

# Apoptosis en la atresia folicular y la regresión del cuerpo lúteo. Revisión

## Apoptosis in follicular atresia and luteal regression. Review

Ana María Rosales Torres<sup>a</sup>, Adrián Guzmán Sánchez<sup>b</sup>

### RESUMEN

En esta revisión se analizan las principales moléculas que participan en la supervivencia y la muerte por apoptosis de las células de los folículos antrales y del cuerpo lúteo (CL). Las gonadotropinas, los estrógenos y factores de crecimiento como IGF-I y VEGF, deben estar presentes en el ambiente folicular para que el folículo se mantenga sano. Mientras que la progesterona, LH y los factores de crecimiento mencionados, son vitales para las células del CL. En la apoptosis de las células ováricas, igual que en otros tipos celulares, participan una gran variedad de moléculas, dentro de las que destacan: Fas/FasL y otros integrantes de la familia del factor de necrosis tumoral (TNF) y sus ligandos, miembros proapoptóticos de la familia de proteínas Bcl-2 (Bax, Bok, Bim, Bad y Bid), citocromo c, Factor Inductor de Apoptosis (AIF), Factor activador de la apoptosis (Apaf-1), p53, caspasas de iniciación (1, 8 y 9), caspasas efectoras (3, 6 y 7), Smac/Diablo y proteínas inhibidoras de la Apoptosis (IAPs). Un ambiente folicular con bajos niveles de factores de supervivencia, incrementa la expresión de Fas y su interacción con el ligando FasL en las células foliculares, provocándoles la muerte por apoptosis, sin embargo, este ambiente inadecuado también puede ocasionar la liberación de proteínas proapoptóticas desde la mitocondria. La apoptosis en las células lúteas es inducida por la PGF2-a, la cual incrementa la expresión de miembros proapoptóticos tales como Bax y de receptores de muerte (RTNF- $\alpha$ )

**PALABRAS CLAVE:** Muerte celular, Apoptosis, Atresia folicular, Regresión del cuerpo lúteo.

### ABSTRACT

This review analyzes the primary molecules involved in survival and in apoptotic death of antral follicle and corpus luteum (CL) cells. Gonadotropins, estrogens and growth factors such as IGF-I and VEGF, must be present in the follicular environment for follicles to remain healthy. While progesterone, LH and the growth factors mentioned above are vital for CL cells and for ovarian cell apoptosis. A large number of molecules participate in these processes, particularly: Fas/FasL and other members of the tumor necrosis factor (TNF) family and their ligands, pro-apoptotic members of the Bcl-2 protein family (Bax, Bok, Bim, Bad and Bid), cytochrome c, apoptosis-inducing factor (AIF), apoptotic protease activating factor 1 (Apaf-1), p53, initiator caspases (1, 8 and 9), effector caspases (3, 6 and 7), Smac/Diablo and the inhibitor of apoptosis proteins (IAPs). A follicular environment with low survival factor levels increases Fas expression and its interaction with ligand FasL in follicular cells, which results in apoptotic death; however, this inadequate environment can also cause the release of pro-apoptotic proteins from the mitochondrion. Apoptosis in luteal cells is induced by PGF2-a, which increases the expression of pro-apoptotic members such as Bax and death receptors (RTNF- $\alpha$ ).

**KEY WORDS:** Cell death, Apoptosis, Follicular atresia, Luteal regression.

### INTRODUCCIÓN

El desarrollo folicular en el ovario de los mamíferos es iniciado por la proliferación de las células de la granulosa alrededor del ovocito<sup>(1)</sup> y posteriormente

### INTRODUCTION

Follicular development in the mammalian ovary initiates by proliferation of granulosa cells around the oocyte<sup>(1)</sup>, which is followed by differentiation

Recibido el 12 de octubre de 2006. Aceptado para su publicación el 15 de noviembre de 2007.

<sup>a</sup> Departamento de Producción Agrícola y Animal. Universidad Autónoma Metropolitana-Xochimilco. Calzada del Hueso 1100, Col. Villa Quietud, Delegación Coyoacán, 04960, D.F. México, edificio 34. Tel. 5483 7000 ext 3082 anamaria@correo.xoc.uam.mx. Correspondencia al primer autor.

<sup>b</sup> Facultad de Medicina Veterinaria y Zootecnia. UNAM.

por la diferenciación de las células intersticiales del estroma para formar la teca inicial<sup>(2)</sup>. Tanto la granulosa como la teca proliferan durante la subsiguiente etapa de desarrollo y crecimiento folicular, y darán lugar a un grupo de folículos pre-antrales y posteriormente antrales, de los cuales se seleccionarán los folículos dominantes. Aquellos folículos que no son seleccionados como dominantes, así como aquellos dominantes que no sean ovulados, se eliminarán por un proceso conocido como atresia<sup>(3)</sup>. La atresia ocurre en cualquier etapa del desarrollo folicular, aunque es más frecuente en los folículos antrales. Que un folículo ovule o sufra atresia, es determinado por el balance de señales que reciben sus células. Si el folículo mantiene su integridad y es seleccionado para la ovulación, el pico preovulatorio de LH desencadena una serie de eventos entre los que destacan: el reinicio de la meiosis del ovocito y la diferenciación de las células de la granulosa y teca a células lúteas, formando del cuerpo hemorrágico y posteriormente el lúteo (CL), capaz de producir una gran cantidad de progesterona<sup>(4,5)</sup>. Si el óvulo no es fecundado, el CL debe desaparecer (luteólisis) para que la hembra inicie un nuevo ciclo estral. Tanto en la atresia como en la regresión del CL, un evento fundamental, es la pérdida controlada de células por medio del mecanismo de apoptosis. En esta revisión se presenta una descripción de la atresia de los folículos antrales y la regresión del cuerpo lúteo, y un análisis de las principales moléculas que disparan la apoptosis en estos eventos.

#### *Desarrollo folicular y atresia*

El desarrollo de los folículos después de la pubertad ocurre en la mayoría de las especies domésticas en un patrón similar a olas, en donde de forma sincrónica, un grupo o cohorte de folículos antrales tempranos, con un tamaño similar sufrirán un proceso de selección para dar lugar al o a los folículos dominantes<sup>(6,7)</sup>. En bovinos, se han descrito de dos a tres olas a lo largo del ciclo estral, que se inician aproximadamente los días 1, 9 y 16 del ciclo<sup>(8)</sup>. Cada ola se caracteriza por un pico transitorio de la hormona folículo estimulante (FSH), que estimula el crecimiento de alrededor

of interstitial stromal cells to form the initial theca<sup>(2)</sup>. Both granulosa and theca proliferate during the next stage of gonadotropin independent follicular development and growth. Antral follicle growth is divided into three consecutive phases; recruitment, selection and dominance. Non-selected and dominant follicles that are not ovulated, are eliminated by a process known as atresia<sup>(3)</sup>. Atresia occurs at any stage of follicular development, although it is more frequent in antral follicles. The balance of signals received by the cells determines if a follicle ovulates or presents atresia. If the follicle maintains its integrity and is selected for ovulation, the pre-ovulatory LH peak triggers a series of events, primarily the re-initiation of oocyte meiosis and differentiation of granulosa and theca cells into luteal cells forming the corpus hemorrhagicum and subsequently the corpus luteum (CL), which is capable of producing a large amount of progesterone<sup>(4,5)</sup>. If the oocyte is not fertilized, the CL disappears (luteolysis) allowing the female to start a new estrus cycle. Both in atresia and in luteal regression, controlled cell loss through apoptosis is essential. The present review describes antral follicle atresia and luteal regression, and analyzes the primary molecules that trigger apoptosis during these events.

#### *Follicular development and atresia*

Follicle development following puberty occurs in most domestic species in a wave-like pattern, during which a cluster or cohort of early antral follicles of similar size synchronically undergo a selection process to become dominant follicles<sup>(6,7)</sup>. In bovines, 2 to 3 waves have been described throughout the estrus cycle, starting approximately on d 1, 9 and 16 of the cycle<sup>(8)</sup>. Each wave is characterized by a transient peak of the follicle-stimulating hormone (FSH), which stimulates the growth of about five follicles of 4 to 5 mm diameter. This period is known as cyclic recruitment; one of these follicles is selected to continue growing (dominant follicle), which in turn exercises dominance on the other growing follicles (subordinate follicles)<sup>(9,10)</sup>. All the follicles that are not selected as dominant undergo a degenerative process known as follicular atresia by which they

de cinco folículos de diámetro entre 4 y 5 mm; este periodo se conoce como reclutamiento cíclico, una etapa de selección, en la cual uno de estos folículos es elegido para continuar creciendo (folículo dominante) y por último, la dominancia que ejerce este folículo sobre el crecimiento de los folículos que comenzaron a crecer con él (folículos subordinados)<sup>(9,10)</sup>. Todos los folículos que no son seleccionados como dominantes, sufren un proceso degenerativo conocido como atresia folicular mediante el cual son eliminados del ovario<sup>(11)</sup>. Por otro lado, si la lisis del CL coincide con la dominancia folicular en una de las tres olas, el folículo dominante podrá ovular, sí esto no sucede, este folículo al igual que sus contemporáneos será eliminado del ovario por el proceso de atresia.

Los mecanismos que regulan el proceso de selección y dominancia han sido estudiados ampliamente aunque no se tienen completamente entendidos. Se sabe actualmente que la capacidad de respuesta a gonadotropinas, la capacidad de producir estradiol<sup>(8,12,13,14)</sup>, la participación del sistema de factor de crecimiento insulinoide (IGF)<sup>(15,16)</sup>, y el medio endocrinológico en el que se desarrollan<sup>(8)</sup>, son factores importantes que determinan el destino hacia la ovulación o la atresia de los folículos.

#### *Atresia folicular*

La atresia es el destino de la gran mayoría de los folículos que pueblan el ovario de los vertebrados<sup>(17)</sup>. Los mecanismos intraováricos que regulan el crecimiento y desarrollo de un número específico de folículos que llegarán a la ovulación en cada especie son pobremente entendidos. Los folículos que comienzan su desarrollo en un ciclo estral y no son ovulados, se volverán atrésicos<sup>(18)</sup>. La atresia folicular es considerada uno de los eventos más enigmáticos de la biología reproductiva<sup>(19)</sup>.

El término atresia es de origen griego, literalmente significa la clausura u obliteración de un orificio o conducto del cuerpo<sup>(20)</sup>. 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; los más grandes presentan un índice

are eliminated from the ovary<sup>(11)</sup>. On the other hand, if luteolysis coincides with follicular dominance during one of the three waves, the dominant follicle can ovulate; if this is not the case, this follicle, as all other contemporary follicles, will be eliminated from the ovary by the process of atresia.

The mechanisms that regulate the selection and dominance process have been widely studied although they are not completely understood. It is currently known that the capacity of response to gonadotropins and to produce estradiol<sup>(8,12,13,14)</sup>, the participation of the insulin-like growth factor (IGF) system<sup>(15,16)</sup> and the endocrinologic environment in which follicles develop<sup>(8)</sup> are important factors that determine if follicles undergo ovulation or atresia.

#### *Follicular atresia*

Atresia is the destiny of most follicles in the vertebrate ovaries<sup>(17)</sup>. The intra-ovarian mechanisms regulating growth and development of a specific number of follicles that reach ovulation are poorly understood in all species. Follicles that initiate their development in an estrus cycle and are not ovulated will become atretic<sup>(18)</sup>. Follicular atresia is considered one of the most enigmatic events in reproduction biology<sup>(19)</sup>. The term atresia is of Greek origin and literally means closure or obliteration of a body opening or conduct<sup>(20)</sup>.

Atresia occurs at any stage of follicular development although it is more frequent in antral follicles; its incidence is directly related to follicle size. Larger follicles present a higher proliferation index which makes their cells more susceptible to apoptotic death and, therefore, to atresia<sup>(21)</sup>.

In natural conditions, atresia is a gradual irreversible degenerative process that extends to the whole follicle, which loses its integrity and functionality<sup>(22,23)</sup>.

Some morphological and histological changes are particularly important in atresia: pycnotic nuclei and/or nuclear fragmentation in granulosa cells, detachment of granulosa cells due to loss of the

proliferativo mayor, que hace a sus células más susceptibles a la muerte por apoptosis y por lo tanto a la atresia<sup>(21)</sup>.

En condiciones naturales, la atresia es un proceso degenerativo, paulatino e irreversible, que se extiende en todo el folículo, con lo cual, éste pierde su integridad y funcionalidad<sup>(22,23)</sup>.

En la atresia, destacan algunos cambios morfológicos e histológicos, como son: núcleos picnóticos y fragmentación nuclear en las células de la granulosa, desprendimiento de las células de la granulosa por la pérdida de la matriz intercelular, desprendimiento del complejo cumulus-ovocito y en algunos casos hipertrofia de las células de la teca<sup>(22)</sup>. Además, ocurren procesos bioquímicos como la reducción en la síntesis y por ende en la cantidad de ADN en células de la granulosa<sup>(24,25)</sup>, pérdida de uniones comunicantes, pérdida de receptores a gonadotropinas<sup>(26)</sup>, así como la disminución en la síntesis y expresión de RNAm para aromatasas y receptores a gonadotropinas<sup>(27)</sup>. Es importante resaltar el aumento en la expresión de varios genes, entre ellos, el de las proteínas unidoras del Factor de Crecimiento Insulinoide (IGBPs)<sup>(28)</sup>, el de la glicoproteína -2-sulfatada (TRPM-2)<sup>(29)</sup>, el de una aspartil endopeptidasa, la catepsina-D y el del receptor para la angiotensina II<sup>(30)</sup>. Además, en la atresia participan enzimas lisosomales (fosfatasa ácida y glucosaminidasa)<sup>(25)</sup>, con actividad anti-tripsina<sup>(31)</sup>, las involucradas en la remodelación tisular como colagenasas, gelatinasas, Pz-peptidasa<sup>(32)</sup> y el activador del plasminógeno entre otras<sup>(33)</sup>.

La presencia de núcleos picnóticos y cariorrexis en las células de la granulosa y teca de folículos atrésicos<sup>(3,34)</sup>, así como estudios bioquímicos posteriores que demostraron la fragmentación internucleosomal del ADN en estas células, han permitido conocer que la apoptosis es el tipo de muerte preponderante en la atresia<sup>(35,36)</sup>, aunque no el único<sup>(25)</sup>.

#### *Desarrollo y regresión del cuerpo lúteo*

El pico preovulatorio de LH desencadena una serie de eventos que culminan con la ovulación del

intercellular matrix, detachment of the cumulus-oocyte complex and, in some cases, hypertrophy of theca cells<sup>(22)</sup>. Other biochemical processes include synthesis reduction and, therefore, a decrease in the amount of DNA in granulosa cells<sup>(24,25)</sup>, loss of gap junctions, loss of gonadotropin receptors<sup>(26)</sup>, as well as decrease in mRNA synthesis and expression of aromatasas and gonadotropin receptors<sup>(27)</sup>. Also important is the increase in expression of several genes including those for insulin-like growth factor binding proteins (IGBPs)<sup>(28)</sup>, sulfated glycoprotein-2 (TRPM-2)<sup>(29)</sup>, of an aspartyl endopeptidase labeled cathepsin-D and of the angiotensin II receptor<sup>(30)</sup>. Some of the enzymes involved in atresia are lysosomal enzymes (acid phosphatase and glucosaminidase)<sup>(25)</sup>, anti-trypsin enzymes<sup>(31)</sup>, those involved in tissue remodeling such as collagenases, gelatinases, Pz-peptidase<sup>(32)</sup> and plasminogen activator, among others<sup>(33)</sup>.

The presence of pycnotic nuclei and karyorrhexis in granulosa and theca cells of atretic follicles<sup>(3,34)</sup>, as well as DNA internucleosomal fragmentation shown by biochemical studies in these cells, have identified apoptosis as the predominant type of cell death in atresia<sup>(35,36)</sup>, albeit not the only one<sup>(25,42)</sup>.

#### *Development and luteal regression*

The pre-ovulatory LH peak triggers a series of events that result in follicle ovulation. Shortly before ovulation, the oocyte reinitiates meiosis and follicular cells are luteinized. Granulosa cells differentiate into large luteal cells (LLC), while theca cells differentiate into small luteal cells (SLC)<sup>(4)</sup> capable of producing progesterone. This is the result of an increase in expression of the enzymes that convert cholesterol to progesterone (P450 ssc and 3 $\beta$ -HSD) and a decrease in expression of those that convert progesterone to estrogens (P450-17- $\alpha$  and P450arom)<sup>(12)</sup>.

After ovulation, the follicle antral cavity is filled with blood: for this reason, it is called the corpus hemorrhagicum. Small luteal cells, fibroblasts and endothelial cells proliferate, and large luteal cells duplicate in size without modifying their number

foliculo. Poco antes de la ovulación, el ovocito reinicia la meiosis y se luteinizan las células foliculares. Las células de la granulosa se diferencian a células lúteas grandes (LLC) y las de la teca a células lúteas pequeñas (SLC)<sup>(4)</sup>, capaces de producir progesterona, lo cual ocurre por el incremento en la expresión de enzimas que convierten colesterol a progesterona (P450ssc y 3 $\beta$ -HSD) y el decremento en la expresión de las que convierten progesterona a estrógenos (P450-17- $\alpha$  y P450arom)<sup>(12)</sup>.

Después de la ovulación, la cavidad antral del foliculo se llena de sangre, razón por la cual a la estructura se le denomina cuerpo hemorrágico, las células lúteas pequeñas, fibroblastos, y células endoteliales proliferan, y las células lúteas grandes duplican su tamaño sin modificar su número, hasta formar una masa compacta de células a la que propiamente se le denomina CL<sup>(4,7)</sup>.

#### *Regresión del cuerpo lúteo*

Cuando el ovocito no es fecundado o es fecundado y el embrión muere tempranamente, el CL sufre un proceso de regresión alrededor del día 16 del ciclo estral en bovinos<sup>(37)</sup> por un proceso denominado luteólisis, que ocurre como resultado de la liberación pulsátil de prostaglandina F2- $\alpha$  (PGF2- $\alpha$ ) en el endometrio<sup>(38)</sup>. La regresión funcional del CL involucra principalmente una reducción en la secreción de progesterona, mientras que la regresión estructural involucra alteraciones en la estructura celular de la glándula y una gradual involución dentro del ovario, para formar una pequeña cicatriz compuesta de tejido conectivo fibroso a la que se le denomina cuerpo *albicans*<sup>(39)</sup>.

El efecto luteolítico de la PGF2- $\alpha$ , ocurre principalmente por acción vaso constrictora sobre del endotelio vascular que irriga al CL, como consecuencia habrá una menor llegada de nutrientes, oxígeno y colesterol necesarios para la esteroidogénesis; además esta hormona puede tener efecto directo sobre los receptores a hormonas luteotrópicas, captación de colesterol por la célula, la expresión de enzimas esteroidogénicas y el transporte de colesterol hacia la mitocondria<sup>(4)</sup>.

until they form a compact mass of cells known as CL<sup>(4,7)</sup>.

#### *Luteal regression*

When the oocyte is not fertilized or it is fertilized but the embryo dies early, the CL undergoes a regression process around d 16 of the estrus cycle in bovines<sup>(37)</sup> by a process known as luteolysis, which is the result of the pulsatile release of prostaglandin F2- $\alpha$  (PGF2- $\alpha$ ) into the endometrium<sup>(38)</sup>. CL functional regression primarily involves a reduction in progesterone secretion, while structural regression involves alterations in gland cellular structure and a gradual involution within the ovary to form a small scar constituted by fibrous connective tissue called the corpus albicans<sup>(39)</sup>.

The luteolytic effect of PGF2- $\alpha$  is mainly caused by vasoconstriction of the vascular endothelium that irrigates the CL, causing a decrease in nutrient, oxygen and cholesterol levels required for steroidogenesis. This hormone can have a direct effect on luteotropic hormone receptors; cell cholesterol uptake, steroidogenic enzyme expression and transport of cholesterol to mitochondrion<sup>(4)</sup>.

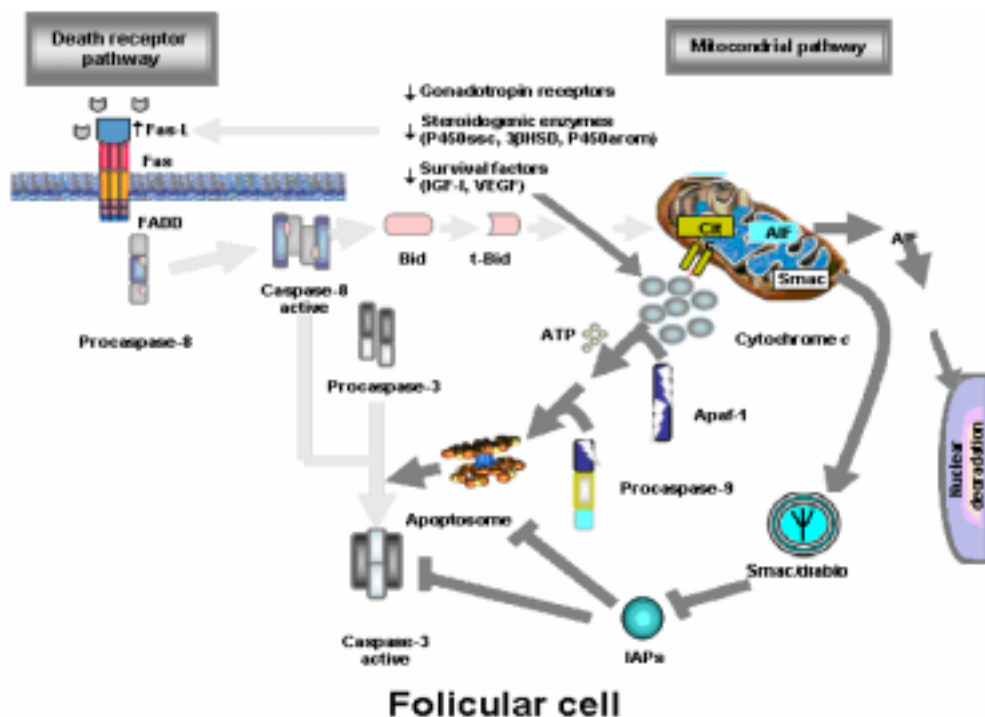
#### *Apoptosis in follicular atresia and luteal regression*

Apoptosis or programmed cell death is a genetically regulated process that plays an essential role in the development and homeostasis of higher organisms. This process can be initiated by a large variety of death signals, such as ligands and the interaction with their receptors, problems in energy metabolism and redox potential, ceramide generation, Ca<sup>++</sup> mobilization and activation or inactivation of the Bcl-2 protein family<sup>(40)</sup>. Death signals initiate the apoptosis process by altering the balance between pro- and anti-apoptotic factors<sup>(41)</sup> (Figure 1).

Atretic follicle cells present morphological and biochemical features characteristic of apoptotic death as demonstrated in studies carried out by our group. These include cell shrinkage, loss of membrane phospholipid asymmetry, oligonucleosomal DNA fragmentation, increase in hypodiploid cell ratio associated with the degree of atresia in follicles<sup>(25)</sup> and alterations in mitochondrial permeability<sup>(42)</sup>.

Figura 1. La apoptosis en las células foliculares, puede seguir dos vías ocasionadas la ausencia de gonadotropinas, la pérdida de capacidad esteroidogénica o la ausencia de factores de sobrevivencia y proliferación celular: i) La liberación de proteínas proapoptóticas, tales como: citocromo c, Smac y AIF ii) Un incremento en la expresión de Fas y la interacción con su ligando FasL. La interacción Fas/FasL, activa a la proteína DISC y otra proteína adaptadora conocida como dominio de muerte asociado a Fas (FADD), la cual lleva a las caspasas iniciadoras 8 y 10 hacia DISC para activarlas. Una vez activada la caspasa 8, rompe y activa a las pro caspasas 3 y 7. Además caspasa 8 rompe el fragmento C-terminal de Bid (formando un Bid truncado (tBid), el cual se transloca en la membrana mitocondrial externa, para potenciar la liberación de factores proapoptóticos desde la mitocondria (Punto de convergencia de ambas vías). La liberación de citocromo c activa directamente Apaf-1 y en presencia de dATP o ATP, induce la formación de un complejo multimérico denominado apoptosoma, el cual media la activación de la caspasa iniciadora 9 que subsecuentemente activa a las caspasas efectoras 3 y 7, que se encargan de dismantelar a las células en apoptosis. La liberación de Smac/Diablo por su parte, activa directamente caspasas efectoras, removiendo a las proteínas inhibidoras de la apoptosis (IAPs).

Figure 1. Apoptosis in follicular cells follows one of two possible paths produced by the absence of gonadotropins, the loss of steroidogenic capacity or the absence of survival factors and cellular proliferation: i) The release of proapoptotic proteins such as cytochrome C, Smac and AIF. ii) An increase in Fas expression and interaction with its FasL ligand. The Fas/FasL interaction activates protein DISC and another adapter protein known as Fas-associated death domain (FADD), which carries the initiator caspases 8 and 10 to DISC for their activation. Once activated, caspase-8 breaks down and activates pro-caspases 3 and 7. In addition, caspase-8 breaks down the C-terminal fragment of Bid (forming a truncated Bid, tBid), which translocates in the mitochondrial outer membrane to strengthen the release of pro-apoptotic factors from the mitochondrion (convergence point of both pathways). The release of cytochrome C directly activates Apaf-1 and in presence of dATP or ATP induces the formation of a multimeric complex called apoptosome, which mediates the activation of initiator caspase-9, which in turn, activates effector caspases 3 and 7; these disassemble cells in apoptosis. The release of Smac/Diablo directly activates effector caspases removing the inhibitor of apoptosis proteins (IAPs).



### Apoptosis en la atresia folicular y la regresión del cuerpo lúteo

La apoptosis o muerte celular programada, es un proceso genéticamente regulado, que juega un papel esencial en el desarrollo y la homeostasis de organismos mayores. Este proceso puede ser iniciado por una gran variedad de señales de muerte, tales como ligandos y la interacción con sus receptores, problemas en el metabolismo de energía y potencial redox, generación de ceramidas, movilización de  $Ca^{++}$  y activación o inactivación de proteínas de la familia de Bcl-2<sup>(40)</sup>. La señal de muerte inicia el proceso de apoptosis, alterando el balance entre factores pro y anti-apoptóticos<sup>(41)</sup> (Figura 1).

Las células de folículos atrésicos presentan características morfológicas y bioquímicas características de muerte por apoptosis, como lo hemos podido constatar en trabajos realizados por nuestro grupo, dentro de las que destacan: encogimiento celular, pérdida de la asimetría fosfolipídica de la membrana, ruptura oligonucleosomal del ADN, aumento en la proporción de células hipodiploides relacionado con el grado de atresia de los folículos<sup>(25)</sup> y alteraciones en la permeabilidad mitocondria<sup>(42)</sup>.

En la atresia folicular ocurre apoptosis en las células somáticas y cuando está muy avanzada, también en el ovocito<sup>(43)</sup>. El adecuado desarrollo del folículo depende de la presencia de factores de sobrevivencia que promuevan el crecimiento del folículo y lo protejan de la apoptosis. Cuando las células de un folículo no pueden proseguir en el ciclo celular, éste entra en el proceso de atresia. En términos generales, la progresión de una célula en el ciclo celular, es mediada por una familia de ciclinas dependientes de cinasas (cdk), que son secuencialmente activadas por proteínas ciclinas sintetizadas periódicamente durante el ciclo celular<sup>(44)</sup>. La progresión de la fase G1 hacia la de síntesis o fase S, representa un punto de restricción en el cual se decide la vida o la muerte de la célula. Cuando se dispone de factores de sobrevivencia, las células foliculares siguen su camino en el ciclo celular, mientras que la carencia

de factores de sobrevivencia, apoptosis ocurre en células somáticas y, a un nivel muy avanzado, en el ovocito<sup>(43)</sup>. Adecuado desarrollo del folículo depende de la presencia de factores de sobrevivencia que promuevan el crecimiento del folículo y lo protejan de la apoptosis. Cuando las células de un folículo no pueden proseguir en el ciclo celular, éste entra en el proceso de atresia. Generalmente hablando, la progresión de una célula en el ciclo celular es mediada por ciclinas dependientes de cinasas (cdk), que son secuencialmente activadas por proteínas ciclinas sintetizadas periódicamente durante el ciclo celular<sup>(44)</sup>. La progresión de la fase G1 hacia la de síntesis o fase S, representa un punto de restricción en el cual se decide la vida o la muerte de la célula. Cuando se dispone de factores de sobrevivencia, las células foliculares continúan su ciclo celular, pero su ausencia favorece la expresión de moléculas pro-apoptóticas como Bid, causando la muerte celular. Estos factores incluyen los producidos dentro del ovario como estradiol, factor de crecimiento similar a la insulina (IGF) y VEGF, así como gonadotropinas FSH y LH. En ausencia de factores de sobrevivencia, la vía endógena de apoptosis se activa en el folículo (acción directa sobre el mitocondrion), y la atresia folicular comienza<sup>(21)</sup>.

Como se mencionó anteriormente,  $PGF2-\alpha$  causa la regresión luteal, aunque los mecanismos asociados con este proceso son inciertos; la apoptosis ha sido asociada con la regresión funcional y estructural de esta glándula. Se ha demostrado por electroforesis que el ADN de las células luteales presenta fragmentación oligonucleosomal sólo después de la regresión natural o inducida del CL<sup>(45,46)</sup>. No está claro si la apoptosis en las células luteales comienza antes o después de que  $PGF2-\alpha$  genere su acción luteolítica.

La inducción de apoptosis durante la regresión luteal es mediada por varias moléculas, aunque  $PGF2-\alpha$  es la señal primaria que inicia el proceso. Esto puede estar asociado con la disminución de la secreción de  $P4$  por las células luteales y con el efecto de  $PGF2-\alpha$  sobre los receptores de gonadotropina; algunos reportes indican que la apoptosis comienza sólo cuando los niveles de progesterona han disminuido<sup>(47)</sup>.

La administración de  $PGF2-\alpha$  a vacas búfalas produce un aumento en el porcentaje de muerte celular del CL 18 h después de la administración cuando se compara con el CL

de ellos favorece la expresión de moléculas proapoptóticas como Bid, llevando a la célula a la muerte. Para el folículo estos factores incluyen a los producidos dentro del ovario, como son el estradiol, el Factor de Crecimiento insulinoide (IGF) y el VEGF, así como a las gonadotropinas FSH y LH. En ausencia de los factores de sobrevivencia, se activa la vía de la apoptosis endógena (acción directa sobre la mitocondria) en el folículo, y se da paso a la atresia folicular (Figura 1)(21).

Como se mencionó, la PGF2- $\alpha$  es la encargada de la regresión del CL, aunque los mecanismos asociados con este proceso son poco claros, la apoptosis ha sido involucrada en la regresión funcional y estructural de esta glándula. Se ha demostrado por electroforesis que el ADN de las células lúteas, presentan ruptura oligonucleosomal, sólo después de iniciada la regresión natural o inducida del CL(45,46). No es claro si la apoptosis de las células lúteas inicia antes o una vez que PGF2- $\alpha$  ejerce su acción luteolítica.

La inducción de la apoptosis durante la regresión del CL, está mediada por varias moléculas, aunque PGF2- $\alpha$  es la principal señal iniciadora del proceso, lo cual se puede relacionar con la disminución en la secreción de P4 por las células lúteas, y con el efecto de la PGF2- $\alpha$  sobre los receptores a gonadotropinas; algunos reportes indican que sólo inicia la apoptosis cuando los niveles de progesterona han declinado(47).

La aplicación de PGF2- $\alpha$  en vacas búfalo ocasionó un incremento en el porcentaje de muerte celular en CL después de 18 h de aplicación, en comparación con CLs de vacas sin tratar, mientras que el porcentaje de muerte celular en el grupo con PGF2- $\alpha$  fue similar al observado en CL en regresión(46). En células lúteas en cultivo se observan resultados similares(48). La inhibición de la síntesis de P4 con aminoglutamina en células lúteas en cultivo, incrementa el porcentaje de apoptosis en comparación con células sin tratar, tratadas con P4 y tratadas con P4 y aminoglutamina(49).

Como hemos mencionado, la preponderancia de factores de sobrevivencia sobre los de muerte,

untreated cows, while cell death percentage in the PGF2- $\alpha$  group is similar to that observed in regression CL(46). Cultured luteal cells showed similar results(48). P4 synthesis inhibition with aminoglutethimide in cultured luteal cells increases the apoptosis percentage in comparison with untreated cells, cells treated with P4 and cells treated with P4 and aminoglutethimide(49).

The predominance of survival factors over death factors determines the destiny of ovarian structures. The primary molecules involved in this equilibrium are described below.

## SURVIVAL FACTORS

### *Hormones*

Follicle-stimulating hormone (FSH), luteinizing hormone (LH) and estradiol are the most important survival factors for antral follicles(50). In cattle, it has been known for more than a decade that the estrogen level found in a follicle is a good indicator of health conditions. Estrogen-active follicles with a higher content of estrogens in the estradiol: progesterone ratio are healthy follicles, while progesterone content is higher (estrogen-inactive follicles) since the first stages of atresia(51); this has been confirmed for other species such as sheep(25).

The high estradiol level in healthy dominant follicles is associated with the higher expression levels of aromatase mRNA, beta estrogen receptor and FSH and LH receptors in granulosa cells of dominant follicles in comparison with subordinate follicles. Estradiol levels in healthy dominant follicles have also been positively associated with the expression of genes related to cell survival, while the expression of genes associated with cell death or apoptosis predominates in estrogen-inactive follicles(52).

The inhibition of gonadotropin-mediated apoptosis in follicle granulosa cells is partially linked to changes in the expression of various genes related to cell death. These hormones can induce the expression of Bcl-2, GATA-4, FLIP and XIAP (survival molecules) and reduce the expression of



determinan el destino de las estructuras ováricas. Por tal motivo en adelante describiremos las principales moléculas involucradas en esta balanza.

## FACTORES DE SOBREVIVENCIA

### *Hormonas*

La hormona folículo estimulante (FSH), la hormona luteinizante (LH) y el estradiol son los factores de sobrevivencia más importantes para los folículos antrales<sup>(50)</sup>. Como se ha demostrado hace más de una década, en el ganado bovino el nivel de estrógenos en un folículo es un buen indicador de su estado de salud. Los folículos considerados estrógeno activos, cuya relación estradiol: progesterona es en favor de los estrógenos, son folículos sanos, mientras que esta relación se vuelve a favor de progesterona (folículos estrógeno-inactivos) desde los primeros estadios de la atresia<sup>(51)</sup>, lo cual también ha sido confirmado para otras especies como el ovino<sup>(25)</sup>.

La alta concentración de estradiol en folículos dominantes sanos, está relacionado también con la mayor expresión de los RNAm para aromatasas, para el receptor beta de estrógenos y para los receptores a FSH y LH en células de la granulosa de los folículos dominantes en comparación con los subordinados. La concentración de estradiol de los folículos sanos dominantes también ha sido asociada positivamente con la expresión de genes relacionados con la sobrevivencia celular, mientras que en los folículos estrógeno inactivos, predomina la expresión de genes asociados a la muerte celular o apoptosis<sup>(52)</sup>.

La inhibición de apoptosis mediada por gonadotropinas en células de la granulosa de los folículos está vinculada en parte con los cambios en la expresión de varios genes relacionados con la muerte celular. Estas hormonas pueden inducir la expresión de Bcl-2, GATA-4, FLIP y XIAP (moléculas de sobrevivencia) y disminuir la expresión de Bax, Apaf-1 (Factor-1 activador de la proteasa-apoptosis), Fas/FasL y p53 (moléculas proapoptóticas)<sup>(53,54)</sup>.

La disminución en la producción de estradiol es un evento temprano en la atresia folicular, lo cual

Bax, Apaf-1 (apoptotic protease activating factor 1), Fas/FasL and p53 (pro-apoptotic molecules)<sup>(53,54)</sup>.

The decrease in estradiol production is an early event in follicular atresia, which results in apoptotic death of granulosa cells<sup>(55,56)</sup>. Some studies suggest that 17 $\beta$  estradiol can modulate nuclear factor kappa B (NF $\kappa$ B) activation<sup>(55,57-60)</sup>. NF $\kappa$ B is a transcription factor involved in the expression of genes associated with granulosa cells apoptosis. However, though NF $\kappa$ B activation is directly associated with estradiol levels, its activation seems to have anti- and pro-apoptotic effects<sup>(55)</sup>.

As with the follicle, CL requires hormonal support for its development. This support is mainly provided by the luteinizing hormone, which favors luteal cell survival and promotes the steroidogenic activity that stimulates enzymes P50ssc and 3 $\beta$ -HSD<sup>(61)</sup>. Progesterone produced as a result of the action of these enzymes on cholesterol molecules is essential to favor luteal cell survival<sup>(49,62)</sup>.

### *Insulin-like growth factor (IGF)*

In order to understand IGF participation in follicular atresia and luteal regression, it is necessary to refer to the IGF system. This system includes ligands IGF-I and IGF-II, proteins that bind to IGF (IGFBP-1 - IGFBP-6), receptors type 1 and 2, and a large number of proteases that regulate the binding of IGFBPs with ligands. IGF plays an essential role in follicle development, it stimulates follicular cell proliferation, increases estradiol secretion and increases cell response to gonadotropins in the granulosa cells of bovines and sheep<sup>(63,64)</sup>. The components of this system are compartmentalized inside the mammalian ovary. In bovines, ligand IGF II and protein IGFBP-4 are produced in theca cells, while IGFBP-2 is produced in granulosa cells<sup>(65)</sup>. IGF ligands regulate granulosa and theca cell growth and differentiation, and it has been suggested that they could also be anti-apoptotic factors<sup>(66)</sup>. Some studies have associated the increase in IGF bioactivity in follicular fluid with dominant follicle selection<sup>(10,67)</sup>. There are differences between dominant and subordinate follicles in bovines regarding the presence of IGFBP; those with lower molecular weight (BP2,

precede a la muerte apoptótica de las células de la granulosa<sup>(55,56)</sup>. Algunos estudios indican que el 17 $\beta$  estradiol puede modular la activación del factor nuclear kappa B (NF $\kappa$ B)<sup>(55,57-60)</sup>. El NF $\kappa$ B es un factor de transcripción involucrado en la expresión de genes asociados con la apoptosis de las células de la granulosa; sin embargo aunque la activación de NF $\kappa$ B está directamente relacionada con la concentración de estradiol, su activación parece tener efectos anti y pro apoptótico<sup>(55)</sup>.

Al igual que el folículo, el CL necesita un soporte hormonal para poder desarrollarse, el cual es otorgado principalmente por la hormona luteinizante, la cual favorece la sobrevivencia de las células lúteas y promueve la actividad esteroidogénica estimulando la actividad de las enzimas P50 $\alpha$  y 3 $\beta$ -HSD<sup>(61)</sup>. La progesterona producida como resultado de la acción de estas enzimas sobre las moléculas de colesterol, es fundamental para favorecer la sobrevivencia de las células lúteas<sup>(49,62)</sup>.

#### *Factor de crecimiento insulinoide (IGF)*

Para hablar de la participación de IGF en la atresia folicular y en la regresión del CL, es necesario referirse al sistema IGF. Este sistema incluye a los ligandos IGF-I e IGF-II, a las proteínas que se unen a IGF (IGFBP-1 - IGFBP-6), a los receptores tipo 1 y 2, y a una gran variedad de proteasas que regulan la unión de las IGFBPs con los ligandos. El IGF, juega un papel fundamental en el desarrollo del folículo, estimula la proliferación de las células foliculares, incrementa la secreción de estradiol e incrementa la respuesta celular a las gonadotropinas en células de la granulosa de bovinos y ovinos<sup>(63,64)</sup>. Los componentes de este sistema están compartimentalizados dentro del ovario de los mamíferos. En bovinos, el ligando IGF II y la proteína IGFBP-4, se producen en las células de la teca, mientras que IGFBP-2 se produce en las células de la granulosa<sup>(65)</sup>. Los ligandos IGF, regulan el crecimiento y diferenciación de las células de la granulosa y teca y se piensa también que pueden ser factores antiapoptóticos<sup>(66)</sup>. Algunos estudios asocian el aumento en la bioactividad de IGF en líquido folicular con la selección del folículo

BP4 and BP5) are present in subordinate follicles but not in dominant follicles<sup>(9,56,68)</sup>. In dominant follicles in cows<sup>(16,69)</sup> ewes<sup>(70)</sup>, sows<sup>(71)</sup> and women<sup>(72)</sup>, the presence of binding proteins is controlled by the synthesis level<sup>(73)</sup> and by the presence of specific proteases that degrade IGFBP with low molecular weight. Among the isoforms with low molecular weight, IGFBP-5 seems to be a good marker of follicular atresia since it is the only one expressed in atresia<sup>(74)</sup>.

Participation of the IGF system in luteal regression has been also assessed. Some reports reveal that addition of IGF-I to bovine luteal cell cultures increases DNA synthesis and progesterone secretion. On the other hand, *in vivo* studies in heifers with negative energy balance have shown a decrease in CL development, as well as in IGF-I circulating levels and progesterone content in CL<sup>(75)</sup>. An increase in the expression of IGF-I mRNA has been observed between d 5 and 15 of the estrus cycle in bovines, while IGF-II expression presents the opposite behavior<sup>(76)</sup>. It has been suggested that IGF-I strengthens the binding capacity of LH to its receptor favoring the luteotropic effect of this hormone<sup>(76)</sup>. IGF bioactivity is mediated by IGFBP, which has been associated with luteal regression<sup>(77)</sup>.

#### *Vascular endothelial growth factor (VEGF)*

In the ovary the formation of new blood vessels facilitates the transference of hormones, oxygen and nutrients to follicle cells. Follicles and corpus luteum produce different angiogenic factors, among which VEGF is considered the most important. VEGF expression in ovary follicles depends on their size. The inhibition of VEGF expression results in decrease of follicle angiogenesis, and loss of development and maturity of antral follicles. In addition, due to its permeabilizing activity, VEGF could be responsible for antrum formation and may participate in ovulation<sup>(78)</sup>.

VEGF belongs to a protein family that includes VEGF-A with its particular angiogenic action. Five isoforms are produced as result of splicing in the expression of only one gene (VEGF<sub>121</sub>, VEGF<sub>145</sub>, VEGF<sub>165</sub>, VEGF<sub>189</sub> and VEGF<sub>206</sub>). The biological

dominante<sup>(10,67)</sup>. Existen diferencias entre folículos dominantes y subordinados de bovinos en cuanto a la presencia de IGFBP, las de menor peso molecular (BP2, BP4 y BP5) están presentes en los folículos subordinados, pero no en los dominantes<sup>(9,56,68)</sup>. En folículos dominantes de vacas<sup>(16,69)</sup> ovejas<sup>(70)</sup>, cerdas<sup>(71)</sup> y en humanos<sup>(72)</sup>, la presencia de las proteínas unidoras, es controlada por el nivel de síntesis<sup>(73)</sup> y por la presencia de proteasas específicas, que degradan las IGFbps de bajo peso molecular. De las isoformas de bajo peso molecular, IGFBP-5 parece ser un buen marcador de la atresia folicular, debido a que es la única que sólo se expresa en la atresia<sup>(74)</sup>.

La participación del sistema IGF en la regresión del CL también ha sido evaluada. Algunos reportes muestran que la adición de IGF-I a cultivos de células lúteas de bovino, incrementa la síntesis de ADN y la secreción de progesterona, mientras que *in vivo*, en novillas con balance negativo de energía se observó un decremento en el desarrollo del CL y disminuyeron tanto las concentraciones circulantes de IGF-I como el contenido de progesterona en el CL<sup>(75)</sup>. Un aumento en la expresión del RNAm del IGF-I se ha observado entre el día 5 y el 15 del ciclo estral en bovinos, en tanto que la expresión del IGF-II tuvo un comportamiento inverso<sup>(76)</sup>. Se ha sugerido también que el IGF-I potencia la capacidad de unión de LH a su receptor, lo que favorece el efecto luteotrófico de esta hormona<sup>(76)</sup>. La bioactividad de IGF está mediada por las IGFbps, las cuales han sido involucradas en la regresión del CL<sup>(77)</sup>.

#### *Factor de crecimiento endotelio vascular (VEGF)*

En el ovario, la formación de nuevos vasos sanguíneos facilita la transferencia de hormonas, oxígeno y nutrientes hasta las células del folículo que lo demanden. Los folículos y cuerpo lúteo producen varios factores angiogénicos, de los cuales VEGF es considerado el de mayor importancia. La expresión de VEGF en los folículos ováricos depende del tamaño. La inhibición de la expresión de VEGF, ocasiona la disminución de la angiogénesis del folículo y la pérdida de desarrollo y maduración en los folículos antrales. Además,

effect of VEGF is mediated almost exclusively by two tyrosine kinase receptors with high affinity, Flt-1 or VEGFR-1 and Flk-1/KDR or VEGFR-2<sup>(79)</sup>. The primary mediator of VEGF angiogenic effects is receptor Flk-1. Recent studies reported a clear cytoprotective effect of VEGF on follicular cells, especially in granulosa; thus, its expression has been associated with follicle health<sup>(80)</sup>.

In a study carried out by our group<sup>(81)</sup>, the presence of VEGF and Flk-1 was detected by immunohistochemistry in granulosa cells of dominant follicles (DF) and subordinate follicles (SF) obtained in d 4, 6 and 9 of estrus. VEGF expression in SF decreased with collection time and was always lower than in DF; also, VEGF expression increased in DF on d 6, although by then atresia was already evident (>10% of TUNEL-positive cells). In contrast, the expression of receptor Flk-1 decreased on d 6, in comparison with that observed on d 4, which suggests that the limiting factor in cytoprotection of granulosa cells is receptor Flk-1, more so than VEGF.

In another study by our group<sup>(82)</sup> analyzing the expression of VEGF isoforms in the development and follicular atresia in ewes by RT-PCR, we verified that, as in other species, the VEGF isoforms with higher expression levels in theca cells, granulosa cells and corpus luteum were VEGF121 and VEGF165; in addition, the expression of VEGF189 and VEGF206 isoforms was found. In this work, the relative abundance of VEGF mRNA of embryo sac cells (cells from both, theca and granulosa) was higher in follicles with initial atresia than in healthy follicles; however, when the experiment was performed using only theca cells, the relative abundance decreased according to follicle health or degree of atresia. These results suggest that theca cells undergoing a loss of irrigation because of atresia have no time to respond to hypoxia with the higher expression of VEGF; however, granulosa cells with no direct irrigation respond to oxygen loss with a higher expression of VEGF mRNA.

A significant feature during CL development is its high metabolic demand due to an increase in growth

se cree que por su actividad permeabilizante, VEGF puede ser responsable de la formación del antro y participar en la ovulación<sup>(78)</sup>.

VEGF pertenece a una familia de proteínas entre cuyos integrantes destaca por su acción angiogénica VEGF-A. Cinco isoformas son producidas como resultado del corte y empalme de la expresión de un solo gen (VEGF<sub>121</sub>, VEGF<sub>145</sub>, VEGF<sub>165</sub>, VEGF<sub>189</sub> y VEGF<sub>206</sub>). El efecto biológico de VEGF es mediado casi exclusivamente por dos receptores tirosina cinasa con alta afinidad; Flt-1 ó VEGFR-1 y el Flk-1/KDR ó VEGFR-2<sup>(79)</sup>. El principal mediador de los efectos angiogénicos de VEGF, es el receptor Flk-1. Estudios muy recientes reportan un claro efecto citoprotector de VEGF en células foliculares, especialmente en granulosa, por lo cual su expresión se ha relacionado con la salud del folículo<sup>(80)</sup>.

En un trabajo realizado por nuestro grupo<sup>(81)</sup>, se detectó por inmunohistoquímica la presencia de VEGF y Flk-1 en las células de la granulosa de folículos dominantes (FD) y subordinados (FS) obtenidos el día 4, 6 y 9 del estro. La expresión de VEGF en los FS disminuyó con el tiempo de colección y siempre fue menor que en los FD además la expresión de VEGF se incrementó en los FD del día 6 aunque entonces, la atresia ya era evidente (> de 10% de células positivas a TUNEL). En contraste, la expresión del receptor Flk-1 disminuyó en el día 6, en comparación con la observada el día 4, lo que nos permite sugerir que el factor limitante en la citoprotección de las células de la granulosa es el receptor Flk-1 más que VEGF.

En otros resultados de nuestro grupo<sup>(82)</sup>, en el que se estudió por RT-PCR la expresión de las isoformas de VEGF en el desarrollo y la atresia folicular de la oveja, se comprobó que igual que en otras especies, las isoformas de VEGF con mayor expresión tanto en células de la teca, granulosa y cuerpo lúteo de la oveja fueron VEGF 121 y VEGF165, además se encontró la expresión de las isoformas VEGF189 y VEGF206. En este trabajo la abundancia relativa del RNAm de VEGF en células del saco (células de ambas tecas y de la granulosa), fue mayor en los folículos con atresia

rate. In ewes, the ovulated follicle weighs about 40 mg and develops into a mature CL of 600-700 mg in 3 or 4 d<sup>(4)</sup>. This elevated metabolic rate implies a high-speed development of blood vessels to satisfy the oxygen and nutrient requirements of the gland and VEGF and its receptors play an essential role in blood-vessel formation during CL development allowing to cover these demands<sup>(83)</sup>. In the CL of sows, VEGF is expressed with no significant changes between d 4 and 15 of the cycle, while the highest expression level of receptor Flk-1 occurs in early CL and decreases in late diestrus, and receptor Flt-1 is expressed at low levels in early diestrus and increases as CL gets closer to regression<sup>(83)</sup>.

#### *Signals received by follicular and luteal cells for apoptotic death*

Receptors TNF (tumor necrosis factor), TGF- $\alpha$  (transforming growth factor  $\alpha$ ), Fas/FasL and TRAIL play an essential role in follicular atresia<sup>(39)</sup>. They are not only expressed in apoptotic granulosa cells of healthy and atretic antral follicles but also in the embryonic gonad<sup>(53)</sup>.

TGF- $\alpha$  and transforming growth factor  $\beta$  (TGF- $\beta$ ) induce apoptosis in theca and interstitial cells<sup>(84)</sup>. In the ovary, as well as in thymus, liver and heart, high levels of Fas mRNA are expressed. Receptor Fas has been found in granulosa and theca cells, and interstitial tissue, which suggests that the Fas receptor/Fas ligand (FasL) system is involved in the elimination by apoptosis of these cellular types during atresia<sup>(85)</sup> (Table 1). A higher content of Fas mRNA has been reported in granulosa and theca cells of atretic follicles than in healthy follicles<sup>(86)</sup>; likewise, the expression of TRAIL receptor type 1 (the receptor that blocks the TRAIL apoptotic action) is markedly reduced in granulosa cells of atretic follicles<sup>(87)</sup>. The expression of these proteins is directly linked to the gonadotropin levels; therefore, deprivation or treatment of granulosa cells with these proteins is associated with the expression or disappearance of Fas/FasL and p53, respectively<sup>(53)</sup>. However, *in vitro* studies have demonstrated that when granulosa and theca cells are incubated in a medium with serum, FasL-induced cell death is prevented, which suggests

inicial que en los sanos, sin embargo cuando el experimento se realizó sólo en células de las tecas, la abundancia relativa disminuyó de acuerdo a la salud o al grado de atresia del folículo. Con estos resultados podemos pensar que las células de la teca que sufren la pérdida de irrigación como consecuencia de la atresia, no tiene tiempo a responder a la hipoxia con la mayor expresión de VEGF, sin embargo, en las células de la granulosa que no tienen irrigación directa, sí responden a la pérdida de oxígeno con la mayor expresión del RNAm de VEGF.

Una característica importante durante el desarrollo del CL es su gran demanda metabólica debido a la elevada tasa de crecimiento. En ovejas por ejemplo, el folículo ovulado que pesa alrededor de 40 mg tiene que desarrollarse a un CL maduro de entre 600 y 700 mg en 3 ó 4 días<sup>(4)</sup>. Esta elevada tasa metabólica implica un gran desarrollo de vasos sanguíneos para satisfacer las necesidades de oxígeno y nutrientes de esta glándula, para ello el VEGF y sus receptores, juegan un papel fundamental en la formación de vasos sanguíneos durante el desarrollo del CL que le permite cubrir estas demandas<sup>(83)</sup>. En el CL de la cerda, el VEGF se expresa sin cambios importantes entre el día 4 y 15 del ciclo, mientras que la expresión más importante del receptor Flk-1 ocurre en cuerpos lúteos tempranos y disminuye en el diestro tardío y el receptor, Flt-1, se expresa poco en el diestro temprano y se incrementa conforme el CL se acerca a la lisis<sup>(83)</sup>.

*Señales que reciben las células foliculares y lúteas para la muerte por apoptosis*

Los miembros de la familia de receptores TNF (Factor de Necrosis Tumoral), TGF $\alpha$  (Factor de Crecimiento Transformante- $\alpha$ ), Fas/FasL y TRAIL tienen un papel crítico en la atresia folicular<sup>(39)</sup>. Su expresión no sólo ocurre en células de la granulosa apoptóticas de folículos sanos y atrésicos antrales sino también en la gónada embrionaria<sup>(53)</sup>.

El tratamiento de células de la teca y células intersticiales con TGF $\alpha$  y el Factor de Crecimiento Transformante- $\beta$  (TGF  $\beta$ ), les induce apoptosis<sup>(84)</sup>. En ovario, igual que el timo, hígado y corazón, se

Cuadro 1. Moléculas que se expresan en folículos sanos y atrésicos

Table 1. Molecules expressed in healthy and atretic follicles

Healthy follicles	Atretic follicles
Survival factors favoring follicular health: Gonadotropins, estradiol, IGF and VEGF	Absence of survival factors and dominance of progesterone in follicular environment
Molecules expressed	
Bcl2	Bax
Bclw	Bak
Bcl-wl	Bik
IAP and XIAP	Bad
NF- $\kappa$ B	Bid
Inhibin	Bok
LHR	P53
ER- $\beta$	c-Myc
	Fas/FasL
	TNF- $\alpha$ and TNF- $\beta$
	Caspases
	Apaf-1
	IGFBP-5
	Smac/Diablo
	AIF
	Mcl-1
	BOD
	ICE
	Release of cytochrome c
	NF- $\kappa$ B

Bcl2= B cell /lymphoma-2; IAP= inhibitor of apoptosis proteins; XIAP= inhibitor of apoptosis protein bound to x; NF  $\kappa$ B= nuclear factor kappa B; LH-R= luteinizing hormone receptor; ER- $\beta$ = estrogen receptor  $\beta$ ; Bax= proteins associated with Bcl2; Bak= Bcl2 homologous; Bid= pro-apoptotic protein; Bik= Bcl2 interacting killer; Bad= Bcl2 cell death agonist; Bok= Bcl2 associated with ovary killing; c-Myc= cellular homologue of myelocytomatosis; Fas= death receptor; FasL= Fas ligand; TNF- $\alpha$ = tumor necrosis factor alpha; TNF- $\beta$ = tumor necrosis factor beta; caspases= cytosolic aspartate-specific proteases; Apaf-1= apoptotic protease activating factor 1; IGFBP5= IGF-binding protein 5; Smac/Diablo= Mitochondrion-released proteins, inhibit IAP; AIF= apoptosis-inducing factor; BOD= Bcl2 agonist associated with ovary death; ICE= interleukin-1  $\beta$ -converting enzyme.

that, *in vivo*, healthy follicles are surrounded by an environment containing survival factors that prevent the interaction of Fas with its ligand<sup>(21)</sup>.

Receptor Fas, a transmembrane protein, is a type-1 receptor of the TNF receptor family. When FasL binds to this receptor, the death domains and other

expresan abundantes niveles de RNAm del receptor de Fas. El receptor Fas ha sido localizado tanto en células de la granulosa como en teca y en el tejido intersticial, lo cual sugiere que el sistema Fas receptor /Fas ligando (FasL) está involucrado en la eliminación por apoptosis de estos tipos celulares durante la atresia<sup>(85)</sup> (Cuadro 1). Se ha reportado un mayor contenido de RNAm de Fas en células de la granulosa y teca de folículos atrésicos que en folículos sanos<sup>(86)</sup>; así mismo la expresión del receptor anzuelo tipo 1 de TRAIL (receptor que bloquea la acción apoptótica de TRAIL) es marcadamente reducido en las células de la granulosa de folículos atrésicos<sup>(87)</sup>. La expresión de estas proteínas está vinculada directamente con los niveles de gonadotropinas, de tal manera que la privación o tratamiento con ellas en células de la granulosa está asociado con la expresión o desaparición de Fas/FasL y p53 respectivamente<sup>(53)</sup>. No obstante, estudios *in vitro* han permitido conocer que cuando las células de la granulosa y tecas son incubadas en un medio que contiene suero, se impide la muerte celular inducida por FasL, esto permite suponer que *in vivo*, los folículos sanos están rodeados de un ambiente que contiene factores de sobrevivencia que impiden la interacción de Fas con su ligando<sup>(21)</sup>.

El receptor Fas es una proteína transmembranal que pertenece al receptor tipo 1 de los receptores de la familia de TNF. Cuando FasL se une a este receptor, se produce el aprovisionamiento de los dominios de muerte, otros trasductores intracelulares y la activación de la cascada de caspasas, provocándose la apoptosis<sup>(88)</sup> (Figura 1). La inducción de la muerte involucra la interacción de una familia de cisteína-proteasas relacionadas con la familia de las proteínas ICE (enzima convertidora de interleucina 1 $\beta$ )<sup>(39)</sup>.

El mecanismo molecular por el cual la activación del sistema Fas/FasL, provoca la señalización para la apoptosis de las células foliculares es provocando la activación de la enzima esfingomielinasa para hidrolizar a la esfingomielina en fosfolina y ceramida. La ceramida es un lípido que actúa como segundo mensajero y provee la señal para la muerte por apoptosis<sup>(84)</sup>.

intracellular transducers are supplied, and the caspase cascade is activated leading to apoptosis<sup>(88)</sup> (Figura 1). Death induction involves the interaction of a cysteine-protease family related to the ICE (interleukin-1  $\beta$  converting enzyme)<sup>(39)</sup>.

The molecular mechanism by which the Fas/FasL system activation sends out the signal for apoptosis of follicular cells is the activation of the enzyme sphingomyelinase, which hydrolyzes sphingomyelin into phosphocholine and ceramide. Ceramide is a lipid that acts as a second messenger and provides the signal for apoptotic death<sup>(84)</sup>.

The participation of death ligands such as Fas L, TNF- $\alpha$  and interferon  $\gamma$  (IFN- $\gamma$ ) in CL regression has been recently investigated. Cultures of CL-derived endothelial cells incubated with 100 ng/ml of human recombinant TNF- $\alpha$  for 6, 12, 18 and 24 h show a significant increase in the number of apoptotic cells after 6 h, and this increase continues as incubation time passes<sup>(89)</sup>. Similar results are observed when the same type of cells is incubated with 50 ng/ml of TNF- $\alpha$  alone or in combination with IFN- $\gamma$  (200 UI/ml)<sup>(48,90)</sup>. In bovine CL, the expression of TNF- $\alpha$  type-1 receptor mRNA significantly increased in CL regression when compared to CL of early, mid and late luteal phase. Likewise, the expression of this receptor increased in CL, 24 h after adding PGF2- $\alpha$ <sup>(89)</sup>. This evidence suggests that TNF- $\alpha$  participates in CL regression inducing luteal cell apoptosis by means of its type-1 receptor (Figure 2).

FasL, as well as the combination of TNF- $\alpha$  and IFN- $\gamma$ , increases caspase-3 activity in luteal cells from CLs collected during the mid-luteal phase in cows<sup>(38,48)</sup>. On the other hand, in rat CL, the expression of Fas and FasL is higher during CL regression than in functional CL<sup>(91)</sup>. PGF2- $\alpha$  can increase death ligand activity (TNF- $\alpha$ , primarily) (Figure 2). Although this effect is not very clear, it would be important to determine more accurately if the activity of these death ligands (FasL, TNF- $\alpha$  and IFN- $\gamma$ ) initiates before or after PGF2- $\alpha$  release in the endometrium.

#### *Bcl-2 protein family and other oncogenes*

The mitochondrion is considered the chief executor of apoptosis; cell processes such as redox potential

La participación de ligandos de muerte como Fas L, TNF- $\alpha$  y el interferón  $\gamma$  (IFN- $\gamma$ ) durante la regresión de CL ha sido evaluada recientemente. En cultivos de células endoteliales derivadas del CL incubadas con 100 ng/ml de TNF- $\alpha$  recombinante humano durante 6, 12, 18 y 24 h, se observó un aumento significativo en el número de células apoptóticas desde las 6 h con un incremento constante conforme avanza el tiempo de incubación<sup>(89)</sup>. Resultados similares se observaron en este mismo tipo de células incubadas con 50 ng/ml de TNF- $\alpha$  solo o en combinación con IFN- $\alpha$  (200 UI/ml)<sup>(48,90)</sup>. En CL de bovino, la expresión de RNAm del receptor tipo I del TNF- $\alpha$  se incrementó significativamente en CL en regresión comparado con CL de la fase lútea temprana, media y tardía; de la misma manera, la expresión de este receptor se incrementó en CLs después de 24 h de la aplicación de PGF2- $\alpha$ <sup>(89)</sup>. Estas evidencias sugieren que el TNF- $\alpha$  participa en la lisis de CL induciendo la apoptosis de las células lúteas, por medio de su receptor tipo I (Figura 2).

Fas L así como la combinación de TNF- $\alpha$  y IFN- $\gamma$  incrementan la actividad de caspasa 3 en células lúteas en cultivo de CLs colectados en la fase lútea media de bovinos<sup>(38,48)</sup>. Mientras que en CL de ratas, la expresión de Fas y de Fas L es mayor en CL en regresión que en CL funcionales<sup>(91)</sup>. La PGF2- $\alpha$  es capaz de incrementar la actividad de ligandos de muerte (TNF- $\alpha$  principalmente) (Figura 2), aunque este efecto no es muy claro, sería importante determinar con mayor exactitud, si la actividad de estos ligandos de muerte (Fas L, TNF- $\alpha$  e IFN- $\gamma$ ) se inicia antes o después de la liberación de PGF2- $\alpha$  por el endometrio.

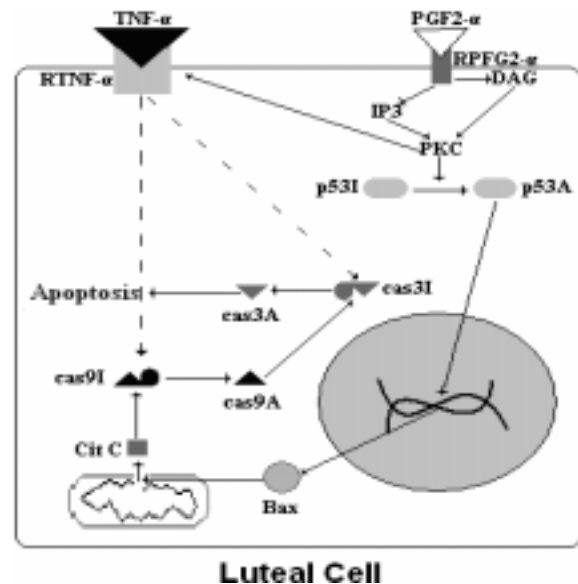
*Proteínas de la familia Bcl-2 y otros oncogenes*

La mitocondria se considera el ejecutor central de la apoptosis, para lo cual procesos celulares como el potencial redox y la expresión de oncogenes entre los que destacan los miembros de la familia Bcl-2, que tienen una función reguladora muy importante en este tipo de muerte<sup>(92)</sup>. La familia de Bcl-2 está integrada por miembros antiapoptóticos (e.g., Bcl-2, Bcl-xl, Boo) y proapoptóticos (e.g.,

and expression of oncogenes, including members of the Bcl-2 family, play a very important regulating role<sup>(92)</sup>. The Bcl-2 family comprises anti-apoptotic (e.g., Bcl-2, Bcl-xl, Boo) and pro-apoptotic (e.g.,

Figura 2. Modelo esquemático de la inducción de apoptosis por Prostaglandina F2, alfa (PGF2- $\alpha$ ) en células lúteas. La PGF2- $\alpha$  inicia la regresión estructural del CL, iniciando la apoptosis de las células lúteas por diferentes mecanismos: i) Incrementa la expresión de Bax, modificando la relación Bcl-2:Bax, ii) Incrementa la expresión de p53 lo cual probablemente sea la vía de activación de la expresión de Bax. iii) Activa la actividad de caspasas 9 y 3, iv) Es capaz de incrementar la actividad de ligandos de muerte (Factor de necrosis tumoral alfa (TNF $\alpha$ ) principalmente). RPF2- $\alpha$  = receptor PGF2- $\alpha$ , RTNF $\alpha$  = receptor del TNF $\alpha$ , DAG = Dlacilglicerol, IP3 = Folfatidil inositol, PKC = Proteína quinasa C, p53I = p53 inactivo, p53A = p53 activo, Cas3A= caspasa 3 activa; cas3I Inactiva; cas9A= caspasa 9 activa; cas9I, inactiva, DAG = Dlacilglicerol, IP3 = Folfatidil inositol, PKC = Proteína quinasa C

Figure 2. Schematic model of apoptosis induction by prostaglandin F2, alpha (PGF2- $\alpha$ ) in luteal cells. PGF2- $\alpha$  initiates structural regression of CL, starting apoptosis of luteal cells by different mechanisms: i) Increases Bax expression modifying the relation Bcl-2:Bax; ii) Increases p53 expression, which is probably the activation path for Bax expression; iii) Activates caspases 9 and 3 activity; iv) It is capable of increasing the activity of death ligands (primarily, tumor necrosis factor alpha [TNF- $\alpha$ ]). RPF2- $\alpha$  = receptor PGF2- $\alpha$ ; RTNF- $\alpha$  = receptor of TNF- $\alpha$ ; DAG = Diacylglycerol; IP3 = Phosphatidylinositol; PKC = Protein kinase C; p53I = inactive p53; p53A = active p53; cas3A = active caspase-3; cas3I = inactive caspase-3; cas9A = active caspase-9; cas9I = inactive caspase-9.



Bax, Bok, Bim, Bid)<sup>(39)</sup>. La relación entre proteínas pro y anti-apoptóticas, determina si una célula vivirá o morirá<sup>(93)</sup>. Bcl-2 y Bax son reguladores importantes en el ovario<sup>(93,94)</sup>. Bcl-2, Bax y c-Myc son expresados en células de la granulosa de ovarios fetales y adultos, lo cual sugiere su participación en la atresia<sup>(95)</sup>. Bcl-2 se ha encontrado principalmente en folículos en desarrollo mientras que Bax en folículos atrésicos<sup>(96)</sup>.

Yang and Rajamahendran<sup>(94)</sup> demostraron que la inducción de atresia en folículos antrales por efecto de progesterona estuvo asociada con el incremento en la relación de los niveles de Bax sobre Bcl-2 en folículos de bovino. Otro estudio reporta que la sobreexpresión de Bcl-2 durante la vida embrionaria, resultó en un mayor número de folículos primordiales al nacimiento<sup>(97)</sup>. Similarmente, ratones genéticamente modificados para la ausencia de Bcl-2 en ovario, tuvieron menos folículos primordiales al nacimiento que los ratones normales<sup>(98)</sup>. Ratones deficientes en la proteína proapoptótica Bax, tuvieron un mayor número de folículos primordiales en el ovario y fueron mantenidos hasta una edad cronológica avanzada<sup>(99)</sup>. La expresión de Bax es más alta en folículos atrésicos que en sanos<sup>(100)</sup>. Otros miembros de la familia de Bcl-2 involucrados en la apoptosis del ovario incluyen: Mcl-1, Bok (Bcl-2 relacionada con el asesinato ovárico), BOD (Bcl-2 agonista relacionado con la muerte ovárica) y Bad (Bcl-2 agonista de la muerte celular, pro-apoptótico). En la ruta de señalización de muerte, los factores de sobrevivencia del folículo regulan en primera instancia al ligando proapoptótico Bad. Mientras que, Mcl-1 y Bok, regulan la liberación del citocromo c, y junto con Smac/Diablo controlan en un siguiente paso de la apoptosis a los homólogos de Apaf-1 (Factor1 activador de la apoptosis) y caspasas (Figura y Cuadro 1)<sup>(101)</sup>.

La PGF2- $\alpha$  inicia la regresión funcional y estructural del CL, altera la producción de P4, dispara la apoptosis de las células lúteas por diferentes mecanismos: primero incrementa la expresión de Bax, modificando la relación Bcl-2:Bax, lo que puede desencadenar la vía intrínseca de la apoptosis, segundo, incrementa la expresión

Bax, Bok, Bim, Bid) members<sup>(39)</sup>. The relation between pro- and anti-apoptotic proteins determines if a cell lives or dies<sup>(93)</sup>. Bcl-2 and Bax are important regulators in the ovary<sup>(93,94)</sup>. Bcl-2, Bax and c-Myc are expressed in granulosa cells of fetal and adult ovaries, which suggests their participation in atresia<sup>(95)</sup>. Bcl-2 has been found primarily in developing follicles, while Bax is found in atretic follicles<sup>(96)</sup>.

Yang and Rajamahendran<sup>(94)</sup> demonstrated that atresia induced in antral follicles by progesterone is associated with the increase in the relation of Bax levels on Bcl-2 in cow follicles. Another study reported that overexpression of Bcl-2 during embryonic life results in a larger number of primordial follicles at birth<sup>(97)</sup>. Similarly, mice genetically engineered for the absence of Bcl-2 in the ovary present less primordial follicles at birth than normal mice<sup>(98)</sup>. Mice deficient in the proapoptotic protein Bax present a large number of primordial follicles in the ovary and survived until a chronological advanced age<sup>(99)</sup>. The expression of Bax is higher in atretic follicles than in healthy follicles<sup>(100)</sup>. Other members of the Bcl-2 family involved in ovary apoptosis include Mcl-1, Bok (Bcl-2 related to ovary killing), BOD (Bcl-2 agonist related to ovary death) and Bad (Bcl-2 agonist of cell death, pro-apoptotic). In the death signaling path, follicle survival factors first regulate the proapoptotic ligand Bad; while Mcl-1 and Bok regulate the release of cytochrome c and, jointly with Smac/Diablo, control the homologues of Apaf-1 (apoptotic protease activating factor 1) and caspases (Figures and Table 1) in the next step of apoptosis<sup>(101)</sup>.

PGF2- $\alpha$  initiates the functional and structural regression of CL, alters P4 production, and triggers apoptosis of luteal cells by different mechanisms. First, it increases Bax expression modifying the relation Bcl-2: Bax, which can trigger the intrinsic apoptosis path; second, it increases p53 expression, which is a key protein in cell-cycle regulation and the main regulator of apoptosis<sup>(102)</sup>; and third, it is capable of increasing the activity of initiator caspases (caspase-8 and 9) and effector caspases (caspase-3) (Figura 2). According to the literature, Bax expression is higher in regression CLs collected



de p53 que es una proteína clave en la regulación del ciclo celular y la principal reguladora de la apoptosis<sup>(102)</sup>, y tercero, es capaz de incrementar la actividad de caspasas iniciadoras (caspasa 8 y 9) y efectoras (caspasa 3) (Figura 2). Según los reportes de la bibliografía, la expresión de Bax es mayor en los CLs en regresión colectados el día 21 del ciclo que en los CLs funcionales colectados el día 21 de gestación, sin embargo no se encontraron diferencias en la expresión de la proteína anti-apoptóticas Bcl-X<sup>(4)</sup>. Trabajos más recientes reportan que existe un efecto del tiempo de administración de PGF2- $\alpha$  sobre la expresión de Bax y Bcl-2. La relación de Bax/Bcl-2 tanto de RNAm como de la proteína tuvo su mayor incremento a las 4 h de la aplicación de PGF2- $\alpha$ , y ya no hubo mayores cambios a las 12 y 18 h de la aplicación<sup>(103)</sup>. Posteriormente por Inmunohistoquímica, se confirmó que existe una mayor marca de Bax en CL en regresión que en CL funcionales, contrario a la intensidad de marca que se observa para Bcl-2<sup>(91)</sup>. Experimentos con factores de proliferación como IGF también han tenido efecto en el balance en la expresión de genes anti y proapoptóticos. En células en cultivo de CL de la fase lútea media de mujeres, se ha observado que la adición de IGF-I incrementa la expresión del RNAm de Bcl-2 y reduce la expresión de Bax comparado con células lúteas tratada con IGFBP-3. Estos cambios en la expresión de Bcl-2 y Bax, se ven reflejados en el porcentaje de células apoptóticas, ya que el tratamiento con IGF-1, reduce el porcentaje de células apoptóticas y el tratamiento con IGFBP-3 incrementa este porcentaje en comparación con el control. La P4 secretada por las células lúteas participa en la regulación de genes de la familia de Bcl-2 para contribuir a la sobrevivencia de las células lúteas<sup>(38)</sup>, igualmente esta hormona tuvo efecto protector para las células endoteliales del CL de bovino, en donde se observó que la adición de P4 al cultivo de estas células redujo significativamente el porcentaje de citotoxicidad inducida por 100 ng/ml de TNF- $\alpha$ <sup>(89)</sup>.

### *p53*

p53, es una proteína clave en la regulación del ciclo celular, induce la apoptosis por la activación

at day 21 of the cycle than in functional CL collected at d 21 of gestation; however, no differences were found in expression of the anti-apoptotic protein Bcl-X (4). More recent studies have reported an effect of the administration time of PGF2- $\alpha$  on Bax and Bcl-2 expression. The Bax/Bcl-2 relation both of mRNA and protein presents the highest increase 4 h after PGF2- $\alpha$  administration and no changes are observed 12 and 18 h after PGF2- $\alpha$  administration<sup>(103)</sup>. It was subsequently confirmed by immunochemistry that there is a higher label of Bax in regression CL than in functional CL, opposite to the label intensity observed for Bcl-2<sup>(91)</sup>. Experiments with proliferation factors such as IGF also have had effects on the balance of the expression of anti- and pro-apoptotic genes. It was observed in cultures of women CL from mid luteal phase that the addition of IGF-I increased the expression of Bcl-2 mRNA and reduced the expression of Bax in comparison with luteal cells treated with IGFBP-3. These changes in Bcl-2 and Bax expression was reflected in the percentage of apoptotic cells, since treatment with IGF-1 reduced the percentage of apoptotic cells and treatment with IGFBP-3 increased this percentage when compared to control. P4 secreted by luteal cells participates in the regulation of genes of the Bcl-2 family to contribute with the survival of luteal cells<sup>(38)</sup>. Similarly, this hormone presented a protective effect for CL endothelial cells in cows, where it was observed that the addition of P4 to the culture of these cells significantly reduced the percentage of cytotoxicity induced by 100 ng/ml of TNF- $\alpha$ <sup>(89)</sup>.

### *p53*

p53 is a key protein in the regulation of the cellular cycle that induces apoptosis by the activation of pro-apoptotic genes such as Bax<sup>(104)</sup>. The expression of this protein in apoptotic granulosa and luteal cells in regression suggest its participation in atresia and luteolysis<sup>(53)</sup>. The inhibition of p53 expression is associated with a marked decrease in the number of apoptotic granulosa cells and atretic follicles<sup>(101)</sup>. p53 modulates the transcriptional activity of genes Bcl-2 and Bax. In CL of does in d 15 of pseudopregnancy (approximate time in

de genes proapoptóticos tales como Bax<sup>(104)</sup>. La expresión de esta proteína en células de la granulosa apoptóticas y en células lúteas en regresión sugiere su participación en la atresia y la luteólisis<sup>(53)</sup>. La inhibición de la expresión de p53 está asociada con una marcada reducción en el número de células de la granulosa apoptóticas y de folículos atrésicos<sup>(101)</sup>. p53 modula la actividad transcripcional del gen Bcl-2 y Bax. En CL de conejas en el día 15 de pseudo-preñez (tiempo aproximado en que se inicia la regresión del CL), existe un incremento en la expresión de p53<sup>(105)</sup>. Estos resultados coinciden con lo reportado en bovinos en donde la expresión de p53 fue mayor en el CL de 21 días del ciclo que en los CLs funcionales de 21 días de gestación<sup>(106)</sup>.

### *Caspasas*

Las caspasas (por sus siglas en inglés: Cytosolic Aspartate-Specific ProteASAS), son una familia de proteasas altamente conservadas que median la apoptosis. Pueden ser divididas en caspasas “iniciadoras” dentro de las que se encuentran la caspasa 8 y 9 y las “efectoras” que son la 3, 6 y 7. La característica de estas enzimas es que rompen proteínas fundamentales para la vida y además forman parte del “apoptosoma”, el cual es un complejo proteínico formado por: citocromo c, Apaf-1, procaspasa 9 y ATP<sup>(39)</sup>. La formación del apoptosoma, es iniciada por la liberación del citocromo c desde la mitocondria hasta el citoplasma, donde se une a Apaf-1 y en presencia de dATP/ATP, induce la oligomerización de Apaf-1. Este complejo recluta pro caspasa-9, la cual después de sufrir autoactivación, promueve el reclutamiento de caspasa 3. La activación de caspasa 3 está asociada con el rompimiento de la polimerasa poly- (ADP-ribosa) y de actina, así como con la formación de oligonucleosomas, todos ellos cambios característicos de la apoptosis<sup>(107)</sup>.

Las caspasas son las principales efectoras en la apoptosis ovárica. Ellas son activadas por dos vías en la granulosa. i) por receptores de superficie (Fas/FasL) y ii) por proteínas miembros de la familia Bcl-2. Evidencias experimentales soportan que hay expresión de caspasa-1, caspasa-3, Factor

which luteal regression initiates), there is an increase in p53 expression<sup>(105)</sup>. These results agree with that reported for cows, where p53 expression was higher in 21-day CL of the cycle than in functional CL of 21 days of gestation<sup>(106)</sup>.

### *Caspases*

Caspases (Cytosolic Aspartate-Specific Proteases) are a family of highly conserved proteases that mediate apoptosis. These can be divided in “initiator” caspases, which include caspase-8 and 9, and “effector” caspases that include caspase-3, 6 and 7. The characteristic of these enzymes is that they break down proteins essential for life and are part of the “apoptosome”, which is a protein complex formed by cytochrome c, Apaf-1, procaspase-9 and ATP<sup>(39)</sup>. Apoptosome formation is initiated by the release of cytochrome c from the mitochondrion to the cytoplasm, where it binds to Apaf-1 and in presence of dATP/ATP induces Apaf-1 oligomerization. This complex recruits procaspase-9, which after undergoing self-activation, promotes the recruitment of caspase-3. The activation of caspase-3 is associated with the breakdown of poly-A ribose polymerase and actin, as well as with formation of oligonucleosomes, all of them characteristic changes of apoptosis<sup>(107)</sup>.

Caspases are the main effectors of ovarian apoptosis. These are activated by two routes in the granulosa: i) by surface receptors (Fas/FasL) and ii) by proteins of the Bcl-2 family. Experimental evidences support the fact that there is expression of caspase-1, caspase-3, DNA fragmentation factor, interleukin-converting enzyme 6 (ICE) and Apaf-1 in granulosa cells<sup>(96,107)</sup>.

Caspase-3 is also expressed in CL and granulosa cells of atretic follicles; their expression is regulated by gonadotropins<sup>(107)</sup>. Table 1 shows the primary molecules found in healthy and atretic antral follicles.

In bovines, 4 h after PGF2- $\alpha$  administration, there is a significant increase in the activity of caspases 9 and 3; this increase intensifies after 18 h of treatment<sup>(103)</sup>. It should be mentioned that caspase-9 is an initiator caspase that activates

de fragmentación del ADN, enzima convertidora de interleucina 6 (ICE) y Apaf-1 en células de la granulosa<sup>(96,107)</sup>.

La caspasa -3 también es expresada en las células del cuerpo lúteo y en las células de la granulosa de folículos atrésicos, su expresión es regulada por gonadotropinas<sup>(107)</sup>. En el Cuadro 1 se presentan las principales moléculas encontradas en folículos antrales sanos y atrésicos.

En bovinos, a partir de las 4 h de la aplicación de PGF2- $\alpha$ , existe un incremento significativo en la actividad de la caspasas 9 y 3, este incremento se intensifica a las 18 h del tratamiento<sup>(103)</sup>. Se debe recordar la que la caspasa 9 es iniciadora, que activa a las caspasas efectoras (3, 6 y 7), con lo cual se entiende el aumento paralelo que tiene estas proteínas en la luteólisis inducida. No obstante, la caspasa 8, sólo se incrementa significativamente hasta las 18 horas post aplicación de PGF2- $\alpha$ , esto permite proponer que en la luteólisis, la activación de la caspasa 3 mediada por la PGF2- $\alpha$  sigue la ruta de la caspasa 9. La participación de caspasa 3 en la luteólisis ha sido también apoyada por experimentos en donde la inhibición de P4<sup>(38)</sup> o la aplicación PGF2- $\alpha$  a células lúteas en cultivo incrementan la actividad de caspasa 3<sup>(48)</sup>. En rata, por inmuno-tinción pudo observarse una mayor presencia de pro.caspasa y caspasa 3 en CL en regresión que en CL funcionales<sup>(91)</sup>.

### CONCLUSIONES Y DIRECCIÓN A FUTURAS INVESTIGACIONES

Los gametos son células sometidas a una gran presión de selección con la finalidad de elegir a los más aptos para el desarrollo embrionario, por ello en la gónada femenina se pierden por atresia la inmensa mayoría de los folículos que la pueblan. Este proceso de selección entre los folículos que ovularán y los que se perderán por el proceso de atresia, es sin duda uno de los grandes enigmas de la biología reproductiva Tanto en la atresia como en la luteólisis, la apoptosis es un evento central. Las células de estas estructuras ováricas comparten con otros tejidos, vías de señalización y moléculas que participan en diferentes niveles del proceso de

effector caspases (3, 6 and 7) and this accounts for the parallel increase of these proteins in induced luteolysis. However, caspase-8 only increases significantly 18 h after PGF2- $\alpha$  administration; this suggests that, in luteolysis, the activation of caspase-3 mediated by PGF2- $\alpha$  follows the path of caspase-9. The participation of caspase-3 in luteolysis has been supported by experiments where P4 inhibition<sup>(38)</sup> or the administration of PGF2- $\alpha$  to luteal cells in culture increases caspase-3 activity<sup>(48)</sup>. Using immunostaining in rats, a procaspase and caspase-3 were found to be more abundant in regression CL than in functional CL<sup>(91)</sup>.

### CONCLUSIONS AND FUTURE RESEARCH

The gametes are cells submitted to a great selection pressure with the purpose of choosing to the most suitable for the embryonic development; in fact, most of the follicles in the feminine gonad are lost due to atresia. The selection process that distinguishes between follicles destined for ovulation and follicles to be lost by the process of atresia is one of the great enigmas of reproduction biology. Apoptosis is a key event in both, atresia and luteolysis. Cells of the ovarian structures share with cells from other tissues the signaling pathways and molecules that participate at different levels of the apoptosis process, however, they differ in the factors that allow their survival. Since the ovary forms part of an endocrine axis, circulating hormones and the capacity of ovarian cells to receive them and to respond to the received signals will determine cell survival or apoptosis. Signaling pathways in apoptosis of follicular and luteal cells need to be studied more deeply. Some questions that must still be answered are: How does the absence of survival factors favor the release of apoptogenic factors from the mitochondrion? When is the Fas/FasL death receptor path followed and when that of the mitochondrion? In addition to estradiol, which other intra- or extra-ovarian molecules favor the expression of anti-apoptotic factors in follicular cells? Do (early) genetic labels allow the recognition of the cells that will die by apoptosis before the process initiates? Regarding CL apoptosis: Is apoptosis of luteal cells initiated by the effect of PGF2- $\alpha$  or is the effect of this

apoptosis, aunque difieren en los factores de que permiten su sobrevivencia. Como el ovario forma parte de un eje endocrino, las hormonas circulantes, la capacidad de las células ováricas para recibir las y la respuesta que éstas tengan a la señal recibida, permitirán la sobrevivencia o apoptosis de sus células. Existen conocimientos sobre las vías de señalización en la apoptosis de las células foliculares y lúteas que requieren ser estudiadas con mayor profundidad, entre ellos: cuál es el mecanismo por el cual la ausencia de factores de sobrevivencia favorece la liberación de factores apoptogénicos desde la mitocondria; cuándo se sigue la vía del receptor de muerte Fas/FasL y cuándo la de la mitocondria; además del estradiol, qué otras moléculas intra o extraováricas favorecen la expresión de factores antiapoptóticos en las células foliculares y existen marcas genéticas (tempranas) que permitan reconocer que una célula morirá por apoptosis aun antes de iniciar el proceso?. En la apoptosis del CL, además existe una gran interrogante: la apoptosis de las células lúteas, es iniciada por efecto de la  $PGF2\alpha$ , o bien el efecto de esta prostaglandina sólo se suma a la ejecución del programa de muerte que las células lúteas ya habían iniciado.

El desarrollo folicular en forma de olas que presentan la mayoría de las especies de interés zootécnico, en donde existen folículos dominantes sanos y subordinados atrésicos es un modelo fisiológico en el que se pueden caracterizar bioquímica, endocrinológica y por la expresión de genes a los folículos atrésicos y sanos, y con ello avanzar en el conocimiento de la cronicidad de las señales y rutas que siguen para mantener al folículo sano, o favorecer la muerte de sus células por apoptosis.

El conocimiento preciso de la viabilidad o apoptosis de las células ováricas, permitirá dirigir la toma de decisiones en tratamientos para el control de tumores malignos en el ovario, procesos inflamatorios o persistencia de estructuras como quistes foliculares, así como comprender con mayor profundidad los mecanismos hormonales que se utilizan en la producción animal para hiperovular y las consecuencias que esto ocasiona en el desarrollo embrionario.

prostaglandin independent from the death program already initiated in luteal cells?

The wave-like follicular development shown by most species of zootechnical interest, in which there are healthy dominant follicles and atretic subordinate follicles provides a physiological model in which healthy and atretic follicles may be characterized at biochemical, endocrinological and genetic expression level allowing to advance the understanding of signal chronicity and the pathways followed in order to maintain follicles healthy or to favor cell death by apoptosis.

The understanding of ovarian cell viability or apoptosis will contribute to improve decisions concerning treatment for malignant tumor and inflammatory process control, or against persistence of structures such as follicular cysts, and it will add to a deeper understanding of the hormone mechanisms in animal hyperovulation and its effect on embryonic development.

## ACKNOWLEDGEMENTS

This study was supported by grant # 37767-B of the National Council for Science and Technology (CONACyT) and by program #2115-3-34824 to consolidate academic bodies of PIFI/SEP.

*End of english version*

---

## AGRADECIMIENTOS

Este trabajo fue apoyado por el financiamiento 7767-B del Consejo Nacional de Ciencia y Tecnología (CONACyT) y por el programa #2115-3-34824 para consolidar cuerpos académicos del PIFI/SEP.

## LITERATURA CITADA

1. Zamboni L. Fine morphology of the follicle wall and follicle cell-oocyte association. *Biol Reprod* 1974;10:125-129.

## APOPTOSIS EN LA ATRESIA FOLICULAR Y LA REGRESIÓN DEL CUERPO LÚTEO

2. Amsterdam A, Rotmensch S. Structure-function relationships during granulosa cell differentiation. *Endocrine Rev* 1987;8:309.
3. Hirshfield AN, Midgley LAR. Morphometric analysis of follicular development in the rat. *Biol Reprod* 1978;19:606-611.
4. Niswender GD, Juengel JL, Silva PJ, Rollyson MK, McIntush EW. Mechanisms controlling the function and life span of the corpus luteum. *Physiol Rev* 2000;80:1-29.
5. Demeestere I, Centner J, Gervy C, Englert Y, Delbaere A. Impact of various endocrine and paracrine factors on in vitro culture of preantral follicles in rodents. *Reproduction* 2005;130:147-156.
6. Ginther OJ, Kastelic JP, Knopf L. Composition and characteristics of follicular waves during the bovine estrous cycle. *Anim Reprod Sci* 1989;20:187-200.
7. Rathbone MJ, Kinder JE, Fike K, Kojima F, Clopton D, Ogle CR, Bunt CR. Recent advances in bovine reproductive endocrinology and physiology and their impact on drug delivery system design for the control of the estrous cycle in cattle. *Adv Drug Deliv Rev* 2001;50:277-320.
8. Webb R, Campbell BK, Garverick HA, Gong JG, Gutierrez CG, Armstrong DG. Molecular mechanisms regulating follicular recruitment and selection. *Reproduction in Domestic Ruminants IV. J Reprod Fertil* 1999;54(Suppl 1):33-48.
9. Mihm M, Austin EJ, Good TEM, Ireland JLH, Knight PG, Roche JF, Ireland JJ. Identification of potential intrafollicular factors involved in selection of dominant follicles in heifers. *Biol Reprod* 2000;63:811-819.
10. Fortune EJ, Rivera MG, Evans ACO, Turzillo AM. Differentiation of dominant versus subordinate follicles in cattle. *Biol Reprod* 2001;65:648-654.
11. Rosales TAM. Atresia folicular. *Biología de la reproducción*. Velázquez MJ editor. México: UAM-I 1998.
12. Bao B, Garverick HA. Expression of steroidogenic enzymes and gonadotropin receptor genes in bovine follicles during ovarian follicular waves: a review. *J Anim Sci* 1998;76:1903-1921.
13. Garverick HA, Baxter G, Gong J, Armstrong DG, Campbell BK, Gutierrez CG, Webb R. Regulation of expression of ovarian mRNA encoding steroidogenic enzymes and gonadotrophin receptors by FSH and GH in hypogonadotrophic cattle. *Reproduction* 2002;123:651-661.
14. Braw-Tal R, Roth Z. Gene expression for LH receptor, 17 alpha-hydroxylase and StAR in the theca interna of preantral and early antral follicles in the bovine ovary. *Reproduction* 2005;129:453-61.
15. Rivera MG, Fortune EJ. Proteolysis of insulin-like growth factor binding proteins -4 and -5 in bovine follicular fluid: implications for ovarian follicular selection and dominance. *Endocrinology* 2003;144:2977-2987.
16. Rivera MG, Fortune EJ. Selection of the dominant follicle and insulin-like growth factor (IGF)-binding proteins: evidence that pregnancy-associated plasma protein A contributes to proteolysis of IGF-binding protein 5 in bovine follicular fluid. *Endocrinology* 2003;144:437-46.
17. Rosado A, Rosales AM. Maduración folicular en el mamífero. Atresia, determinantes bioquímicos. *Ciencia* 1991;42:81-97.
18. Ireland JJ, Mihm M, Austin E, Diskin MG, Roche JF. Historical perspective of turnover of dominant follicles during the bovine estrous cycle: key concepts, studies, advancements, and terms. *J Dairy Sci* 2000;83:1648-1658.
19. Hurwitz A, Adashi E. Ovarian follicular atresia as an apoptotic process: a paradigm for programmed cell death in endocrine tissues. *Mol Cell Endocrinol* 1992;84:19-23.
20. Ryan RJ, Lee CY. The role of membrane bound receptors. *Biol Reprod* 1976;14:16-29.
21. Quirk MS, Cowan GR, Harman MR, Hu LC, Porter AD. Ovarian follicular growth and Atresia: the relationship between cell proliferation and survival. *J Anim Sci* 2004;82(E Suppl):E40-E52.
22. Sharma RK. Follicular atresia in goat: A review. *Indian J Anim Sci* 2000;70:1035-1046.
23. Chedrese J. Regulación autocrina y paracrina del desarrollo folicular I: Efectos de los esteroides. *Rev Col Cienc Pec* 2003;16:171-182.
24. Greenwald GS. Temporal and topographic changes in ADN synthesis after induced follicular atresia. *Biol Reprod* 1989;41:175-181.
25. Rosales-Torres AM, Avalos-Rodríguez A, Vergara-Onofre M, Hernández Pérez O, Ballesteros LM, García-Macedo R, et al. Multiparametric study of atresia in ewe antral follicles: Histology, flow cytometry, internucleosomal ADN fragmentation and lysosomal enzyme activities in granulosa cells and follicular fluid. *Molec Reprod Develop* 2000;55:270-281.
26. Carson RS, Findlay JK, Burger HG, Trounson AO. Gonadotropin receptors of the ovine ovarian follicle during follicular growth and atresia. *Biol Reprod* 1979;21:75-87.
27. Tilly JL, Kowalski KI, Schomberg DW, Hsue AJW. Apoptosis in atretic ovarian follicles is associated with selective decreases in messenger ribonucleic acid transcripts for gonadotropin receptors and cytochrome P450 aromatase. *Endocrinology* 1992;131:1670-1676.
28. Murdoch WJ. Comparative morphometry and steroidogenic function of antral ovine follicles destined for ovulation or atresia. *Dom Anim Endocrinol* 1992;9:219-224.
29. Kaynard AH, Periman LM, Simard J, Melner MH. Ovarian 3 beta-hydroxysteroid dehydrogenase and sulfated glycoprotein-2 gene expression are differentially regulated by the induction of ovulation, pseudopregnancy, and luteolysis in the immature rat. *Endocrinology* 1992;130:2192-2200.
30. Daud AI, Bumpus FM, Husain. Evidence for selective expression of angiotensin II receptors on atretic follicles in the rat ovary: an autoradiography study. *Endocrinology* 1989;122:2727-2734.
31. Rosales AM, Hernández-Pérez O, Domínguez R, Mercado E, Rosado A. Proteolytic and antiproteolytic activities in goat antral follicles. *Anim Reprod Sci* 1990;23:213-222.
32. García R, Ballesteros LM, Hernández Pérez O, Rosales AM, Espinosa R, Soto H, Díaz de León L, Rosado A. Metalloproteinase activity during growth, maturation and atresia in the ovarian follicles of the goat. *Anim Reprod Sci* 1997;47:211-228.
33. Meinecke B, Meinecke TS, Gips H. In vitro studies on steroid secretion of intact and atretic follicles. *Berl Much Tierarztl Wochenschr* 1989;95:107-111.
34. Hay MF, Cran DG, Moor RM. Structural changes occurring during atresia in sheep ovarian follicles. *Cell Tissue Res* 1976;169:515-529.
35. Hughes FM Jr, Gorospe WC. Biochemical identification of apoptosis (programmed cell death) in granulosa cell: evidence for a potential mechanism underlying follicular atresia. *Endocrinology* 1991;129:2415-2422.

36. Tilly JL, Kowalski KI, Johnson AI, Hsueh AJW. Involvement of apoptosis in ovarian follicular atresia and postovulatory regression. *Endocrinology* 1991;129:2799-2801.
37. Zheng J, Fricke PM, Reynolds LP, Redmer DA. Evaluation of growth, cell proliferation, and cell death in bovine corpora lutea throughout the estrous cycle. *Biol Reprod* 1994;51:623-632.
38. Okuda K, Korzekwa A, Shibaya M, Murakami S, Nishimura R, Tsubouchi M, Woclawek-Potocka I, Skarzynski DJ. Progesterone is a suppressor of apoptosis in bovine luteal cells. *Biol Reprod* 2004;71:2065-71.
39. Hussein MR. Apoptosis in the ovary: molecular mechanisms. *Hum Reprod Update* 2005;11:162-178.
40. Chen Q, Crosby M, Almasan A. Redox Regulation of Apoptosis before and after Cytochrome C Release. *Korean J Biol Sci* 2003;7:1-9.
41. Lu Q, Harrington EO and Rounds S. Apoptosis and lung injury. *Keio J Med* 2005;54:184-189.
42. Alonso-Pozos I, Rosales TAM, Ávalos RA, Vergara OM, Rosado GA. Mechanism of granulosa cell death during follicular atresia depends on follicular size. *Theriogenology* 2004;60:1071-1081.
43. Chun SY, Hsueh AJW. Paracrine mechanisms of ovarian follicle apoptosis. *J Reprod Immunol* 1998;39:63-75.
44. Sherr CJ, JM Roberts. CDK inhibitors: positive and negative regulators of G1-phase progression. *Genes Dev* 1999;13:1501-1512.
45. Juengel JL, Garverick HA, Johnson AL, Youngquist RS, Smith MF. Apoptosis during luteal regression in cattle. *Endocrinology* 1993;132:249-254.
46. Yadav VK, Sudhagar RR, Medhamurthy R. Apoptosis during spontaneous and prostaglandin F(2alpha)-induced luteal regression in the buffalo cow (*Bubalus bubalis*): involvement of mitogen-activated protein kinases. *Biol Repro* 2002;67:752-759.
47. Rueda BR, Tilly KI, Hansen TR, Hoyer PB, Tilly JL. Expression of superoxide dismutase, catalase and glutathione peroxidase in the bovine corpus luteum: Evidence supporting a role for oxidative stress in luteolysis. *Endocrine* 1995;3:227-232.
48. Korzekwa AJ, Okuda K, Woclawek-Potocka I, Murakami S, Skarzynski DJ. Nitric oxide induces apoptosis in bovine luteal cells. *J Reprod Dev* 2006;52:353-361.
49. Rueda BR, Hendry IR, Hendry III WJ, Stormshak F, Slayden OD, Davis JS. Decreased progesterone levels and progesterone receptor antagonists promote apoptotic cell death in bovine luteal cells. *Biol Reprod* 2000;62:269-76.
50. Hsu SY, Hsueh AJ. Tissue-specific Bcl-2 protein partners in apoptosis: an ovarian paradigm. *Physiol Rev* 2000;80:593-614.
51. Sunderland SJ, Crowe MA, Boland MP, Roche JF, Ireland JJ. Selection, dominance and atresia of follicles during the oestrous cycle of heifers. *J Reprod Fertil* 1994;101:547-555.
52. Evans JLH, Ireland ME, Winn P, Lonergan GW, Smith PM, Coussens, Ireland JJ. Identification of genes involved in apoptosis and dominant follicle development during follicular waves in cattle. *Biol Reprod* 2004;70:1475-1484.
53. Kim JM, Yoon YD, Tsang BK. Involvement of the Fas/Fas ligand system in p53-mediated granulosa cell apoptosis during follicular development and atresia. *Endocrinology* 1999;140:2307-2317.
54. Wang Y, Asselin E, Tsang BK. Involvement of transforming growth factor alpha in the regulation of rat ovarian X-linked inhibitor of apoptosis protein expression and follicular growth by follicle-stimulating hormone. *Biol Reprod* 2002;66:1672-1680.
55. Valdez KE, Cuneo SP, Turzillo AM. Regulation of apoptosis in the atresia of dominant bovine follicles of the first follicular wave following ovulation. *Reproduction* 2005;130:71-81.
56. Austin IJ, Mihm M, Evans ACO, Knight PG, Ireland JLH, Ireland JJ, Roche JF. Alterations in intrafollicular regulatory factors and apoptosis during selection of follicles in the first follicular wave of the bovine estrous cycle. *Biol Reprod* 2001;64:839-848.
57. Caulin-Glaser T, Watson CA, Pardi R, Bender JR. Effects of 17 beta-estradiol on cytokine-induced endothelial cell adhesion molecule expression. *J Clin Invest* 1996;98:36-42.
58. Harnish DC, Scicchitano MS, Adelman SJ, Lyttle CR, Karathanasis SK. The role of CBP in estrogen receptor cross-talk with nuclear factor-kappaB in HepG2 cells. *Endocrinology* 2000;141:3403-3411.
59. Pelzer T, Schumann M, Neumann M, deJager T, Stimpel M, Serfling E, Neyses L. 17beta-estradiol prevents programmed cell death in cardiac myocytes. *Biochem Biophys Res Commun* 2000;268:192-200.
60. Pelzer T, Neumann M, de Jager T, Jazbutyte V, Neyses L. Estrogen effects in the myocardium: inhibition of NF-kappaB ADN binding by estrogen receptor-alpha and -beta. *Biochem Biophys Res Commun* 2001;286:1153-1157.
61. Hadley ME, *Endocrinology*. USA: Ed. Carrie Brandon. 1996.
62. Peluso JJ. Multiplicity of progesterone's actions and receptors in the mammalian ovary [in press]. *Biol Reprod* 2006.
63. Campbell BK, Scaramuzzi RJ, Webb R. Control of antral follicle development and selection in sheep and cattle. *J Reprod Fertil* 1995;49(Suppl):335-350.
64. Glister C, Tannetta DS, Groome NP, Knight PG. Interactions between follicle-stimulating hormone and growth factors in modulating secretion of steroids and inhibin-related peptides by nonluteinized bovine granulosa cells. *Biol Reprod* 2001;65:1020-1028.
65. Spicer LJ. Proteolytic degradation of insulin-like growth factor binding proteins by ovarian follicles: a control mechanism for selection of dominant follicles. *Biol Reprod* 2004;70:1223-1230.
66. Lamote I, Meyer E, Massart-Leen AM, Burvenich C. Sex steroids and growth factors in the regulation of mammary gland proliferation, differentiation, and involution. *Steroids* 2004;69:145-159.
67. Ginther OJ, Beg MA, Bergfelt DR, Donadeu FX, Kot K. Follicle selection in monovular species. *Biol Reprod* 2001;65:638-647.
68. Beg MA, Bergfelt DR, Kot K, Wiltbank MC, Ginther OJ. Follicular fluid factors and granulosa-cell gene expression associated with follicle deviation in cattle. *Biol Reprod* 2001;64:432-441.
69. Rivera GM, Fortune JE. Development of codominant follicles in cattle is associated with a follicle-stimulating hormone-dependent insulin-like growth factor binding protein-4 protease. *Biol Reprod* 2001;65:112-118.
70. Besnard N, Pisselet C, Zapf J, Hornebeck W, Monniaux D, Monget P. Proteolytic activity is involved in changes in intrafollicular insulin-like growth factor-binding protein levels during growth and atresia of ovine ovarian follicles. *Endocrinology* 1996;137:1599-1607.
71. Besnard N, Pisselet C, Monniaux D, Monget P. Proteolytic activity degrading insulin-like growth factor-binding protein-2,

- 3, -4, and -5 in healthy growing and atretic follicles in the pig ovary. *Biol Reprod* 1997;56:1050-1058.
72. Conover CA, Faessen GF, Ilg KE, Chandrasekher YA, Christiansen M, Overgaard M T, Oxvig C, Giudice LC. Pregnancy-associated plasma protein-A is the insulin-like growth factor binding protein-4 protease secreted by human ovarian granulosa cells and is a marker of dominant follicle selection and the corpus luteum. *Endocrinology* 2001;142:2155-2158.
  73. Armstrong DG, Baxter G, Gutierrez CG, Hogg CO, Glazyrin AL, Campbell BK, Bramley TA, Webb R. Insulin-like growth factor binding protein -2 and -4 messenger ribonucleic acid expression in bovine ovarian follicles: effect of gonadotropins and developmental status. *Endocrinology* 1998;139:2146-2154.
  74. Nicholas B, Alberio R, Fouladi-Nashta A, Webb R. Relationship between low-molecular-weight insulin-like growth factor-binding proteins, Caspase-3 activity, and oocyte quality. *Biol Reprod* 2005;72:796-804.
  75. Rivera GM, Fortune JE. Development of codominant follicles in cattle is associated with a follicle-stimulating hormone-dependent insulin-like growth factor binding protein-4 protease. *Biol Reprod* 2001;65:112-118.
  76. Yung MC, VandeHaar MJ, Fogwell RL, Sharma BK. Effect of energy balance and somatotropin on insulin-like growth factor I in serum and on weight and progesterone of corpus luteum in heifers. *J Anim Sci* 1996;74:2239-2244.
  77. Woad KJ, Baxter G, Hogg CO, Bramley TA, Webb R, Armstrong DG. Expression of mRNA encoding insulin-like growth factors I and II and the type I IGF receptor in the bovine corpus luteum at defined stages of the oestrous cycle. *J Reprod Fertil* 2000;120:293-302.
  78. Fraser HM, Lunn SF, Kim H, Duncan WC, Rodger FE, Illingworth PJ, Erickson GF. Changes in insulin-like growth factor-binding protein-3 messenger ribonucleic acid in endothelial cells of the human corpus luteum: a possible role in luteal development and rescue. *J Clin Endocrinol Metab* 2000;85:1672-1677.
  79. Kaczmarek MM, Schams D, Ziecik AJ. Role of vascular endothelial growth factor in ovarian physiology – an overview. *Reprod Biol* 2005;5:111-136.
  80. Ferrara N. Vascular Endothelial Growth Factor: Basic Science and Clinical Progress. *Endocrine Reviews* 2004;25:581-611.
  81. Greenaway J, Connor k, Pedersen H, Coomber B, Lamarre J, Petrik J. Vascular endothelial growth factor and its receptor, Flk-1/KDR, are cytoprotective in the extravascular compartment of the ovarian follicle. *Endocrinology* 2004;145:2896-2905.
  82. Guzmán SA, Vergara OM, Ávalos RA, García VFJ, Gutiérrez AC, Rosado GA y Rosales TAM. 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. 2006:242-254.
  83. Alonso-Pozos, I, Romano-Pardo M, Gutiérrez-Aguilar C, Ávalos-Rodríguez A, Vergara-Onofre M, Rosado-García A, Rosales-Torres A. Expresión de isoformas del factor de crecimiento endotelio vascular (VEGF) durante el desarrollo y atresia folicular en las células de la granulosa y de la teca de los folículo de oveja. Reunión Anual de la Academia de Investigación en Biología de la Reproducción, Acapulco, Guerrero, México. 2006:204-220.
  84. Boonyaprakob U, Gadsby JE, Hedgpeth V, Routh P, Almond GW. Expression and localization of vascular endothelial growth factor and its receptors in pig corpora lutea during the oestrous cycle. *Reproduction* 2003;126:393-405.
  85. Foghi A, Teerds KJ, Van der Donk H, Dorrington J. Induction of apoptosis in rat thecal/interstitial cells by transforming growth factor alpha plus transforming growth factor beta in vitro. *J Endocrinology* 1997;153:69-178.
  86. Hakuno N, Koji T, Yano T, Kobayashi N, Tsutsumi O, Takatani Y, Nakane PK. Fas/Apo-1/CD95 system as a mediator of granulosa cell apoptosis in ovaries follicle atresia. *Endocrinology* 1996;137:1938-1948.
  87. Porter SB. Current status of clinical trials with anti-TNF. *Chest* 1997;112(Suppl 6):339-341.
  88. Wada M, Amae S, Sasaki H, Ishii T, Sano N, Nio M, Hayashi Y, Ohi R. The functional roles of porcine CD80 molecule and its ability to stimulate and regulate human anti-pig cellular response. *Transplantation* 2003;75:1887-1894.
  89. Raisova M, Bektas M, Wieder T, Daniel P, Eberle J, Orfanos CE, Geilen CC. Resistance to CD95/Fas-induced and ceramide-mediated apoptosis of human melanoma cells is caused by a defective mitochondrial cytochrome c release. *FEBS Lett* 2000;473:27-32.
  90. Friedman A, Weiss S, Levy N, Meidan R. Role of tumor necrosis factor alpha and its type I receptor in luteal regression: induction of programmed cell death in bovine corpus luteum-derived endothelial cells. *Biol Reprod* 2000;63:1905-1912.
  91. Okano A, Kishi H, Takahashi H, Takahashi M. Tumor necrosis factor-alpha induces apoptosis in cultured porcine luteal cells. *J Reprod Dev* 2006;52:301-306.
  92. Slot KA, Voorendt M, de Boer-Brouwer M, van Vugt HH, Teerds KJ. Estrous cycle dependent changes in expression and distribution of Fas, Fas ligand, Bcl-2, Bax, and pro- and active caspase-3 in the rat ovary. *J Endocrinol* 2006;188:179-192.
  93. Henkar PA. ICE family proteases: mediators of all apoptotic cell death. *Immunit* 1996;4:195-201.
  94. Adams JM, Cory S. The Bcl-2 protein family: arbiters of cell survival. *Science* 1998;281:1322-1326.
  95. Yang MY, Rajamahendran R. Involvement of apoptosis in the atresia of nonovulatory dominant follicle during the bovine estrous cycle. *Biol Reprod* 2000;63:1313-1321.
  96. Nandedkar TD and Dharma SJ. Expression of Bcl(xs) and c-Myc in atretic follicles of mouse ovary. *Reprod Biomed Online* 2001;3:221-225.
  97. Van Nassauw L, Tao L and Harrisson F. Distribution of apoptosis related proteins in the quail ovary during folliculogenesis: BCL-2, BAX and CPP32. *Acta Histochem* 1999;101:103-112.
  98. Flaws JA, Hirshfield AN, Hewitt JA, Babus JK, Furth PA. Effect of Bcl-2 on the primordial follicle endowment in the mouse ovary. *Biol Reprod* 2001;64:1153-1159.
  99. Ratts VS, Flaws JA, Kolp R, Sorenson CM, Tilly JL. Ablation of Bcl-2 gene expression decreases the numbers of oocytes and primordial follicles established in the post-natal female mouse gonad. *Endocrinology* 1995;136:3665-3668.
  100. Perez GI, Robles R, Knudson CM, Flaws JA, Korsmeyer SJ, Tilly JL. Prolongation of ovarian lifespan into advanced chronological age by Bax-deficiency. *Nat Genet* 1999;21:200-203.
  101. Kugu K, Ratts VS, Piquette GN, Tilly KI, Tao XJ, Martimbeau S, Aberdeen GW, Krajewski S, Reed JC, Pepe GJ, Albrecht ED, Tilly JL. Analysis of apoptosis and expression of Bcl-2

- gene family members in the human and baboon ovary. *Cell Death Differ* 1998;5:67-76.
102. Tilly JL, Tilly KI, Kenton ML, Johnson AL. Expression of members of the Bcl-2 gene family in the immature rat ovary: equine chorionic gonadotropin-mediated inhibition of granulosa cell apoptosis is associated with decreased Bax and constitutive Bcl-2 and Bcl-xlong messenger ribonucleic acid levels. *Endocrinology* 1995;136:232-241.
103. Jiang JY, Cheung CK, Wang Y, Tsang BK. Regulation of cell death and cell survival gene expression during ovarian follicular development and atresia. *Front Biosci* 2003;1;8:222-237.
104. Yadav VK, Lakshmi G, Medhamurthy R. Prostaglandin F<sub>2</sub>α-mediated activation of apoptotic signaling cascades in the corpus luteum during apoptosis: involvement of caspase-activated DNase. *J Biol Chem* 2005;280(11):10357-10367.
105. Crow MT, Mani K, Nam YJ, Kitsis RN. The mitochondrial death pathway and cardiac myocyte apoptosis. *Circ Res* 2004;95:957-970.
106. Boiti C, Guelfi G, Zerani M, Zampini D, Brecchia G, Gobetti A. Expression patterns of cytokines, p53 and nitric oxide synthase isoenzymes in corpora lutea of pseudopregnant rabbits during spontaneous luteolysis. *Reproduction* 2004;127(2):229-38.
107. Rueda BR, Tilly KI, Hansen TR, Jolly PD, Hoyer PB, Tilly JL. Increased bax and interleukin-1β-converting enzyme messenger ribonucleic acid levels coincide with apoptosis in the bovine corpus luteum during structural regression. *Biol Reprod* 1997;56:186-193.
108. Boone DL, Tsang BK. Caspase-3 in the rat ovary: localization and possible role in follicular atresia and luteal regression. *Biol Reprod* 1998;58:1533-1539.