de uno de los dos tipos de muerte depende del tamaño del folículo (Rosales *et al.*, 2000).

Dentro de los primeros estudios sobre la atresia mediante observación en microscopio electrónico y óptico se encontró que en la atresia inicial o temprana se puede observar la presencia de núcleos picnóticos y fragmentados en las CG y en algunos casos retracción del ovocito. En cuanto a la atresia avanzada en CG se encontraron alteraciones citoplásmicas como vacuolización y aumento en tamaño de mitocondria, en tanto que en el ovocito también se observó vacuolización y disminución de las microvellosidades. Mientras que en un folículo sano las CG se observan esféricas y presentan numerosas microvellosidades que se correlacionan con la presencia de receptores para la LH. Esta evidencia permite relacionar fácilmente la pérdida de microvellosidades observada durante el principio de la atresia con la pérdida de receptores para esta hormona (Rosales, 1999).

2.2.1 Clasificación de la atresia

Desde hace aproximadamente 50 años se han postulado diversas clasificaciones histológicas de la atresia folicular, una de estas es la propuesta por Carson *et al* (1979) que es una modificación a la designada por Byskov (1974), la cual comprende:

Atresia I: Involucra a los folículos no atrésicos, los cuales presentan una capa de CG integra y uniforme. Las CT se observan sin alteraciones y están en contacto

con la granulosa. La membrana basal está intacta. No hay células con núcleos picnóticos en la granulosa o bien son muy escasos (< 5%).

Atresia II: Se encuentran algunas áreas discontinuas en la granulosa, provocadas por el desprendimiento de algunas células y presenta un porcentaje de 5 a 20% de células con núcleos picnóticos o fragmentado localizados adyacentes a la cavidad antral. La membrana basal se conserva intacta.

Atresia III: Las perforaciones de la capa de la granulosa están asociadas con extensas áreas de núcleos picnóticos de esta capa. Se observa un número de leucocitos extravasados, lo cual se correlaciona con el rompimiento de la membrana basal. En esta etapa es posible demostrar la presencia de linfocitos T citotóxicos en la pared folicular, se observa hipertrofia de CT.

Atresia IV: Se perfora la capa de la granulosa, además de una separación parcial de la teca interna. Los núcleos picnóticos son evidentes en ambas capas, a pesar de que el número total de células con núcleos picnóticos es menor que en el estado anterior, probablemente a causa de la fagocitosis de las células degeneradas por los macrófagos. El ovocito inicia su separación de la pared folicular.

Atresia V: Los fragmentos residuales de la granulosa están totalmente separados de la teca. Los capilares de la teca y el ovocito han desaparecido. El folículo se

encuentra encogido y puede haber colapso total de las paredes, aparentemente debido a la contracción de tejido muscular liso que han sido descrito en la teca.

En la actualidad esta clasificación ha sido modificada y reducida con la finalidad de una mejor comprensión de las características macroscópicas que envuelven las diferentes etapas de la atresia, considerando 3 aspectos fundamentales: vascularización de CT interna, integridad de la capa granulosa y translucidez del folículo. Esta clasificación comprende a la atresia inicial o temprana donde las CG comienzan a desprenderse, presentan apariencia grisácea o que han perdido su apariencia translúcida y se observa adecuada vascularización sanguínea. Por otro lado en la atresia avanzada su característica principal es un desprendimiento total de las CG con la formación de glóbulos blanquecinos (cuerpos atrésicos) que flotan en el antro folicular lo cual indica muerte progresiva de estas células (Fig. 3), tienen apariencia opaca lo que obedece a que la mayor parte de los vasos sanguíneos se encuentran vacíos por lo tanto no hay vascularización y por último un folículo sano o no atrésico el cual tienen la capa de CG intacta, con <5% de núcleos picnóticos, apariencia translúcida y una visible vascularización (Bedaiwy y Hussein, 2004; Matsuda *et al.*, 2006; Rosales *et al.*, 2010).

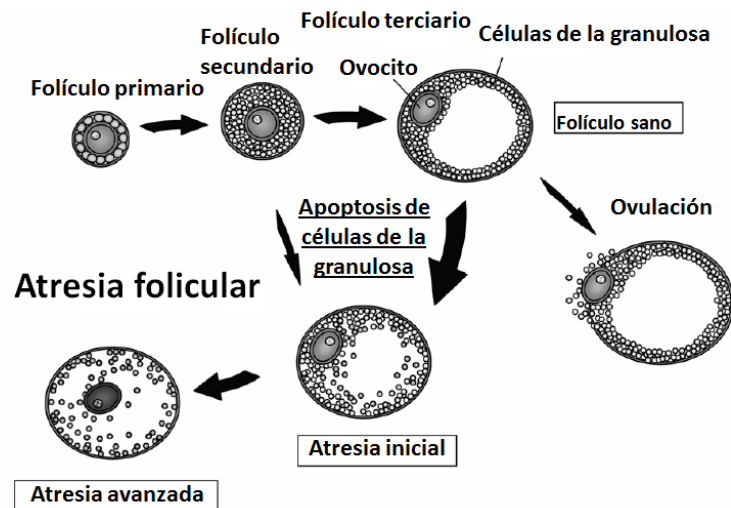


Figura 3. Destino del folículo dominante. El folículo antral seleccionado para ser el dominante tiene 2 destinos: 1. La ovulación lo cual habla de la capacidad de sobrevivencia celular y de una fuente de estímulos para mantener la viabilidad, en un balance entre estímulos de sobrevivencia y muerte. 2. La atresia folicular donde si la capacidad de mantener la viabilidad de las células que conforman el folículo se pierde, entonces las células sufrirán muerte celular. La atresia puede ser observada como una atresia inicial donde comienza a haber un desprendimiento de las células de las granulosa (CG) y muerte de las mismas y una atresia avanzada donde se observa ya un una muerte total de las células, denotando que este es un proceso progresivo por el cual el folículo pierde su integridad funcional y estructural. Tomado de Matsuda *et al* (2006).

Por otro lado Rodgers *et al* (2001) comenzaron a retomar una de las clasificaciones mencionadas y que hasta la fecha algunos investigadores la utilizan pero con mayor conocimiento sobre lo que se sabía en sus inicios. Esta clasificación se basa en la forma morfológica de la atresia en el bovino: 1. Atresia antral o apical y 2. Atresia basal (Townson *et al.*, 2011).

La atresia antral o apical es caracterizada por la eliminación de CG que se encuentran próximas al antro. Hay un número evidente de núcleos picnóticos en éstas CG y algunas veces en células dentro del antro, los restos de mitocondrias y membrana plasmática han sido asociados con los núcleos picnóticos. Las CG basal (están alineadas en la membrana basal) permanecen intactas y poseen muchas características estructurales de células saludables (número moderado de mitocondrias, gotas lipídicas y cantidad moderada de retículo endoplásmico). En cuanto a las CT estas son las últimas en sufrir degeneración en este tipo de atresia (Fig. 4; Young y McNeily, 2010). Este tipo de atresia es la forma clásica observada debido a que ocurre en cualquier etapa del desarrollo folicular en la mayoría de las especies, aunque es con frecuencia encontrada en folículos mayores a 5mm de diámetro incluyendo el folículo dominante.

La atresia basal implica la destrucción de las CG cercanas a lámina basal o membrana basamental del folículo, mientras que la mayoría de la capa de CG cercanas al antro permanece intactas y saludables. La lámina basal es a menudo penetrada por macrófagos y la capa de CT tiene una deposición adicional de colágeno y muerte temprana de CT y endoteliales, además la producción de andrógenos se ve reducida asociado con altos niveles de P_4 en estos folículos. Estas observaciones sugieren que la teca es más susceptible a muerte celular en etapas tempranas del desarrollo folicular con respecto a etapas más avanzadas (Fig. 4). Este tipo de atresia se ha encontrado en folículos de vaca de menos de 5mm (son folículos pequeños) de diámetro aunque datos indican que en otras

especies también puede ser encontrada (Rodgers y Rodgers, 2010; Young y McNeily, 2010; Townson *et al.*, 2011).

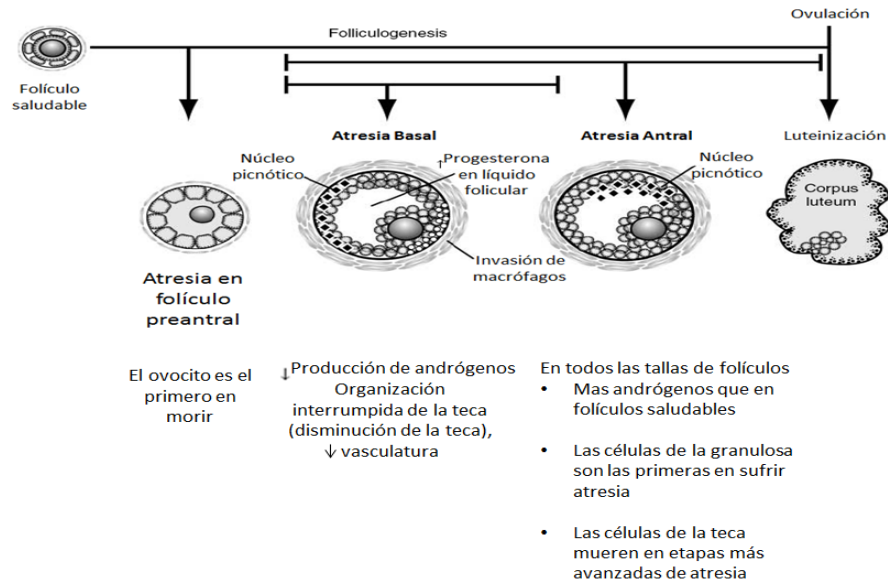


Figura 4. Modelo del proceso de atresia antral y basal en el folículo de bovino. En folículos preantrales el ovocito es el primero en sufrir muerte celular, cuando continúan su desarrollo, los folículos sufren atresia basal o antral. Las células de la teca (CT) son más susceptibles a la muerte celular en el desarrollo folicular temprano mientras que en folículos atrésicos con atresia basal las CT comienzan a morir y son menos vasculares. A lo largo de las etapas del desarrollo folicular, las células de la granulosa (CG) próximas al antro son las primeras en morir, por lo tanto las CT son las últimas en morir o su proceso de muerte es más lento, hasta que el folículo es degradado en su totalidad Tomado de Young y McNeily (2010).

2.2.2 Teorías sobre la atresia

Por lo menos 3 modelos teóricos han sido propuestos para explicar como se determina el destino de los folículos, el cual puede ser: la ovulación o en la gran mayoría la atresia (Rosales *et al.*, 1999)

1. Los folículos que sufren atresia pueden estar predeterminados por diferencias inherentes del ovocito, las células foliculares o por su ambiente inmediato. Como la mayoría de los folículos son capaces de crecer bajo apropiada estimulación hormonal, este mecanismo no parece ser la base para la atresia de la mayoría de los folículos.
2. La mayoría, si no es que todos los folículos son capaces de llegar a la ovulación a menos que la atresia se dispare por estímulos atresiogénicos.
3. El destino final de todos los folículos es la muerte celular por atresia. Solo los folículos que alcanzan un estado específico de desarrollo que coincida con señales hormonales críticas, escapan de la atresia (Hsueh *et al.*, 1994)

2.2.3 Muerte celular en la atresia folicular

Existen diferentes vías implicadas en la muerte de las celular; entre las más sobresalientes tenemos a la apoptosis, necrosis y la diferenciación terminal (envejecimiento celular) la última de las cuales se ejemplifica en normoblastos diferenciadores en los eritrocitos, células de la epidermis en los queratinocitos, o megacariocitos en plaquetas. La apoptosis es un proceso activo dentro de la célula que implica la degradación del ADN. La cromatina se condensa seguida por división del núcleo y finalmente la formación de cuerpos apoptóticos que son fagocitados por los macrófagos o en algunos epitelios por las células adyacentes. Por otro lado, la necrosis se produce como resultado de la lesión celular o trauma y se caracteriza por la ruptura de la célula, dando lugar a la hinchazón de las mitocondrias y otros orgánulos. El ADN nuclear es entonces fragmentado al azar y expuesto al ambiente externo (Kerr *et al.*, 1995; Clark *et al.*, 2004). Finalmente la diferenciación terminal (envejecimiento celular) se presenta en normoblastos diferenciadores en los eritrocitos, en células de la epidermis en los queratinocitos o megacariocitos y en plaquetas.

Hasta la fecha, se ha demostrado en varias especies, rata (Drake *et al.*, 2003) caballo (Pedersen *et al.*, 2003), bovinos (Van-Wezel *et al.*, 1999 y Yang *et al.*, 2000), cerdo (Tilly *et al.*, 1991) y humanos (Yuang y Giudice, 1997) que en la atresia ocurre la muerte celular por apoptosis y se manifiesta en todas las etapas del desarrollo folicular. En bovinos Van Wezel *et al* (1999), mostraron en folículos antrales que las CG sufren apoptosis demostrada mediante la técnica de TUNEL, además se observó condensación de la cromatina y fagocitosis por las células de la granulosa adyacentes. Otros estudios muestran que las CG más cercanas al

antro no presentaron ninguna característica asociada con la apoptosis (Clark *et al.*, 2004).

Mientras que en otros estudios realizados por los mismos autores Van Wezel *et al.* (1999) mostraron que las células tenían núcleos picnóticos, aunque éstas no fueron detectadas por la técnica de TUNEL, lo que indicó no había muerte por apoptosis, así que mediante un ensayo cometa y electroforesis en gel para detectar la presencia de necrosis en células próximas al antro folicular, se observó que el ADN estaba fragmentado al azar pero mediante microscopía electrónica detectaron que no había evidencia de este tipo de muerte, lo cual llevó a los autores a concluir que la muerte celular observada tenía más en común con un mecanismo programado de muerte por diferenciación terminal en folículos de la especie bovina.

Este es un mecanismo de eliminación discreta de células que se presenta en la atresia folicular y que permite la regresión de folículos sin la presencia de una respuesta inflamatoria (Tilly *et al.*, 1991; Matsuda *et al.*, 2006). Durante la atresia las células foliculares son generalmente vistas dispersas a través del parénquima y pueden o no incluir el ovocito (Peluffo *et al.*, 2007). Algunas hipótesis que justifican la pérdida apoptótica son: 1. control para eliminar anomalías meióticas, 2. déficit en los factores de sobrevivencia (gonadotropinas, factores de crecimiento, hormonas) y 3. el suicidio de la célula (Hussein, 2005) por la acción de miembros de la súper familia del factor de necrosis tumoral (TNF). Las citocinas más sobresalientes que disparan la apoptosis en el folículo, incluyen al TNF, el ligando de Fas (FasL) y el ligando de TNF inductor de apoptosis TRAIL; (Johnson *et al.*, 2007; Jaaskelainen *et al.*, 2009). Éstos miembros son claramente

identificados como moléculas proapoptóticas asociadas con la muerte de CG como un mecanismo en la atresia folicular. En el bovino y otras especies, FasL unido a su receptor Fas median vías de apoptosis en el mecanismo de muerte celular de CG durante la atresia. En general la unión de este ligando a su receptor dispara la activación intracelular de las cisteína proteasas (caspasas) iniciadoras y efectoras llevando a la célula a muerte celular por apoptosis (Kondo *et al.*, 1996; Vickers *et al.*, 2000). Éstas señales extracelulares o la falta de factores de supervivencia, estimulan a proteínas proapoptóticas como Bax y la expresión de p53 en CG de folículos lo cual resulta en efectos apoptóticos tales como la liberación de citocromo c de la mitocondria, consecuentemente activación de caspasas y por último la fragmentación del ADN (Johnson *et al.*, 2007).

En el folículo los estrógenos son moléculas antiapoptóticas mientras que los andrógenos son moléculas proapoptóticas, por lo que una alta proporción de andrógenos sobre E₂ en los folículos es generalmente un indicativo de atresia (Billig *et al.*, 1996; Young y McNeily, 2010).

En folículos preantrales de bovino el ovocito es el primero en morir (Young y McNeily, 2010), mientras que en folículos antrales el primer indicio de atresia folicular son los cambios degenerativos que sufren las CG, lo que provoca la destrucción completa de las capas de granulosa que revisten el interior de la pared folicular (Clark *et al.*, 2004). Hace algunos años era controversial si las CT tenían el mismo destino, pensando que estas células permanecían en folículos atresicos. Sin embargo diversos estudios indican que las CT son eliminadas del

ovario de la misma forma que las CG. Por lo tanto de manera inicial en la atresia hay una pérdida de CG, seguida por una pérdida un poco más lenta de las CT, observándose este efecto sobre las CT en etapas tardías de atresia (Maillet *et al.*, 2003).

La participación simultánea de apoptosis y necrosis en la atresia de la oveja y en otras especies como la gansa y la codorniz es el resultado de la intensidad y del tipo de estímulo que reciben las células foliculares. En la oveja, la participación preponderante de uno o de otro tipo está relacionada con el tamaño folicular. En los folículos de mayor tamaño (mayores de 6mm) se ha encontrado que las enzimas lisosomales, fosfatasa ácida y glucosaminidasa aumentaron con el grado de atresia, sin embargo, en folículos pequeños (3-5mm), en los que el tipo primario de muerte fue la apoptosis, la concentración de estas enzimas fue significativamente menor comparada con los folículos grandes y solo hubo cambios importantes en la atresia muy avanzada. 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 (Rosales *et al.*, 2000; Alonso *et al.*, 2003).

2.2.4 Mecanismos endócrinos involucrados en la atresia folicular.

El avance en el conocimiento de los mecanismos moleculares que inducen la atresia folicular no es suficiente para la comprensión de este proceso. En la muerte de las células germinales y somáticas en el ovario se encuentran

implicados factores reguladores locales, como las hormonas esteroides, factores de crecimiento y las citocinas y factores endocrinos como las gonadotropinas hipofisarias FSH y LH. (Zeuner *et al.*, 2003; Flores *et al.*, 2005; Mihm *et al.*, 2008).

2.2.4.1 Importancia de FSH, Factor de Crecimiento del Endotelio Vascular (VEGF) y E₂

El desarrollo continuo de nuevos vasos sanguíneos en la funcionalidad ovárica es esencial para garantizar el suministro de oxígeno, nutrientes y las hormonas esenciales para el mantenimiento del folículo y cuerpo lúteo. Además este sistema vascular permite la salida de los esteroides que se producen en las células foliculares y lúteas para alcanzar su respectivo órgano blanco. Los folículos que llegan a la ovulación tienen una extensa red de capilares que soportan su crecimiento y maduración, mientras que la muerte y degeneración de las células endoteliales que conforman el lecho capilar del folículo y que ocasiona un suministro vascular insuficiente, parecen ser disparadores de la atresia (Tamanini *et al.*, 2004; Kaczmarek *et al.*, 2005; Rosales y Guzmán, 2011). El VEGF ha sido identificado como un importante regulador de la permeabilidad vascular así como de la angiogénesis del folículo y protector de las CG y es producido por las CT, CG y células lúteas. En el folículo las CG son las principales productoras de VEGF, lo cual parece crear un gradiente con dirección hacia la membrana basal, favoreciendo el aporte de oxígeno, nutrientes y hormonas a las granulosa. Por tal motivo VEGF puede actuar como un factor de sobrevivencia para las CG y con ello evitar la atresia de los folículos antrales (Wulff *et al.*, 2002; Castle *et al.*, 2011; Rosales y Guzmán, 2011). Los niveles de

VEGF se relacionan con los niveles de FSH y LH. En estudios realizados en bovinos mencionan que FSH y LH estimula la expresión de VEGF en el folículo dominante durante el desarrollo folicular protegiendo a las CG de la muerte celular y por lo tanto de la atresia folicular (Shimizu *et al.*, 2007; Vázquez y Olivera, 2010). En otro estudio realizado por Rosales *et al.* (2011) se observó que tanto en las CG como en las CT se ha visto la expresión de VEGF específicamente de sus isoformas (120, 164 y 205) y que el inicio de la atresia en folículos de oveja está acompañada por una reducción del RNAm de VEGF, además esta disminución de VEGF durante la atresia es mayor en CG que en CT.

Como ya se ha venido mencionando la FSH es una hormona importante en el desarrollo e integridad del folículo, ésta se une a sus receptores acoplados a proteína Gs, estimula a la adenilato ciclasa (AC) induciendo la síntesis de AMPc el cual activa a la proteína cinasa A (PKA). La activación de ésta enzima favorece el transporte de colesterol a la mitocondria y se lleva a cabo la esteroidogénesis en CG promoviendo el crecimiento del folículo e incrementando la transcripción de genes que codifican para la producción de enzimas necesarias para convertir los andrógenos procedentes de la teca a E₂. Además la PKA activa la vía PI3K/Akt/FoxO3a para inhibir la apoptosis mediante la regulación de la expresión de proteínas antiapoptóticas tales como XIAP, la FLIP, Bcl-2, Bim y por la producción de VEGF (Fuller *et al.*, 2002; Alam *et al.*, 2004; Bernard *et al.*, 2009; Wang *et al.*, 2012).

Se ha visto que tras el retiro de hormonas gonadotrópicas específicamente FSH en las CG ocasiona un incremento de las proteínas proapoptóticas, tales como el

receptor FAS y del ligando de Fas (FasL) culminando en la apoptosis mediada por caspasas (Cytosolic Aspartate-Specific Proteasas) y la atresia del folículo. Ante el mismo estímulo, el Factor de Necrosis Tumoral alfa (TNF- α) ejerce su efecto proapoptótico por la activación de las caspasas a través de su receptor y apoptosis (Jiang *et al.*, 2003). Es así que durante la atresia la disminución en los niveles de FSH aumenta el RNAm de receptores de muerte y proteínas proapoptóticas.

Recientemente, se ha descrito la participación de otras moléculas implicadas en el mecanismo de la atresia se trata de un esfingolípido (SLP) de membrana, que funciona como segundo mensajero denominado Ceramida (Cer) que induce muerte en las células por necrosis al ser estimuladas por el ligando de Fas (Pedrero, 2005). Se ha visto que Cer genera señal apoptótica mediante el receptor de TNF- α y además puede participar directamente formando canales en la mitocondria que permiten la liberación de citocromo c y posterior activación de caspasas efectoras (Iaroslav *et al.*, 2007). Este podría ser el mecanismo por el cual estos factores de muerte ejercen su efecto (Fig. 5).

Se ha encontrado también que la concentración de estrógenos en el folículo dominante es más alta que en los subordinados y que la baja concentración de estrógenos intrafoliculares se ha asociado a la expresión de RNAm de CG para factores proapoptóticos tales como Fas, TNF- α , beta glicano, ciclooxigenasa1 (COX-1), DNAsa activada por caspasas (CAD) y Drak-2. En la teca de folículos subordinados que ya iniciaron la atresia se ha observado el incremento de beta glicano, caspasa 12, p58, factor activador de caspasas apoptóticas 1 (Apaf-1),

BTG-3 (Evans *et al.*, 2003). En otros estudios se ha asociado la sobreexpresión de algunos genes relacionados con apoptosis (MPKL41, VDAC2), Fagocitosis de células de folículos en atresia (STX7) y regresión de folículos subordinados (SPC22 Y EHD3) (Zielak *et al.*, 2007). Otros factores de inhibición del desarrollo folicular incluyen al factor de crecimiento transformante alfa (TGF- α), la superóxido dismutasa (SOD) y la proteína 90 de choque térmico los cuales pueden disminuir la actividad de aromatasa y consecuentemente la producción de E₂ aunque se desconoce si estas sustancias son preferentemente producidas por el folículo dominante para inhibir a los demás folículos (Vásquez y Olivera, 2010). La reducción en la concentración de E₂ por la disminución de la actividad de aromatasa está directamente relacionada con la reducción de FSH ocasionada por el folículo dominante para evitar que los subordinados se desarrollen y se vuelvan atrésicos.

2.2.4.2 Importancia de LH y P₄

En el caso de que exista un cuerpo lúteo durante el ciclo estral, los niveles circulantes de P₄ harán un bloqueo en el centro de liberación de picos de LH, primero inhibiendo la liberación del factor liberador de gonadotropinas (GnRH), por consiguiente disminuyendo la producción de LH y consecuentemente induciendo la atresia del folículo dominante. Ésto explica porqué el folículo dominante de la primera onda no ovula y se vuelve atrésico (Manikkam y Rajamahendran, 1997; Vásquez y Olivera, 2010). La disminución en la producción pulsátil de LH generará una reducción en la expresión del RNAm de proteínas antiapoptóticas generando un aumento en el RNAm de proteínas proapoptóticas

tales como caspasas y el factor activador de proteasas de apoptosis 1 (APAF-1) llevando en primera instancia a la muerte de las CG y al último a las CT (Vásquez y Olivera, 2010) (Figura 2).

Aunque el conocimiento del efecto inhibitorio de P_4 no está bien entendido diversos estudios indican su mecanismo de acción a nivel hipotalámico en distintas regiones, ya que en las neuronas GnRH no hay expresión de receptores para hormonas esteroides de esta manera el efecto de P_4 es efectuado mediante un sistema interneuronal (Skinner *et al.*, 2001; Romano *et al.*, 2008). Durante la fase lútea la P_4 circulante incrementa la actividad gabaérgica y la disminución de la frecuencia de pulsos de GNRH mediante la hiperpolarización de las neuronas que producen esta hormona (Ciechanowska *et al.*, 2010)

Otro de los mecanismos por los cuales los niveles elevados de P_4 producida por el cuerpo lúteo podrían ejercer un efecto de retroalimentación negativa y posterior atresia de folículos es mediante su efecto a nivel de la hipófisis. Se ha visto que la secreción de LH es inhibida por hormonas producidas en el ovario, como ya se mencionó de manera indirecta por efecto en el hipotálamo o de manera directa por la disminución de la respuesta de GNRH en los gonadótrofos, lo cual indica que los receptores de P_4 están presentes también en los gonadótrofos haciendo estas células potencialmente sensibles a la acción de esteroides (Ronald *et al.*, 1992).

La P_4 suprime la expresión del gen $LH\beta$ y probablemente también del receptor de GnRH en el gonadótrofo (Thackray *et al.*, 2009). El mecanismo de acción por el cual realiza esta supresión es mediante el receptor clásico o nuclear de P_4 (RP). Para que esta acción se lleve a cabo se necesita exclusivamente una región única o dominio amino terminal (NTD) de la isoforma B del receptor de progesterona (RP) la cual es responsable de la transactivación de genes y un intacto dominio de unión al ADN (LBD o DBD) (Curtin *et al.*, 2001). Sin embargo estudios realizados por Thackray *et al* (2009) encontraron que no hay evidencia de que la supresión por P_4 involucre la unión directa del RP al promotor de $LH\beta$ por lo que sus datos sugieren que estos dominios son necesarios para la unión de otros factores de transcripción.

2.2.4.3 Relación estradiol - progesterona ($E_2:P_4$).

En el folículo, LH regula la esteroidogénesis por la estimulación de la producción de andrógenos en CT y la unión de FSH a su receptor promueve la aromatización para la producción de E_2 en CG por la enzima P450 aromatasa. Por lo tanto la atresia involucra por un lado una disminución en la disponibilidad del precursor andrógeno en CT y por otro lado una disminución en la actividad aromatasa una disminución en la expresión del RNAm de los receptores a gonadotropinas y menor expresión del citocromo P450 aromatasa. Al haber una disminución de los receptores, y enzimas de la esteroidogénesis en CG estas células dejarán de producir E_2 , por consiguiente habrá una elevada concentración de P_4 en el folículo atrésico a diferencia de un folículo sano (Fig. 5; Manikkam y Rajamahendran, 1997). Por lo anterior la relación entre E_2 y P_4 es un buen

indicador del estado fisiológico y de salud del folículo (Rosales *et al.*, 2000). Lo cual se ha demostrado midiendo la concentración de E₂ y P₄ en líquido folicular, encontrando que el nivel de E₂ es significativamente más bajo en folículos atrésicos que en folículos sanos. Por otro lado el nivel de progesterona es más alto en folículos atrésicos resultando en una relación E₂/P₄: ≥1 en folículos sanos y <1 en folículos atrésicos (Rosales *et al.*, 2000; Yu *et al.*, 2004). Estos resultados sugieren que un desbalance entre E₂ y P₄ en líquido folicular está relacionado con la iniciación de atresia en el folículo. Por lo que esta relación refleja la integridad o el estatus esteroidogénico del folículo, a lo que muchos autores le llaman “salud folicular” (Rosales *et al.*, 2000; Yu *et al.*, 2004; Jayawardana *et al.*, 2006, Shimizu *et al.*, 2007).

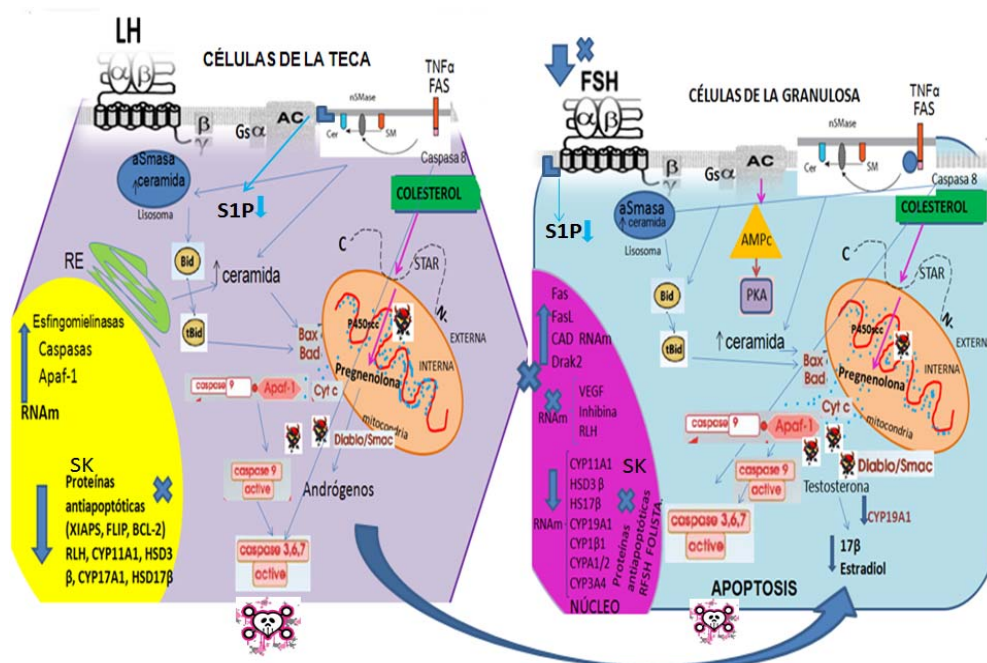


Figura 5. Aspectos endocrinológicos durante la atresia folicular en células de la teca (CT) y células de la granulosa (CG). Durante la atresia folicular la privación de factores de supervivencia principalmente las gonadotropinas, las cuales estimulan la síntesis de RNAm de proteínas en pro de la supervivencia genera muerte de las células foliculares. La retroalimentación negativa sobre FSH del folículo dominante durante el desarrollo folicular inhibe en CG la expresión del RNAm de enzimas de la esteroidogénesis, así como VEGF, receptor para LH y proteínas antiapoptóticas por lo cual no pueden sintetizar este tipo de células estradiol (E_2). El mismo efecto sucede con las CT las cuales sufren degeneración por altas concentraciones de progesterona (P_4) secretadas por el cuerpo lúteo, esta hormona genera un efecto inhibitorio hacia LH impidiendo se una a su receptor en estas células y lleva a la célula a apoptosis por la disminución en la expresión de enzimas de la esteroidogénesis y proteínas antiapoptóticas. Dado que las CT mueren posterior a las CG, las tecas continúan produciendo andrógenos pero las granulosa no pueden convertir a E_2 por la disminución en la expresión del RNAm de la aromatasa, por lo cual el folículo acumula más P_4 que E_2 considerándolo como un indicativo de atresia folicular. El estudio de los esfingolípidos permite suponer que la Cer y S1P podrían jugar un papel crucial en la atresia folicular.

2.3. Necrosis

La muerte celular por necrosis como ya se mencionó es uno de los tipos de muerte que se presentan en la atresia folicular (Celestino *et al.*, 2009). El término necrosis deriva del griego *necros* que significa cadáver o muerte (Syntichaki y Tavernaraquis, 2002). La necrosis es el resultado de agresiones severas a las células, en ellas se pierde la integridad de la membrana y organelos liberando su contenido fuera de la célula generando una respuesta inflamatoria por lo cual esta es la característica más sobresaliente que diferencia a la necrosis de otros tipos de muerte como la apoptosis (Tabla 1; Ramírez *et al.*, 2010).

Tabla 1. Diferencias básicas entre apoptosis y necrosis.

Características.	Apoptosis.	Necrosis.
Estímulo	Fisiológico	Patológico
Efecto	Selectivo sobre la célula	Afecta el tejido circundante
Reversibilidad	Hasta la activación de las nucleasas	Irreversible, hay sensibilidad entre tejidos
Actividad de endonucleasa	Temprana	Post-mortem
Morfología celular	Proyecciones digitiformes y cuerpos apoptóticos	Turgencia celular
Organelos	Turgencia tardía	Turgencia rápida
Núcleo	Cariorrhexis	Diversos patrones
Cromatina	Condensación periférica	Condensación ligera
Fragmentación del ADN	Internucleosomal organizada	Aleatoria
Remoción y fagocitosis	Antes de la lisis	Tardía e incompleta
Inflamación	Ausente, excepto piroptosis	Heterólisis, Hsp
Autofagia	Inicia la apoptosis	Ausente
Cicatrización	Ausente	Fibrosis
ATP	Dependiente de ATP	Disminuido
Calcio	Permeabilidad mitocondrial	Favorece la necrosis
Caspasas	Dependiente	Independiente

Tomado de Ramírez *et al* (2010).

La necrosis en el pasado ha sido con frecuencia referida como un tipo de muerte accidental, observando en la célula, como ya se mencionó ruptura de la membrana, liberación del contenido celular y disminución de ATP, en este escenario se considera que la célula es una víctima de los daños causados y la muerte celular se observa como una consecuencia de un daño irreparable, de ahí el nombre de muerte “accidental” y siempre se le ha relacionado con procesos inflamatorios-patológicos (Henríquez *et al.*, 2008). Aunque hace ya algunos años se ha referido a la necrosis como un evento que ocurre de manera ordenada (Syntichaki y Tavernarquis, 2002) hasta la fecha no ha sido definida en su totalidad como un tipo de muerte programada por lo que sigue siendo blanco de estudio (Chavez *et al.*, 2012).

La hipoxia y la isquemia son los principales inductores de necrosis y durante éste proceso, hay agotamiento de ATP, así como un incremento en el calcio citosólico y de las especies reactivas de oxígeno (ROS), además de un flujo de sodio que repercute en la inestabilidad de la membrana. (Henríquez *et al.*, 2008).

En el modelo de la isquemia, en el cual no hay una regulación evidente de calcio, las calpaínas localizadas en el citosol y membranas de manera inactiva pero por un incremento en los niveles de calcio pueden alterar su integridad, generando una permeabilidad de la membrana lisosomal y favoreciendo la activación y liberación de catepsinas (enzimas proteolíticas que se encuentran en el lisosoma) y otras enzimas del lisosoma (hidrolasas) al citosol, las cuales a su vez, hidrolizan diferentes metabolitos celulares desencadenando necrosis (Tulk y Tulk, 2009). La participación de las calpaínas y las catepsinas en la inducción de muerte celular se ha evaluado en diferentes modelos (Syntichaki y Tavernaraquis, 2002). En la degeneración neuronal en *C. elegans* por necrosis se requieren proteasas reguladas por calcio, calpain-proteasas (designadas como Calpain 1-10; CAPN 1-10) y aspartil proteasas que son una familia más heterogénea; esto demuestra que en este modelo hay dos clases de proteasas involucradas en la necrosis, que son homólogas de las calpaínas y catepsinas en humanos, en los que pueden mediar la necrosis. El aumento de calcio por la pérdida del control de las bombas puede alterar la función de enzimas como las ATPasas, que al estar activadas contribuyen a la supresión o agotamiento brusco del ATP. Además, las favorece la actividad de fosfolipasas y media la activación de proteasas y de endonucleasas responsables de la fragmentación de la cromatina así como del ADN (Ramírez *et al.*, 2010). La liberación de enzimas como las hidrolasas

lisosomales participa desde el inicio en el proceso de desintegración celular y es evidente en los estadios tardíos de la necrosis.

El aumento de calcio citosólico y su prolongada estadía en el citoplasma lleva a la sobrecarga mitocondrial del Ca^{2+} ion, lo que provoca la apertura del poro de permeabilidad transitoria mitocondrial (PPTM), perdiendo la capacidad de producir ATP por la cadena respiratoria, además de activación de las proteasas dependientes de calcio. El tipo de muerte celular es probablemente determinado por la concentración del calcio citoplasmático. Concentraciones de bajas a moderadas (200-400 nM) disparan la apoptosis, mientras que altas concentraciones (mayores de 1 μM) se asocian con necrosis (De Toro, 2006).

En varios modelos se ha descrito la importancia del ATP en la inducción de muerte celular: la línea celular linfocítica humana Jurkat y las células B de ratón sufren necrosis en ausencia de ATP al ser tratadas con anti- CD95 o con TNF- α , lo que se explica por el incremento de Ceramida (Villena *et al.*, 2008). Éste esfingolípido induce la movilización de calcio en respuesta a, senescencia y receptores apicales de muerte, entre otros. En presencia de bajas concentraciones de ATP puede inhibir el complejo III de la cadena respiratoria y favorecer la producción de ROS y consecuentemente la necrosis (Ramírez *et al.*, 2010).

Se ha considerado que el aumento de las ROS también puede ser determinante en la inducción de necrosis. Las ROS que no alcanzan a ser amortiguadas dañan

los lípidos de las membranas mitocondriales, alterando la concentración de solutos en la mitocondria y la diferencia de potencial entre la matriz y el exterior (evento comúnmente denominado transición de permeabilidad), disminuyen el ATP y llevan a la necrosis (Orrenius *et al.*, 2007; Villena *et al.*, 2008). Aunque esto se considera el preludeo de la activación de la caspasa 9 y luego, de la cascada de las caspasas efectoras, se argumenta que las mismas ROS pueden inactivar oxidativamente las caspasas y las lipasas o afectar la oxidación de la cardiolipina y que podrían forzar la salida forzada, del citocromo c, incluso del que está fuertemente anclado a la mitocondria. En algunos casos, incluso la caspasa 3 se ha asociado con la necrosis, pero su bloqueo no tiene efectos sobre la muerte necrótica, por esta razón a la necrosis se le ha denominado como muerte celular independiente de caspasas (Ramírez *et al.*, 2010). Las ROS pueden iniciar el daño de proteínas, ácidos nucleicos y lípidos rompiendo puentes disulfuro y haciendo modificaciones cis-trans que promueven proteólisis ulteriores y modifican la estructura y función de proteínas (Celik y Arinc, 2009).

La muerte celular por necrosis se concreta en 2 etapas: 1. Autólisis; Incluye todos los cambios que dependen de alteraciones en los componentes celulares, proceso que ocurre con un patrón morfológico en cierta medida característico y que consiste en: cambios en el núcleo (disolución progresiva de la cromatina o cariólisis), cambios en el citoplasma (cariorrexis) (por esparcimiento de las ribonucleoproteínas), aspecto homogéneo del citoplasma (por pérdida de los compartimientos celulares), tumefacción de las mitocondrias y 2. Fagocitosis de los restos celulares por los macrófagos tisulares, la muerte de las células no

siempre va seguida de la disolución inmediata de su almacén, puede seguir distintos caminos que originan distintos tipos morfológicos de necrosis (Sánchez, 2001).

2.4. Apoptosis

El término apoptosis (a-po-toe-sis) se utilizó por primera vez en un artículo ya clásico de Kerr, Wyllie y Currie en (1972) para describir una forma morfológicamente distinta de muerte celular. La apoptosis se produce normalmente durante el desarrollo y el envejecimiento como un mecanismo homeostático para mantener las poblaciones de células en los tejidos. La apoptosis se produce también como un mecanismo de defensa, como en las reacciones inmunológicas o cuando las células son dañadas por enfermedades o agentes nocivos. Aunque hay una gran variedad de estímulos y condiciones, tanto fisiológicos y patológicos que pueden desencadenar la apoptosis, no todas las células necesariamente va a morir en respuesta al mismo estímulo (Kroemer et al., 2007; Elmore, 2007).

El término apoptosis se ha utilizado con diferentes connotaciones: (a) contracción atípica del volumen celular; (b) cambios morfológicos nucleares, acompañados por la contracción exagerada del volumen celular; (c) la condensación de la cromatina nuclear y la fragmentación del ADN; (d) las alteraciones de las membranas celulares con aumento de la permeabilidad y ampollamiento (“blebbing”); (e) el aumento de la capacidad para unir anexina; (f) la activación de proteasas catabólicas (caspasas); (g) la escisión de la queratina (Leist, 1997). Lo más llamativo de las alteraciones apoptóticas son las alteraciones morfológicas.

Brevemente, se puede decir que apoptosis es un proceso destinado a eliminar células infectadas o dañadas genéticamente, con efectos opuestos a la mitosis en la regulación del tamaño de los órganos y de los tejidos (Danial *et al.*, 2003).

Los términos apoptosis y muerte celular programada han originado controversias y en general, se acepta su sinonimia cuando la muerte celular depende de la intervención de proteasas (las caspasas). Pero la ausencia de esa intervención no es necesariamente la muerte celular en cuyo caso el término apoptosis no sería pertinente. Es interesante señalar que mientras muchas formas de apoptosis representan muerte celular programada, no se puede decir que todas las muertes celulares programadas están comprendidas dentro de la apoptosis (Dubin y Stoppani, 2000; Kroemer *et al.*, 2007). Por lo cual se ha clasificado a la muerte celular 1 como la apoptosis y a la muerte celular 2 como autofagia (Ramírez *et al.*, 2010).

Una característica importante de una célula apoptótica es la degradación de ADN por endonucleasas dependientes de Ca^{2+} y Mg^{2+} , resultando en fragmentos de ADN de 180 a 200 pares de bases. El ADN fragmentado durante la apoptosis se puede visualizar mediante electroforesis en gel de agarosa como muchos lo llaman "escalera de ADN (Elmore, 2007).

Otra característica bioquímica de importancia es que las células que van a morir despliegan señales que atraen a los macrófagos. Una de esas señales es la fosfatidilserina (FS), un fosfolípido normalmente limitado a la parte interna de la

membrana celular, que, en esta oportunidad, es desplegado en la parte externa. Un receptor en los macrófagos reconoce la FS y orquesta la desaparición de la célula «suicida» (Calderón, 2005). Aunque la externalización de fosfatidilserina es un indicador de reconocimiento bien conocido para los fagocitos en la superficie de la célula apoptótica, estudios recientes han demostrado que otras proteínas también quedan expuestas en la superficie celular durante la remoción de las células apoptóticas. Estos incluyen Anexina I y calreticulina (Calderón, 2005; Elmore, 2007).

Los mecanismos de la apoptosis son altamente complejos, este tipo de muerte involucra una cascada de eventos moleculares dependientes de energía. A lo largo del estudio de la apoptosis se ha observado hay 2 vías apoptóticas: la extrínseca o vía de receptor de muerte y la intrínseca o vía mitocondrial (Elmore, 2007; Singh *et al.*, 2010). Sin embargo existen evidencias de que las 2 vías convergen y que las moléculas que participan en una vía pueden influenciar en la otra. Existe otra vía denominada perforina/granzima que induce apoptosis por la granzima B o A pero tanto la vía extrínseca como la intrínseca y la de la granzima convergen en la misma fase de ejecución (Elmore, 2007). Otra forma de clasificar a la apoptosis es por los cambios que van surgiendo a nivel celular por lo que Dubin y Stoppani (2000) menciona que la apoptosis presenta tres fases que se pueden denotar como (a) la fase pre-mitocondrial o de inducción; (b) la fase de daño mitocondrial efectivo (fase efectora) y (c) la fase post-mitocondrial, degradativa o de lisis celular. La primera fase involucra a la membrana plasmática y sus adyacencias. La segunda fase involucra a las membranas, la matriz

mitocondrial. La tercera fase involucra a todas las estructuras celulares incluyendo al núcleo celular y termina con la citólisis (ruptura de la célula). Es importante mencionar que en algunas células la señal extrínseca no será lo suficientemente fuerte para generar una vía de señalización mediante caspasas y llevar a la célula a muerte sino en este caso, la señal deberá ser amplificada a través de la mitocondria (Singh *et al.*, 2010).

2.4.1 Vías de la apoptosis

2.4.1.1 Extrínseca.

La vía de señalización extrínseca es mediada por la activación de los llamados “receptores de muerte” los cuales se encuentran en la membrana celular y se encargan de la transmisión de señales después de la unión con su ligando específico. Estos receptores pertenecen a la superfamilia del receptor del factor de necrosis tumoral (TNFR) por sus siglas en inglés, incluyendo a TNFR-1, Fas/CD95 y los receptores de TRAIL DR-4 y DR-5. Diversos tipos de células responden al estímulo de la unión ligando-receptor de muerte debido a que expresan estos receptores (Singh *et al.*, 2010). Todos los miembros de la familia TNFR consisten de subdominios extracelulares ricos en cisteína que les permiten reconocer sus ligandos con especificidad, resultando en la trimerización y activación del respectivo receptor de muerte (Elmore, 2007; Singh *et al.*, 2010). Hasta la fecha, los ligandos mejor caracterizados y los receptores correspondientes de la muerte incluyen FasL/FasR, el *TNF- α* /TNFR1, Apo3L/DR3, Apo2L/DR4 y Apo2L/DR5 (Rubio *et al.*, 2004). La unión del ligando con us

receptor activa una parte citoplasmática del receptor que contiene una secuencia conservada, denominada dominio receptor de muerte (DD). Las las moléculas adaptadoras FADD o TRADD poseen también un DD lo que les permite ser reclutadas por el DD del receptor para formar el complejo de señalización inductor de muerte (DISC). Adicionalmente estas moléculas adaptadoras contienen un dominio efector de muerte (DED) el cual a través de una interacción homotípica DED-DED secuestran a la procaspasa 8 para permitir una activación autocatalítica y liberación de la caspasa 8, y en algunos casos a la caspasa 2 (Calderón, 2005). La caspasa 8 activa entonces puede interactuar con caspasas efectoras resultando en la muerte celular (Singh *et al.*, 2010). En general hay dos vías por las cuales las procaspasas pueden ser activadas: una es la señal inducida por los receptores de muerte y la otra es el estrés inducido en la vía mitocondrial (vía dependiente de la caspasa 9) (Fan *et al.*, 2005).

La muerte por apoptosis puede ser inhibida por una proteína llamada c-FLIP que se unirá a FADD y la caspasa-8, evitando su efecto (Kataoka *et al.*, 1998. ; Scaffidi, 1999). Otro punto de potencial regulación de la apoptosis se refiere a una proteína llamada Toso (proteína antiapoptótica), la cual se ha demostrado bloquea la apoptosis inducida por Fas en células T a través de la inhibición de la activación de la caspasa-8 (Hitoshi *et al.*, 1998).

2.4.1.2 Intrínseca

Las vías de señalización intrínsecas implican un conjunto diverso de organizaciones no mediados por estímulos de receptores que producen señales

intracelulares que actúan directamente sobre sus blancos dentro de la célula y son eventos iniciados por la mitocondria. Los estímulos que inician la vía intrínseca producen señales intracelulares que pueden actuar ya sea en una forma positiva o negativa. Señales negativas implican a ciertos factores de crecimiento, hormonas y citoquinas que pueden conducir al fracaso de los programas de muerte. Otros estímulos que actúan de una manera positiva incluyen, la radiación, toxinas, la hipoxia, hipertermia, infecciones virales y los radicales libres (Dubbin y Stoppani, 2000). Todos estos estímulos provocan cambios en la membrana mitocondrial interna que se traduce en una apertura del poro de permeabilidad transitoria mitocondrial (PPTM), pérdida del potencial de membrana mitocondrial y la liberación de los dos principales grupos secuestrados de proteínas pro-apoptóticas desde el espacio intermembrana al citosol (Elmore, 2007) en este punto de pérdida de la permeabilidad de la membrana mitocondrial es a lo que se refiere como punto de no retorno.

El PPTM es un complejo multiprotéico que se forma en las zonas de unión entre la membrana interna y externa de la mitocondria en forma de crestas. En él participan proteínas de localización citoplasmática (hexocinasa), de la membrana externa como canales aniónicos dependientes de voltaje (VDAC), de la membrana interna (ANT) y de la matriz mitocondrial (ciclofilina D). El mecanismo propuesto consiste en que cierto estímulo (sobrecarga de calcio o daño por radicales libres) produce una remodelación del cuello de la cresta mitocondrial, que pasa de medir aproximadamente de 20 nm a 60 nm, con lo que el citocromo c, que previamente se ha disociado de cardiolipina mediante oxidación por ROS,

puede acceder a la membrana externa, atravesándola vía formación de megacanales formados por combinación de BID, BAX (Del Toro, 2006). De los cuales se detallará su función más adelante. Estos efectos facilitan la salida de iones calcio de la matriz mitocondrial, el colapso del potencial de membrana mitocondrial, el aumento en la producción de ROS en la misma, lo mismo que la depleción del GSH (glutatión reducido) en la matriz mitocondrial (Dubin y Stoppani, 2000)

La mitocondria contribuye a la vida de la célula mediante la producción de ATP pero desencadena la muerte a través de la liberación de un grupo de proteínas como el citocromo *c*, Smac/Diablo (Smac: second mitochondrial activator of caspases: DIABLO: direct IAP binding protein with low pI) y la serina proteasa HtrA2/Omi. Estas proteínas activan la vía mitocondrial dependiente de caspasas. El citocromo *c* se une y activa Apaf-1, así como a la procaspasa-9, formando un "apoptosoma" (Del Toro, 2006). La agrupación de la procaspasa-9 a este complejo conduce a la activación de la caspasa-9. El Smac/Diablo y HtrA2/Omi promueven la apoptosis mediante la inhibición de la actividad de las IAP (proteínas inhibidoras de la apoptosis) y éste apoptosoma permite la activación de las caspasas efectoras promoviendo la apoptosis (Van Loo *et al.*, 2002; Schimmer, 2004).

Un segundo grupo de proteínas pro-apoptóticas AIF (Factor Inductor de Apoptosis), endonucleasa G y CAD (DNAsa activada por caspasas), se liberan de la mitocondria durante la apoptosis, pero este es un evento tardío que se produce

después de que la célula se ha comprometido a morir. El AIF se transloca al núcleo y provoca la fragmentación del ADN y la descondensación de la cromatina nuclear periférica. Esta forma temprana de condensación nuclear se conoce como "etapa I" condensación (Susin *et al.*, 2000). La endonucleasa G también se transloca al núcleo donde se rompe la cromatina nuclear para producir fragmentos de ADN oligonucleosomal. El AIF y la endonucleasa G, funcionan tanto de manera independiente de caspasas como dependiente. El CAD es posteriormente liberado de la mitocondria y se transloca al núcleo, donde posterior a la escisión de la caspasa-3 conduce a la fragmentación del ADN oligonucleosomal y una condensación de la cromatina más pronunciada y avanzada. Esta condensación de la cromatina más pronunciada se conoce como "fase II", de condensación (Li *et al.*, 2001).

La familia de proteínas Bcl-2 (homólogo del proto-oncogen responsable del linfoma folicular humano) es determinante en el control de la vida y la muerte de la célula. Estas proteínas se sintetizan justamente en la membrana de la mitocondria y juegan un papel pro o antiapoptótico, ya que pueden aumentar la permeabilidad de la membrana o disminuirla hasta bloquear el escape de citocromo c y de AIF (Cory y Adams, 2001). Las proteínas sintetizadas en esta familia son: BCL-2, BCL-XL, MCL-1 (células mieloides de leucemia 1), BFL-1 (A1), BCLW y probablemente BCL-B, que inhiben la apoptosis (Belka y Budach, 2002).

Mediante fosforilación se originan proteínas con acción proapoptótica como BAX, BAK, BOK/MTD, pues producen una caída del potencial transmembranal con el consecuente aumento en la permeabilidad membranal (Danial, 2007). Además,

actúan como activadores de las vías proapoptóticas Fas y TNF y de algunas caspasas. Un segundo mecanismo, a través del cual el citocromo c puede ser liberado al citosol, es a través de un canal que se forma en la membrana externa mitocondrial, cuando proteínas de la familia de Bcl-2 como BAX y BAK, que se encuentra normalmente en el citosol, se translocan a la mitocondria y se oligomerizan para formar una estructura de poro durante la apoptosis (Brunelle y Letai, 2009). Estas proteínas forman un canal que permite la salida de citocromo c. Además del efecto directo que se cree tienen las proteínas de la familia Bcl-2 sobre la permeabilidad mitocondrial, también se ha reportado que BAX podría tener una función independiente estimulando la salida de calcio del retículo endoplásmico y dirigiéndolo hacia la mitocondria (Sánchez y Arboleda, 2008). Otros autores proponen que el calcio mitocondrial puede promover la incorporación de BAX a la membrana externa, aunque también se ha reportado la liberación de citocromo c inducida por BAX independiente de calcio.

La subfamilia BH3 parece ser guardiana del daño celular y crítica para desencadenar la apoptosis. Estas proteínas pertenecen al segundo grupo de las proteínas pro-apoptóticas debido a que solo tienen el dominio BH3, esta porción es conocida como dominio mínimo de muerte y es necesario para unirse con el multidominio de los miembros de la familia Bcl-2. Las BH3 (Bid, Bim, Bad, Bik, BMF, bNIP3 HRK, Noxa y Puma) son proteínas inductoras de muerte que subyacen a varios mecanismos de control (Chipuk y Green, 2008). Algunas proteínas se regulan a nivel transcripcional, como es el caso de *noxa*, *hrk*, cuya expresión se induce en respuesta a estímulos proapoptóticos. Otras lo hacen a través de modificaciones postransduccionales como *bid*, que se mantiene inactivo

hasta que es cortada por una caspasa, lo que genera el fragmento *tBid*, o *Bim*, que es secuestrado por los microtúbulos al interactuar con la dineína LC8. Bad es un ejemplo de la regulación de la actividad por fosforilación, cuando está desfosforilada se asocia a Bcl-XL en la mitocondria y promueve la muerte, en cambio, al ser fosforilada se encuentra en el citoplasma asociada a la proteína chaperona 14-3-3, que se unen a proteínas fosforiladas en serinas y pierde la capacidad de interactuar con Bcl-XL. La cinasa Akt es la responsable de la activación e inactivación de BAD (Brunelle y Letai, 2009; Chipuk *et al.*, 2010).

La proteína p53 es la que ordena la ejecución de la apoptosis en respuesta a los agentes que dañan el ADN. Se ha demostrado que la p53 requiere de las proteínas p63 y p73 para realizar su acción. Estas proteínas actuarían en conjunto o en forma paralela a la p53 para inducir la apoptosis, mediante la activación de la expresión de genes pro-apoptosis, como *bax* y *puma* (Calderón, 2005; Chipuk *et al.*, 2010).

ROS: superóxido, peróxido de hidrógeno y radical hidroxilo, son potentes promotores de la apoptosis. La acumulación de EROS en las mitocondrias es el resultado del balance entre dos procesos: (a) la producción de esos radicales por reacciones redox en la membrana mitocondrial interna y (b) eliminación de los mismos por mecanismos desintoxicantes. Entre los mecanismos de desintoxicación tenemos, el dependiente del glutatión (GSH/GSSG), el cual al haber una depleción del GSH produce la apertura del PMPT y con ello la apoptosis (Dubin y Stoppani, 2000; Pollack y Leeuwenburgh, 2001).

En una fase de iniciación de la apoptosis se ha visto la implicación del retículo endoplásmico a lo que muchos autores han denominado la vía del estrés del retículo endoplásmico (RE). Esto es una respuesta adaptativa al estrés denominada respuesta a proteínas mal plegadas (UPR), una señalización por calcio (procesos dependientes de la mitocondria) y por la participación de la procaspasa 12 (proceso independiente de la mitocondria) (Kim *et al.*, 2008). A través de una serie de interacciones bioquímicas entre las proteínas del RE durante las UPR, al menos 2 cinasas del RE son activadas y un factor de transcripción (Proteína reclutadora de inositol 1 (IRE-1a/b), PERK ((PKR (RNA-activated protein kinase) -like ER kinase) y Factor de transcripción activado 6 (ATF6)) a los cuales se les ha denominado como receptores de estrés (Breckenridge *et al.*, 2003).

El calcio en el RE es tomado del citosol por una ATPasa-Calcio (SERCA) y liberado a través del receptor inositol-1,4,5-trifosfato (InsP3R) o del receptor rianodina. Las oscilaciones de los niveles de calcio en el RE son esenciales para la funcionalidad de la célula y disturbios en sus niveles causa su liberación lo cual es un factor apoptogénico (Kim *et al.*, 2008). Ciertos estímulos de muerte incrementa los niveles de calcio citosólico y esto es regulado por BAX y Bcl-2 en la membrana del RE mediante la interacción de Bcl-2 y InsP3R. El InsP3R promueve la liberación de calcio del RE induciendo directamente la pérdida de la permeabilidad de la membrana mitocondrial externa y apoptosis asociada con la liberación de proteínas apoptogénicas (Breckenridge *et al.*, 2003; Movassagh y Foo, 2008).

2.4.1.3 Vía de ejecución.

Las vías extrínseca e intrínseca coinciden en el punto final de la fase de ejecución la cual es considerada la vía final de la apoptosis. Se trata de la activación de las caspasas de ejecución. Las caspasas de ejecución activan endonucleasas del citoplasma, que degradan los materiales nucleares, y las proteasas que degradan las proteínas nucleares y del citoesqueleto. La caspasa-3, caspasa-6, y la caspasa-7 funcionan como caspasas efectoras (Fan *et al.*, 2005).

La caspasa-3 se considera que es el verdugo más importante de las caspasas y es activado por cualquiera de las caspasas iniciadoras (caspasa-8, caspasa-9, o caspasa-10). La caspasa-3 activa específicamente a la endonucleasa CAD. En las células que proliferan CAD es un complejo con su inhibidor, ICAD. En las células apoptóticas, la caspasa-3 se degrada al inhibidor de CAD (ICAD) para liberar CAD. El CAD a continuación degrada el ADN cromosómico en el núcleo y provoca condensación de la cromatina. La caspasa-3 también induce la reorganización del citoesqueleto y la desintegración de la célula en cuerpos apoptóticos (Elmore, 2007). La gelsolina, una proteína de unión a actina y ha sido identificada como uno de los sustratos fundamentales de caspasa-3 (Li *et al.*, 2001; Fan *et al.*, 2005). Una vez activadas las caspasas efectoras, la apoptosis se vuelve irreversible.

La Cer es un importante mediador en ambas vías apoptóticas, tanto en la extrínseca como en la intrínseca. La generación endógena de Cer y su señalización en la apoptosis ha sido demostrada por efecto de los receptores de

muerte con sus ligandos FasL (CD95) y el ligando de TNF- α . En estas células la exposición de PS y la internalización de esfingomielina (SM), ocasiona que mediante la esfingomielinasa ácida (aSMasa) la SM se hidrólisis a Cer y la inhibición de esta enzima evita la apoptosis. El TNF- α activa la esfingomielinasa neutra (nSMasa) a través de FAN (factor asociado con la activación de la esfingomielinasa neutra) para inducir apoptosis. En la apoptosis intrínseca diversos estímulos permiten el incremento de los niveles de Cer endógena a través de múltiples mecanismos, no solo mediante las esfingomielinasas (SMasas) sino también por la Ceramida sintasa. En general el incremento de Cer causa la activación de varias proteínas cinasas y fosfatasa, cascada de activación por caspasas, disfunción de organelos como lisosomas, mitocondria, entre otros y lleva a la célula a apoptosis (Huang *et al.*, 2011).

2.5. Otros tipos de muerte celular

En el estudio de la atresia, se ha prestado mucha atención sobre cómo las células foliculares mueren. Durante la atresia, la muerte celular no está determinada por un tipo específico de muerte sino que puede deberse a diferentes tipos de muerte como los ya mencionados apoptosis, necrosis y otros no tan sobresalientes como la autofagia y un proceso parecido a la cornificación llamado diferenciación terminal el cual es un mecanismo genéticamente programado (Young y McNeily, 2010).

La autofagia o muerte celular programada tipo 2 se ha visto en folículos antrales de gansos y codornices (Choi *et al.*, 2010). Éste tipo de muerte se caracteriza por

una degradación precoz de orgánulos pero los elementos del citoesqueleto persisten hasta las etapas finales del proceso. Considerando que la muerte celular por apoptosis es dependiente de caspasas y se caracteriza por la escisión del ADN internucleosomal, la activación de caspasas y fragmentación del ADN (Ramírez *et al.*, 2010). En contraste con la necrosis, tanto la muerte celular por apoptosis y la autofagia se caracterizan por la falta de una respuesta inflamatoria de los tejidos (Levine y Yuan, 2005). La vía autofágica comienza con el secuestro de material citoplasmático o todos los organelos en autofagosomas, los cuales se fusionan con los lisosomas y degradan el contenido por las proteasas lisosomales (catpsina B y D principalmente). La inducción de la autofagia durante el desarrollo folicular y la atresia no está aún bien determinado (Hilario *et al.*, 2010).

Otro tipo de muerte encontrado específicamente en las CG es la cornificación o queratinización, la cual llaman diferenciación terminal, esto porque según estudios realizados por Wezel *et al* (1999) reportan que las CG muestran histológicamente una estructura similar a la piel por lo que sus datos indican que las CG cercanas al antro no siguen un patrón de muerte como en la apoptosis o la necrosis sino mueren por diferenciación terminal.

2.6. Importancia de la membrana plasmática en la integridad de la célula.

La integridad de la membrana es fundamental para mantener la función normal de la célula. La membrana celular es un filtro altamente selectivo que controla la entrada de nutrientes y la salida de productos residuales, además genera diferencias en la concentración de iones entre el interior y el exterior de la célula. También actúa como un sensor de señales externas permitiendo a la célula alterar su comportamiento en respuesta a estímulos de su entorno. Por lo que si se presenta una falla en el funcionamiento de la membrana por pérdida de su integridad la célula morirá (Chan y Boxer, 2007).

Todas las membranas biológicas, incluidas la membrana plasmática y las membranas internas de las células eucariotas, tienen una estructura general común; se trata de agrupaciones de moléculas lipídicas y proteicas, unidas por interacciones no covalentes. Las moléculas lipídicas están dispuestas en forma de una doble capa continua de 4-5 nm de grosor. Esta bicapa lipídica constituye la estructura básica de la membrana y actúa de barrera impermeable al flujo de la mayoría de moléculas hidrosolubles. Las moléculas proteicas están «disueltas» en la bicapa lipídica y desempeñan diversas funciones de la membrana. Algunas proteínas sirven para el transporte de moléculas específicas hacia el interior y el exterior de la célula; otras son enzimas que catalizan reacciones asociadas a la membrana; otras, actúan de eslabones estructurales entre el citoesqueleto de la célula y la matriz extracelular o de receptores que reciben y traducen las señales químicas procedentes del entorno de la célula. Las membranas celulares son estructuras fluidas y dinámicas; la mayoría de sus moléculas lipídicas y proteicas

pueden desplazarse con rapidez por el plano de la membrana. Además, las membranas son estructuras asimétricas, es decir la composición de sus dos caras refleja las diferentes funciones realizadas por cada una de ellas (Arrazola, 1994).

La membrana plasmática de la célula por tal motivo tiene la importante función de separar el ambiente celular interno del espacio extracelular. Sin embargo tiene un papel crucial en la comunicación entre células y su ambiente lo cual la involucra en procesos tales como tráfico subcelular, transducción de señales y el intercambio de metabolitos. Todas las membranas tienen una superficie extracelular y una citosólica (Milhas *et al.*, 2010).

Los lípidos son el mayor componente estructural de las membranas celulares constituyendo alrededor del 50%. Existe una gran variedad de estos lípidos tales como los glicerofosfolípidos: fosfatidilcolina, fosfatidiletanolamina, fosfatidilserina, fosfatidilinositol y el ácido fosfatídico. Su porción hidrofóbica es un diacilglicerol, el cual contiene una cadena de ácido graso saturado o cis-no saturado de diferente longitud (Haynes *et al.*, 2009). Los esfingolípidos (SPLs) constituyen otra clase de lípidos estructurales, el mayor componente esfingolipídico en la membrana celular de mamífero es la SM y los glicoesfingolípidos (GSLs), los cuales contienen una base mono- di u oligosacárido en glucosilceramida (GlcCer) y algunas veces en galactosilceramida. Los gangliósidos son GSLs formados por una o más unidades de ácido N-acetilneuramínico o ácido siálico (Milhas *et al.*, 2010). Los SPLs tienen una porción saturada o trans-no saturada por lo cual tienen la capacidad de poseer una porción más larga, es decir todos ellos son moléculas anfipáticas, con una cabeza polar y dos radicales fuertemente hidrofóbicos. Los esteroides son lípidos no polares en la membrana: el colesterol

predomina en mamíferos mientras que el ergosterol predomina en levaduras. La mezcla de esteroides con esfingolípidos es causada por una interacción de la porción no polar del esteroide con la cabeza del esfingolípido mediante interacciones intermoleculares. La señalización inducida por la hidrólisis de glicerolípidos y SLPs produce lípidos mensajeros tales como: lisofosfatidilcolina, ácido fosfatídico, diacilglicerol, esfingosilfosforilcolina, esfingosina (Sph), esfingosina 1-fosfato (S1P), ceramida 1-fosfato (C1P) y Cer (Van-Meer *et al.*, 2008).

2.6.1 Asimetría de la membrana plasmática.

Los eritrocitos humanos han servido como un modelo para estudiar la estructura de las membranas en eucariontes, específicamente la asimetría de lípidos de dicha membrana (Daleke, 2008). Las primeras evidencias experimentales de la distribución asimétrica de lípidos en membranas biológicas de eritrocitos se dio mediante su exposición a fosfolipasas y esfingomielinasas (SMasas) (Meza *et al.*, 2010).

El compendio de estos y posteriores reportes ha llevado a concluir que la monocapa externa de la membrana plasmática está compuesta principalmente de fosfatidilcolina y SM, mientras que la monocapa interna preferentemente incluye fosfatidilserina y fosfatidiletanolamina. Los GSLs de la monocapa externa usualmente poseen un ácido graso de cadena larga (18-24 carbonos) que interacciona con las cadenas acilo de los lípidos de la monocapa interna de la membrana. Lateralmente, se asocian entre sí a través de puentes de hidrógeno y de las interacciones débiles que se establecen entre sus carbohidratos. Por su

parte, aquellas regiones de la membrana que exhiben un mayor grado de fluidez generalmente involucran moléculas de fosfatidilcolina con ácidos grasos insaturados. Se acepta que las regiones ordenadas y fluidas pueden intercalarse en el plano de la membrana plasmática. La asimetría lipídica también está presente en la membrana del aparato de Golgi y de endosomas. En contraste, ésta no se observa en la membrana del retículo endoplásmico (Meza *et al.*, 2010).

Existen transportadores con una actividad dependiente o independiente de energía, los cuales participan en la generación y mantenimiento de la asimetría lipídica de la célula (Daleke, 2007; Daleke, 2008).

La asimetría lipídica entre las monocapas de las biomembranas se genera a través de distintos procesos: transferencia espontánea de componentes lipídicos entre las monocapas (flip-flop), actividad de ATP-*asas* transportadoras de especies lipídicas y retención específica de ciertos lípidos en una u otra de las monocapas (Meer *et al.*, 2008; Meza *et al.*, 2010). Al menos 3 tipos de transportadores lipídicos han sido estudiados: una flipasa aminofosfolipídica translocasa dependiente de ATP (ATPasa P4) la cual cataliza el transporte de lípidos al interior, una flopasa dependiente de ATP (proteínas transportadoras tipo ABC "ATP Binding cassette") que permite la migración de los fosfolípidos al exterior y una escramblasa independiente de ATP la cual estimula movimientos bidireccionales de lípidos entre las 2 caras de la membrana. Mientras que las 2 primeras actividades tienen como propósito el mantenimiento de la asimetría de lípidos, la bidireccionalidad de lípidos promueve el colapso de esta asimetría (Meer *et al.*, 2008; Daleke, 2008). La distribución asimétrica de los lípidos reviste gran importancia, ya que previene el desarrollo de ciertos tipos de síndromes

autoinmunes que pudieran comprometer la integridad de la membrana plasmática y por lo tanto, la viabilidad celular. El patrón de distribución de colesterol entre las monocapas es un aspecto que a la fecha no está del todo dilucidado; existen reportes que lo ubican de manera preferente en la monocapa interna de la membrana plasmática, otros que lo sitúan principalmente en la monocapa externa o, incluso, aquellos que sostienen que su rápida transferencia entre las dos monocapas propicia su distribución homogénea (Janmey y Kinnunen, 2006; Meza *et al.*, 2010).

Evidencias indican que la pérdida de la asimetría puede ser causado como ya se mencionó por la acción de las escramblasas, por una disfunción de los transportadores aminofosfolipídicos o por la producción de grandes cantidades de Cer por SMasas (Meer *et al.*, 2008).

La membrana de las células eucariontas posee una composición y organización compleja la cual es importante para la mayoría de los procesos celulares en los cuales ella participa. Aunque primeramente se conoció a la membrana como un simple dominio homogéneo en el modelo de mosaico fluido, estudios recientes indican que la membrana plasmática contiene microdominios denominados “Balsas lipídicas” (Milhas *et al.*, 2010) Durante mucho tiempo los lípidos fueron considerados componentes de las membranas biológicas con función exclusivamente estructural, sin embargo en los años recientes cada vez se hace más evidente que los lípidos se comportan como moléculas de señalización, específicamente los SLPs (Sterin y Leocata, 2007).

2.7. Esfingolípidos y su función como moléculas de señalización.

Los SPLs y sus metabolitos contribuyen a la formación de las balsas lipídicas y se encuentran localizados predominantemente en la cara externa de la membrana plasmática, en el lumen de vesículas intracelulares y organelos (endosomas, Aparato de Golgi etc) así como en la mitocondria y núcleo aunque esta localización no ha sido bien definida (Merril y Sandhoff, 2002; Breslow y Weisman, 2010).

Los SPLs están formados por 3 dominios estructurales principales: una base de cadena larga, normalmente la esfingosina, un ácido graso de longitud variable unido al carbono 2 de la cadena base y diferentes cabezas polares unidas al carbono 1 lo cual permite diferenciar a todos los SPLs (Sterin y Leocata, 2007; Sánchez y Díaz, 2008; Navarrete y Ibáñez; 2008, Milhas *et al.*, 2010).

Además de que los SPLs son un componente estructural de la membrana plasmática, son moléculas de reconocimiento y participar como moléculas de señalización (Merril y Sandhoff, 2002; Alewijnse y Peters, 2008). Los SPLs comprenden un largo y esencial grupo de lípidos que incluyen esfingosinas, ceramidas, SM y varios derivados fosforilados y glicosilados (Breslow y Weisman, 2010).

En particular los SPLs regulan procesos importantes de la fisiología celular tales como crecimiento, diferenciación y muerte celular. Consecuentemente la biología de los SPLs se ha convertido en un blanco importante para la investigación de la señalización celular. Los SPLs tienen doble papel como moléculas bioactivas por un lado actúan como segundos mensajeros en la transducción de señales

extracelulares, pero además como ya se mencionó regulan la dinámica de las membranas biológicas, dentro de los principales SPLs bioactivos se incluyen Cer, Sph, C1P y S1P. De ellos destaca Cer por ser el centro de la ruta de síntesis y degradación de SPLs y se podría considerar como reguladora del destino celular. Por un lado la generación de Cer por estímulos de estrés activa rutas encaminadas a producir la muerte celular, mientras que la transformación de Cer en C1P o en S1P activa vías mitogénicas y regula la diferenciación y proliferación (Sánchez y Díaz, 2008).

Un evento temprano en la muerte celular independientemente del tipo de ésta es el cambio en la distribución de los componentes de la membrana (pérdida de la asimetría). En la membrana celular en condiciones normales los fosfolípidos se encuentran distribuidos de forma asimétrica entre ambas capas de la membrana. En su cara interna contiene ácido fosfatídico, fosfatidiletanolamina, fosfatidilserina (PS) y en la cara externa contiene colina, fosfolípidos (fosfatidilcolina, SM y glicoesfingolípidos). Por medio de aminofosfolípido translocasas dependientes de ATP ó flipasas, los lípidos de la cara externa de la membrana se mueven a la cara citoplasmática y por una flopasa, los lípidos de la cara interna se mueven a la superficie, este proceso es realizado constantemente y es denominado como flip-flop (Daleke, 2007; Navarrete y Ibañez, 2008). Se ha observado que la falta de ATP como es el caso en la necrosis se ve interrumpido el proceso de flip-flop, el cual también se ha visto es inducido por apoptosis y se caracteriza por la exposición de PS en la cara externa y SM en la cara interna lo cual es un indicativo de procesos de muerte celular por la inhibición de aminofosfolípidos y de un inductor de calcio, lo cual impide el regreso de los fosfolípidos de la cara

interna y externa a su lugar (Verhoven *et al.*, 1995; Bratton *et al.*, 1997). Estudios recientes han demostrado que la SM está implicada en procesos apoptóticos (Navarrete y Ibáñez; 2008, Milhas *et al.*, 2010).

La SM es un esfingolípido clasificado dentro de los fosfolípidos de membrana y ha sido muy estudiado simplemente como un componente estructural, encontrándose de un 10 a un 15% de SM del total del contenido de fosfolípidos, reside predominantemente en la cara externa de la membrana plasmática formando interacciones rígidas con el colesterol. Su estructura consta de una cadena base de Sph unida mediante un enlace amida a un ácido graso formando Cer y así esta estructura formada esté ligada a un residuo de colina o etanolamina mediante un enlace fosfodiéster (Fig. 6). En los seres humanos, la SM consta alrededor del 85% de todos los SLPs y es el único fosfolípido que es un fosfoglicérido (Zager, 2000). La SM está localizado en los balsas de membrana donde ayuda al ensamblaje de complejos de señalización. De particular interés es la degradación enzimática de SM por SMasas a Cer y fosfocolina. Varios procesos celulares han sido relacionados a la actividad de SMasas de los cuales la más sobresaliente es la apoptosis (Milhas *et al.*, 2010). La formación rápida de Cer por SMasas facilita el agrupamiento del receptor de muerte en la membrana plasmática posiblemente por la propiedad que tiene Cer de estabilizar rafts de membrana. Por otro lado la generación de Cer puede indirectamente afectar la actividad de proteínas no localizadas en las balsas y Cer puede activar segundos mensajeros en esta etapa. En la fase efectora la membrana plasmática pierde asimetría de la distribución de lípidos y la esfingomielinasa neutra (nSMasa) en la cara interna de

la membrana plasmática permite la formación de Cer, esta etapa apoptótica ocurre lenta y continuamente (Bratton *et al.*, 1997; Navarrete y Ibáñez; 2008).

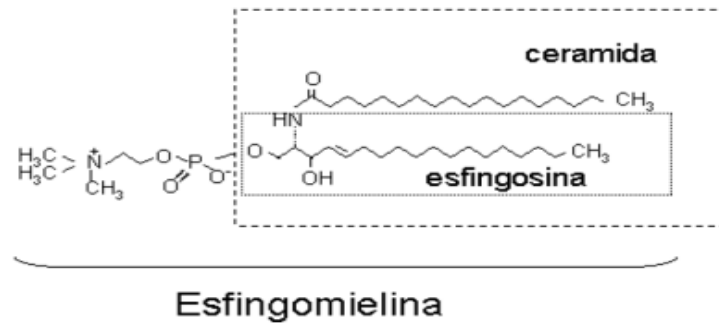


Figura 6. Estructura general de una molécula de SM. La SM está compuesta por una cadena de esfingosina la cual con un ácido graso forma Cer y esta estructura está unida a un residuo de colina o etanolamina. Tomado de Sánchez y Díaz, (2006).

Las SMasas como ya se mencionó son enzimas que catalizan la hidrólisis de SM en Cer y fosfocolina y se han encontrado 5 tipos basándose en su pH óptimo, localización subcelular y dependencia de cationes, aunque las más sobresalientes son la SMasa neutras (nSMasas), esfingomielinasa ácida (aSMasa) y la esfingomielinasa secretora (sSMasa) la cual surge a partir de a aSMasa (Goñi y Alonso 2002; Milhas *et al.*, 2010).

La aSMasa actúa a un pH de 5.0 por lo cual se localiza intracelularmente en los lisosomas pero puede ser secretada al espacio extracelular. Diversos autores mencionan que una vez activado el receptor Fas (CD95), esta enzima se transloca de su sitio intracelular a la cara extracitoplasmática de la membrana la cual es rica en SM. La actividad de aSMasa induce la unión de Fas en balsas de

membrana ricos en SLPs y subsecuentemente se inicia la apoptosis, esta unión del receptor de muerte probablemente indica el resultado de segregación lateral de Cer, la sSMasa a diferencia de la ácida reside en el aparato de Golgi (Goñi y Alonso 2002). La aSMasa, puede ser también activada por el receptor de TNF a través de proteínas adaptadoras como FADD y TRADD que se unen al DED del receptor (Sánchez y Díaz, 2006)

Por otro lado se han encontrado dos nSMasas, una dependiente de magnesio y unida a la membrana y una SMasa neutra independiente de magnesio. La activación de las nSMasas han sido reportada en la apoptosis inducida por el receptor de muerte Fas y TNFR, notablemente ambos receptores son distribuidos en los sitios de caveolas (tipo específico de balsas) de membrana bajo la estimulación de sus ligandos, además puede ser localizada en mitocondria, retículo endoplásmico y núcleo. Esta enzima es la más estudiada para la generación de Cer. La forma neutra parece participar en la fase ejecutora de la apoptosis en respuesta a Fas aunque puede actuar río arriba de los eventos de la mitocondria en la vía de señalización del TNFR participando en la fase efectora de la apoptosis (Goñi y Alonso 2002; Milhas *et al.*, 2010).

La nSMasa es activada por el receptor de TNF a través de una proteína adaptadora denominada FAN que se asocia al dominio NSD del receptor. La proteína FAN a su vez puede asociarse con otras proteínas ensambladoras como el receptor de PKC activada RACK1, que sirve de atracción y activación de numerosas proteínas implicadas en rutas de señalización (Sánchez y Díaz, 2006). A pesar de estos datos, el mecanismo exacto por el cual la generación de Cer por

nSMasa conduce a la activación de caspasas y muerte celular, está todavía por dilucidar pero el mecanismo más certero menciona que el aumento de la Cer en las balsas lipídicas puede aumentar el reclutamiento de TNF-RI potencia la actividad del receptor sin embargo la activación de la forma neutra también puede servir como una fuente para otros SLPs bioactivos (Goñi y Alonso 2002; Milhas *et al.*, 2010).

2.8. Ceramida

La Cer es un lípido central en el metabolismo de SPLs, está formada por un ácido graso unido por un enlace amida a una cadena de Sph, el ácido graso es variable en longitud (C2-C24), sirve como molécula de señalización y es precursora de SPLs bioactivos como Sph y S1P o bien formar SM y glicoesfingolípidos complejos por lo cual se ha postulado que Cer es el esfingolípidos más simple dado que todas las vías que forman SLPs convergen en su formación (Sterin y Leocata, 2007). La Cer es generada durante el estrés celular y apoptosis pero en condiciones donde no hay estímulo de muerte, la Cer también se genera dada su característica de ser precursora de otros esfingolípidos que la célula requiere (Navarrete y Ibáñez; 2008, Milhas *et al.*, 2010).

La Cer es generada por la síntesis *de novo* en el retículo endoplásmico a través de una serie de reacciones que comienzan con la condensación de serina y palmitol-CoA por serina palmitol-CoA transferasa (SPT) para así pasar al aparato de Golgi por vesículas o por la proteína transportadora de Cer (CERT) y pueda servir para la formación de SM y glucoesfingolípidos en el aparato de Golgi. Además la Cer puede ser formada por la vía de reciclaje en la cual es el

substrato de numerosas enzimas incluyendo las que producen SLPs complejos como la SM y GSLs (Blitterswijk *et al.*, 2003). La hidrólisis de SM por acción de enzimas ácidas y neutras (aSMasa, nSMasa) forma Cer. Subsecuentemente Cer puede ser hidrolizada por ceramidasa para liberar el ácido graso y producir Sph. Posteriormente por la enzima esfingosina cinasa (SK) la Sph es fosforilada a S1P y se ha postulado que por ser Cer el esfingolípido más simple S1P, Sph y Cer son metabolitos interconvertibles entre sí (Fig. 7) (Sterin y Leocata, 2007; Alewijnse y Peters, 2008; Boath, 2008; Mullen *et al.*, 2010). Solo 10-20% de SM reside en la cara citoplasmática de la membrana, SM en ambos sitios de la membrana es sujeta a hidrólisis para producir Cer y cada tipo de hidrólisis ocurre en diferente escala de tiempo después de la estimulación de la célula teniendo una función específica (Blitterswijk *et al.*, 2003).

En los últimos años se ha propuesto que la cantidad de Cer que se produce en una célula, puede ser un importante indicador de la vía de muerte que seguirá. Las ceramidas, han sido reconocidas como importantes segundos mensajeros disparadores de los procesos apoptótico/necróticos en diversos tipos celulares (Pedrero, 2005).

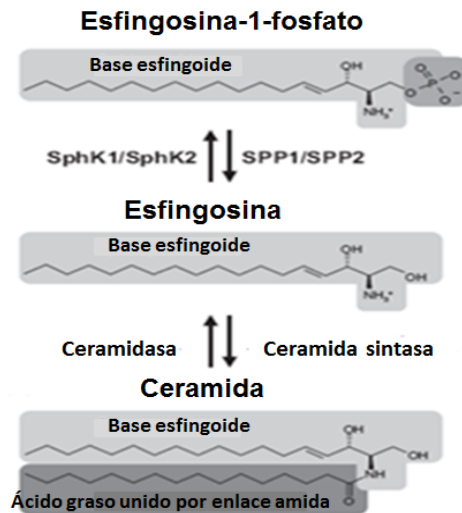


Figura 7. Estructura y formación de los principales esfingolípidos bioactivos. El esqueleto de todos los esfingolípidos es una cadena de esfingosina la diferencia entre ellos radica en el compuesto de la cabeza polar. S1P, Sph y Cer representan un reóstato por sus funciones además de que son metabolitos interconvertibles entre si pero dadas las características antagónicas se ha denominado como esfingostato a S1P/Cer en el destino celular. Tomado de Takabe *et al* (2008).

2.8.1 Membrana plasmática y Cer.

Como se ha estado mencionando la Cer puede actuar como un componente estructural y modulador funcional de las balsas de la cara externa de la membrana o como un posible segundo mensajero en la cara interna de la membrana. La Cer es un componente estructural de membrana, se segrega lateralmente en microdominios de membrana (rafts/caveola), es empacada fuertemente en homodímeros/multímeros asociados a otros esfingolípidos y a colesterol, en estos rafts se encuentran los receptores de muerte (Fas y TRAIL). Las concentraciones de Cer han sido determinadas en caveolas aisladas, aún en células no estimuladas. Esto promueve y estabiliza la formación de estos

rafts/caveolas. Por la misma razón fisicoquímica la Cer natural no se transfiere espontáneamente entre la bicapa de lípidos y no realiza flip-flop tan fácilmente como el diacilglicerol (DAG) entendiendo con esto la participación de Cer no solo como segundo mensajero en señales de muerte sino también como componente estructural (Venkataraman y Futerman, 2000).

Las cadenas largas de Cer no son solubles en agua a diferencia de las cadenas cortas que si lo son, en algunos casos son utilizadas con mayor facilidad para trabajar experimentalmente. La Cer al estar fuertemente unida a la membrana donde es generada puede permanecer unida a proteínas ya sea en esa misma membrana o en vesículas de membrana derivadas directamente de tal membrana. La Cer-C2 por ser de cadena corta puede ser translocada al citosol hacia otras membranas dentro de la célula. Tepper *et al* (2000) observó que Cer exógena (tomada de la membrana, espacio extracelular) fue convertida en GlcCer en el aparato de Golgi, mientras que Cer endógena generada en la membrana plasmática expuesta a CD95/Fas o por SMasa bacteriana exógena no alcanzó el aparato de Golgi y no fue glicosilada.

La activación de nSMasa por la unión de CD40 y TNF a su receptor mostró dependencia a la proteína FAN que se asocia a estos receptores. La función de Cer formada relativamente rápido (15-60min) en la cara citosólica de la membrana plasmática aún no ha sido bien definida pero los estudios continúan indicando que sirve como segundo mensajero por la activación de enzimas específicas generando vías de señalización en procesos apoptóticos (Segui *et al.*, 1999).

Zhang *et al* (1997) incubó células Molt-4 leucemicas con nSMasa bacterial teniendo un grupo con la enzima y uno control y los resultados indicaron que el grupo con nSMasa generó Cer de un pool de SM (en la cara interna de la membrana plasmática) lo cual condujo a apoptosis, mientras que Cer generada en la cara extracelular no causó apoptosis. Además de la generación de Cer por nSMasa, estudios indican que también se genera por aSMasa, esta actividad fue detectada en balsas como una respuesta rápida a la estimulación por la familia de receptores TNF lo cual hace partícipe el papel de los lisosomas durante la apoptosis (Levade *et al.*, 1999). La activación del receptor resulta en la translocación de aSMasa de su almacenamiento intracelular a la cara extracelular de la membrana donde se co-localiza con los SPLs en los rafts por sus características glicoproteicas (Fig. 8). La enzima actúa a pH bajo pero cuando las condiciones en la célula se presentan a pH neutro la enzima permanece inactiva, una teoría que avala el hecho de su activación se refiere a que esta aSMasa se genera en endosomas de reciclaje donde el pH es bajo y así puede generar Cer a partir de SM al sitio luminal por lo tanto cuando el endosoma se fusiona con la membrana plasmática Cer puede aparecer en la cara extracitoplasmática de la membrana facilitando la acción de los receptores de muerte con su ligando por lo cual muchos receptores activan la liberación de Cer que transforma pequeñas balsas de membrana (rafts), en grandes plataformas que median la agrupación de receptores los cuales se activan y transmiten señales al interior celular. Estudios indican que la activación y consiguiente translocación a la membrana de la aSMasa es lo que genera Cer en la cara externa de la membrana celular. (Grassme *et al.*, 2001; Paris *et al.*, 2001).

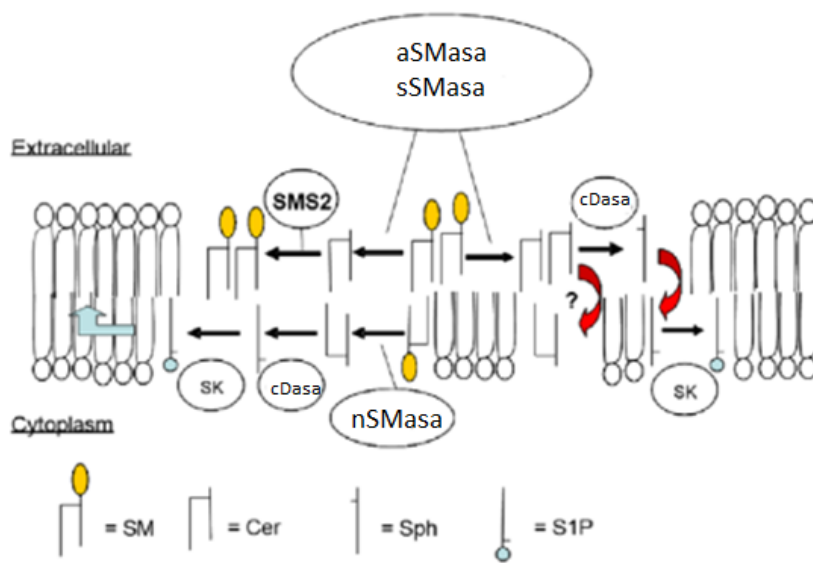


Figura 8. Metabolismo de SM en la membrana plasmática. La aSMasa (L-SMasa) y la sSMasa pueden actuar sobre la SM del espacio extracelular para producir Cer, la cual a su vez puede ser metabolizada nuevamente a SM por una SMS2 (esfingomielina sintasa). Por otro lado Cer puede pasar a la cara interna mediante el flip (y viceversa, es decir la de la cara interna pase a la externa) o por acción de una ceramidasa (cDasa) pueda ser convertida a Sph la cual además puede hacer flip o realizar lo mismo que Cer (viceversa puede hacer flop). En contraste nSMasa en la cara interna puede hidrolizar SM Cer para que sea convertida a Sph por una cDasa y posteriormente a S1P por una SK, por otra parte S1P en la cara interna puede ser bombeado fuera de la célula para actuar extracelularmente. Tomado de Milhas *et al* (2010).

Entre las proteínas que interaccionan con la Cer se incluyen: proteína quinasa activada por Cer (CAPK), proteína quinasa supresora de Ras (KSR), las fosfatasas PP2A y PP1B, proteína cinasa c Zeta (PKC ζ), catepsina D, cPLA2 y PKC α (Heinrich *et al.*, 2000; Ruvolo, 2003; Huwiler *et al.*, 2004). Una de las primeras enzimas identificadas fue la proteína quinasa activada por Cer,

CAPK/KSR. La CAPK es una ser/thr quinasa que ha sido recientemente identificada como la quinasa supresora de Ras (Ruvolo, 2003).

El tratamiento de células con Cer ha demostrado inhibir la actividad de las proteínas cinasas activadas por mitógenos (MAPKs), Erk-1, Erk-2 y simultáneamente activa proteínas cinasas activadas por estrés (SAPKs) tales como JNK y p38 en una gran variedad de tipos celulares llevando a la célula a apoptosis (Woodcock, 2006). Sin embargo la Cer generada por la nSMasa en la membrana plasmática activa directamente a KSR, que fosforila y activa la quinasa Raf-1, la cual fosforila y estimula MEK-1 y esta a su vez fosforila y activa ERK (Sánchez y Díaz 2006; Bartke y Hannum, 2009). Este efecto de Cer por lo que se ve no corresponde al observado en la apoptosis lo cual sugiere que Cer puede tener distintos efectos a nivel de la célula además de la apoptosis (Woodcock, 2006).

Se ha demostrado que la Cer y sus análogos inducen translocación de la PKC atípica PKC ζ , desde el citosol a la membrana perinuclear y que también aumentan la fosforilación de esta quinasa tanto in vitro como in vivo (Bartke y Hannum, 2009) pero cabe mencionar que dependiendo de la concentración de Cer se generará la estimulación o inhibición de PKC ζ (Woodcock, 2006). La unión de PKC ζ a Cer, produce un cambio conformacional y activación de PKC ζ por fosforilación, lo cual activa otras rutas, en particular la vía de supervivencia de NF- κ B. Además, la Cer activa múltiples cascadas de señalización que involucran a JNK. Se ha sugerido que la Cer puede activar JNK vía Rac-1, PKC ζ y MEKK1

(miembro de la familia de las quinasas activadas por mitógenos), la cual es análoga de c-Raf en la cascada de JNK llevando a la célula a apoptosis (Sánchez y Díaz 2006).

2.8.2 Cer en los componentes celulares.

La señalización de Cer implica la regulación del crecimiento celular, diferenciación, senescencia, necrosis, proliferación y apoptosis. La actividad de Cer se ha visto se efectúa en diferentes organelos celulares lo cual parece indicar que puede ser controlado su efecto dependiendo de su localización. Por ejemplo cuando la Cer es generada en la membrana plasmática por la vía de la hidrólisis de SM por SMasas ésta activa vías relacionadas con inhibición del crecimiento, estrés oxidativo y muerte celular (Segui *et al.*, 2001; Testai *et al.*, 2004).

Se ha observado que la translocación de Cer a la mitocondria provoca cambios iónicos entre la matriz mitocondrial y el citoplasma, produciendo un descenso del potencial transmembrana mitocondrial dando como resultado la formación del poro de permeabilidad transitoria mitocondrial. Las mitocondrias contienen Cer en una concentración de 3 veces mayor en la membrana mitocondrial externa que en la interna. Datos obtenidos de mitocondrias aisladas de hígado de ratas sanas muestran que estos organelos contienen mayor cantidad de dihidroceramida que de Cer por lo cual los niveles de Cer no se expresan en gran cantidad en células sanas. Por lo tanto la conversión de dihidroceramida a Cer podría ser una manera rápida de generar Cer en la mitocondria. Las vías de señalización activadas en la mitocondria por Cer se deben en parte por la activación/regulación de proteínas fosfatasa PP1A y PP2A las cuales se ha visto experimentalmente tienen afinidad

por el D-*erythro* y regulan la función de miembros de la familia de Bcl-2 tanto con actividad anti-apoptótica (Bcl-2, Bcl-xL, Mcl-1) como pro-apoptótica (Bad, Bax, Bim), además de la liberación de citocromo c, SMAC/Diablo y la pérdida de la permeabilidad mitocondrial llevando a la célula a apoptosis intrínseca. Por tal motivo diversos autores mencionan el hecho de que probablemente Cer no solo se transloca a la mitocondria sino también se sintetiza en este organelo celular (Blitterswijk *et al.*, 2003; Jordan, 2003; Siskind, 2005; Thon *et al.*, 2005). Factores de sobrevivencia inducen fosforilación de Bad, inactivando su función pro-apoptótica. La desfosforilación de Bad por PP1 induce apoptosis. Por el contrario PP2A podría desfosforilar Bcl-2 convirtiéndolo en una molécula pro-apoptótica (Sánchez y Díaz 2006). Otro punto importante sobre la Cer en las mitocondrias es que ellas contienen las enzimas encargadas de la síntesis de Cer, es decir la Ceramida sintasa, dihidroceramida desaturasa y las ceramidasa, estas características involucran a este organelo en la apoptosis (Siskind, 2005).

Otro mecanismo por el cual Cer puede inducir apoptosis es la regulación del potencial redox. Se ha demostrado que tanto Cer como sus derivados glicosilados pueden inducir estrés oxidativo celular a través de disfunción mitocondrial, sobrerregulación del óxido nítrico sintasa (NO sintasa), activación de la NADPH oxidasa y desregulación de enzimas antioxidantes. Recientemente ha sido demostrado que la activación de la NADPH oxidasa asociada a membrana mediada por ceramida es dependiente de la activación de PKC ζ (Sánchez y Díaz 2006).

La Cer puede ser generada en los lisosomas por la aSMasa generando una interacción con la catepsina D llevando al rompimiento de BID y subsecuentemente la muerte celular por apoptosis, es así como la catepsina D puede mediar las acciones de Cer generada lisosomalmente, esto se ha visto con la implicación de los receptores de muerte TNF y Fas (Saad *et al.*, 2007). Un punto crítico en el efecto de Cer en los lisosomas se encuentra en la regulación de la permeabilidad de la membrana lisosomal. En respuesta a estímulos de muerte celular, la esfingomielinasa lisosomal (aSMasa) se activa y convierte SM en Cer. La Cer causa permeabilidad de la membrana lisosomal y muerte celular por apoptosis y necrosis. La Cer induce ruptura parcial lisosomal y la apoptosis en baja a moderadas concentraciones (<20 micras), y la ruptura lisosomal y necrosis extensa en una concentración elevada (> 20 mM) (Zong y Thompson, 2006).

La generación de Cer en el retículo endoplásmico (RE) se asocia a que en él se da la síntesis de novo de Cer y por ende contiene las enzimas encargadas de generarla. Además se asocia topológicamente con el núcleo debido a que la membrana nuclear es una estructura continua de la membrana del RE. Ya en el núcleo Cer activa a la proteína fosfatasa-1 la cual desfosforila proteínas ricas en serina/arginina (proteínas SR) lo cual induce un corte alternativo para la generación de proteínas pro-apoptóticas Bcl-XS o la caspasa- 9. Otro blanco de la Cer en el núcleo son las proteínas pro-supervivencia como la telomerasa, la cual cataliza la elongación y mantenimiento de los telómeros en los extremos de los cromosomas. Ésta telomerasa está formada por 2 subunidades principales, la

primera es la Transcriptasa inversa de la Telomerasa (TERT o hTERT) y la segunda es el componente del ARN de la telomerasa (hTR) (Blackburn, 2005). La Cer está involucrada en la represión del promotor de TERT e impide que efectúe su actividad de telomerasa. Esto se ha visto específicamente en la inhibición de la activación dependiente de c-Myc del promotor TERT donde Cer causa una desacetilación de histonas y represión de TERT, aunque cabe mencionar que estudios indican que la longitud de la cadena acyl de Cer o específicamente el tipo de Cer causa un efecto biológico diferente (Wooten-Blanks *et al.*, 2007; Saddoughi *et al.*, 2008).

2.9. Esfingosina 1-fosfato y esfingosina cinasa (SK).

Las concentraciones de Cer, Sph y S1P difieren aproximadamente por un orden de magnitud, lo que quiere decir que Cer se puede presentar más abundantemente que S1P pero un cambio en los niveles de Cer puede drásticamente incrementar los niveles de Sph y S1P aunque el periodo de tiempo puede ser variado. Dentro de la familia de SLs, Cer y S1P son los mejores componentes bioactivos. La Cer y Sph actúan como lípidos involucrados en procesos de muerte celular no solo en procesos intracelulares sino también en extracelulares. La S1P es un esfingolípido al cual se le ha involucrado en la regulación de la proliferación, crecimiento, supervivencia, migración celular, inflamación, angiogénesis, vasculogénesis y resistencia a muerte celular apoptótica. Bajo estas características muestra efectos antagónicos a los mencionados por Cer (Daum *et al.*, 2009; Bartke y Hannum, 2009)

La acumulación celular de estos compuestos depende de los niveles de expresión y actividades de ceramidasa (acídica y neutra/alcalina), SK entre otras enzimas. Dado que Cer y S1P son metabolitos interconvertibles entre sí, además de sus características antagónicas, se ha postulado que es la relación en sus concentraciones y no el valor absoluto lo que determina el destino celular (Fig. 9) (Sterin y Leocata, 2007).

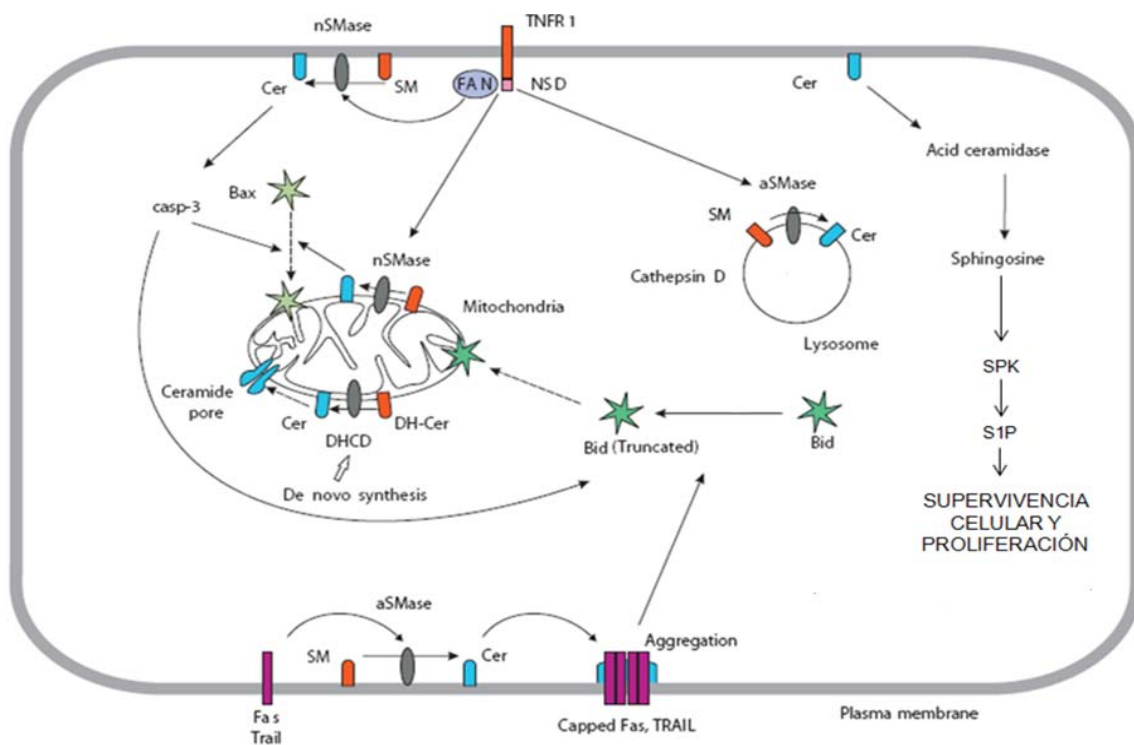


Figura 9. Efectos generados por Cer y S1P a nivel celular. La generación de Cer ante la falta de estímulos de supervivencia puede activar tanto la vía extrínseca como la intrínseca de la apoptosis, generando detención del crecimiento y muerte celular, sin embargo una buena fuente de factores de supervivencia puede generar supervivencia celular y proliferación a partir de la Cer presente en membrana como componente estructural, además de que las altas concentraciones de SK (esfingosina cinasa) modulan las concentraciones a la alta de S1P y a la baja de Cer. El efecto por el cual Cer genera apoptosis se debe: 1. A la interacción de los receptores de muerte con su

ligando (TNFR1, Fas y Trail) en el caso de Fas y Trail por sus características en determinados tipos celulares se unen a una misma proteína adaptadora (FADD), cada uno se trimeriza formando un complejo de señalización inductor de muerte (DISC), activando a la aSMasa (esfingomielinasa ácida) de membrana plasmática para generar Cer , posteriormente la procaspasa 8, 10 son reclutadas al complejo para el complejo DISC active las caspasas 8 y 10 y este pueda generar T-Bid a partir de Bid lo cual en la mitocondria causa la liberación de citocromo c y SMAC/Diablo, aunque la Cer también puede ser generada en la mitocondria y generar el poro para la salida de estas proteínas, eso se efectúa debido a que están en ella las enzimas convertidoras de este esfingolípido (dihidroceramida sintasa, ceramidasas, SMasas) y junto con la Cer y enzimas generadas por la síntesis de novo causan este efecto en la mitocondria. 2. La mitocondria es también blanco río abajo de los receptores de muerte porque en otros tipos celulares TNFR1 unido a su ligando por un lado media la activación de esfingomielinasa ácida (aSMasa) en el lisosoma generando Cer y esta Cer se une directamente a la catepsina D activando a T-Bid y tenga efecto en la mitocondria y por otro lado TNFR1 se asocia con el factor asociado con la activación de esfingomielinasa neutra (nSMasa) (FAN) y este se une con el dominio de activación de la nSMasa) y ya formado este complejo pueda activarla y esta genere Cer a partir de esfingomielina (SM) en la membrana activando a la caspasa 1 y generando T-Bid, así como a la caspasa 3 y no retorno de apoptosis. dadas las características antagónicas de S1P/Cer se ha postulado que no es su valor absoluto sino la relación en sus concentraciones lo que determina el destino celular. Tomado de Savtchouk et al (2007).

Como ya se ha mencionado, la SK es la enzima encargada de la generación de S1P mediante la fosforilación de Sph. La S1P es un esfingolípido polar el cual actúa como un mediador extracelular y como un segundo mensajero intracelular.

Los efectos extracelulares son mediados mediante receptores acoplados a proteína G. La S1P es almacenado en plaquetas pero es sintetizado en una gran variedad de tipos celulares como eritrocitos, células mononucleares, neutrófilos y células endoteliales en respuesta a estímulos extracelulares tales como factores de crecimiento y citocinas (Pyne y Pyne, 2000; Venkataraman *et al.*, 2008). En mamíferos la S1P es encontrado principalmente en sangre y linfa. Las plaquetas han sido consideradas como la principal fuente de S1P en sangre, sin embargo los niveles de este metabolito no se ven modificados al haber una disminución de plaquetas por lo cual recientes estudios indican que los eritrocitos están encargados del almacenamiento de S1P. Sin embargo estudios aún más recientes muestran que células del endotelio vascular han emergido como las grandes contribuyentes en la producción de S1P en plasma, dadas estas características se le han atribuido funciones en el sistema vascular como regulador de la angiogénesis, estabilidad vascular y permeabilidad (González *et al.*, 2008).

Además de SK las concentraciones de S1P son reguladas por enzimas de degradación como S1P liasa y S1P fosfatasa (Venkataraman *et al.*, 2008). Las dos isoformas de SK en mamíferos (SphK1 and SphK2) tienen 5 dominios conservados (C1-C5) con un único dominio catalítico que va del C1-C3. La SphK1 no posee un dominio hidrofóbico transmembranal mientras que SphK2 tiene 4. Aunque las dos isoformas muestran homología y producen el mismo producto que es S1P ellas tienen diferentes propiedades catalíticas así como localización subcelular, distribución en tejidos y patrones de expresión temporal durante el

desarrollo y posiblemente tienen una función única y específica (Van Brocklyn *et al.*, 2005; Sankala *et al.*, 2007). La SphK1 tiene afinidad por esfingosinas D-*erythro* como sustrato mientras que SphK2 fosforila un amplio rango de bases esfingoides como sustrato, incluyendo fitoesfingosina y dihidroesfingosina. Sin embargo una baja en la expresión de estas enzimas resulta en la inhibición del crecimiento celular e inducción de apoptosis, por otra parte tanto SphK1 como SphK2 tienen roles opuestos en la regulación de la biosíntesis de cer por lo cual son enzimas encargadas de la regulación de la generación de cer, disminuyendo sus niveles y aumentando los de S1P (Maceyka *et al.*, 2005; Sterin y Leocata, 2007). Aunque tengan probablemente distinto efecto, al final el producto es el mismo y la carencia de una puede suplir la otra, esto se especifica debido a que en estudios en ratones se observó la expresión de las enzimas y a pesar de la utilización de ratones knockout para una de las isoformas se corroboró un desarrollo neural adecuado (Mizugishi *et al.*, 2005).

La SphK1 puede ser estimulada por una amplia variedad de factores de crecimiento los cuales incluyen al factor de crecimiento derivado de plaquetas (PDGF), al factor de crecimiento endotelio vascular (VEGF), al factor de crecimiento epidermal (EGF), factor de crecimiento de hepatocitos, citosinas (factor de necrosis tumoral), hormonas esteroides (estradiol) entre otros (Takabe *et al.*, 2008).

Hay varios mecanismos por los cuales SphK1 puede ser activada: 1) fosforilación y translocación a la membrana plasmática, 2) interacción con fosfolípidos 3) posible asociación con otras proteínas. Todas o algunos de estos mecanismos

pueden ser requeridos para una activación total de esta isoforma. La translocación de SphK1 a la membrana plasmática se deberá a la presencia de su sustrato, en este caso la esfingosina que resida en ese sitio con lo cual se obtendrá una producción localizada de S1P en la superficie de la célula. La fosforilación en Ser225 por ERK2 (cinasa reguladora de señales extracelulares-2) es esencial para una mejor afinidad a la membrana plasmática (Johnson *et al.*, 2002; Pitson *et al.*, 2005).

Es menor el conocimiento sobre la función y regulación de SphK2. Existen reportes que indican que EGF y la proteína cinasa C, estimulan SphK2, estos activan ERK1, el cual se une a SphK2 y la fosforila en residuos de Serina y treonina incrementando su actividad enzimática. Sin embargo otros estudios sugieren que la fosforilación de SphK2 es catalizada por la proteína cinasa D la cual la lleva a su exportación nuclear para una subsecuente señalización celular (Hait *et al.*, 2005, 2007; Takabe *et al.*, 2008).

Una vez generada, S1P puede actuar intracelularmente como segundo mensajero y extracelularmente uniéndose a receptores de membrana de los cuales es un ligando específico. Se han descubierto transportadores específicos que podrían exportar la S1P desde el interior celular al medio extracelular. Se han caracterizado 5 subtipos de receptores de S1P que pertenecen a la familia de receptores acoplados a proteínas G (GPCR) y que se han denominado: S1P1, S1P2, S1P3, S1P4 y S1P5 (Rosen y Goetzl, 2005; Rosen, 2009).

Las vías de señalización intracelular activadas por estos receptores son diversas ya que están acoplados a diferentes subtipos de proteínas G. Una de las vías de señalización más estudiadas es el aumento de calcio intracelular que se produce tanto por acoplamiento a fosfolipasa C (PLC) a través de Gq como de por formas independientes de PLC. Además los receptores de S1P acoplados a proteínas G pueden activar la GTPasa monomérica Rho, la cual es un importante regulador del citoesqueleto y de la movilidad celular (Coussin *et al.*, 2003; Zhou y Murthy., 2004).

Las respuestas mitogénicas y de supervivencia de S1P son principalmente activadas por los receptores S1P acoplados a proteínas G que regulan las vías de PI3K/Akt y Ras/ERK. Otro posible mecanismo de acción de los receptores S1P es la transactivación de receptores de factores de crecimiento. Por ejemplo, ha sido recientemente demostrado que el receptor S1P3 está involucrado en la transactivación del receptor de EGF inducida por estrógenos (Sukocheva *et al.*, 2006). Además de estas vías, S1P también actúa de forma intracelular modulando varias cascadas de transducción entre las que se encuentran Ras/Raf/MEK/ERK y PI3K/Akt (Fig 10) (Sánchez y Díaz 2006).

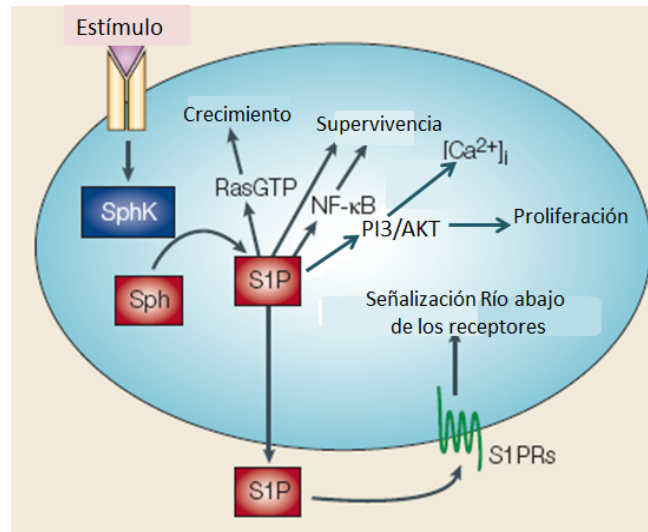


Figura 10. Efectos a nivel celular de S1P. Diversos estímulos externos, particularmente factores de crecimiento y supervivencia incluyendo factor de crecimiento derivado de plaquetas (PDGF), factor de crecimiento endotelio vascular (VEGF), factor de crecimiento epidermal, factor de crecimiento de fibroblastos, S1P por si mismo a través de sus receptores, entre otros, estimulan a la SK para generar S1P intracelular. S1P puede tener una función dual, primero puede funcionar de manera autócrina o parácrina para estimular el receptor de S1P que está presente en la superficie de la misma célula o en la vecina. El receptor de S1P se acopla a diferentes proteínas G llevando a la activación de numerosas vías de señalización, por la vía de las Rac se activan vías para la migración celular, por otro lado por la activación de la fosfolipasa C (PLC) se regulan los niveles de calcio así como por la vía del fosfatidilinositol 3 cinasa, la cual activa a la proteína cinasa B/AKT para también generar cascadas de señalización en pro de la supervivencia celular, aunque aún no está muy clara la forma por la cual S1P es secretado y presentado a su respectivo receptor. En segunda instancia S1P además puede tener una función intracelular para regular los niveles de calcio, la supervivencia y crecimiento. Por ejemplo la estimulación de SK y consiguiente producción de S1P moviliza el calcio de lamacenamiento intracelular independientemente de la formación de inositoles trifosfatos como se mencionó en su otra funcionalidad, además TNF lleva a la activación del factor de transcripción nuclear (NF- κ B), el cual es esencial para la prevención de

la apoptosis. El potente factor angiogénico VEGF estimula a la SK para producir S1P, el cual media la activación de Ras inducida por VEGF para la generar crecimiento celular. Tomado de Spiegel y Milstein (2003).

2.10. Otros esfingolípidos señalizadores.

Además de los efectos de los principales esfingolípidos bioactivos, estudios recientes amplían atención a otros esfingolípidos bioactivos como C1P (ceramida 1-fosfato) GlcCer (glucosilceramida), liso-SM (liso-esfingomielina) y dhCer (dihidroceramida) dentro de los más sobresalientes (Kihara *et al.*, 2007; Chalfant y Spiegel, 2005).

La C1P ha sido implicada en inflamación y tráfico vesicular (Pettus *et al.*, 2004) y es producida por una ceramida cinasa dependiente de ATP (CERK). Esta cinasa es altamente específica para la Cer y su actividad es dependiente de iones Mg^{2+} y de iones Ca^{2+} a través de su unión a calmodulina. La C1P generada por CERK, ha sido implicada en diferentes procesos celulares como respuesta inflamatoria, fagocitosis, inhibición de apoptosis, mitogénesis y mecanismos de patogenia inducidos por agentes infecciosos. C1P media la liberación de ácido araquidónico por (fosfolipasa 2) PLA₂, que es el primer paso para la biosíntesis de eicosanoides (Pettus *et al.*, 2004). Otras acciones biológicas de C1P incluyen la inhibición de la apoptosis y la inducción de la supervivencia celular. El mecanismo por el cual C1P ejerce este efecto probablemente sea la inhibición directa de la esfingomielinasa ácida (aSMasa) ya que se ha demostrado que la cer puede inhibir *in vitro* a esta enzima. La reducción de niveles de cer llevaría a promover la activación de otras señales celulares inductoras de la supervivencia celular. En

este sentido, se ha demostrado que la C1P induce activación de la vía fosfoinositol 3 cinasa/proteína cinasa (BPI3K/PKB), la cual es el principal mecanismo por el que promueven supervivencia celular los factores de crecimiento. Además se ha mostrado que la C1P estimula la síntesis de ADN y la división celular en fibroblastos (Sánchez y Díaz 2006). Finalmente la GlcCer está involucrada en tráfico vesicular post-Golgi y en resistencia a fármacos (Radin *et al.*, 1993).

La Sph ha sido relacionada con procesos como el arresto del ciclo celular y apoptosis por la modulación de proteínas cinasas y otras vías de señalización, además tiene efecto en los filamentos de actina del citoesqueleto, endocitosis y en la inhibición de PKC. Dentro de las cinasas blanco de bases esfingoides se encuentran pkh1p y pkh2p las cuales se han encontrado en levaduras mostrando funciones en la regulación de endocitosis, arresto del ciclo celular y síntesis de proteínas (Saddougui *et al.*, 2008). La Sph induce la muerte celular debido a una débil estimulación de la vía JUNK y una fuerte inhibición de la vía ERK, la muerte celular inducida por este esfingolípido es dependiente de caspasas. La esfingosina puede inducir activación por clivaje de la proteína pro-apoptótica Bid, liberación de citocromo c, la posterior activación de las caspasas ejecutoras 3 y 7 y la degradación de la enzima PARP. Adicionalmente la esfingosina puede reducir la expresión de las principales proteínas guardianas de las mitocondrias, las proteínas anti-apoptóticas Bcl-2 y Bcl-x_L. La muerte celular inducida por Sph ocurre aún en condiciones de sobre-expresión de la proteína Bcl-2 e involucra el rompimiento de la proteína pro-apoptótica Bax y su posterior asociación con Bcl-2 (Sterin y Leocata, 2007)

3. Planteamiento del problema y justificación.

Existen evidencias que muestran la participación de muerte celular principalmente por apoptosis en el proceso de atresia folicular, entendiéndose como un proceso irreversible que termina con la actividad biológica de las células que conforman el folículo (Clark *et al.*, 2004).

Se ha estudiado en diferentes especies la unión Fas-FasL debido a que actúa como factor apoptogénico a nivel intraovárico, esto significa que la interacción Fas-FasL es una señal potencial para la iniciación de la atresia.

Histológicamente la esfingomielina (SM) ha sido reconocida como un componente estructural de la membrana celular; sin embargo recientemente se le ha visto involucrada en las vías de transducción de señales que llevan a la muerte celular, por tal motivo se ha tomado el interés de estudiar a los esfingolípidos (SLPs) como moléculas de señalización (Milhas *et al.*, 2010). La unión de FasL a su receptor; estimula a las esfingomielinasas (SMasas) y consecuentemente causa la hidrólisis de SM permitiendo la liberación de fosfocolina y ceramida (Cer) (Mullen *et al.*, 2010). La Cer es considerada como el más simple de los SLPs ya que es un potente disparador de muerte celular, además es el precursor de otros SLPs que están involucrados en la proliferación y sobrevivencia de la célula tales como esfingosina 1- fosfato (S1P) y Ceramida 1- fosfato (C1P). Además, tanto en células de la granulosa (CG) como en células de la teca (CT) se ha visto que Fas induce apoptosis a través de la generación de Cer.

Los mecanismos por los que Cer media la apoptosis aún no han sido plenamente dilucidados, sin embargo, se sabe que las mitocondrias son blanco de este SLP.

Así, la inhibición directa de complejo III de la cadena respiratoria mitocondrial por Cer induce generación de especies reactivas de oxígeno en las mitocondrias (Ghafourifar *et al.*, 1999), además puede participar directamente formando canales en la mitocondria que permiten la liberación de citocromo c y posterior activación de caspasas efectoras (Savtchouck *et al.*, 2007). Estas son líneas de evidencia de la fuerte influencia de este SLP en las mitocondrias.

Trabajos recientes en diferentes sistemas celulares en condiciones in vitro, muestran que Cer como ya se mencionó es un SLP involucrado directamente con la muerte celular y S1P está relacionado con la supervivencia y proliferación, por lo que dadas sus características antagónicas se ha observado que no es su valor absoluto si no la relación en sus concentraciones lo que determina el destino de la célula.

Por lo anterior el propósito del proyecto es conocer si la relación S1P/Cer es un indicador de atresia en el bovino.

El conocimiento sobre las vías y mecanismos moleculares que ocurren en la muerte celular es importante para comprender mejor los diferentes procesos fisiológicos y patológicos en los cuales interviene, de tal manera que los resultados obtenidos de este proyecto no solo serán importantes para el avance en el conocimiento de la atresia sino que la atresia puede ser un modelo fisiológico de gran interés para comprender los procesos mediante los cuales se define el destino celular en un grupo de células

4. Pregunta de investigación:

¿COMO AFECTA LA RELACION S1P/Cer EN LA ATRESIA FOLICULAR?

5. Hipótesis

En folículos dominantes (FD) sanos de bovino predominará esfingosina 1-fosfato (S1P) sobre ceramida (Cer), mientras que en los folículos dominantes atrésicos será mayor la presencia de Cer que de S1P.

6. Objetivo general

Determinar la relación S1P/Cer como indicador de atresia folicular en el bovino.

7. Objetivos particulares

- Determinar, la concentración de Cer y S1P en células de la granulosa y teca de folículos dominantes sanos y atrésicos.
- Identificar en cuál de los compartimentos celulares (teca y granulosa) la concentración de S1P/Cer es mayor.
- Establecer en cuál de los 2 compartimentos la relación S1P/Cer es mayor indicador de Atresia folicular

8. Metodología

8.1. Obtención de ovarios, clasificación y recuperación de células y líquido folicular.

8.1.1 Obtención de ovarios

Se obtuvieron ovarios de vacas sacrificadas en un rastro municipal ubicado en Temamatla Estado de México. Los ovarios fueron lavados y transportados al laboratorio de Bioquímica de la Reproducción de la Universidad Autónoma Metropolitana-Xochimilco en PBS 0.01M pH 7.4 a 4°C en un lapso de tiempo no mayor a 60min. Antes de iniciar la disección de los folículos, los ovarios se lavaron 2 veces con PBS para eliminar la mayor cantidad de sangre contaminante. La disección de los folículos se realizó bajo un microscopio estereoscópico (American Optical Instrument Company) equipado con fuente de iluminación eléctrica para tratar de quitar la mayor cantidad de tejido estromal. Durante todo el proceso las muestras se mantuvieron en PBS y se trabajó sobre refrigerantes. Se obtuvieron folículos antrales y se midió su diámetro mayor con ayuda de un vernier. Se incluyeron en el estudio los folículos que midieron de 8-17mm de diámetro (Montaño *et al.*, 2005; Espinoza *et al.*, 2007; Rosales *et al.*, 2012). Posteriormente se clasificaron por los niveles hormonales mediante la relación E_2/P_4 en folículos dominantes sanos y dominantes atrésicos.

8.1.2 Líquido folicular (LF)

El LF fue colectado por la punción del folículo, se colocó en un tubo eppendorf de 1.5ml y se centrifugó a 4800 rpm por 10 minutos a 4°C para separar las células de la granulosa (CG) (precipitado). Posteriormente se centrifugó nuevamente pero a 10000 rpm por 10 minutos a 4°C para obtener líquido folicular libre de CG, el precipitado se descartó y se guardó el líquido folicular a -70°C hasta su uso para determinación de Progesterona (P₄) y 17 β estradiol (E₂).

8.1.3 Células de la teca (CT) y granulosa

Para recuperar las CG adheridas a las CT, los sacos foliculares fueron raspados ligeramente con pinzas de microcirugía y se realizaron 2 lavados con 200μl de PBS, pH 7.4, esta suspensión fue colocada en tubos eppendorf de 1.5mL. El precipitado obtenido de la primer centrifugación del LF (CG) se resuspendió en el eppendorf con 200μl de PBS y el eppendorf se enjuagó con 200μl de PBS más para recuperar las células que se hayan quedado en el tubo. Los 400μl de los lavados del saco se juntaron con los 400μl de la resuspensión y se centrifugaron a 4800 rpm por 10 minutos a 4°C, el sobrenadante se eliminó y el precipitado se almacenó a -70°C hasta su uso. Antes de realizarse la centrifugación se separaron 50μl para contar las células recuperadas

Las células de la teca o sacos foliculares se lavaron con 200μl de PBS, se verificó bajo el microscopio que no hubiera CG adheridas, se sacudieron y secaron suavemente sobre una gasa, se colocaron en forma individual en tubos eppendorf previamente pesados a -70°C (Fig. 11) hasta su uso.

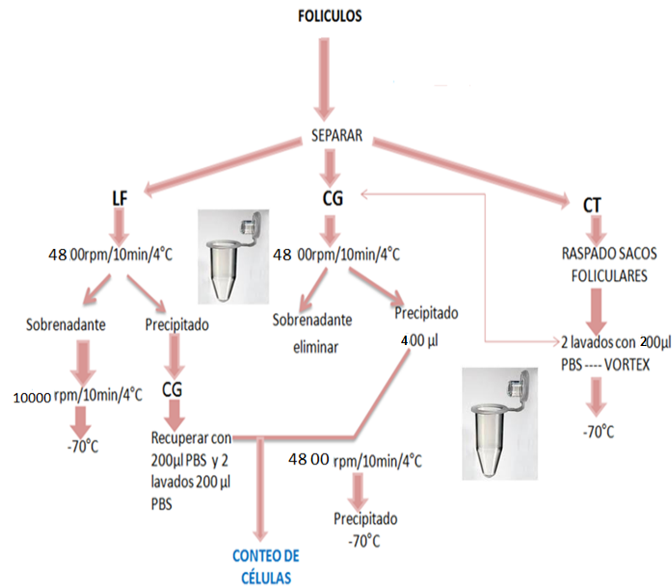


Figura 11. Procesamiento de células y líquido folicular.

8.2 Determinación de hormonas esteroides

Se determinaron las concentraciones de E_2 y P_4 en el LF por la técnica de radioinmunoensayo (RIA). Para ambas determinaciones se utilizó el estuche de detección COAT-A-COUNT (Diagnostic Products Corporation, los Angeles CA), el cual no requirió de extracción (Rosales *et al.*, 2000). La determinación se hizo para poder clasificarlos los FD tomando la relación de estas concentraciones obtenidas mediante el análisis considerando como folículos atrésicos a aquellos que tuvieron una relación E_2/P_4 : <1 y como sanos a los que presentaron una relación E_2/P_4 : ≥ 1 (Rosales *et al.*, 2000; Yu *et al.*, 2004; Jayawardana *et al.*, 2006, Shimizu *et al.*, 2007).

8.3 Extracción de esfingolípidos de CG y CT de folículos de Bovino.

La homogenización se llevó a cabo por la técnica descrita por Bielawski *et al.*, (2006) donde las células y tejido fueron homogenizados con buffer de homogenización (0.25M sucrosa, 25mM KCl, 50mM Tris y 0.5mM EDTA, pH 7.4.) sobre hielo. Para las CG se utilizaron de 1×10^6 - 10×10^6 células/ 0.5mL y para las CT se usaron 100mg de tejido/1mL de buffer de homogenización, cada una se homogenizaron por separado (Sullards *et al.*, 2001).

Una vez homogenizado se tomaron 500 μ l de cada una de las muestras de células para la extracción de esfingolípidos (SLPs).

Para la extracción de SLPs se utilizó la técnica propuesta por Villa *et al.*, (2009) con algunas modificaciones. Los 500 μ l del homogenizado se colocaron en un tubo cónico de 15 mL y se le agregó lo siguiente:

1. 3 mL de Cloroformo:Metanol 1:2 (CHCL₃:MEOH) y se vortexeó hasta obtener una suspensión.
2. 0.8ml de agua y para obtener un rompimiento prematuro de fases se agregaron 0.5mL de metanol adicional.
3. Se mantuvieron toda la noche a 4°C
4. Al otro día se centrifugaron a 3000rpm
5. Se transfirió el sobrenadante a otro tubo cónico.
6. Se adicionó 1 mL de cloroformo y 1mL de agua, vortex e incubación por 30min para una efectiva separación de fases.
7. Se centrifugaron las muestras a 3000rpm por 5 min para obtener las fases limpias.

8. Se retiró la fase acuosa para utilizar la fase orgánica
9. Los 2 mL de cloroformo se evaporaron con un evaporador de nitrógeno hasta que quedara totalmente seco.
10. Posteriormente se disolvieron los lípidos en cloroformo (300 µl)
11. Los 300 µl fueron sometidos a metanólisis alcalina.

8.3.1 Metanólisis alcalina

La Metanólisis alcalina consiste en hidrolizar los lípidos mediante una fuente alcalina como el sodio y el potasio que junto con metanol hidroliza generando una metilación rápida. En este caso se desea eliminar la interferencia de glicerolípidos para garantizar solo la presencia de SLPs, además de liberar el ácido graso en el caso de Cer para que pueda ser detectada en el HPLC.

1. Se agregó 1 mL de 0.125 M de KOH metanólico a cada muestra para eliminar la interferencia de glicerolípidos
2. Posteriormente fueron calentadas a 37°C en una parrilla por 75 min a baño maría.
3. Se mantuvieron a temperatura ambiente y se adicionaron 1500µl de cloroformo.
4. Se agregaron 200µl de 0.3M de HCL para neutralizar y posteriormente 400µl de una solución de 1 M NaCL en 5% Glycerol la cual ayudó a romper las fases.
5. Fueron centrifugadas por 5 min a 3000rpm obteniendo una fase acuosa la cual se eliminó y una fase orgánica.

6. A la fase orgánica se le adicionó 1 mL de agua neutralizada y se volvió a centrifugar a 3000rpm por 5 min para limpiar la muestra.
7. Se eliminó la fase acuosa y la fase orgánica fue evaporada hasta que quedó totalmente seca.
8. Las muestras de extracción de esfingolípidos de células de la teca y de la granulosa fueron almacenadas a -20°C hasta su uso en el HPLC.

8.4. Determinación de esfingosina1-fosfato (S1P), Ceramida (Cer) y muestras de CG y CT de folículos de Bovino por Cromatografía de Líquidos de alta Resolución (HPLC)

8.4.1 Procesamiento de los estándares.

Se utilizó 1 estándar externo comercial de S1P marca Sigma Aldrich para realizar una curva de calibración del esfingolípido en un HPLC automatizado marca Merck Hitachi L-600A Intelligent Pump.

El estándar de S1P fue diluido en metanol tomando en cuenta sus características bioquímicas (molécula polar), obteniendo una concentración de 497.1µM. Se realizaron las siguientes diluciones para realizar la curva de calibración tomando como referencia las concentraciones utilizadas por He *et al.*, (2009) sin embargo posteriormente se decidió realizar las diluciones en otras unidades como se muestra a continuación:

S1P: 0.75, 1.8, 3.7 y 7.5 ng/mL

Para realizar la curva de calibración del esfingolípido en el HPLC se utilizó un estándar externo comercial de Cer (Ceramide 18 *D-erythro-Sphingosine*, *N-Stearoyl*- [N-Stearoyl ceramide, C18-Ceramide]) marca Avanti Polar Lipids. El estándar fue diluido en 1mL de metanol (1:10) con una concentración de 5000µg/mL posteriormente se tomaron 100µl del estándar y se almacenaron en 10 viales con una concentración de 500µg/mL. Para realizar las diluciones se tomó un vial con 100µl y se secaron por evaporación con nitrógeno para posteriormente agregar al estándar seco 1mL de cloroformo y de esa solución se tomaron 200µl con una concentración de 100µg/mL del estándar para procesarlos. A diferencia del estándar de S1P, Cer por sus características fisicoquímicas (no ser polar) tuvo que ser procesada como las muestras a partir del paso de Metanólisis alcalina, por lo que estos 200µl fueron sometidos a este procedimiento, de igual manera se evaporó hasta obtener la muestra del estándar seco y se almacenó a -20°C. Esto con el fin de que la reacción de derivatización fuera efectiva (Fig. 12).

Una vez finalizado su procesamiento se obtuvieron las siguientes diluciones:

Cer: 0.06, 0.12, 0.25, 0.50 ng/mL.

En cuanto a las diluciones para Cer se tomaron como referencia las utilizadas para S1P, sin embargo posteriormente se decidió ir probando diferentes concentraciones con la información contenida en el estándar de Avanti Polar Lipids USA, hasta que se obtuvieron las ya mencionadas.

Para realizar la determinación en el HPLC para S1P y Cer se realizaron las inyecciones por triplicado para cada punto de la curva.

8.4.2 Derivatización con OPA (*O*-phtalaldehyde)

1. El estándar de Cer y las muestras de SLPs extraídos de las células foliculares fueron resuspendidos en 100µl de metanol con ayuda de un vórtex.
2. Se tomaron 50µl de cada uno de los estándares y muestras de células foliculares y cada uno se colocó en su respectivo Eppendorf para su derivatización, mezclándolos con 50µl de OPA (5mg OPA, 0.1mL de etanol, 10µl 2-mercaptoetanol y 9.9 mL de ácido bórico pH 10.5 al 3% (p/v) como describe Merril *et al* (1988).
3. La mezcla fue incubada por 25 min en obscuridad a temperatura ambiente.
4. Pasado el tiempo de incubación se agregaron 300µl de la fase móvil empleada para el análisis.

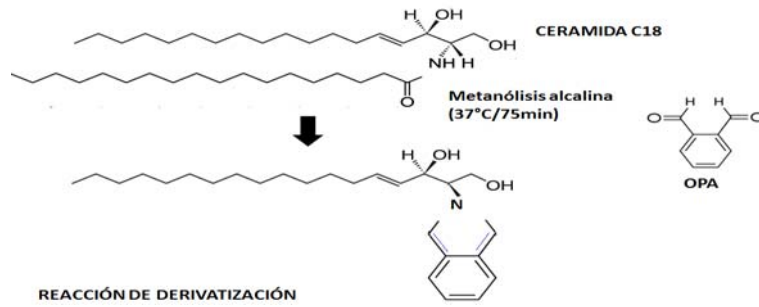


Figura 12. Reacción de derivatización del estándar de Ceramida (Cer). Por ser una molécula tan compleja y debido a que la reacción de derivatización implica la unión del O-phtalaldehyde (OPA) en el grupo amino de la molécula, mediante Metanolisis alcalina se disoció el ácido graso de Cer para que así pudiera ser detectada en el HPLC.

8.4.3 Análisis por HPLC

El estándar de S1P (0.75, 1.8, 3.7 y 7.5 ng/ml) así como el estándar de Cer (0.06, 0.12, 0.25, 0.50 ng/ml) y las células foliculares fueron analizados por un HPLC automatizado Hitachi Elite Lachrom L-2200 en una columna XTerra RP18 (5 μ m, 3.0X150mm) utilizando una precolumna de 2PK, XTerra RP18 (3.0X20mm), se utilizó un detector de fluorescencia Hitachi Elite Lachrom L-2485 con una longitud de onda de excitación y emisión de 340 y 435nm respectivamente. La corrida de los estándares y muestras problema fueron derivatizados con OPA se realizaron por 20 min y el loop de inyección tanto para estándares y muestras fue de 30 μ l. Las corridas para el estándar de S1P, las células foliculares y el estándar de Cer fueron isocráticas utilizando como solvente metanol y un buffer de pH 7 de fosfato de potasio (K₂HPO₄) 5mM, (80:20), con un flujo de 0.6mL/min.

8.5. Análisis estadístico.

El análisis estadístico incluyó promedios, desviación estándar y coeficientes de variación. Las diferencias estadísticas entre las concentraciones de Cer, S1P y la relación S1P/Cer por tipo de folículos se obtuvieron mediante la prueba no paramétrica de Wilcoxon. Se realizó un análisis de regresión lineal simple así como una correlación entre la relación S1P/Cer con la relación E_2/P_4 . El análisis estadístico se realizó con ayuda del software JMP 5.

9. Resultados

9.1 Obtención de ovarios y clasificación.

Se obtuvieron un total de 40 folículos de bovino los cuales fueron clasificados en folículos dominantes sanos y dominantes atrésicos (Tabla 2).

Tabla 2. Clasificación de folículos mediante determinación de hormonas esteroides

FOLÍCULOS	
SANOS	ATRÉSICOS
19	21
CG 19	CG 21
CT 19	CT 21

9.2 Determinación de hormonas esteroides por RIA

9.2 Determinación de hormonas esteoides por RIA.

En base a la relación E2/P4 de los 40 folículos colectados en rastro, se obtuvieron 19 folículos sanos con una relación $E2/P4 = 3.19 \pm 0.4431$ y 21 folículos atrésicos cuya relación fue de 0.25 ± 0.04 (Tabla 3).

Tabla 3. Media del diámetro folicular, concentraciones de E2 y P4 en líquido folicular y la relación E2/P4 en el bovino.

FOLÍCULO	LÍQUIDO FOLICULAR		
	E2 (ng/ml)	P4 (ng/ml)	E2/P4
Sano (n=19)	97.90±12.95 ^a	38.175±5.31 ^a	3.19±0.4431 ^a
Atrésico (n=21)	12.76±2.14 ^b	75.13±7.78 ^b	0.25±0.0493 ^b

a,b= literales diferentes entre folículos (P<0.05)

9.3 Determinación de S1P y Cer por HPLC

Los estándares comerciales de S1P y Cer ya formado el derivado con OPA fueron analizados por el HPLC. Los resultados del estándar de S1P y Cer realizados bajo las mismas condiciones cromatográficas se visualizan en la Fig. 13 y 14 respectivamente, observándose un factor de correlación de 0.9992 para S1P y de 0.9516 para Cer lo que indica que hay una buena correlación lineal de la respuesta del detector con la concentración de los estándares.

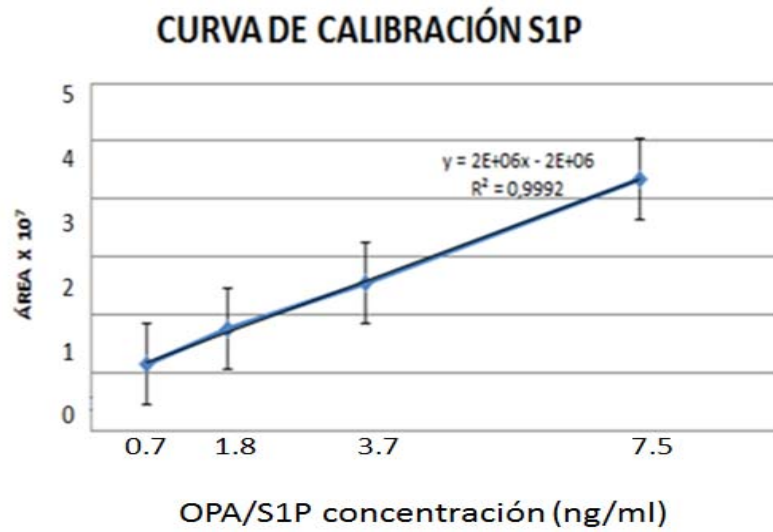


Figura 13. Curva de calibración por duplicado de S1P utilizando concentraciones de 0.75, 1.87, 3.7, 7.50 ng/ml

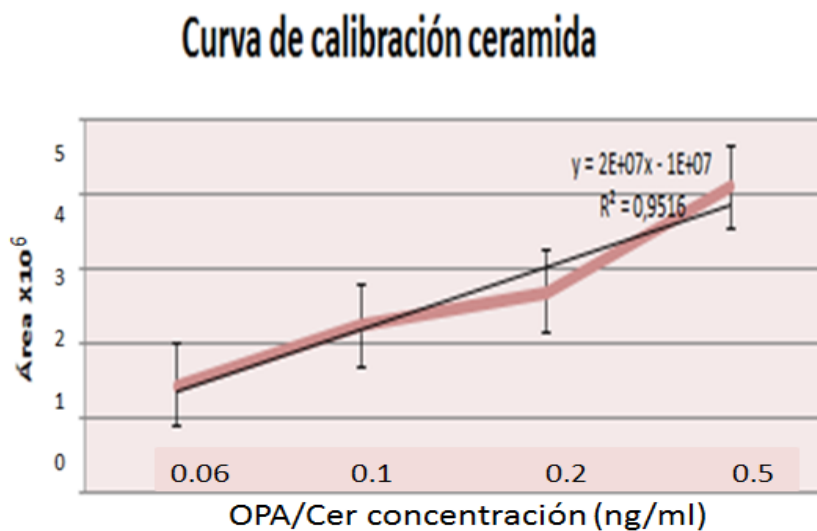


Figura 14. Curva de calibración de Cer utilizando concentraciones de 0.06, 0.1, 0.2 y 0.5 ng/ml.

En cuanto a los picos obtenidos en el análisis por HPLC se observó que en cuanto al estándar de S1P el tiempo de retención osciló cerca de 8.3min tal y como se observa en la Fig. 15. Para el caso de Cer el pico correspondiente al

estándar fue encontrado por el minuto 13.720 (Fig. 16). Lo cual indica que la fase móvil empleada para el análisis fue adecuada para los dos tipos de estándares y el método resulta adecuado.

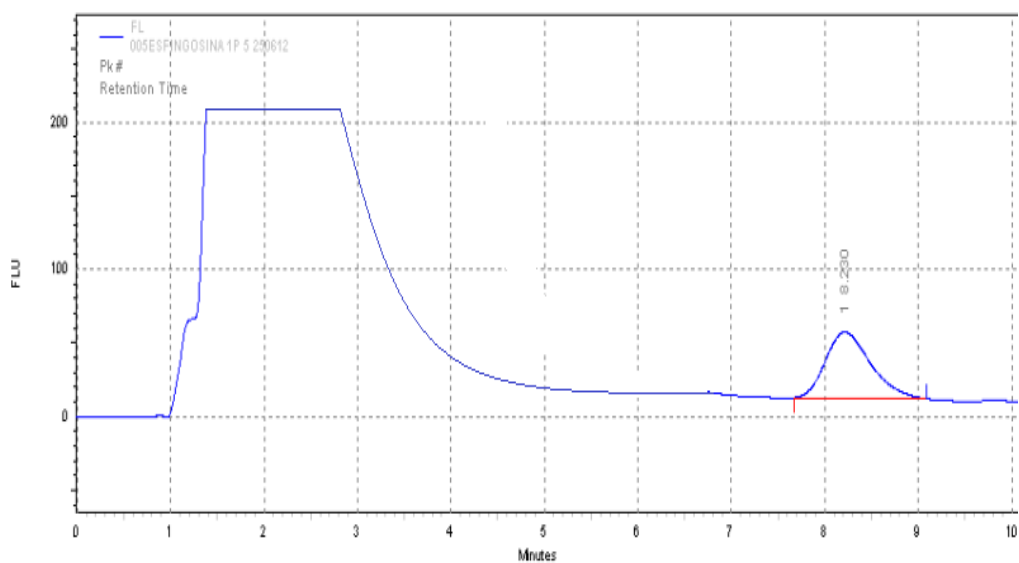


Figura 15. Cromatograma por HPLC del estándar S1P mostrando un tiempo de retención de 8.230min.

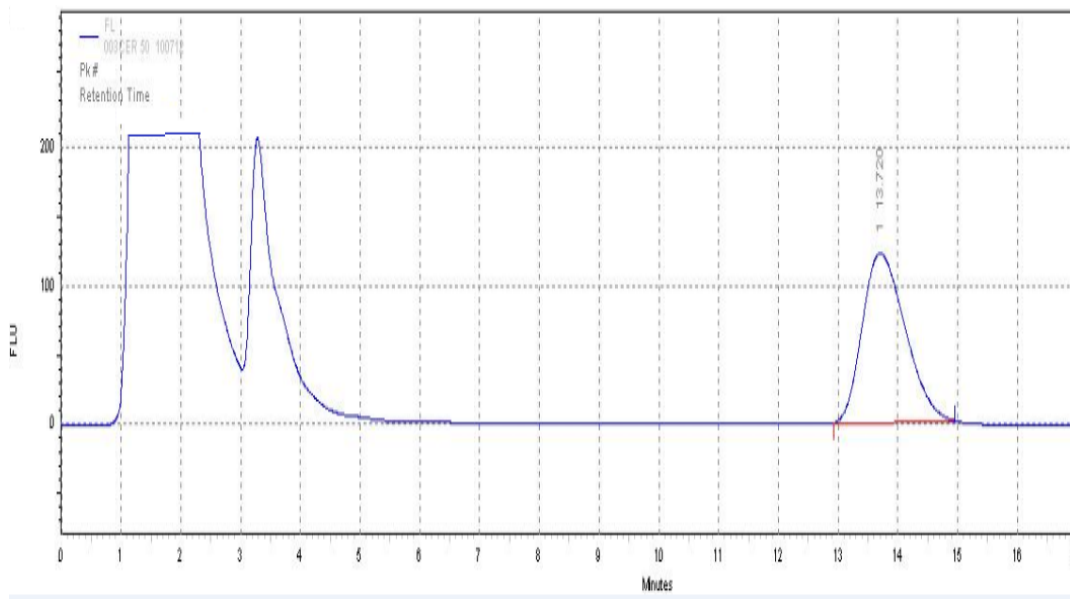


Figura 16. Cromatograma por HPLC del estándar Cer mostrando un tiempo de retención de 13.720 min.

9.4 Determinación de S1P y Cer en CT y CG mediante HPLC.

La Fig. 17 muestra un cromatograma representativo de CT de un folículo dominante sano donde los picos correspondientes a los metabolitos a analizar se observan bien separados, por lo que por el tiempo de retención y la definición adquirida en el que eluyen las moléculas de interés, los picos que anteceden y preceden a los analizados no generan interferencia. En cuanto a las CG los picos se observan de un tamaño menor por lo cual la escala del cromatograma es ampliada pero de igual manera los metabolitos de interés se observan adecuadamente (Fig.18). Cabe destacar que en el pico de S1P se observó de mayor tamaño que el de Cer en la mayoría de los cromatogramas.

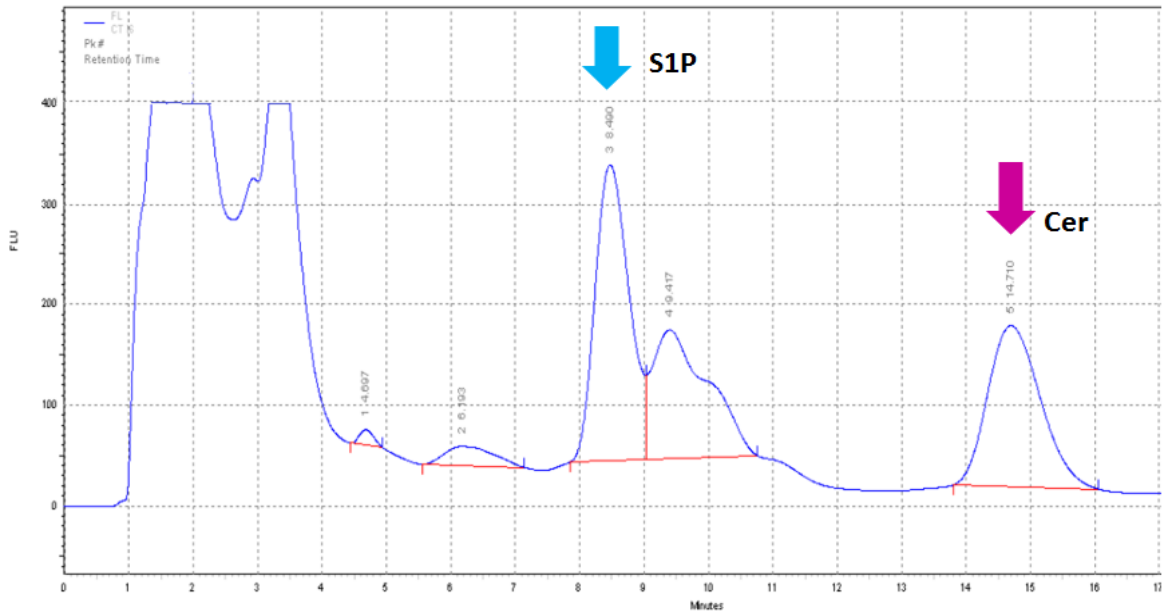


Figura 17. Cromatograma por HPLC de Células de la teca (CT) de un folículo sano derivado con OPA. Picos: 1 S1P; 2 Cer con un tiempo de retención de 8.4 y 14.7 min respectivamente.

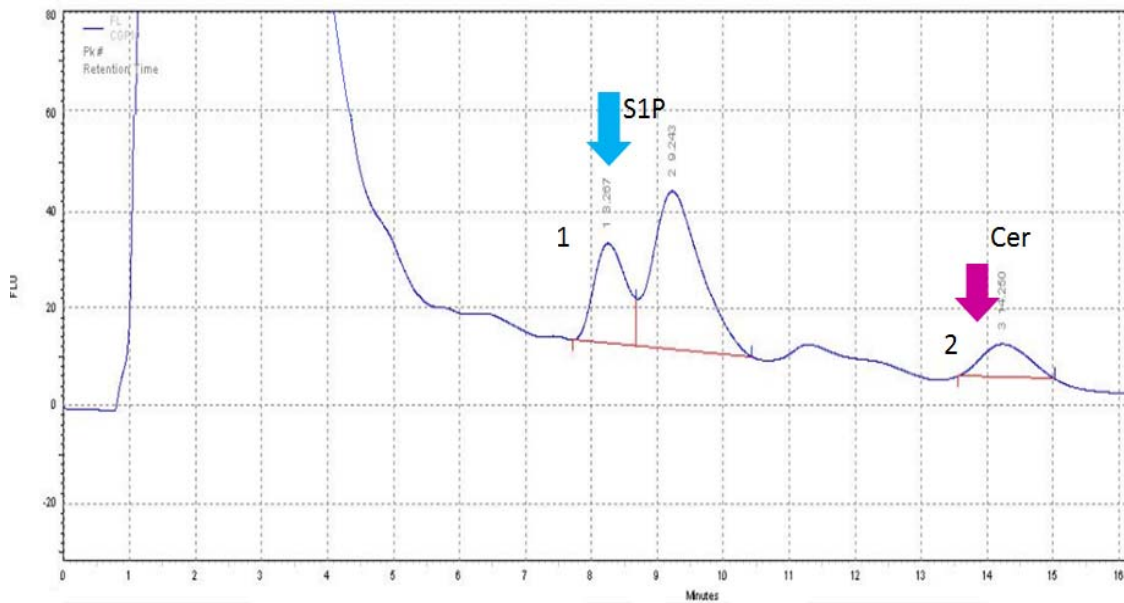


Figura 18. Cromatograma por HPLC de Células de la granulosa (CG) de un folículo sano derivado con OPA. Picos: 1 S1P; 2 Cer con un tiempo de retención de 8.2 y 14.2 min respectivamente.

En las CT y CG de los folículos dominantes atrésico se observaron de igual manera los picos correspondientes a S1P y Cer bien separados, no interfiriendo en su análisis los picos que pudieran aparecer antes o después de los de interés. Los tiempos de retención fueron muy parecidos a los obtenidos por los estándares, cabe mencionar que en este tipo de folículos los picos se observaron de menor tamaño y un dato interesante es que a diferencia de los folículos sanos, el patrón de picos de los atrésicos fue mayor, es decir se observó mayor cantidad de picos no referentes a los de interés en los dos tipos celulares de folículos dominantes atrésicos (Fig. 19 y 20). Otro punto sobresaliente es que en la mayoría de los cromatogramas, el pico de S1P fue de menor tamaño que el de Cer en folículos dominantes atrésicos.

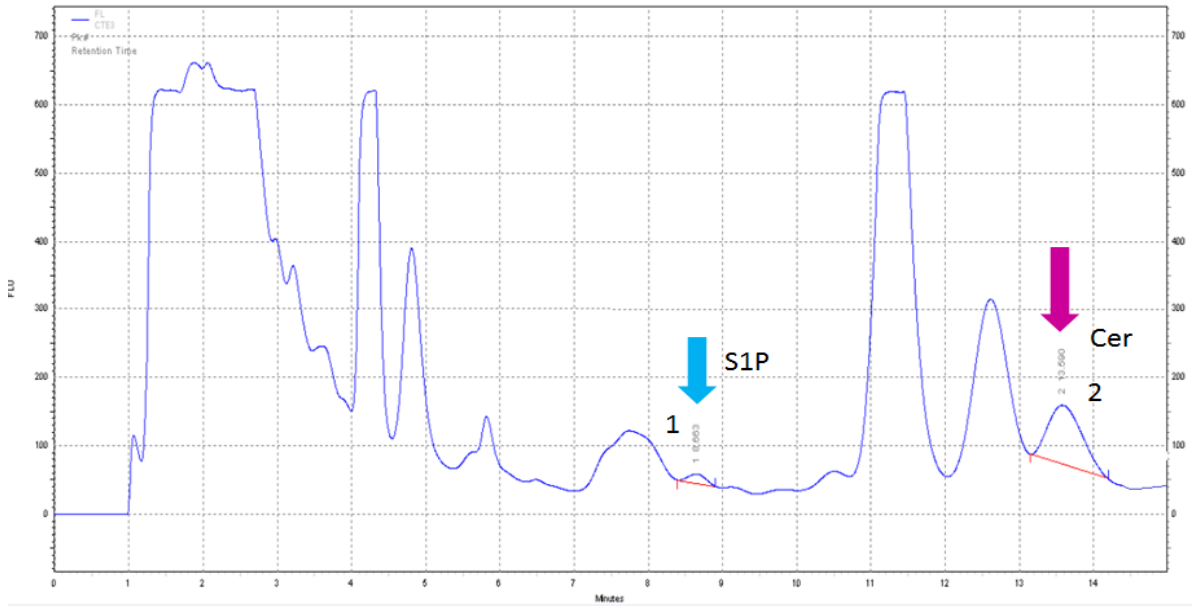


Figura 19. Cromatograma por HPLC de Células de la teca (CT) de un folículo atrésico derivado con OPA. Picos: 1 S1P; 2 Cer con un tiempo de retención de 8.6 y 13.7 min respectivamente.

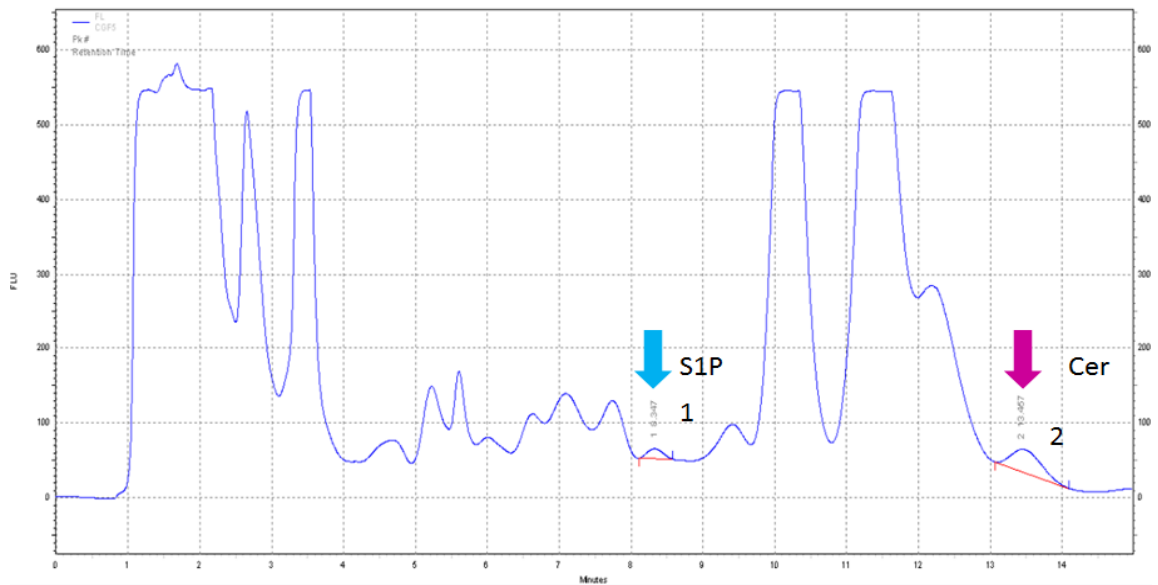


Figura 20. Cromatograma por HPLC de Células de la granulosa (CG) de un folículo atrésico derivado con OPA. Picos: 1 S1P; 2 Cer con un tiempo de retención de 8.3 y 13.8 min respectivamente.

Para poder constatar y tener la certeza de que el pico del estándar era el correspondiente al identificado en las muestras se adicionó una concentración tanto del estándar de Cer como de S1P a las muestras. Para el estándar de S1P se adicionó a una muestra de CT de un folículo dominante atrésico previamente inyectada sin el estándar, observando que el pico original aumentó su tamaño (Fig. 21). Es importante mencionar que el tiempo de retención se recorrió por condiciones del análisis.

En el caso de Cer se realizó de igual manera pero en muestra de CG de un folículo dominante sano con el resultado de un aumento de tamaño del pico ya identificado como Cer en las muestras con lo que se corrobora lo analizado (Figura 22).

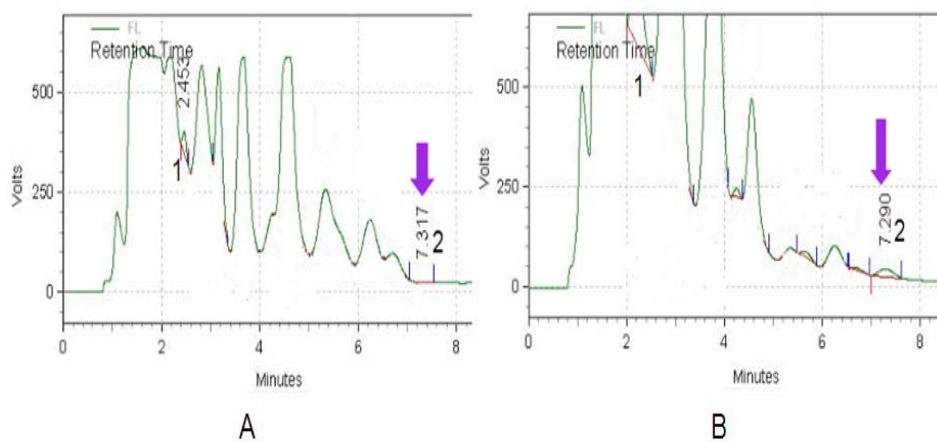


Figura 21. A) Cromatograma por HPLC de Células de la teca (CT) de un folículo dominante atrésico derivadas con OPA. Pico: S1P con un tiempo de retención de 7.317 min. B) Adición de 10µl del estándar S1P 10µM en la muestra del cromatograma A para identificar claramente que el pico seleccionado como S1P sea el correcto.

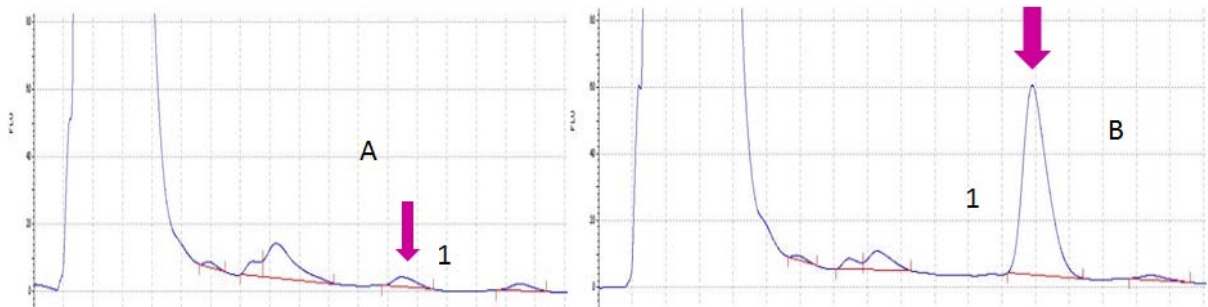
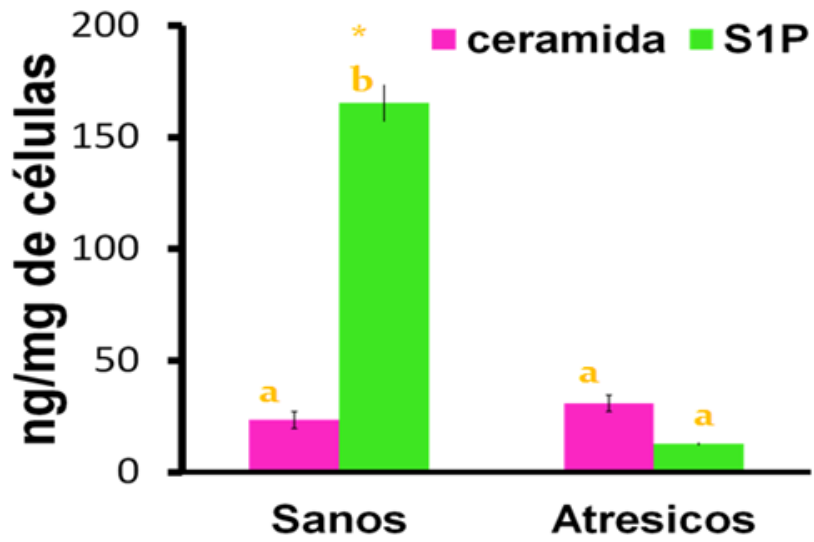


Figura 22. A) Cromatograma por HPLC de Células de la granulosa (CG) de un folículo dominante sano derivado con OPA. Pico: 1 Cer 18 con un tiempo de retención de 13 min. B) Adición de 10µl del estándar Cer 0.5µg/ml en la muestra del cromatograma A para identificar claramente que el pico seleccionado como Cer sea el correcto.

9.5 Concentraciones de S1P y Cer en CT y CG de folículos dominantes sanos y atrésicos.

Los resultados muestran que en CG, la concentración de S1P es mayor ($P < 0.05$) en folículos dominantes sanos que en atrésicos y que no se encontró diferencia ($P > 0.05$) en la concentración de Cer por tipo de folículo, mientras que en CT tanto la concentración de S1P como de Cer fue mayor ($P < 0.05$) en folículos dominantes sanos que en atrésicos (Figura 23 y 24). Cabe señalar que la concentración de ambos SPLs fue mucho mayor en CT que en las CG, obteniendo que en CT la concentración de S1P y Cer en folículos dominantes sanos fue de $3.34\mu\text{g}/\text{mg}$ tejido y $0.22\mu\text{g}/\text{mg}$ tejido respectivamente y en el caso de CG la concentración de S1P fue de $0.165\mu\text{g}/\text{mg}$ tejido y de $0.023\mu\text{g}/\text{mg}$ tejido para Cer (Tabla 4 y 5) por lo que las concentraciones de S1P y Cer en CT fue 20 veces y 9 veces mas respectivamente en folículos dominantes sanos y 2.25 veces de S1P y 3.6 veces mas de Cer en folículos dominantes atrésicos.

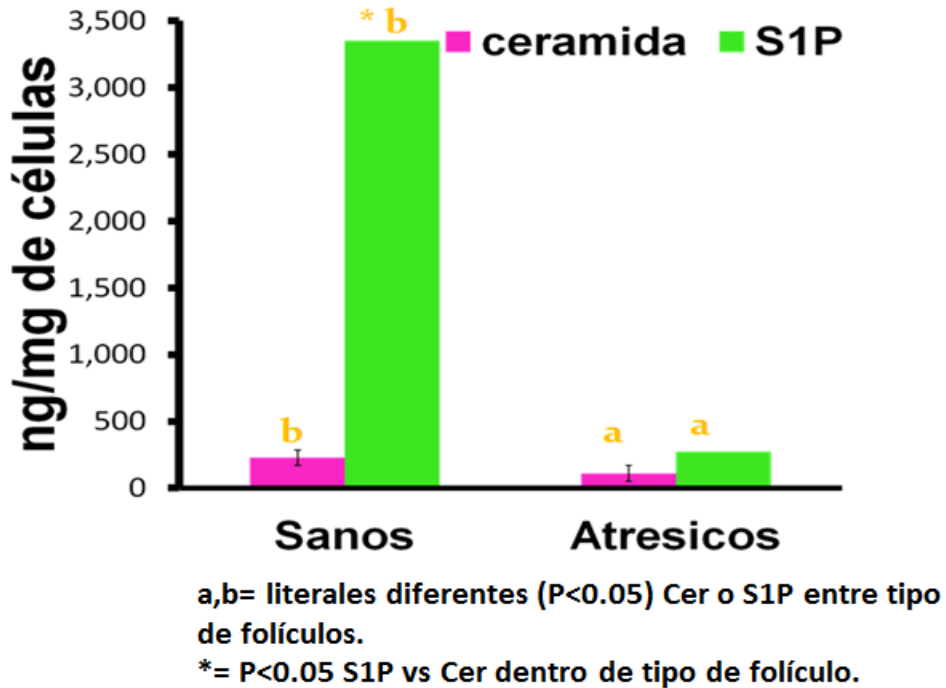
Figura 23. Concentraciones de S1P y Cer en CG de folículos sanos y atrésicos obtenidos en rastro.



a,b= literales diferentes ($P < 0.05$) Cer o S1P entre tipo de folículos.

*= $P < 0.05$ S1P vs Cer dentro de tipo de folículo.

Figura 24. Concentraciones de S1P y Cer en CT de folículos sanos y atrésicos obtenidos en rastro.



9.6 Relación S1P/Cer en CT y CG.

Un hallazgo importante es que la relación S1P/Cer en CG y CT fue mayor en folículos dominantes sanos que en atrésicos (P<0.05) aunque con diferentes proporciones. Mientras que en CG la concentración de S1P fue en promedio 26 veces mayor (P<0.05) que Cer, considerando que las concentraciones fueron determinadas en $\mu\text{g}/10^6$ células (Tabla 4), para obtener un indicativo que pudiera compararlas con las CT, se convirtió el número de células a $\mu\text{g}/\text{mg}$ de tejido (Tabla 5 y 6). En este caso la relación S1P/Cer fue 40 veces mayor (P<0.05) que Cer. Como se observa el patrón en la relación siguió siendo mayor independientemente de las unidades utilizadas.

Por otra parte en las CT se encontró hay alrededor de 14 veces más ($P<0.05$) S1P que Cer en folículos sanos respecto a los atrésicos (Tabla 6).

Por lo que aunque en las CT se observó mayor producción de SLPs, la relación S1P/Cer se fue más prominente en las CG y las concentraciones de cada uno de los SLPs en CG concuerdan con la literatura.

Finalmente mediante análisis de regresión lineal se observó que la relación S1P/Cer en CT se incrementa linealmente ($R^2= 0.XX$ y $= 7.62 + 2.72x$) con el aumento de la relación E2/P4 ($P<0.05$) obtenida de la determinación de hormonas esteroides en LF y que estas relaciones están correlacionadas ($r=0.43$; $P<0.05$).

Tabla 4. Media de las concentraciones de S1P y Cer en células de la granulosa (CG) expresadas en $\mu\text{g}/10^6$ células y la relación S1P/Cer.

CG ($\mu\text{g}/10^6$ células)			
CLAS.	S1P	Cer	S1P/Cer
FOLICULOS			
Sanos	0.556 ± 0.17^a	0.074 ± 0.04^a	26.091 ± 4.8^a
Atrésicos	0.024 ± 0.01^b	0.064 ± 0.01^a	0.09 ± 0.06^b

Los datos representan el promedio \pm el error estándar

a,b= literales diferentes entre folículos ($P<0.05$)

Tabla 5. Media de las concentraciones de S1P y Cer en células de la granulosa (CG) expresadas en $\mu\text{g}/\text{mg}$ tejido y la relación S1P/Cer.

CG ($\mu\text{g}/\text{mg}$ tejido)			
CLAS.	S1P	Cer	S1P/Cer
FOLICULOS			
Sanos	0.165 \pm 0.05 ^a	0.023 \pm 0.007 ^a	40.27 \pm 7.3 ^a
Atrésicos	0.012 \pm 0.007 ^b	0.030 \pm 0.014 ^a	0.48 \pm 0.2 ^b

Los datos representan el promedio \pm el error estándar

a,b= literales diferentes entre folículos (P<0.05)

Tabla 6. Media de las concentraciones de S1P y Cer en células de la teca (CT) y la relación S1P/Cer.

CT ($\mu\text{g}/\text{mg}$ tejido)			
CLAS.	S1P	Cer	S1P/Cer
FOLICULOS			
Sanos	3.34 \pm 0.6 ^a	0.22 \pm 0.04 ^b	17.02 \pm 1.9 ^a
Atrésicos	0.27 \pm 0.08 ^b	0.11 \pm 0.03 ^a	3.09 \pm 0.7 ^a

Los datos representan el promedio \pm el error estándar

a,b= literales diferentes entre folículos (P<0.05).

10. Discusión.

Los resultados de este trabajo indican que la relación en la concentración esfingosina 1-fostato y Ceramida (S1P/Cer) en células de la granulosa (CG) y células de la teca (CT) de folículos dominantes (FD) de bovinos se relaciona con la salud o la atresia de los folículos, también muestran que la concentración de S1P y Cer es mucho mayor en CT que en CG, y aunque la relación S1P/Cer disminuye de manera muy importante con la atresia en ambos tipos de células, la relación de estos esfingolípidos en CG tiene una caída más abrupta con la atresia que en las CT.

El adecuado desarrollo y ovulación del folículo depende de la presencia de factores de supervivencia producidos localmente como estradiol (E_2), Factor de Crecimiento Insulinoide (IGF), Factor de Crecimiento del Endotelio Vascular (VEGF), así como de las gonadotropinas foliculoestimulante (FSH) y luteinizante (LH) (Celestino *et al.*, 2009). Cuando se dispone de estos factores las células que conforman el folículo (CT y CG) siguen su camino en el ciclo celular y los folículos continúan su desarrollo, sin embargo la carencia de ellos lleva al folículo a la atresia (Clarck *et al.*, 2004). La atresia es un proceso degenerativo, paulatino e irreversible que provoca que la gran mayoría de los folículos que pueblan el ovario pierdan su integridad funcional y estructural, impidiendo alcanzar la ovulación (Sharma, 2000). Un evento fundamental en la atresia de los folículos es la muerte de las células que lo conforman; la presencia de características morfológicas y bioquímicas particulares de muerte por apoptosis en CG y CT de

folículos atrésicos han permitido reconocer que es el tipo de muerte preponderante del proceso de atresia (Rosales y Guzman, 2008).

En los últimos años los esfingolípidos (SLPs) han sido identificados como moléculas bioactivas en procesos de supervivencia y muerte de la célula (Pavoine y Pecker, 2009). Dentro de los SLPs bioactivos más sobresalientes se encuentran Cer y S1P, estos SLPs de membrana ejercen efectos opuestos en muchos tipos celulares (Sánchez y Díaz, 2006). Mientras que la formación de Cer (especies: C2-C24) a partir de esfingomielina (SM) mediante las esfingomielinasas (SMasas) (Navarrete y Ibáñez; 2008) inhibe la proliferación y promueve la apoptosis a través de 1. proteínas fosfatasa que inactivan moléculas de señalización de supervivencia (PKC y Akt/PKB, 2. catepsina D que tiene efecto sobre la mitocondria para la salida de citocromo c y 3. proteínas cinasas como la CAPC (proteína cinasa activada por Cer) que activa factores proapoptóticos como BAD y BAX (Spiegel y Milstein, 2003), S1P tiene como función la proliferación y supresión de la apoptosis mediante la liberación de este metabolito por transportadores de membrana y posterior estimulación de sus receptores (familia de receptores Edg), además S1P regula la expresión de proteínas proapoptóticas y antiapoptóticas (Futterman y Hannum, 2004), por lo que la supresión de apoptosis se ha asociado con un incremento en S1P y disminución en Cer (Spiegel y Milstein, 2003). Dadas sus características antagónicas se le ha denominado como el reóstato Cer/S1P y debido a que son metabolitos interconvertibles, siempre están presentes en la célula (Pavoine y Pecker, 2009). Cer es el precursor de S1P por la acción de la esfingosina cinasa (SK) pero mediante una enzima fosfatasa y otras reacciones se puede convertir la S1P en

Cer, debido a esto se ha postulado que no es el valor absoluto de cada una sino la relación en sus concentraciones lo que define si la célula sobrevive o muere (Bektas *et al.*, 2005; Sterin y Leocata, 2007). Esta relación es un indicador del destino de la célula en diversos tipos de tejidos.

Los resultados de este trabajo además muestran por primera vez que en FD sanos y atrésicos la relación S1P/Cer es un indicador de su estado fisiológico, porque tanto en CG como en CT de FD sanos se encontró que la relación S1P/Cer disminuyó dramáticamente ($P < 0.05$) cuando los folículos estaban atrésicos con lo cual se comprueba la hipótesis planteada: En FD sanos de bovino predominará S1P sobre Cer, mientras que en los FD atrésicos será mayor la presencia de Cer que de S1P.

Estos SLPs han sido estudiados en diversos tipos celulares donde la relación S1P/Cer ha sido indicador del estado fisiológico. Baran *et al* (2007) mencionan que alteraciones en el balance Cer/S1P por la SK está involucrado en la supervivencia de células K562. En otro estudio realizado por Meng *et al* (2011) en neuronas y células embrionarias de ratón demostraron que la relación de S1P y Cer son importantes en la regulación de la supervivencia celular *in vivo*. Paug *et al* (2008) concluyeron que la regulación en la relación de estos metabolitos suprime la apoptosis de células leucémicas. Así como en otros estudios en gónadas femeninas donde observaron muerte del ovocito y en pulmón de ratón sugieren que el balance entre Cer como molécula proapoptótica y la antiapoptótica S1P es necesaria para la homeóstasis de la supervivencia celular (Diab *et al.*, 2009). Una observación interesante del trabajo de Eliyahu *et al* (2010) es que se basaron en

la expresión de la enzima ceramidasa ácida (CA) encargada de generar Sph a partir de Cer (Alewijnsse y Peters, 2008) ya que para ellos es la principal reguladora de la supervivencia o muerte celular. Ellos encontraron niveles altos de CA en CT de folículos primarios y secundarios de la foliculogénesis además de folículos en etapa preantral a antral por ser folículos más susceptibles a la atresia. Y aunque ellos únicamente observaron si había altas concentraciones de Cer y una alta expresión de CA para observar si esta enzima era un determinante del destino del folículo, sus resultados mostraron claramente que el reóstato Cer/S1P es crítico para que se lleve a cabo el desarrollo folicular proponiendo a la CA como mayor regulador de esta vía, este estudio con nuestros resultados donde medimos la relación de estos 2 metabolitos nos permite reiterar que están involucrados en el desarrollo y la atresia folicular.

Las evidencias mostradas en otros tipos celulares y nuestros resultados encontrados en CT y CG de FD nos acercan a los efectos que estos SLPs pueden ejercer en el folículo.

Un folículo antral en crecimiento adquiere un área mayor de vasos sanguíneos conforme se acerca la ovulación, alcanzando una red vascular madura (Martelli *et al.*, 2009; Rosales y Guzman, 2011), además hasta la fase preovulatoria la red vascular presenta capilares y pocas horas antes de la ovulación nuevos vasos sanguíneos grandes aparecen en la pared del FD (Zimmerman *et al.*, 2003; Rosales y Guzman, 2011). Los resultados obtenidos en este trabajo, permite proponer que la acción de S1P en supervivencia celular y el efecto angiogénico que se le ha atribuido (Barthomeuf *et al.*, 2006), se suman a los de otros factores

involucrados en la formación de vasos sanguíneos y la sobrevivencia celular en los folículos como es VEGF, para propiciar el desarrollo de los folículos dominantes y mantener su integridad tal como se ha propuesto para este factor (Grenawwey *et al.*, 2007). Una de las principales fuentes para la generación de S1P son las células endoteliales (Igarashi y Michel, 2008; Daum *et al.*, 2009) y como en las CT existe un porcentaje tan alto de estas células (40% o mas) (Martelli *et al.*, 2009), podemos proponer que esta sea la razón de la mayor concentración de S1P en FD sanos en comparación con las CG que no tienen células endoteliales. Por otro lado Venkataraman *et al* (2006) mostraron que en células endoteliales, en condiciones in vitro la expresión de SK en medios de cultivo, incrementó los niveles de S1P y dado que es la enzima encargada de generar S1P por ende consideraron a este tipo de células como fuente de este metabolito lo que genera un mejor entendimiento en la mayor concentración de S1P en CT de FD sanos.

En cuanto a las CG, aunque las concentraciones encontradas de S1P en FD sanos fueron mas bajas que en CT, Heo *et al* (2009) indican que S1P induce la expresión de VEGF, por otro lado Spiegel y Milstein (2003) mencionan que VEGF activa proteína cinasa C, la cual estimula a la SK incrementando los niveles de S1P y Shimizu *et al* (2003) e Irusta *et al* (2010) mencionan que VEGF puede actuar como un factor de sobrevivencia, teniendo un efecto proliferativo y citoprotector en CG suprimiendo la atresia. Por lo tanto esta puede ser la explicación de que se haya visto una elevación de S1P en estas células y que probablemente esto le brinde proliferación y salud a las CG. Por otro lado las

redes capilares en un folículo sano no penetran hacia las CG por lo que estas células carecen de irrigación durante todo el desarrollo folicular (Rosales y Guzmán, 2011), con lo que dadas estas evidencias se puede entender que las CG como cualquier otra célula pueden estar produciendo S1P a niveles no tan altos como se producen en células endoteliales y como se observó en CT.

Cabe mencionar que el incremento en los niveles de S1P en CT se observa en FD sanos pero inclusive en FD atrésicos donde se pudieron encontrar las concentraciones de Cer mayores, sin embargo esto se puede relacionar con datos fisiológico del folículo referente a que las CT son las últimas en sufrir la atresia a diferencia de las CG (Rosales *et al.*, 2010). Young y McNeily (2010) mencionan que la atresia antral se manifiesta en folículos mayores a 5mm de diámetro incluyendo el folículo dominante lo que permite inferir que las CT mueren en etapas avanzadas de la atresia o son las últimas en sufrir apoptosis por ende a inicios de la atresia estas células aún están metabólicamente activas a lo que se puede deber el incremento observado en las concentraciones de S1P, aunado a esto la vascularización y hormonas que están presentes estimulando la expresión de la SK, importantes para la salud del folículo. Otro punto importante a considerar es que estudios *in vitro* sobre los mecanismos moleculares por los cuales las CT pueden sufrir apoptosis, realizados por Fogui *et al* (1998) muestran que la Cer funciona como segundo mensajero en el proceso de apoptosis mediante la hidrólisis de SM y para que pueda activarse esta vía es necesaria la unión del receptor de Fas con su ligando, estos autores utilizaron un tratamiento con anti-Fas sobre CT y observaron que la hidrólisis de SM ocurría alrededor de

30min o mas, además de esto incubaron las células con Cer C-2 sintética como inductor de apoptosis y observaron características morfológicas específicos de este tipo de muerte celular. Nuestros resultados en CT de FD atrésicos muestran que las concentraciones de Cer no se encuentran incrementadas y a pesar de que en otros estudios se indican los efectos sobre muerte de este segundo mensajero (Blitterswijk *et al.*, 2003; Sánchez y Díaz 2006), es importante considerar que cuando la atresia inicia, las CT se mantienen intactas, razón por la que probablemente las concentraciones intracelulares de Cer no se vieron modificadas. Seguramente el estímulo de muerte no es tan fuerte como para una generación rápida de Cer, sin embargo la relación S1P/Cer en estos folículos muestra perfectamente que es un indicador de la atresia.

Por otro lado, según evidencias mostradas por Pru *et al* (2002), el incremento de Cer en células esteroideogénicas de ovario de vaca (cuerpo lúteo) es derivado de la vía de hidrólisis de SM y no de la síntesis de novo bajo estimulación de Fas, enfatizando en que en células esteroideogénicas la vía de SM es la encargada de inducir apoptosis. Estos resultados nos muestran que si la Cer está causando efecto de muerte por la vía de SM en cuerpo lúteo, la Cer producida por la síntesis de novo por la cual también se genera S1P (Sterin y Leocata, 2007) pudiera estar sirviendo como precursor de este SLP, lo que podría dar otro indicio sobre nuestros resultados, donde en las CT de FD atrésicos se observó ligeramente mayor cantidad de S1P que de Cer, aunque no hubo diferencias significativas.

En las CG las concentraciones tanto de S1P como de Cer obtenidas entre diferentes tipos de folículos coincide con los efectos de estos SLPs; S1P se presenta como un factor de supervivencia a diferencia de Cer que su efecto es de detención del crecimiento y muerte (Baran *et al.*, 2007). Los resultados obtenidos en CG justamente permiten observar que S1P es mayor en FD sanos y menor en los atrésicos y Cer tiene una tendencia a subir en FD atrésicos respecto a los sanos aunque Cer fue mayor numéricamente pero no estadísticamente. Lo anterior se puede relacionar con lo que ya se mencionó sobre que las CG son las primeras en sufrir atresia (Yang *et al.*, 2000; Rodgers y Rodgers, 2010) donde al no tener irrigación directa responden rápidamente a la pérdida de oxígeno (Guzmán *et al.*, 2006; Rosales y Guzmán, 2008) por lo tanto la hipoxia es un inductor en la generación de Cer (Birkman y Summers, 2011), es así que en estas células los cambios observados durante el procesos de atresia se manifiestan incipientemente. Con esto es importante mencionar que aunque las CT producen altas cantidades de SLPs, nuestros datos indican que el patrón en las concentraciones observadas en CG además de la sobresaliente relación de S1P/Cer, permite considerarlas como el mejor compartimento celular indicador de atresia folicular.

Al igual que las CT en las CG las concentraciones de Cer no se observaron tan elevadas en FD atrésicos como S1P en FD sanos pero esto puede explicarse porque estudios realizados por Kim *et al* (1999) mencionan que en cultivos de CG estimuladas con Fas observaron que la formación de este metabolito ocurre minutos después de la unión del receptor con su ligando o inclusive horas

después de esta unión, lo cual se asocia con datos obtenidos por Schutze *et al* (1992) y Boesen *et al* (1998) en células linfoides, en ambos estudios emplearon 3 cadenas acilo cortas de Cer (C2, C6 y C8). Los resultados que obtuvieron sugieren que la vía de señalización de Fas requiere más tiempo para activar SMasas, respondiendo así a la formación de Cer en respuesta a varios estímulos de estrés, por lo que probablemente la generación de Cer puede ser lenta, siendo esta una de las razones por las que en nuestros resultados no se observó una gran elevación de Cer en las células foliculares, además aunque existen diversas especies de Cer en la célula, el efecto que causan es el mismo (Navarrete y Ibáñez; 2008) y es importante destacar que nosotros a diferencia de los autores mencionados únicamente medimos una de estas ceramidas por lo que en estudios posteriores puede ser importante considerarlas para el análisis. No obstante es trascendente reiterar que la relación S1P/Cer encontrada en CG resultó ser un buen indicador.

Bajo estos elementos, sabiendo que la adquisición de un suministro vascular específico puede representar una limitante en la selección de un folículo dominante destinado a la ovulación y la desaparición de esta vasculatura de las CT se correlaciona con el proceso de atresia folicular, estudios de Martelli *et al* (2009) y Macchiarelli *et al* (2010) donde utilizaron folículos y cuerpo lúteo determinaron que un folículo dominante posee una mayor irrigación a diferencia de los subordinados por lo que con lo obtenido con nuestros resultados se puede explicar la relación S1P/Cer haya sido mayor en FD sanos que tienen un mayor aporte en los factores de sobrevivencia con respecto a los atrésicos.

Lo encontrado por Venkataraman *et al* (2006) sobre la expresión de SK y lo mencionado por Takabe *et al* (2008) sobre que esta enzima es estimulada por VEGF (Shu *et al*; 2002) y por E₂ (Sukocheva *et al.*, 2003 y 2006) permite entender el aumento en los niveles de S1P en FD sanos que están produciendo altas concentraciones de E₂ y están obteniendo mayor irrigación porque producen más VEGF que estimula la angiogénesis y por consiguiente mantienen al folículo sano, lo cual puede ser finalmente orquestado por la mayor expresión de S1P a diferencia de los folículos atrésicos que producen muy bajas concentraciones de E₂ y no poseen adecuada vascularización, sin embargo en los FD arésicos que dejan de producir E₂ por inactivación de aromatasa debido a la falta del estímulo de LH y al no producirse E₂ no se puede sintetizar SK y las concentraciones de S1P se reducen.

Además de lo ya mencionado por el trabajo de Eliyahu *et al* (2010) donde observaron que la CA es clave en la modulación de las concentraciones de Cer presentes en la célula pero no necesariamente para generar efecto de muerte celular sino que estas altas concentraciones de la CA bajo diferentes estímulos podrían estar mediando la generación elevada de S1P, haciendo énfasis en la presencia de los 2 SLPs en las células foliculares lo que también podría explicar la marcada elevación de S1P en FD sanos.

Como se observó con este trabajo la concentración de S1P fue mucho mayor que la de Cer aunque se debe considerar se solo se midió una de sus variantes,

sin embargo la relación de los SLPs S1P/cer, es un indicativo del proceso degenerativo que está sufriendo el folículo.

Otro resultado importante es que se encontró correlación entre la relación E_2/P_4 con la de S1P/Cer en CT pero no en CG observando que a mayor relación E_2/P_4 , mayor relación S1P/Cer, esto debido probablemente porque las CG son las primeras en sufrir atresia, sin embargo en CT por ser las ultimas en sufrir este proceso es que se permitió encontrar esta relación.

11. Conclusiones.

1. En este trabajo se demuestra por primera vez que la relación en la concentración de Esfingosina 1-fosfato y Ceramida (S1P/Cer) en células de la teca (CT) y granulosa (CG) de folículos dominantes (FD) de bovino, es un indicador de atresia folicular.
2. Las CT producen concentraciones más altas de S1P y Cer que las CG.
3. Las concentraciones de S1P y Cer en CG reflejaron claramente el estado de salud y atresia de los folículos; S1P fue mayor en los FD sanos y menor en los atrésicos y Cer fue mayor en los FD atrésicos y menor en los sanos, por lo tanto la relación S1P/Cer fue alta en los FD sanos y disminuyó dramáticamente en los FD atrésicos.
4. En CT, la relación en la concentración S1P/Cer, igual que en CG, disminuyó significativamente con la atresia, sin embargo en las CT de los FD atrésicos, la concentración de S1P fue mayor que la de Cer, lo cual muestra una diferencia importante entre los dos compartimientos, debida seguramente a su ubicación en el folículo y al tipo de células que lo conforman.
5. Las diferencias en las concentraciones de S1P y Cer así como de la relación S1P/Cer en los dos compartimientos celulares de FD, indican que el proceso degenerativo de la atresia ocurre primero o al menos de manera más abrupta en las CG que en CT.

12. Referencias.

1. Adams GP., Jaiswal R., Singh J., Malhi P. (2008). Progress in understanding ovarian follicular dynamics in cattle. *Science Direct: Theriogenology*. Canadá. 69:72–80.
2. Alam PJ., Maizels ET., Park Y., Ghaey S., Feigers ZJ., Chandel NS., Hunzicker DM. (2004). Follicle-stimulating hormone activation of hypoxia-inducible Factor-1 by the phosphatidylinositol 3 Kinase/AKT/Ras homolog enriched in brain (Rheb)/mammalian target of rapamycin (mTOR) pathway is necessary for induction of select protein markers of follicular differentiation. *The Journal of Biological Chemistry*. USA. 279 (19): 19431–19440.
3. Alewijnse AE., Peters SLM. (2008). Sphingolipid signalling in the cardiovascular system: good, bad or both?. *European Journal of Pharmacology*, ELSEVIER. Amsterdam. 585:292-302.
4. Alonso PI., Rosales TAM., Avalos RA., Vergara OM., Rosado GA. (2003). Mechanism of granulosa cell death during follicular atresia depends on follicular size. *Theriogenology*. México. 60:1071-1081.
5. Arrazola A. (1994). *Biología de la membrana celular*. NEFROLOGIA. España. 15(4):418-426.
6. Baran Y., Salas A., Senkal CE., Gunduz U., Bielawski J., Obeid LM., Ogretmen B. (2007). Alterations of ceramide/sphingosine 1-phosphate rheostat involved in the regulation of resistance to imatinib-induced apoptosis in K562 human chronic myeloid leukemia cells. *J Biol Chem*. USA. 282(15):10922-34.
7. Barthomeuf C., Lamy S., Blanchette M., Boivin D., Gingras D., Béliveau R. (2006). Inhibition of sphingosine-1-phosphate- and vascular endothelial growth factor-induced endothelial cell chemotaxis by red grape skin polyphenols correlates with

- a decrease in early platelet-activating factor synthesis. *Free Radic Biol Med.* Francia. 40(4):581-90.
8. Bartke N., Hannun YA. (2009) Bioactive sphingolipids: metabolism and function. *Journal of Lipid Research.* USA. 50: 91-96.
 9. Bedaiwy MA., Hussein MR. (2004) Histological evaluation and in situ localization of apoptosis in fresh and cryopreserved ovarian tissue. *Middle East Fertility Society.* Egipto. 9(2): 163-170.
 10. Bektas M., Jolly PS., Müller C., Eberle J., Spiegel S., Geilen CC. (2005). Sphingosine kinase activity counteracts ceramide-mediated cell death in human melanoma cells: role of Bcl-2 expression. *Oncogene.* Alemania. 24(1):178-87.
 11. Belka C., Budach W. (2002). Anti-apoptotic Bcl-2 proteins: structure, function and relevance for radiation biology. *Int J Radiat Biol.* Alemania. 78(8):643-658.
 12. Bernard DJ., Forton J., Wang Y., Lamba PMD. (2010). Mechanisms of FSH synthesis: what we know, what we don't, and why you should care. *Fertil Steril.* Canadá. 93:2465–85.
 13. Bielawski J., Szulc ZM., Hannun YA., Bielawska A. (2006). Simultaneous quantitative analysis of bioactive sphingolipids by high-performance liquid chromatography-tandem mass spectrometry. *Methods.* USA. 39(2):82-91.
 14. Bikman BT., Summers SA. (2011). Ceramides as modulators of cellular and whole-body metabolism. *J Clin Invest.* Singapur. 121(11):4222-30.
 15. Billig H., Chun SY., Eisenhauer K., Hsueh AJ. (1996). Gonadal cell apoptosis: hormone-regulated cell demise. *Hum Reprod.* USA. 2(2):103-17.
 16. Blitterswijk WJ., Arnold H., Luit VD., Veldman RJ., Verheij M. Borst J. (2003). Ceramide: second messenger or modulator of membrane structure and dynamics? *Biochem. J.* Inglaterra. 369: 199-211.
 17. Boath A., Graf C., Lidome E, Ullrich T., Nussbaumer P., Bornancin F. (2008). Regulation and Traffic of Ceramide 1-Phosphate Produced by Ceramide Kinase:

- Comparative Analysis to Glucosylceramide and Sphingomyeline. *Journal of Biological Chemistry*. Austria. 283(13):8517-8526.
18. Boesen-de Cock, JGR., Tepper AD., de Vries E., Blitterswijk WJ., Brost J. (1998). CD95 (Fas/APO-1) induces ceramide formation and apoptosis in the absence of a functional acid sphingomyelinase. *J. Biol. Chem.* Holanda. 273:7560–7565.
 19. Breckenridge DG., Germain M., Mathai JP., Nguyen M., Shore GC. (2003). Regulation of apoptosis by endoplasmic reticulum pathways. *Oncogene*. Canadá. 22(53): 8608–8618.
 20. Breslow DK., Weissman JS. (2010). Membranes in Balance: Mechanisms of Sphingolipid Homeostasis. *Molecular cell*. USA. 40:267-279.
 21. Brunelle JK., Letai A. (2009). Control of mitochondrial apoptosis by the Bcl-2 family. *Cell Science at a Glance*. USA. 122(4): 437-441.
 22. Byskov AGS. (1974). Cell kinetic studies of follicular atresia in the mouse ovary. *Reproduction Fertility*. Dinamarca. 37:277-285.
 23. Calderón VL. (2005). La apoptosis en biología y patología. *Revista Peruana de Cardiología*. Perú. 31(2): 119-128.
 24. Carson RS., Findlay JK., Burger HJ., Trounson AO. (1979). Gonadotropin receptors of the ovine ovarian follicle during follicular growth and atresia. *Biology of Reproduction*. Australia. 21:75-87.
 25. Castle mj. Cengarle M. Batest., Qiu Y. Tortonese D. (2011). Dynamics of ovarian follicular development and atresia are regulated by the balance of pro- and anti-angiogenic isoforms of vascular endothelial growth factor (VEGF). *Proc Physiol Soc. Inglaterra*. 23: s/p.
 26. Celestino JJH., Chaves RN., Matos MHT., Saraiv MVA., Bruno JBMaia-Júnior J.E., Silva RV., Figueiredo JR. (2009). Mechanisms of atresia in ovarian follicles. *Anim. Reproduction*. Brasil. 6(4): 495-508.

27. Celik H., Arinc E. (2008). Bioreduction of idarubicin and formation of ROS responsible for DNA cleavage by NADPH-cytochrome P450 reductase and its potential role in the antitumor effect. *J Pharm Pharm Sci. Turquía.* 11: 68-82.
28. Chalfant CE., Spiegel S. (2005). Sphingosine 1-phosphate and ceramide 1-phosphate: expanding roles in cell signaling. *J. Cell Sci. USA.* 118: 4605–4612.
29. Chan YHM., Boxer SG. (2007). Model membrane systems and their applications. *Curr Opin Chem Biol. USA.* 1:1–7.
30. Chávez VR., Martin LJ., Northington FJ. (2012). Programmed necrosis: a prominent mechanism of cell death following neonatal brain injury. *Neurology Research International. USA.* 2012: 1-12.
31. Chipuk JE., Green DR. (2008). How do BCL-2 proteins induce mitochondrial outer membrane permeabilization? *Trends in Cell Biology. USA.* 18(4). 157-164.
32. Choi JY., Jo MW., Lee EY., Yoon BK., Choi DS. (2010). The role of autophagy in follicular development and atresia in rat granulosa cells. *Fertil Steril. Korea.* 93(8):2532-7.
33. Ciechanowska M., Łapot M., Mateusiak K., Przekop F. (2010). Neuroendocrine regulation of GnRH release and expression of GnRH and GnRH receptor genes in the hypothalamus-pituitary unit in different physiological states. *Reproductive Biology. Polonia.* 10(2): 85-124.
34. Clark LJ., Rodgers IHF., Dharmarajan AM., Rodgers JL. (2004). Theca interna: the other side of bovine follicular atresia. *Biol Reprod. Australia.* 71(4):1071-8
35. Cory S., Adams JM. (2001). Life-or-death decisions by the Bcl-2 protein family. *Trends Biochem Sci. Australia.* 26(1):61-6.
36. Coussin F., Scott RH., Nixon GF. (2003). Sphingosine 1-phosphate induces CREB activation in rat cerebral artery via a protein kinase C-mediate inhibition of voltage-gated K⁺ channels. *Biochem. Pharmacol. Inglaterra.* 66:1861-1870.

37. Curtin D., Jenkins S., Farmer N., Anderson AC., Haisenleder DJ., Rissman E., Wilson EM., Shupnik MA. (2001). Androgen suppression of GnRH-stimulated rat LH β gene transcription occurs through Sp1 sites in the distal GnRH-responsive promoter region. *Mol Endocrinol. USA.* 15:1906–1917.
38. Daleke DL. (2008). Regulation of phospholipid asymmetry in the erythrocyte membrane. *Curr Opin Hematol. Indiana.* 15(3):191-5.
39. Daleke LD. (2007). Phospholipid Flippases. *THE JOURNAL OF BIOLOGICAL CHEMISTRY. USA.* 282(2): 821–825.
40. Danial NN., Gramm CF., Scorrano L., Zhang CY., Krauss S., Ranger AM., Datta SR., Greenberg ME., Licklider LJ., Lowell BB., Gygi SP., Korsmeyer SJ. (2003). BAD and glucokinase reside in a mitochondrial complex that integrates glycolysis and apoptosis. *Nature. USA.* 424: 952–956.
41. Darzynkiewich Z., Juan GX., Gorcyca W., Murakami T., Traganos F. (1977) Cytometry in cell necrobiology: analysis of apoptosis and accidental cell death. *Cytometry New York.* 27(1):1-20.
42. Daum G., Grabski A., Reidy M.A. (2009). Sphingosine 1-Phosphate : A regulator of arterial lesions. *Arterioscler Thromb Vasc Biol. USA.* 29:1439-1443.
43. De Toro G. (2006). Muerte celular programada. Revisión del paradigma apoptosis-necrosis y formas alternativas de muerte celular. VIII Congreso Virtual Hispanoamericano de Anatomía Patológica. Chile.
44. Diab KJ., Adamowicz JJ., Kamocki K., Rush NI., Garrison J., Gu Y., Schweitzer KS., Skobeleva A., Rajashekhar G., Hubbard WC., Berdyshev EV., Petrache I. (2010). Stimulation of sphingosine 1-phosphate signaling as an alveolar cell survival strategy in emphysema. *Am J Respir Crit Care Med. USA.* 181(4):344-52.
45. Drake JM., Friis RR., Dharmarajan AM. (2003). The role of sFRP4, a secreted frizzled-related protein, in ovulation: Apoptosis. *Australia.* 8:389–397.

46. Dubin M., Stoppani AOM. (2000). Muerte celular programada y apoptosis: función de las mitocondrias. *Medicina*. Buenos Aires. 60:375-386.
47. Eliyahu E., Shtraizent N., Shalgi R., Schuchman EH. (2012). Construction of conditional acid ceramidase knockout mice and in vivo effects on oocyte development and fertility. *Cell Physiol Biochem*. USA. 30(3):735-48.
48. Elizabeth H. Blackburn EH. (2005). Telomeres and telomerase: their mechanisms of action and the effects of altering their functions. *FEBS Letters*. USA. 579: 859–862.
49. Elmore S. (2007). Apoptosis: A review of programmed cell death. *Toxicologic Pathology*, USA. 35:495–516.
50. Espinoza VJL., Ortega PR., Palacios E. (2007) Crecimiento folicular ovárico en animales domésticos: una revisión. *INCI. México*. 32(2):93-99.
51. Evans ACO., Ireland JLH., Winn ME., Lonergan P., Smith GW., Coussens PM., Ireland JJ. (2004). Identification of genes involved in apoptosis and dominant follicle development during follicular waves in cattle. *Biology of Reproduction*. Irlanda. 70: 1475–1484.
52. Flores PFI., Rosas VC., Romano PMC., Pérez MM. (2005). Apoptosis y atresia folicular: un binomio esencial en el desarrollo ovárico. *Veterinaria México*. México. 36(001):87-103.
53. Fogui A., Ravandi A., Teerds KJ., Kuksis A., Dorrington J. (1998). Fas-induced apoptosis in rat thecal/interstitial Cells signals Through sphingomyelin-ceramide pathway. *Endocrinology*. Canadá. 139(4):2041-2047.
54. Friberg A. (2009). Granulosa cell apoptosis. Transcriptional regulation by the nuclear progesterone receptor. (Tesis de doctorado- Gothenburg, Sweden). [En línea]. Disponible en: http://gupea.ub.gu.se/bitstream/2077/19404/2/gupea_2077_19404_2.pdf
[Consulta: 24 septiembre 2012]

55. Fuller PJ., Chu S., Fikret S., Burger HG. (2002). Molecular pathogenesis of granulosa cell tumours. *Molecular and Cellular Endocrinology*. 191: 89- 96.
56. Futerman AH., Hannun YA. (2004). The complex life of simple sphingolipids. *EMBO Rep. USA*. 5(8): 777–782.
57. Ghafourifar P., Klein SD., Schucht O., Schenk U., Pruschy M., Rocha S., Richter C. (1999). Ceramide induces cytochrome c release from isolated mitochondria. *THE JOURNAL OF BIOLOGICAL CHEMISTRY*. Suiza. 274(10): 6080–6084.
58. Gon FM., Alonso A. (2002). Sphingomyelinases: enzymology and membrane activity. *FEBS Letters*. España. 531:38-46.
59. Gonzalez-Cabrera PJ., Jo E., Sanna MG., Brown S., Leaf N. (2008). Full pharmacological efficacy of a novel S1P agonist that does not require S1P-like head-group interactions. *Mol. Pharmacol. USA*. 74:1308–18.
60. Grassme H., Jekle A., Riehle A., Schwarz H., Berger J., Sandhoff K., Kolesnick R., Gulbins E. (2001). CD95 signaling via ceramide-rich membrane rafts. *J. Biol. Chem. USA*. 276: 20589-20596.
61. Greenaway J., Lawler J., Moorehead R., Bornstein P., Lamarre J., Petrik J. (2007). Thrombospondin-1 Inhibits VEGF Levels in the Ovary Directly by Binding and Internalization Via the Low Density Lipoprotein Receptor-Related Protein-1 (LRP-1). *J Cell Physiol. USA*. 210(3): 807–818.
62. Guzmán SA., Vergara OM., Ávalos RA., García VFJ., Gutiérrez AC., Rosado GA., Rosales TAM. (2006). Expresión del factor de crecimiento endotelio-vascular (VEGF) y su receptor tipo 2 (flk-1) en células de la granulosa de folículos dominantes y subordinados de bovinos. Reunión Anual de la Academia de Investigación en Biología de la Reproducción, Acapulco, Guerrero, México. 242-254.

63. Hait NC., Bellamy A., Milstien S., Kordula T., Spiegel S. (2007). Sphingosine kinase type 2 activation by ERK-mediated phosphorylation. *J Biol Chem. USA.* 282:12058–12065.
64. Hait NC., Sarkar S., Le Stunff H., Mikami A., Maceyka M., Milstien S., Spiegel S. (2005). Role of sphingosine kinase 2 in cell migration towards epidermal growth factor. *J Biol Chem. USA.* 280:29462–29469.
65. Haynes CA., Allegood JC., Park H., Sullards MC. (2009). Sphingolipidomics: Methods for the comprehensive analysis of sphingolipids. *Journal of Chromatography. USA.* 877:2696-2708.
66. He X., Huang CL., Schuchman EH. (2009). Quantitative analysis of sphingosine-1-phosphate by HPLC after naphthalene-2,3-dicarboxaldehyde (NDA) derivatization. *J Chromatogr B Analyt Technol Biomed Life Sci. USA.* 877(10):983-90.
67. Heinrich M., Wickel M., Schneider-Brachert W., Sandberg C., Gahr J., Schwandner R., Weber T., Saftig P., Peters C., Brunner J. (1999). Cathepsin D targeted by acid sphingomyelinase-derived ceramide. *EMBO J. Alemania.* 18: 5252-5263.
68. Henriquez M., Armisen R., Stutzin A., Quest AFQ. Cell death by necrosis, a regulated way to go. *Current Molecular Medicine. Chile.* 8: 187-206.
69. Heo K., Park KA., Kim YH., Kim SH., Oh YS., Kim IH., Ryu SH., Suh PG. (2009). Sphingosine 1-phosphate induces vesicular endothelial growth factor expression in endothelial cells. *BMB Reports. Corea.* 42(10):685-690.
70. Hilario E., Cañavate ML., Lacalle J., Alconada DA., Celador IL., Granda LA., Alvarez A. (2010). Cell death. A comprehensive approximation. Delayed cell death. *Microscopy: Science, Technology, Applications and Education. A. Méndez-Vilas and J. Díaz (Eds). España.* 1025-1032.
71. Hitoshi Y., Lorens J., Kitada SI., Fisher J., LaBarge M., Ring HZ., Francke U., Reed JC., Kinoshita S., Nolan GP. (1998). Toso, a cell surface, specific regulator of Fas-induced apoptosis in T cells. *Immunity. USA.* 8 :461–71.

72. Hsueh AJW., Billig H., Tsafriri A. (1994). Ovarian follicle atresia: a hormonally controlled apoptotic process. *Endocrine*. 51:433-491.
73. Huang WC., Chen CL., Lin YS., Lin CF. (2011). Apoptotic sphingolipid ceramide in cancer therapy. *Journal of Lipids*. Taiwan. 2011: 1-15.
74. Husein MR. (2005). Apoptosis in the ovary: molecular mechanisms. *Human Reproduction*. Egipto. 11(2): 162–178.
75. Huwiler A., Xin C., Brust AK., Briner VA., Pfeilschifter J. (2004). Differential binding of ceramide to MEKK1 in glomerular endothelial and mesangial cells. *Biochim. Biophys Acta*. Alemania. 1636: 159-168.
76. Igarashi J., Michel T. (2008). The enigma of sphingosine 1-phosphate synthesis: a novel role for endothelial sphingosine kinases. *Circ Res*. USA. 102(6):630-2.
77. Irusta G., Abramovich D., Parborell F., Tesone M. (2010). Direct survival role of vascular endothelial growth factor (VEGF) on rat ovarian follicular cells. *Mol Cell Endocrinol*. Irlanda. 325(1-2):93-100.
78. Jaaskelainen M., Kyronlahti A., Anttonen M., Nishi Y., Yanase T., Zauli SG., Tapanainen JS., Heikinheimo TM., Vaskivuo TE. (2009). TRAIL pathway components and their putative role in granulosa cell apoptosis in the human ovary. *Differentiation*. Finlandia. 77(4): 369-376.
79. Janmey PA., Kinnunen PKJ. Biophysical properties of lipids and dynamic membranes. *TRENDS in Cell Biology*. Finlandia. 30(10).
80. Jayawardana BC., Shimizu T., Nishimoto H., Kaneko E., Tetsuka M., Miyamoto A. (2006). Hormonal regulation of expression of growth differentiation factor-9 receptor type I and II genes in the bovine ovarian follicle. *Reproduction Research*. Japón. 131:545–553
81. Jerry E. Chipuk JE., Tudor Moldoveanu T., Llambi F, Parsons MJ., Green DR. (2010). The BCL-2 family reunion. *Molecular Cell*. USA. 37: 299-310.

82. Jiang JY., Cheung CJ., Wang Y., Tsang BK., (2003). Regulation of cell death and cell survival gene expression during ovarian follicular development and atresia. *Front Biosci. Canadá.* 1(8): 222-37.
83. Johnson AL., Ratajczak C., Haugen MJ., Liu HK., Woods DC. (2007). Tumor necrosis factor-related apoptosis inducing ligand expression and activity in hen granulosa cells. *Reproduction research. USA.* 133:609–616.
84. Johnson KR., Becker KP., Facchinetti MM., Hannun YA., and Obeid LM. (2002). PKCdependent activation of sphingosine kinase 1 and translocation to the plasma membrane: extracellular release of sphingosine-1-phosphate induced by phorbol 12-myristate 13-acetate (PMA). *J Biol Chem. USA.* 277:35257–35262.
85. Jolly PD., Smith PR., Heat DA., Hudson NL., Lun S., Still LA., Watts CH., McNatty KP. (1997). Morphological evidence of apoptosis and the prevalence of apoptotic versus mitotic cells in the membrane granulosa of ovarian follicles during spontaneous and induced atresia in ewes. *Biology of Reproduction. New Zealand.* 56:837-46
86. Jordán J. (2003). Apoptosis: muerte celular programada. *OFFARM. España.* 22(6):100-106.
87. Kaczmarek MM., Schams D., Ziecik AJ. (2005). Role of vascular endothelial growth factor in ovarian physiology - an overview. *Reprod Biol. Alemania.* 5:111-136.
88. Kanitz W. (2003). Follicular dynamic and ovulation in cattle – a review. *Arch. Tierz., Dummerstorf. Alemania.* 46 (2): 187-198.
89. Kataoka T., Schröter M., Hahne M., Schneider P, Irmeler M., Thome M., Froelich CJ., Tschopp J. (1998). FLIP previene la apoptosis inducida por receptores de muerte, pero no por perforina / granzima B, los medicamentos quimioterapéuticos, y la irradiación gamma. *J Immunol. Suiza.* 161 :3936-42.

90. Kerr JF., Gobe CG., Winterford CM, Harmon BV. (1995). Anatomical methods in cell death. *Methods Cell Biol.* 46: 1 -27.
91. Kerr JFR., Wyllie AH., Currie AR. (1972). Apoptosis: a basic biological phenomenon with wideranging implications in tissue kinetics. *Br. J. Cancer. Escocia.* 26:239-257.
92. Kihara A., Mitsutake S., Mizutani Y., Igarashi Y. (2007). Metabolism and biological functions of two phosphorylated sphingolipids, sphingosine 1-phosphate and ceramide 1-phosphate. *Prog. Lipid Res. Japón.* 46: 126–144.
93. Kim JH., Yoon YD., Shin I., Han JS. (1999). Effects of ceramide, the Fas signal intermediate, on apoptosis and phospholipase D activity in mouse ovarian granulosa cells in vitro. *IUBMB Life. Corea.* 48(4):445-52.
94. Kim JM., Lee JY., Kim YJ. (2008). Inhibition of apoptosis in *Bacteroides fragilis* enterotoxin-stimulated intestinal epithelial cells through the induction of c-IAP-2. *Eur J Immunol. Korea.* 38(8):2190-9.
95. Kondo H., Maruo T., Peng X., Mochizuki M. (1996). Immunological evidence for the expression of the Fas antigen in the infant and adult human ovary during follicular regression and atresia. *J Clin Endocrinol Metab. Japón.* 81(7): 2702-2710.
96. Kroemer G., Galluzzi L., Brenner C. (2007). Mitochondrial membrane permeabilization in cell death. *Physiol Rev. Francia.* 87: 99–163.
97. Leist M, Nicotera P. (1997). The shape of cell death. *Biochem Biophys. Alemania.* 236: 1-9.
98. Levade T., Jaffrezou JP. (1999) Signalling sphingomyelinases : which, where, how and why ? *Biochim. Biophys. Acta. Francia.* 1438: 1-17.
99. Levine B., Yuan J. (2005). Autophagy in cell death: an innocent convict? *The Journal of Clinical Investigation. USA.* 115:2679–2688.

100. Li L, Luo X., Wang X. (2001). Endonucleasa G es una DNasa apoptosis cuando se libera de la mitocondria la Naturaleza.USA. 412 :95-9.
101. Maceyka M., Sankala H., Hait NC., Le Stunff H., Liu H., Toman R., Collier C., Zhang M., Satin LS., Merrill AH. (2005). SphK1 and SphK2, sphingosine kinase isoenzymes with opposing functions in sphingolipid metabolism. J Biol Chem. USA. 280:37118–37129.
102. Maillet G., Benhaïm A., Mittre H., F´eral C. (2003). Involvement of theca cells and steroids in the regulation of granulosa cell apoptosis in rabbit preovulatory follicles. Reproduction Research. Francia. 125: 709–716.
103. Manikkam M., Rajamahendran R. (1997). Progesterone-Induced Atresia of the Proestrous Dominant Follicle in the Bovine Ovary: Changes in Diameter, Insulin-Like Growth Factor System, Aromatase Activity, Steroid Hormones, and Apoptotic Index. Biology of Reproduction. Canadá. 57:580 587.
104. Martelli A., Bernabò N., Berardinelli P., Russo V., Rinaldi C., Di Giacinto O., Mauro A., Barboni B. (2009). Vascular supply as a discriminating factor for pig preantral follicle selection. Reproduction. USA. 37(1):45-58.
105. Matsuda MF., Inoue N., Goto Y. Manabe N. (2006). The regulation of ovarian granulosa cell death by pro and anti-apoptotic molecules. Journal of Reproduction and Development. Japón. 52(6):695-705.
106. Meng H., Yuan Y., Lee VM. (2011). Loss of Sphingosine Kinase 1/S1P Signaling Impairs Cell Growth and Survival of Neurons and Progenitor Cells in the Developing Sensory Ganglia. PLoS ONE. USA. 6(11): e27150.
107. Merrill AH., Wang E., Mullins RE., Jamison WCL., Nimkar S., Liotta DC. (1988). Quantitation of free sphingosine in liver by high-performance liquid chromatograph. Analytical Biochemistry USA. 171(2): 373–381
108. Merrill AH., Sandhoff K. (2002). Sphingolipids: metabolism and cell signaling. Biochemistry of lipids, lipoproteins and membranes. Alemania. 4:1-35.

109. Meza U., Romero ACM., Licón., Sánchez A. (2010). La membrana plasmática: modelos, balsas y señalización. *REB. México.* 29(4): 125-134.
110. Mihn M., Baker PJ., Fleming LM., Montero AM., Shaughnessy PJO., (2008). Differentiation of the bovine dominant follicle from the cohort upregulates mRNA expression for new tissue development genes. *Reproduction Research. UK.* 135:253–265.
111. Milhas D., Clarke CL., Hannun YA. (2010). Sphingomyelin metabolism at the plasma membrane: Implications for bioactive sphingolipids. *ELSEVIER. USA.* 584:1887-1893.
112. Mizugishi K., Yamashita T., Olivera A., Miller GF., Spiegel S., Proia RL. (2005). Essential role for sphingosine kinases in neural and vascular development. *Mol Cell Biol. USA.* 25:11113–11121.
113. Montaña EL., Ruíz CZT. (2005). ¿Por qué no ovulan los primeros folículos dominantes de las vacas Cebú posparto en el trópico colombiano. *Rev Col. Pec. Colombia.* 18(2).
114. Morita Y., Tilly JL. (2000). Sphingolipid regulation of female gonadal cell apoptosis. *Annals of the New York Academy of Sciences.* 905:209-220.
115. Movassagh M., Foo RSY. (2008). Simplified apoptotic cascades. *Heart Fail Rev. Inglaterra.* 13:111–119.
116. Mullen TD., Spassieva S., Jenkins RW., Kitatani K., Bielawski J., Hannun YA., Obeid LM. (2010). Selective knockdown of ceramide synthases reveals complex interregulation. *Journal of lipids research. South Carolina.* 1-40.
117. Navarrete SCL., Ibañez GC. (2008). Rol de la Apoptosis en la Fisiopatología del Lupus Eritematoso Sistémico. *Revista Chilena de Reumatología. Chile.* 24(1):30-38.

118. Orrenius S., Gogvadze V., Zhivotovsky B. (2007). Mitochondrial oxidative stress: implications for cell death. *Annu Rev Pharmacol Toxicol. Suiza.* 47: 143-183.
119. Paris F., Grassme H., Cremesti A., Zager J., Fong Y., Haimovitz-Friedman A., Fuks Z., Gulbins E., Kolesnick R. (2001). Natural ceramide reverses Fas resistance of acid sphingomyelinase hepatocytes. *J. Biol. Chem. USA.* 276: 8297-8305.
120. Paugh SW., Paugh BS., Rahmani M., Kapitonov D., Almenara JA., Kordula T., Milstien S., Adams JK., Zipkin RE., Grant S., Spiegel S. (2008). A selective sphingosine kinase 1 inhibitor integrates multiple molecular therapeutic targets in human leukemia. *Blood. USA.* 112(4):1382-91
121. Pavoine C., Pecker F. (2009). Sphingomyelinases: their regulation and roles in cardiovascular pathophysiology. *Cardiovasc Res. Francia.* 82(2):175-83.
122. Pedersen HG., Watson ED., Telfer EE. (2003). Analysis of atresia in equine follicles using histology, fresh granulosa cell morphology and detection of DNA fragmentation. *Reproduction. Inglaterra.* 125:417–423.
123. Pedrero CAR. (2005). Efecto de ceramidas sintéticas sobre la inducción de necrosis en células HTC. Tesis: Instituto de Ciencias Biomédicas. Chile. pp. 1-47.
124. Peluffo MC., Stouffer RL., Tesone M. (2007). Activity and expression of different members of the caspase family in the rat corpus luteum during pregnancy and postpartum. *J Physiol Endocrinol Metab. Argentina.* 293:1215–1223.
125. Peña MJ., Góngora AO., Estrada LJ., (2007). Factores de crecimiento en el desarrollo folicular embrionario temprano e implantación. Implicaciones en la producción de embriones de bovinos. *Revista MVZ Córdoba. Colombia.* 12(001): 942-954.
126. Pettus, B. J., A. Bielawska, P. Subramanian, D. S. Wijesinghe, M. Maceyka, C. Leslie C., Evans JH., Freiberg J., Roddy P., Hannun YA. (2004).

- Ceramide 1-phosphate is a direct activator of cytosolic phospholipase A2. *J. Biol. Chem.* 279: 11320–11326.
127. Pitson SM., Xia P., Leclercq TM., Moretti PA., Zebol JR., Lynn HE., Wattenberg BW., Vadas MA. (2005). Phosphorylation-dependent translocation of sphingosine kinase to the plasma membrane drives its oncogenic signalling. *J Exp Med. Australia.* 201:49–54.
 128. Pollack M., Leeuwenburgh C. (2001). Apoptosis and Aging: Role of the Mitochondria. *Journal of Gerontology: BIOLOGICAL SCIENCES.USA.* 56(11): 475–482.
 129. Pru JK, Hendry IR, Davis JS, Rueda BR. (2002). Soluble Fas ligand activates the sphingomyelin pathway and induces apoptosis in luteal steroidogenic cells independently of stress-activated p38(MAPK). *Endocrinology. USA.* 143(11):4350-7.
 130. Pyne S., Pyne NJ. (2000). Sphingosine 1-phosphate signalling in mammalian cells. *Biochem. J. Inglaterra.* 349, 385-402.
 131. Radin NS., Shayman JA., Inokuchi J. (1993). Metabolic effects of inhibiting glucosylceramide synthesis with PDMP and other substances. *Adv. Lipid Res.* 26: 183–213.
 132. Ramírez AME., Mauricio RL. (2010). La necrosis, un mecanismo regulado de muerte celular. *IATREIA. Colombia.* 23(2): 166-177.
 133. Rodgers HFI., Van Wezel IL., Mussard ML., Kinder JE., Rodgers RJ. (2001). Atresia revisited: two basic patterns of atresia of bovine antral follicles. *Reproduction. USA.* 122: 761–775.
 134. Rodgers RJ., Rodgers HFI. 2010. Morphological classification of bovine ovarian follicles. *Reproduction Review. Australia.* 139:309-318.
 135. Romano N., Lee K., Istva M A., Jasoni CL., Herbison AE. (2008). Nonclassical Estrogen Modulation of Presynaptic GABA Terminals Modulates

- Calcium Dynamics in Gonadotropin-Releasing Hormone Neurons. *Endocrinology*. USA. 149(11):5335–5344.
136. Ronald LG., WISE M. (1992). Progesterone Directly Inhibits Pituitary Luteinizing Hormone Secretion in an Estradiol-dependent Manner. *Biology of Reproduction*. Arizona. 46: 710-714.
137. Rosales TAM. (1999). Caracterización bioquímica de la maduración y la atresia folicular en la oveja. (Tesis de Doctorado-México DF. Universidad Autónoma Metropolitana-Xochimilco.
138. Rosales TAM., Alonso I., Vergara M., Romano MC., Castillo JH., Avalos A., Rosado A., Gutiérrez GS. (2010). Vascular endothelial growth factor isoforms 120, 164 and 205 are reduced with atresia in ovarian follicles of sheep. *Animal Reproduction Science*. México DF. 122(1-2):111-117.
139. Rosales TAM., Ávalos RA., Vergara OM., Hernández PO., Ballesteros CM., García MR., Ortiz NV., Rosado A. (2000). Multiparametric study of atresia in ewe antral follicles: histology, flow cytometry, internucleosomal DNA fragmentation, and lysosomal enzyme activities in granulosa cells and follicular fluid. *Mol Reprod Dev*. México. 55:270-81.
140. Rosales TAM., Guzmán SA. (2008). Apoptosis en la atresia folicular y la regresión del cuerpo lúteo. *Tec Pecu Mex*. México. 46(2):159-182.
141. Rosales TAM., Guzmán SA. (2011). Importancia del Factor de Crecimiento del Endotelio Vascular (VEGF) y de sus receptores en el ciclo ovárico. Revisión. *Rev Mex Cienc Pecu*. México. 3(1):89-111.
142. Rosales TAM., Guzmán SA., Gutiérrez AC. (2012). Desarrollo folicular en rumiantes domésticos. *Tropical and Subtropical Agroecosystems*. México. 1:147-160.
143. Rosen H., Goetzl EJ. (2005). Sphingosine 1-phosphate and its receptors: an autocrine and paracrine network. *Nat. Rev. Immunol*. USA. 5:560-570.

144. Rubio PFJ., Roelen BAJ., Slot KA., van Tol HTA., Colenbrander B., Teerds KJ. (2004). Role of fas-mediated apoptosis and follicle-stimulating hormone on the developmental capacity of bovine cumulus oocyte complexes in vitro. *Biology of Reproduction*. Holanda. 71:790–796.
145. Ruvolo PP. (2003). Intracellular signal transduction pathways activated by ceramide and its metabolites. *Pharmacol Res. USA*. 47: 383–392.
146. Saad AF., Meacham WD., Bai A., Anelli V., Elojeimy S., Mahdy AE, Turner LS., Cheng J., Bielawska A., Bielawski J, Keane TE, Obeid LM, Hannun YA, Norris JS, Liu X. (2007). The functional effects of acid ceramidase overexpression in prostate cancer progression and resistance to chemotherapy. *Cancer Biol Ther. USA*. 6:1455–1460.
147. Saddoughi SA., Song P., Ogretmen B. (2008). Roles of bioactive sphingolipids in cancer biology and therapeutics. *Subcell Biochem. USA*. 49: 413–440.
148. Salha O., Abusheikha N., Sharma V. (1998). Dynamics of human follicular growth and in-vitro oocyte maturation. *Human Reprod Update. UK*. 4(6):818-32
149. Sánchez AM. Díaz LI. (2006). Papel de los esfingolípidos en la senalización celular. *Dianas. España*.1(1): 1-10.
150. Sánchez R., Arboleda G. (2008). Mitocondria y muerte celular. *Publicación Científica EN CIENCIAS BIOMÉDICAS. Colombia*. 6(10):190-200.
151. Sánchez SV. (2001). Mecanismos reguladores de la muerte celular no necrótica. *Rev Cubana Invest Biomed. Cuba*. 20(4):266-74.
152. Sankala HM., Hait NC., Paugh SW., Shida D., Lepine S., Elmore LW., Dent P., Milstien S., Spiegel S. (2007). Involvement of sphingosine kinase 2 in p53-independent induction of p21 by the chemotherapeutic drug doxorubicin. *Cancer Res USA*. 67:10466–10474.

153. Savtchouk IA., Mattie FJ., Ollis AA. (2007). Ceramide: from embryos to tumors. *Sci STKE. USA.* (394).
154. Scaffidi C., Schmitz I., Krammer PH., Peter ME. (1999) The role of c-FLIP in modulation of CD95-induced apoptosis. *J Biol Chem. Alemania.* 274 :1541–1548.
155. Schimmer AD. (2004). Inhibitor of apoptosis proteins: translating basic knowledge into clinical practice. *Cancer Res. Canadá.* 64 :7183–90. 99.
156. Schutze S., Potthoff K., Machleidt T., Berkovic D., Wiegmann K., Kronke M. (1992). TNF activates NF-kappa B by phosphatidylcholine - specific phospholipase C-induced "acidic" sphingomyelin breakdown. *Cell. Alemania.* 71:765–776.
157. Segui, B., Andrieu-Abadie, N., Adam-Klages, S., Meilhac, O., Kreder, D., Garcia, V., Bruno, A. P., Jaffrezou, J. P., Salvayre, R., Kronke, M. and Levade, T. (1999). CD40 signals apoptosis through FAN-regulated activation of the sphingomyelin-ceramide pathway. *J. Biol. Chem. Alemania.* 274: 37251-37258.
158. Sharma RK. (2000). Follicular atresia in goat: A review. *J Anim Sci. Indian.* 70:1035-1046.
159. Shimizu T., Jayawardana BC., Tetsuk M., Miyamoto A. (2007). Differential effect of follicle-stimulating hormone and estradiol on expressions of vascular endothelial growth factor (VEGF) 120, VEGF 164 and their receptors in bovine granulosa cells. *Journal of Reproduction and Development. Japan.* 53(1):105-112.
160. Shimizu T., Jiang JY., Iijima K., Miyabayashi K., Ogawa Y., Sasada H., Sato E. (2003). Induction of follicular development by direct single injection of vascular endothelial growth factor gene fragments into the ovary of miniature gilts. *Biol Reprod. Japón.* 69(4):1388-93.
161. Shu X., Wu W., Mosteller RD., Broek D. (2002). Sphingosine kinase mediates vascular endothelial growth factor-induced activation of ras and mitogen-activated protein kinases. *Mol Cell Biol. USA.* 22(22):7758-68.

162. Singh A., Bastian TS., Ceena DE., Varghese VI. (2010). Apoptosis: a review. *Oral & Maxillofacial Pathology Journal*. 1(2):1-8.
163. Siskind LJ. (2005). Mitochondrial ceramide and the induction of apoptosis. *J Bioenerg Biomembr. USA*. 37(3): 143–153.
164. Skinner DC., Caraty A., Allingham R. (2001). Unmasking the progesterone receptor in the preoptic area and hypothalamus of the ewe: no colocalization.
165. Spiegel S., Milstien S. (2003). Sphingosine-1-phosphate: an enigmatic signalling lipid. *Nat Rev Mol Cell Biol. USA*. 4:397–407.
166. Sterin SN., Leocata NF. (2007). Los esfingolipidos en la muerte y proliferación celular. *Química viva. Argentina*. 3(6):112-138.
167. Sukocheva O., Wadham C., Holmes A., Albanese N., Verrier E., Feng F., Bernal A., Derian CK., Ullrich A., Vadas MA., Xia P. (2006). Estrogen transactivates EGFR via the sphingosine 1-phosphate receptor Edg-3: the role of sphingosine kinase-1. *J. Cell. Biol. Australia*. 173, 301-310.
168. Sukocheva O., Wadham C., Holmes A., Albanese N., Verrier E., Feng F., Bernal A., Derian CK., Ullrich A., Vadas MA., Xia P. (2003). Estrogen transactivates EGFR via the sphingosine 1-phosphate receptor Edg-3: the role of sphingosine kinase-1. *Journal of Cell Biology. Alemania*. 173(2): 301-3010.
169. Susin SA., Daugas E., Ravagnan L., Samejima K., Zamzami N., Loeffler M., Costantini P., Ferri KF., Irinopoulou T., Prevost MC., Brothers G., Mak TW., Penninger J., Earnshaw WC., Kroemer G. (2000). Two distinct pathways leading to nuclear apoptosis. *J Exp Med. Francia*. 192:571–80.
170. Syntichaki P., Tavernarakis N. (2002). Uncontrollable catastrophe, or is there order behind the chaos? *EMBO Reports. Grecia*. 3(7): 604-609.
171. Takabe K., Paugh SW., Milstien S., Spiegel S. (2008). Inside-Out” Signaling of Sphingosine-1-Phosphate: Therapeutic Targets. *PHARMACOLOGICAL REVIEWS. USA*. 60(2): 181-195.

172. Tamanini C., De Ambrogi M. (2004). Angiogenesis in developing follicle and corpus luteum. *Reprod Domest Anim. Italia.* 39:206-216.
173. Tepper AD., Diks SH., van Blitterswijk WJ., Borst J. (2000). Glucosylceramide synthase does not attenuate the ceramide pool accumulating during apoptosis induced by CD95 or anti-cancer regimens. *J. Biol. Chem. Holanda.* 275: 34810-34817.
174. Testai FD., Landek MA., Dawson G. (2004). Regulation of sphingomyelinases in cells of the oligodendrocyte lineage. *J Neurosci Res. USA.;*75:66–74.
175. Thackray VG., Hunnicutt JL., Memon AK., Ghochani Y., Mellon L. (2009). Progesterone Inhibits Basal and Gonadotropin-Releasing Hormone Induction of Luteinizing Hormone β Subunit Gene Expression. *Endocrinology. USA.* 150(5):2395–2403.
176. Thon L., Mohlig H., Mathieu S., Lange A., Bulanova E., Winoto-Morbach S., Schutze S., Bulfone-Paus S., Adam D. (2005). Ceramide mediates caspase-independent programmed cell death. *Faseb J. Alemania.* 19:1945–1956.
177. Tilly JL., Kowalski KI., Johnson AL., Hsueh AJ. (1991). Involvement of apoptosis in ovarian follicular atresia and postovulatory regression. *Endocrinology. USA.* 129:2799–2801.
178. Ting-Jun Fan TJ., Han LH., Cong RS., Liang J. (2005). Caspase family proteases and apoptosis. *Acta Biochimica et Biophysica Sinica. China.* 37(11): 719–727.
179. Townson DH., Combelles CMH. (2011). Ovarian follicular atresia. *USA.*
180. Turk B., Turk V. (2009). Lysosomes as “suicide bags” in cell death: myth or reality? *Journal of Biological Chemistry. Eslovenia.* 284(33): 21783–21787.

181. Valdez KE., Peder CS., Turzillo AM. (2005). Regulation of apoptosis in the atresia of dominant bovine follicles of the first follicular wave following ovulation. *Reproduction and Fertility*. 1470–1626.
182. Van Brocklyn JR., Jackson CA., Pearl DK., Kotur MS., Snyder PJ., Prior TW. (2005). Sphingosine kinase-1 expression correlates with poor survival of patients with glioblastoma multiforme: roles of sphingosine kinase isoforms in growth of glioblastoma cell lines. *J Neuropathol Exp Neurol*. USA 64:695–705.
183. van Loo G., van Gurp M., Depuydt B., Srinivasula SM., Rodriguez I., Alnemri ES., Gevaert K., Vandekerckhove J., Declercq W., Vandenabeele P. (2002). The serine protease Omi/HtrA2 is released from mitochondria during apoptosis. Omi interacts with caspase-inhibitor XIAP and induces enhanced caspase activity. *Cell Death Differ*. Belgica. 9:20–6.
184. van Meer G., Voelker DR., Feigenson GW. (2008). Membrane lipids: where they are and how they behave. *Nat Rev Mol Cell Biol*. Holanda. 9:112-124.
185. Van Wezel IL., Dharmarajan AM., Lavranos TC., Rodgers RJ. (1999). Evidence for alternative pathways of granulosa cell death in healthy and slightly atretic bovine antral follicles. *Endocrinology*. Australia. 140(6): 2602–2612.
186. Vázquez CJF., Olivera AM. (2010). Señalización celular en el folículo antral bovino. *Orinoquia*. Redalyc. Colombia. 14(2): 178-187.
187. Venkataraman K., Lee YM., Michaud J., Thangada S., Ai Y., Bonkovsky HL., Parikh NS., Habrukowich C., Hla T. (2008). Vascular endothelium as a contributor of plasma sphingosine 1 phosphate. *Circ Res*. Corea. 102(6): 669–676.
188. Venkataraman K., Futerman AH. (2000) Ceramide as a second messenger : sticky solutions to sticky problems. *Trends Cell Biol*. Israel. 10: 408-412.
189. Vickers SL., Cowan RG., Harman RM., Porter DA., Quirk SM. (2000). Expression and Activity of the Fas Antigen in Bovine Ovarian Follicle Cells. *Biology of Reproduction*. USA. 62(1): 54-61.

190. Villa NY., Kupchak BR., Garitaonandia I., Smith JL., Alonso E., Alford C., Cowart LA., Hannun YA., Lyons TJ. (2009). Sphingolipids function as downstream effectors of a fungal PAQR. *Mol Pharmacol. USA.* 75(4):866-75.
191. Villena J., Henriquez M., Torres V., Moraga F., Díaz EJ., Arredondo C., Chiong M., Olea CA., Stutzin A., Lavandero S., Quest AFG. (2008). Ceramide-induced formation of ROS and ATP depletion trigger necrosis in lymphoid cells. *Free Radic Biol Med. Chile.* 44: 1146-1160.
192. Wang X., Wu Y., Tan L., Tian Z., Liu JH., Zhu DS., Zeng SM. (2012). Follicle-Stimulating Hormone Regulates Pro-apoptotic Protein Bcl-2-interacting Mediator of Cell Death-extra long (BimEL) Induced Porcine Granulosa Cell Apoptosis. *The Journal of Biological Chemistry. China.* 10:1074.
193. Wezel ILV., Dharmarajan AM., Lavranos TC., RODGERS RJ. (1999). Evidence for alternative pathways of granulosa cell death in healthy and slightly atretic bovine antral follicles. *Endocrinology. USA.* 140(6): 2602–2612.
194. Woodcock J. (2006). Sphingosine and Ceramide Signalling in Apoptosis. *IUBMB Life. Australia.* 58(8): 462 – 466.
195. Wooten-Blanks LG, Song P, Senkal CE, Ogretmen B. (2007). Mechanisms of ceramide-mediated repression of the human telomerase reverse transcriptase promoter via deacetylation of Sp3 by histone deacetylase 1. *FASEB J. USA.* 21:3386–3397.
196. Wulff C., Wilson H., Wiegand SJ., Rudge JS., Fraser HM. (2002). Prevention of thecal angiogenesis, antral follicular growth, and ovulation in the primate by treatment with vascular endothelial growth factor Trap R1R2. *Endocrinology.* 143:2797-2807.
197. Yang MJ., 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 Cultured Bovine Granulosa Cells. *Biology of Reproduction*. Canadá. 62:1209–1217.
198. Young JM., McNeilly AS. (2010). Theca: the forgotten cell of the ovarian follicle. *Reproduction*. Gran Bretaña. 140 489–504.
199. Yu YS., Sui HS., Han ZB., Li W., Luo MJ., Tan JH. (2004). Apoptosis in Granulosa cells during follicular atresia: relationship with steroids and insulin-like growth factors. *Cell Research*. China. 14(4):341-346.
200. Yu YS., Sui HS., Han ZB., Li W., Luo MJ., Tan JH. (2004). Apoptosis granulosa cells during follicular atresia relationship with esterooids and insulin-like growth factors. *Cell Research*. China. 14(4): 341-346.
201. Yuan W., Giudice LC. (1997). Programmed cell death in human ovary is a function of follicle and corpus luteum status. *J Clin Endocrinol Metab*. USA. 82:3148–3155.
202. Zager RA. (2000). Sphingomyelinase and Membrane Sphingomyelin Content: Determinants of Proximal Tubule Cell Susceptibility to Injury. *J Am Soc Nephrol* USA. 11: 894–902.
203. Zeuner A., Muller K., Reguszynski K., Jeugenow K. (2003). Apoptosis within bovine follicular cells and its effect on oocyte development during in vitro maturation. *Theriogenology*. 59:1421-1433.
204. Zhou H., Murthy KS. (2004). Distinctive G protein-dependent signalling in smooth muscle by sphingosine 1-phosphate receptors S1P1 and S1P2. *Am. J. Physiol. Cell Physiol*. USA. 286:1130-1138.
205. Zielak AE., Forde N., Park SD., Doohan F., Coussens PM., Smith GW. (2007). Identification of novel genes associated with dominant follicle development in cattle. *Reprod Fertil Dev*. USA. 19: 967-975.
206. Zimmermann RC., Hartman T., Kavic S., Pauli SA., Bohlen P., Sauer MV., Kitajewski J. (2003). Vascular endothelial growth factor receptor 2-mediated

angiogenesis is essential for gonadotropin-dependent follicle development. *J Clin Invest. USA.* 112(5):659-69.

207. Zong WX., Thompson CB. (2006). Necrotic death as a cell fate. *Genes Dev. Pennsylvania.* 20: 1-15.