



**UBA**  
Universidad de Buenos Aires

## **SUPLEMENTO DE LA FACULTAD DE CIENCIAS VETERINARIAS DE LA UNIVERSIDAD DE BUENOS AIRES**

Chorroarín 280 (C1427CWO) Bs. As., Argentina. Tel.(54 11) 4524 8400.  
www.fvet.uba.ar



Facultad de Ciencias  
**VETERINARIAS**  
Universidad de Buenos Aires



### **Entre la vida y la muerte: Un frágil equilibrio de las células ováricas**

Por Daniel M. Lombardo. E-mail: dlombard@fvet.uba.ar

**CÁTEDRA DE HISTOLOGÍA Y EMBRIOLOGÍA, INITRA.**

*La apoptosis es una forma de muerte fisiológica que resulta de la activación de un programa genético, promoviendo la eliminación de las células germinales. Hasta hace poco desconocida, la apoptosis como modulador de la dinámica del ovario es hoy motivo de un proyecto de investigación en el área de Histología y Embriología de la Facultad, cuyo objetivo es conocer las vías y mecanismos que regulan la atresia folicular ovárica.*

Una vez que las células germinales llegan para colonizar la cresta gonadal (área del mesodermo intermedio), no sólo comienza la embriogénesis ovárica, sino también la ovogénesis y la foliculogénesis, dos aspectos de la maduración y desarrollo de los ovocitos. De aquí en más, sólo un tercio de las células germinales llegan a término para constituir un folículo germinal, el resto muere durante la división de las ovogonias.

Durante décadas, los mecanismos por los cuales las células germinales eran eliminadas permanecieron en la oscuridad, sin embargo actualmente se conoce que la "apoptosis" es el programa genético que regula este suicidio celular.

El ovario es un órgano dinámico en todo el sentido de la palabra; no sólo funcionalmente, sino también estructuralmente hablando. Las células germinales resultan eliminadas por apoptosis durante la etapa perinatal, en la división de las ovogonias y durante la postnatal en la foliculogénesis mediante una involución estructural del folículo ovárico, denominada atresia folicular.

Estos dos mecanismos, la eliminación de las células germinales y la atresia folicular junto con la luteólisis (eliminación del cuerpo lúteo), basados los tres en el proceso de apoptosis, juegan un rol trascendental en la dinámica del ovario.

### **La apoptosis**

La definición de la apoptosis puede abordarse desde varios puntos de vista, o al menos dos son los

más representativos: el genético y el morfológico. Desde un punto de vista genético definimos apoptosis como la expresión "alterada" de una cohorte de genes que resultan conservados tanto estructural como funcionalmente. Desde lo morfológico, la apoptosis resulta definida por una serie de características observables al microscopio óptico, que ya fueron demarcadas por Kerr y col. en 1972: condensación del citoplasma, condensación de la cromatina, redistribución de la cromatina sobre la membrana nuclear, formación de cuerpos citoplasmáticos con organelas incluidas -apoptosomas- y fagocitosis de las células en apoptosis por las circundantes.

Todas estas características genéticas y estructurales presentan a la apoptosis como una forma de muerte celular fisiológica que la diferencian de la "necrosis", la muerte patológica. Sin embargo, en el ovario debemos diferenciar la apoptosis de la muerte celular programada (PCD), siendo la primera aquella que resulta de la expresión de genes que codifican un efector proteico y reaccionan en respuesta a factores del medio ambiente y la segunda como aquella conducida por genes, con un "reloj biológico propio" (timing), que ocurre durante el desarrollo y sin respuesta a factores del medio.

De acuerdo con esto, la dinámica de las estructuras ováricas responde al término de la apoptosis, ya que depende de la acción de factores tróficos o inhibitorios del orden endocrino, paracrino o autocrino.

La mayoría de los estudios sobre la eliminación

perinatal de células germinales ha sido realizada en ratones. Tanto la morfología o técnicas tales como la citometría de flujo para ciertos marcadores de membrana que señalan la apoptosis (anexina V) indican que éste es el proceso de eliminación de esas células. A la inversa, el uso de ratones "knock out" (aquellos que resultan defectivos en un gen particular) indican que las células germinales necesitan de factores reguladores para lograr su supervivencia y no morir por apoptosis. Por ejemplo la falta de SCF (Stem cell factor) o de LIF (Leukemia inhibiting factor) causan disgenesia ovárica en los ratones (escaso desarrollo gonadal).

Durante la etapa postnatal, los ovocitos que lograron sobrevivir los embates de la apoptosis de la etapa perinatal generan una estrecha comunicación con un grupo de células denominadas foliculares o células granulosa (CG). Estas protegen y colaboran en la maduración del ovocito, manteniéndolo dentro de una estructura compleja que es el folículo ovárico. Esta comunicación entre las CG y el ovocito se hace vital para que este último evada la apoptosis, sin embargo la muerte de las CG por apoptosis no sólo lleva a la involución o atresia de la estructura folicular, sino también a la eliminación de la gameta femenina.

Los folículos como contenedores de la gameta

femenina, son estructuras complejas con un ciclo de desarrollo (foliculogénesis) dependiente de productos génicos y hormonas específicas para cada etapa de su desarrollo, desde su faz inicial, el "folículo primordial," hasta la más avanzada, el "folículo preovulatorio". Sin embargo, el proceso de la atresia folicular mediado por la apoptosis de las CG puede ocurrir en cualquier etapa de la foliculogénesis, siendo más comúnmente observable en los folículos antrales y en los dominantes que no han sido seleccionados para ovular. La apoptosis en estadios tempranos de la foliculogénesis permanece inconspicua dada la eficiente fagocitosis de los macrófagos residentes.

## Modulación de la apoptosis

De todo esto podemos deducir la importancia de conocer qué factores modulan la apoptosis en las CG, mecanismo que hasta el momento resulta sumamente complejo y versátil. De entre estos mecanismos, dos son los que se pueden categorizar como de mayor importancia: a) las interacciones celulares, y b) la acción de factores autocrinos, paracrinos, endocrinos y xenobióticos.

Respecto de las interacciones célula-célula, hay de dos tipos CG – célula de la teca interna y CG

- CG. En el primer caso, se conoce que la acción de ciertas hormonas como FSH sobre las CG pueden modular de manera positiva la producción de factores inhibitorios tales como TGF- $\beta$  (Transforming grown factor  $\beta$ ) que a su vez actúa sobre las células tecales deprimiendo la producción de factores tróficos necesarios para la supervivencia de las CG.

En cuanto a la interacción CG - CG, el segundo caso, resulta éste uno de los motivos de investigación de nuestro laboratorio. Trabajos realizados hasta el momento han demostrado el rol preponderante que tienen las moléculas de adhesión intercelular (caderina tipo E y N) en mantener no sólo la integridad de la estructura folicular sino también preservar de la atresia mediada por la apoptosis, esto en un modelo *in vitro* de células granulosas bovinas mantenidas en cultivo primario. Asimismo, hemos demostrado que el bloqueo experimental de estos contactos lleva a la muerte de las CG por apoptosis.

Acerca del segundo mecanismo (la acción de factores autocrinos, paracrinos, endocrinos y xenobióticos), cabe mencionar que son numerosos los factores que se conocen como moduladores pro apoptóticos o anti apoptóticos, muchos de los cuales entrecruzan funciones regulatorias tanto para el proceso de apoptosis como para la esteroideogénesis.

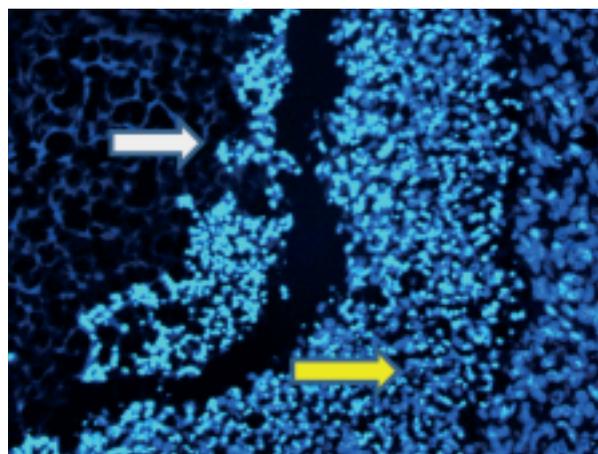
Un ejemplo clásico poco explorado en especies de interés veterinario resulta la GnRH (hormona liberadora de gonadotropinas), para la cual las CG poseen receptores. La relación apoptosis - GnRH en un modelo *in vitro* de CG bovinas, resulta otro de los motivos de trabajo en nuestro laboratorio. Hasta el momento, resultados preliminares utilizando un agonista sintético de GnRH (muchos de los cuales se utilizan durante la sincronización del celo en bovinos), han indicado la acción apoptótica para las condiciones trabajadas en ese modelo, y en folículos antrales de mediano tamaño (hasta 5 mm).

De la misma forma, hemos arribado a la investigación del rol de ciertos factores que resultan tóxicos ambientales (xenobióticos) y de acción teratogénica, tales como los del grupo de las naftoflavonas (NF  $\alpha$  y  $\beta$ ), ambos ligandos exógenos de los receptores de aryl hidrocarburos (AhR), receptores que también juegan un papel muy importante en la esteroideogénesis. Nuestros resultados, confirmados mediante técnicas de distinto grado de especificidad para diagnosticar el mecanismo de apoptosis (DAPI, Anexina V, ensayos de actividad de caspasas, etc.), demuestran claramente el rol apoptótico de la NF  $\alpha$  sobre las CG porcinas mantenidas en cultivo primario.

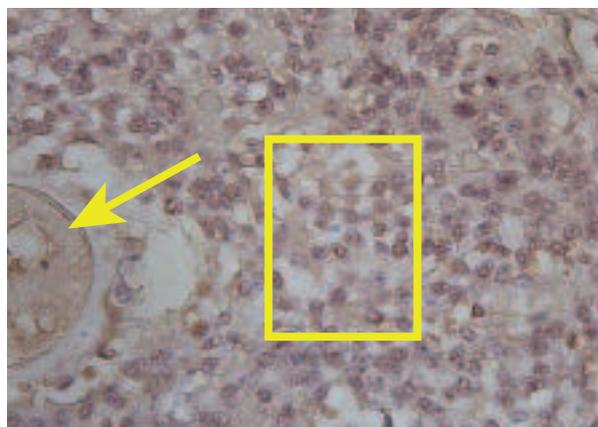
A todo esto debemos agregar que los factores protectores de las especies reactivas al oxígeno (ROS) juegan un papel trascendental en la prevención de la atresia folicular y en la supervivencia de las CG, siendo la evaluación de la actividad de ciertas enzimas como SOD o CAT de importancia en la interpretación del frágil equilibrio entre la vida y la muerte en el que se encuentran las CG y los ovocitos durante la foliculogénesis.

Creemos que el estudio de la apoptosis como un modulador del desarrollo folicular no debe focalizarse ni en un modelo ni en una situación experimental particular, sino que debería apuntar a una caracterización temporal del proceso, es decir en cada una de las etapas de la foliculogénesis. De manera tal de llegar a conocer cuáles son las vías y mecanismos que regulan la atresia en cada una de ellas.

**Fotografía 1.** Detección por tinción con DAPI (fluorescencia) de células granulosas (CG) antrales (flecha blanca) con morfología cromatínica compactada. Obsérvese la diferencia respecto de las CG murales (flecha amarilla) 25x.



**Fotografía 2.** Detección por inmunohistoquímica del producto de expresión de Bax (proteína apoptótica) en células granulosas de un folículo atrésico bovino (recuadro amarillo) y en el ovocito (flecha amarilla). 40x



## IMPORTANCIA

*Uno de los resultados más relevantes de estas investigaciones fue el análisis de las implicancias y consideraciones futuras del estudio de la apoptosis en la dinámica del ovario. El conocimiento de los factores que la regulan y su caracterización temporal durante la foliculogénesis, permitiría: 1) llegar a un conocimiento aplicado que podría ayudar a combatir desordenes reproductivos, 2) facilitar reducir o prevenir la eliminación perinatal de ovocitos, 3) preservar los ovocitos de factores ambientales durante el proceso de congelación, 4) destruir el pool de células germinales en aquellos casos de requerir un control definitivo e irreversible de la natalidad (anticoncepción definitiva) y 5) destruir selectivamente la cohorte ovulatoria (folículos seleccionados para ovular), ergo una anticoncepción temporaria.*

## Destacados:

- Los mecanismos por los cuales las células germinales eran eliminadas permanecieron en la oscuridad, sin embargo actualmente se conoce que la "apoptosis" es el programa genético que regula este suicidio celular.
- Todas estas características genéticas y estructurales presentan a la apoptosis como una forma de muerte celular fisiológica que la diferencian de la "necrosis", la muerte patológica.
- La dinámica cíclica de las estructuras ováricas depende en parte de un frágil equilibrio entre la vida y la muerte de las células ováricas, modulado por efectores proteicos pro y anti apoptóticos.
- Entre los factores modulan la apoptosis en las células granulosa, dos surgen como de mayor importancia: a) las interacciones celulares, y b) la acción de factores autocrinos, paracrinos, endocrinos y xenobióticos.