

Disrupción de las uniones mediadas por caderinas. Su rol en la apoptosis de las células granulosas del ovario porcino

LOMBARDO, DM ^{1,2}; MEDINA, JM ¹; REVILLA, M ¹; CAROU, CM. ^{1,2} Y FIORITO, CD.¹

Resumen

La fisiología normal de los tejidos reproductivos dependería de un apropiado contacto célula-célula mediado por caderinas, moléculas Ca⁺⁺ dependientes. El proceso de la atresia dado por apoptosis de las células de granulosa (CG), podría estar relacionado con la pérdida de los contactos celulares. El objetivo del trabajo fue establecer la relación entre la disrupción de estas uniones y la apoptosis de las CG.

Considerando la importancia de las caderinas (E-CAM y N-CAM) en el desarrollo y en la atresia folicular, que la mayoría de los folículos empiezan a degenerar en el estadio antral temprano y considerando la atresia como un proceso estadio-dependiente se planteó identificar y localizar la expresión de estas moléculas en el ovario de cerdo adulto, tratando de discriminar y relacionarla con los distintos estadios de la folículo génesis. En los folículos antrales, aquellas células que presentan una aparente pérdida de integridad (falta de cohesión con células vecinas o desagregadas de la capa de células antrales), no se identificó marcación alguna para los anticuerpos en cuestión.

Con la finalidad de correlacionar el mismo proceso in vitro, se realizaron cultivos primarios de CG de ovarios porcinos obtenidos por punción en folículos antrales. Los cultivos fueron expuestos por 6, 12 y 24 hs a diferentes concentraciones del inductor de apoptosis, concentraciones de 100 y 9 nM de EGTA (quelante exclusivo de Ca⁺⁺). Se determinó índice relativo de apoptosis (IRA) mediante la cuantificación de las células teñidas con DAPI, TUNEL e inmunocitoquímica (ICQ) con anticuerpos anti Bax. Del mismo modo se determinó el porcentaje de viabilidad por exclusión con Azul Tripán. Se observaron manifestaciones evidentes de apoptosis en los diferentes tratamientos con EGTA, sin embargo las diferencias entre el porcentaje de viabilidad y los IRA por DAPI no son significativas respecto del control. Los resultados observados fueron validados cuali y cuantitativamente por TUNEL e ICQ anti Bax.

Palabras clave: (Células granulosas); (Caderina E); (Apoptosis); (Ovario); (Porcino).

¹Cátedra de Histología y Embriología. Facultad de Cs. Veterinarias. UBA. ² Instituto de Investigación y Tecnología en Reproducción Animal (INITRA - UBA). E-Mail: dlombard@fvet.uba.ar

Recibido: 13-07-2010 - Aceptado: 17/09/2010

Summary

The normal physiology and the dynamics of the reproductive tissue depends in great measure of an appropriate contact cell to cell, which is mediated by proteins of the cadherins family, molecules Ca^{++} dependent such as the E and N Cadherin. In these circumstances, the atresia process for apoptosis of the granulosa cells (CG), it could be related with the loss of this cellular contacts. In this work, the objective was to establish the relationship among the loss of the contacts Ca^{++} dependent with the integrity and the apoptosis of the CG.

Considering the importance of cadherin (E-CAM and N-CAM) in the development and follicular atresia, which most of the follicles begin to degenerate in the early antral stage and considering the atresia as a stage-dependent process was raised identify and localize the expression of these molecules in the ovary of adult pig, trying to discriminate and relate the different stages of follicle genesis. En antral follicles, those cells with an apparent loss of integrity (lack of cohesion with neighboring cells or disaggregated antral cell layer), did not identify any other label for antibodies in question.

In order to correlate the same process in vitro, the study model was a cellular primary culture of porcine CG obtained by aspiration of antrals follicles, which were treated with EGTA, to obtain the disruption of the homophilic junctions. The treatments were made with EGTA 9 nM and 100 nM and without EGTA, both treatment at different times of induction 6, 12 and 24 hours.

In each case, the apoptosis index (AI) was determined by DAPI and TUNEL techniques. Also, was carried out a quantitative evaluation by analysis of images of the expression of Bax by immuno cytochemical. To different concentration of the inductor, the treatments with serum demonstrated a bigger AI to 9 nM (1,27; 2,58 and 1,38 to 6, 12 and 24 hs respectively). The activation was significant in the treatments of 12 hs with serum ($p \leq 0,05$) respect to the control. To concentrations of 100 nM the AI didn't demonstrate significant differences of activation. The quantitative determination of the expression of Bax and for ICQ validates the previous results.

Key words: (Granulosa cells); (Apoptosis), (E-cadherine); (Ovary); (Swine).

Introducción

El ovario de la hembra mamífera, está compuesto por tejido intersticial y estructuras tales como los folículos los que se presentan en diferentes estadios según su dinámica. De acuerdo con esta dinámica y teniendo en cuenta la expresión de receptores hormonales, los folículos pueden ser clasificados en; folículos primordiales, primarios, secundarios y terciarios siendo los últimos tres considerados como antrales, es decir que tienen una pared compuesta por varias capas de células de granulosa (CG) y una cavidad central llamada

antro folicular, el cual se desarrolla a partir de la producción de líquido folicular por parte de las CG y de las células de la teca. En los folículos antrales diferenciamos tres capas o tipos de CG; las CG basales, las murales y las antrales.

La atresia folicular puede ocurrir en cualquier estadio de la foliculogénesis^{10, 16, 23}. Es un proceso totalmente regulado en el cual hay una desorganización de la estructura folicular, en la cual se observa separación por pérdida de los contactos célula-célula y muerte por apoptosis en las CG^{5, 11-12, 14, 26}.

La apoptosis o muerte celular programada

consiste en un proceso ordenado y regulado genéticamente por la síntesis de proteínas tales como los productos de los genes de la familia Bcl-2 (que incluye a genes pro y anti apoptóticos), por las caspasas que constituyen proteínas iniciadoras y efectoras que ejecutan el final de la cascada; la fragmentación ordenada del ADN en fragmentos de 100 a 200 pb³. Estas últimas, integran la vía común de terminación del proceso^{6, 15, 18, 27}.

Durante la apoptosis se observan cambios morfológicos en la célula que pueden ser usados como indicadores. Estos cambios consisten en: la condensación y fragmentación específica de la cromatina en segmentos de 186 pb (fragmentación internucleosómica), la permanencia en un primer momento de la integridad estructural de la membrana plasmática, durante el cual las células se tornan pequeñas y globuliformes y un último periodo durante el cual la membrana se fragmenta formando cuerpos apoptóticos que contienen material celular, evitando que salga el contenido al medio extracelular y estimule una respuesta inflamatoria^{13, 36}.

Las señales necesarias para que una célula entre en apoptosis pueden provenir de la célula misma o de la interacción con otras células como por ejemplo la pérdida de contactos homofílicos entre ellas^{4, 31-32}, constituyendo esto último, nuestra hipótesis general de este trabajo para el modelo celular propuesto, las células granulosas del ovario porcino.

La fisiología normal de los tejidos reproductivos depende de un apropiado contacto célula-célula el cual, está dado por proteínas de superficie de la familia de las caderinas (CAMs)^{1-2, 24, 28}.

Las caderinas (CAMs), intervienen en una amplia variedad de procesos tales como adhesión celular, supervivencia, morfogénesis, mantenimiento de la integridad tisular y tumorigénesis³. Son glicoproteínas de membrana pertenecientes a una gran superfamilia compuesta por dos clases de caderinas: las de tipo I que incluye a E-, N-, y P-CAM que intervienen en uniones calcio dependiente vía interacciones homofílicas

y las de tipo II, menos estudiadas, que incluyen OB-, K-CAM. Las de tipo I estructuralmente presentan cinco dominios extracelulares entre los cuales EC1 tiene una secuencia apropiada para la interacción con otra caderina de la misma especie (unión homotípica). El resto de la molécula lo constituyen un dominio transmembrana y dos dominios intracelulares compuestos por α -catenina, β -catenina y α -actinina. Estos dominios que interactúan con los filamentos intermedios del cito esqueleto y con la actina directa o indirectamente serían los responsables de la transmisión de señales desde la membrana al núcleo celular con la subsiguiente activación génica^{19, 28}.

Estudios hechos en porcinos para determinar los niveles de E-CAM y N-CAM y los niveles de ARNm durante la ontogenia ovárica revelaron una marcada disminución de los niveles de estas moléculas en folículos de cerdas adultas (mayores a 16 semanas) y en folículos atrésicos. Esto le confiere a las CAMs un rol importante en el mantenimiento de la integridad estructural que se ve comprometida en los procesos de atresia folicular^{7-9, 20-22, 29}. Una adhesión celular regulada es requerida para la organización de las células de granulosa CG en dos subpoblaciones necesarias para la foliculogénesis: la apoptosis de CG no deseadas y la formación del cuerpo lúteo²⁸. En los folículos atrésicos de porcino se vio que la pérdida de adhesión celular en CG y de la integridad de la pared folicular está asociada a una disminución significativa en la expresión de E-CAM^{2, 29}, asimismo se vio un importante descenso de los niveles de E-CAM en el cuerpo lúteo en la etapa luteal tardía¹⁷. En CG de rata, la supresión de la actividad y expresión de N-CAM causa una disrupción de la agregación celular y promueve la apoptosis *in vitro*²⁹.

Considerando la importancia de estas moléculas en el desarrollo y en la atresia folicular, que la mayoría de los folículos empiezan a degenerar en el estadio antral temprano y considerando la atresia como un proceso estadio-dependiente se planteó identificar y localizar la expresión de E-CAM y N-CAM en el ovario de cerdo adulto, tratando de discriminar y

relacionarla con los distintos estadios de la folículo génesis.

Asimismo, conociendo el rol de estas moléculas en el mantenimiento de la integridad celular, constituyó también objetivo del trabajo establecer en un modelo celular *in vitro*, la relación entre la pérdida de los contactos homofílicos mediados por caderinas con la integridad y la apoptosis de las CG en el ovario de porcino adulto.

Materiales y métodos

1. Identificación y localización de la expresión de E-CAM y N-CAM en ovario de cerdo

a. Obtención de muestras: los ovarios de porcino se obtuvieron en frigorífico a partir de animales llegados a faena. Se los fijó inmediatamente en formol tamponado al 10%, para mantener la estructura y evitar los cambios *post mortem*.

b. Elección de muestras: se procesaron los ovarios según la técnica histológica de rutina para inclusión en Parafina – Histoplast (a/a). Luego se realizaron cortes seriados de 5 µm de espesor y cada 25 µm y tinción con Hematoxilina-Eosina a fin de caracterizar los diferentes estadios foliculares en cortes de ovario.

c. Inmunohistoquímica: se utilizaron como anticuerpos primarios el monoclonal anti E-CAM Clon DECMA 1 (SIGMA Chemical Co) en la dilución óptima de trabajo de 1:1600 en PBS y el monoclonal anti N-CAM (Sta Cruz Biotechnology, Inc) en la dilución óptima de 1:100. Se utilizó el sistema de detección L-SAB (estreptavidina biotinilada marcado con peroxidasa) y revelado de la señal con diaminobencidina (DAB). En todas las determinaciones por inmunohistoquímica se realizaron los correspondientes controles negativo de técnica (para el anticuerpo primario y secundario), a fin de descartar falsos positivos o *background* debido a uniones inespecíficas.

2. Relación entre la pérdida de contactos homofílicos mediados por caderinas con la integridad y la apoptosis *in vitro* de CG de ovarios porcinos

Diseño experimental

Se realizaron cultivos primarios de CG porcina provenientes de folículos de tamaño mediano (3.5 a 5 mm) para la determinación inmunohistoquímica de caderina E y N fuera del contexto tisular, es decir, su expresión *in vitro*.

Para establecer *in vitro* la relación entre la pérdida de contactos homofílicos mediados por caderinas con la integridad y la apoptosis de las CG y dado que el calcio cumple un rol fundamental en el mantenimiento de las uniones mediadas por caderinas, se usó un compuesto quelante exclusivo del calcio, el EGTA (Ethylene glycol – bis (2-aminoethylether) – N, N, N', N' Tetracetic acid), con el fin de lograr la disrupción de todos los contactos calcio dependiente²⁵.

Se buscó comparar el efecto del EGTA como inductor de la apoptosis en función de diferentes concentraciones de EGTA (9 y 100 nM), contrastándolo con su control experimental (ausencia del inductor) y en función de distintos tiempos de exposición al inductor (6, 12, 24 horas). En todas las situaciones las células fueron cultivadas con niveles de mantenimiento de suero fetal bovino (SFB) (5%).

- 1- EGTA 100 nM + SFB 5%
- 2- EGTA 9 nM + SFB 5%
- 3- EGTA (-) + SFB 5%

La incubación con el inductor se realizó por 6, 12 y 24 horas. En todos los casos se hicieron tres experimentos con tres repeticiones.

a. Cultivo primario de CG porcina. Obtención de muestras: las células de granulosa se extrajeron por punción de folículos de tamaño mediano (3.5 a 5 mm) provenientes de ovarios de faena.

b. Plaqueo de CG para Inmunohistoquímica: las CG se cultivaron en placas de 6 pocillos con medio DMEM + F12 con 5% de SFB y suplemento de L-Glutamina 200 mM y antibióticos (penicilina, estreptomycin + fungizona). A las 24 horas las células llegaron a semi confluencia y se procedió a la fijación con la mezcla fijadora para células adherentes (paraformaldehído 4%, glutaraldehído y buffer fosfato). Se utilizaron los anticuerpos primarios monoclonales anti N-CAM en la dilución de 1:100 en PBS y anti E-CAM en las diluciones de 1:1600 en PBS y se continuó con el kit DAKO hasta revelado de la señal.

c. Análisis de apoptosis (IRA – Índice Relativo de Apoptosis): para determinar el índice de apoptosis, se homogeneizaron las CG obtenidas por punción folicular en medio DMEM + F12, con el agregado de SFB 5%, L-Glutamina 200 mM y antibióticos (Penicilina-Estreptomycin + Fungizona). Para la realización de la tinción de DAPI y/o TUNEL, al final del tiempo dispuesto según el diseño experimental, se procedió a la fijación de las células y al análisis de viabilidad.

Tinción con DAPI: las CG se fijaron con metanol 5 min. Se usó el fluorocromo en la dilución de 1:500. Se procedió a la captura de imágenes y cuantificación utilizando el software Qwin plus de Leica Co. Se contaron 35 campos con una magnificación de 30X.

Técnica de TUNEL: para la fijación se utilizó Paraformaldehído 4%. Se utilizó el kit *In Situ Cell Death Detection*, POD (Roche). Esta técnica se basa en la incorporación de nucleótidos marcados con FICT al extremo 3' de la cadena interrumpida, revelándolos con un anticuerpo anti FICT (fragmento Fab), conjugado con peroxidasa (POD). Se realizó un control positivo de técnica utilizando la enzima ADNasa y un control negativo sin incubación con la misma. De esta forma, el revelado de los núcleos apoptóticos fue con FICT y el contraste citoplasmático de las células se hizo con Verde de Metilo al 0.5%.

d. Análisis de Viabilidad (IV – Índice de Viabilidad): el análisis de viabilidad se hizo

mediante exclusión del Azul Tripán (colorante vital).

e. Identificación de apoptosis folicular basal en el tejido ovárico: se realizaron cortes histológicos de los ovarios seleccionados por presentar mayor variedad de estadios foliculares. En ellos se aplicó la tinción con DAPI a una concentración de 1:500 y se montaron con DPX. La observación se realizó en microscopio de fluorescencia. Se prestó especial atención al patrón de fluorescencia de las CG tanto en folículos antrales como en los atrésicos.

También se realizó la inmunomarcación con anticuerpos primarios anti Bax y anti BCL-2 en las diluciones de 1:1000 y 1:200 respectivamente. Se prosiguió según protocolo L-SAB revelando con DAB.

f. Identificación de productos de Bax en cultivo primario de CG porcina: en las células en cultivo y tratadas con el inductor según el diseño experimental, se realizó un análisis de apoptosis identificando por inmunohistoquímica, los productos intermediarios derivados de Bax, El anticuerpo anti Bax se utilizó en la dilución de 1:1000, aplicando el protocolo de L-SAB.

Resultados

1. Identificación y localización de la expresión de E-CAM y N-CAM en ovario de cerdo

a) Monitoreo inmunohistoquímico de la expresión de E-CAM y N-CAM en tejido de ovario porcino: el análisis histológico de los cortes de ovario reveló la presencia de patrones morfológicos característicos de apoptosis (medias lunas cromatínicas, picnosis nuclear, cuerpos de extrusión apoptóticos, etc.). Los mismos se verificaron en folículos atrésicos, tejido intersticial y en la capa antral de CG de los folículos antrales.

En relación al monitoreo inmunohistoquímico para E-CAM y en el intento de establecer relación entre la expresión de las moléculas de adhesión y la integridad celular, en los cortes realizados se identificó la señal positiva en la capa mural de CG correspondiente a los folículos antrales

(Fotografía 1). Esto es coincidente con la imagen de células agregadas y cohesivas, no viéndose marcación en aquellas que se deslaminan hacia la cavidad antral del folículo perdiendo su contacto con el resto de las CG.

En correspondencia a lo descrito por Ryan *et al.* (1996), se observó señal en aquellas células no desagregadas correspondientes a folículos identificados morfológicamente como atrésicos y en el epitelio superficial ovárico (ESO). También se identificó marca en células intersticiales del parénquima ovárico.

Para el caso de N-CAM sólo se identificó marca en la CG cohesivas de folículos antrales.

b. Caracterización morfológica de la apoptosis en tejido ovárico por DAPI: en el intento de correlacionar la morfología correspondiente al proceso de apoptosis con la falta de integridad y cohesión de aquellas CG que no se marcan con los anticuerpos anti E-CAM, se realizó una tinción con el fluorocromo DAPI (intercalador de bases del ADN) excitando la muestra con luz UV (365 nm). El resultado observado, es coincidente con el hecho que la capa de células murales positivas al anticuerpo anti E-CAM, muestran según esta aproximación metodológica un patrón de integridad en la cromatina (no se observa segmentación apoptótica ni cuerpos). No siendo igual para el caso de aquellos folículos antrales y para las CG antrales que se deslaminan y que reaccionando negativamente al monoclonal anti E-CAM, muestran una mayor condensación cromatínica evidenciable por DAPI (Fotografía 2).

En los cortes de ovario con esta tinción, se pueden identificar células de carácter apoptótico (media luna de compactación cromatínica) y numerosos cuerpos de extrusión apoptóticos, viéndose un mayor número en la capa de células antrales así como también algunos en la capa de células murales de los folículos antrales. La mayor proporción se aprecia en CG correspondiente a los folículos atrésicos.

c) Caracterización inmunohistoquímica de la apoptosis en tejido ovárico por inmunomarcación con anticuerpos anti Bax y

anti Bcl-2: con fin de contrastar lo observado tanto en la tinción con H/E como con DAPI, se procedió a la identificación en el tejido ovárico de marcadores específicos. Para ello se monitoreo dicho tejido por inmunohistoquímica con anticuerpos contra productos pro y anti apoptóticos, Bax y Bcl-2. La señal positiva para el producto de Bax, fue identificada en las CG antrales y murales, correspondiendo a folículos antrales. También se la localizó en CG de folículos atrésicos (Fotografía 3).

A diferencia la señal de Bcl-2 se pudo identificar en las células basales y murales de los folículos antrales, siendo nula en los folículos atrésicos (Fotografía 4).

d) Inmunocitoquímica en cultivo primario de células de granulosa porcina (CGP) para E y N- CAM: a partir de cultivos primarios de CG porcina obtenidas por aspiración de folículos de entre 3,5 y 5 mm se caracterizó por inmunohistoquímica la presencia de ambas caderinas E y N. Ambas se las localiza en la membrana plasmática de las CG así como también en los gránulos de exocitosis.

2. Relación entre la pérdida de contactos homofílicos mediados por caderinas con la integridad y la apoptosis in vitro de CG de ovarios porcinos

a) Efecto inductor de la apoptosis en cultivo primario de CGP mediado por la remoción de las uniones Ca⁺⁺ dependiente. Tratamiento con EGTA como inductor de apoptosis

Índices de apoptosis por DAPI y determinación de viabilidad: el experimento se planteó para dos concentraciones de EGTA (9 y 100 nM) y para tres tiempos de inducción (6, 12 y 24 hs). Ambas variables (tiempo y concentración).

Para concentraciones de 9 y 100 nM y para para 6 hs de inducción no se observó una activación considerable respecto de su control, obteniéndose valores de IRA de 27% y de 10% respectivamente. Las diferencias no son significativas ($p \leq 0.05$).

Bajo 12 hs de inducción, la activación resultó significativa respecto del control ($p \leq 0.05$), siendo de 152% para la concentración de 9 nM y de 35% para 100 nM. Con una inducción de 24 hs los valores de activación se mantienen más altos a concentraciones de 9 nM y 100 nM (38% y 22% respectivamente), aunque la magnitud de la activación es inferior a la del tratamiento con 12 hs de activación (Tabla 1).

Índices de apoptosis por TUNEL en cultivos primarios de CGP tratados con EGTA
La determinación de IRA por DAPI es una técnica de baja especificidad para diagnosticar el proceso apoptótico. Esto se debe a que la técnica se basa en la identificación de patrones cromatínicos compactados. Siendo la causa de

este patrón no solamente el mecanismo de la apoptosis, el empleo de esta técnica como única herramienta puede llevar a la sobre valoración del proceso. Por esta razón se aplicó una técnica de mayor especificidad diagnóstica como el TUNEL, basada en la identificación enzimática de los fragmentos internucleosomales que resultan separados durante la apoptosis.

En este caso, la determinación por TUNEL fue realizada para sólo para 24 hs de inducción dado que la técnica revela una ventana tardía del proceso apoptótico.

Los valores de IRA determinados por TUNEL resultaron inferiores respecto del control por lo que se concluye no habría activación y además también resultaron ser menores a los determinados por DAPI (Tabla 2).

Tabla 1: índice relativo de apoptosis por tinción con DAPI comparado para tratamientos de 6, 12 y 24 hs de inducción. Los valores son relativos al control EGTA (-) – SFB 5%. $p \leq 0.048$.

Tratamiento	6 hs	12 hs	24 hs
EGTA 100 nM – SFB 5%	1,1	1,35	1,22
EGTA 9 nM – SFB 5%	1,27	2,52	1,38
EGTA (-) – SFB 5%	1	1	1

Tabla 2: índice relativo de apoptosis para la técnica de TUNEL para una inducción de 24 hs. Los valores son relativos al control EGTA (-) – SFB 5%. $p \leq 0.05$.

Tratamiento	IRA para 24 hs	Células por campo	% de viabilidad
EGTA 100 nM – SFB 5%	0,30	14,10	10,84
EGTA 9 nM – SFB 5%	0,47	25,50	1,33
EGTA (-) – SFB 5%	1,00	8,60	2,35

Tabla 3: índice relativo de apoptosis para células Bax positivas por ICQ para una inducción de 6 hs. Los valores son relativos al control EGTA (-) – SFB 5%. $p \leq 0.05$.

Tratamiento	IRA para 6 hs	Células por campo	% de células Bax positivas
EGTA 100 nM – SFB 5%	0.72	9,36	21,43
EGTA 9 nM – SFB 5%	1.68	22,28	49,73
EGTA (-) – SFB 5%	1.00	25,22	29,52

b) Determinación de apoptosis por IHQ mediante marcación de productos de Bax en cultivos primarios de CGP tratados con EGTA: con el fin de confirmar el diagnóstico de apoptosis identificando moléculas intervinientes en el proceso, se realizó una inmunocitoquímica (ICQ) identificando en cultivos primarios de CGP la presencia de productos de Bax. Para ello se trabajó con el diseño de 6 hs de inducción, entendiendo que la expresión del producto de Bax se puede considerar como un evento temprano dentro del proceso apoptótico. Se detuvo la activación y se fijaron las células para ICQ. Se empleó un anticuerpo monoclonal anti Bax clon 2D2 (SIGMA Chemical Co) en una dilución óptima de trabajo de 1:1000 en PBS, aplicando el protocolo de L-SAB (Kit IHQ de DAKO).

Basándonos en el criterio de la inmunomarcación específica y en el criterio morfológico de la apoptosis, se realizó una cuantificación subjetiva, es decir un IRA por ICQ determinando productos de Bax en células tratadas según el diseño experimental por 6 hs de inducción.

Los resultados del IRA obtenidos por esta metodología (ICQ) arroja valores de magnitud superior a los obtenidos por DAPI. En cultivos los tratados a la concentración de 9 nM de EGTA se observa un nivel de activación un 20% superior respecto de su control. Sin embargo para 100 nM la activación se encuentra un 8.09% por debajo del control (Tabla 3).

Discusión

Es interesante destacar que en los folículos antrales se observa un marcado proceso de exocitosis en las CG antrales, observándose marcación positiva con el anticuerpo anti E-CAM en la membrana de los gránulos de exocitosis. Esto último no sólo habla del intenso tráfico transcelular de vesículas de membrana, sino también de que se trata de células activas e íntegras morfológicamente.

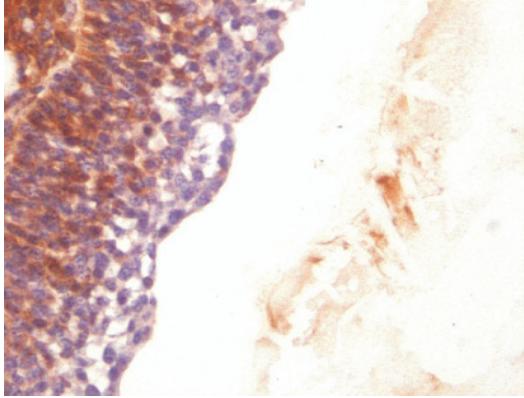
En los folículos antrales, aquellas células que presentan una aparente pérdida de integridad (falta de cohesión con células vecinas o

desagregadas de la capa de células antrales), no se identificó marcación alguna para los anticuerpos en cuestión. Esto sería explicable dado el carácter dinámico de la capa granulosa propuesta por van Wezel (1999)³³, donde se sugiere que la tasa de expansión del antro determina diferencias entre folículos en cuanto a las distintas formas celulares que constituyen la capa granulosa, los distintos fenotipos de la membrana basal y la diferente localización de las células más jóvenes.

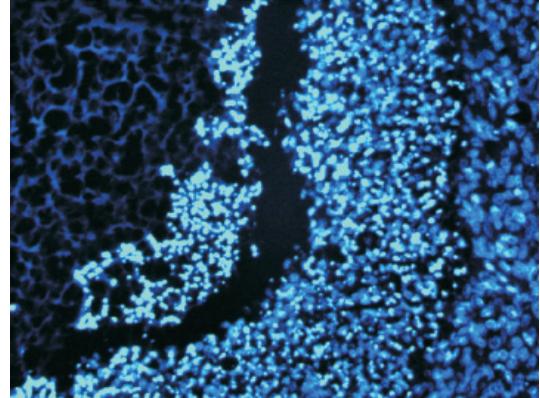
Los productos de genes supresores tumorales o de proto oncogenes de la familia Bcl-2 pueden funcionar como mediadores intracelulares de la supervivencia celular. Los productos proteicos de Bcl-2 y Bax fueron descritos como factores anti apoptóticos o pro apoptóticos, respectivamente³⁴. El gen Bcl-x genera varios productos alternativos de *splaicing*. Uno de ellos codifica una isoforma larga (Bcl-xL), la cual ha sido descrita como una proteína anti apoptótico, y la otra codifica una isoforma corta (Bcl-xS), la cual reúne el efecto represor de la apoptosis de bcl-2 y de Bcl-xL²⁷. Tilly y Tilly han demostrado que el efecto inhibitor de la apoptosis y de la atresia en CG de ovario bovino está relacionado con la capacidad de las gonadotropinas de reducir la expresión de Bax en CG, produciendo un cambio en la relación entre Bax y los niveles constitutivos de Bcl-2 y Bcl-xL¹⁵.

Si consideramos los productos del gen Bax como pro apoptóticos y a los del Bcl-2 como anti apoptóticos, la localización inmunohistoquímica de los mismos en las diferentes estructuras dinámicas del tejido ovárico, justifica con lógica lo que se describe en la caracterización inmunohistoquímica y por DAPI.

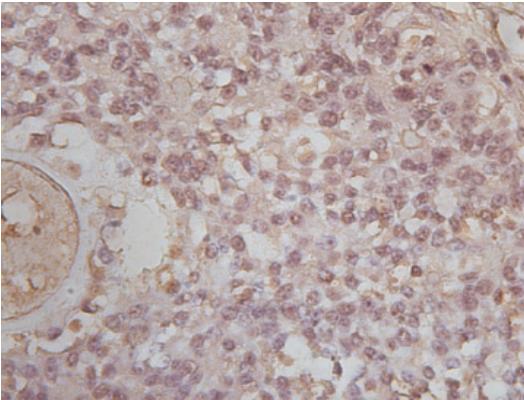
Tal como se describiera en los resultados, a concentraciones de 9 y 100 nM durante 24 hs de inducción, los valores de activación de la apoptosis son significativos pero de menor magnitud respecto de la exposición a inductores durante 12 hs. Las imágenes observadas y el análisis de viabilidad nos permiten afirmar que a tiempos prolongados aumenta la cantidad de células muertas, sub valorando la cantidad de



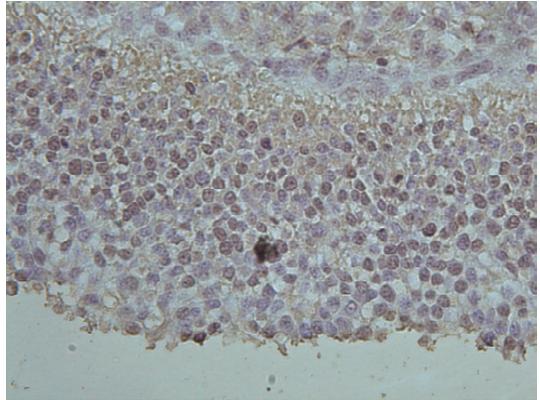
Fotografía 1. Detección por IHQ de E-CAM en CG murales de folículo antral. 40x.



Fotografía 2. Detección por tinción con DAPI de CG antrales con morfología cromatínica compactada. Observe la diferencia respecto de las CG murales. 25x.



Fotografía 3. Detección por IHQ del producto de expresión de Bax en CG de folículo atrésico. 40x



Fotografía 4. Detección por IHQ del producto de expresión de Bcl-2 en CG de folículo antral. Observe la inmunopositividad en la capa de CG basales y murales. 40x

células apoptóticas diagnosticadas y cuantificadas (datos no mostrados).

Finalmente, concluimos que la disrupción de las uniones mediadas por E-CAM bajo la acción de un inductor como el EGTA (quelante de Ca^{++}), el cual impide el establecimiento de las uniones homofílicas y homotípicas dependientes de caderinas en las CG de porcino y de bovino, promueve a la apoptosis de las mismas^{2, 20}. La magnitud de la activación del proceso apoptótico se hace significativa a concentraciones de 9 nM y a incubaciones de 12 hs. Probablemente esto nos está indicando que los IRA por DAPI nos

dan sólo información de una ventana tardía del proceso, por lo que a 24 hs de incubación se estrarían perdiendo de cuantificar muchas células por desprenderse del sustrato de cultivo al final de la apoptosis (muerte celular). Coincidentemente con lo que se propone, los valores de TUNEL a 24 hs de incubación revelaron un número muy bajo de células positivas a la técnica.

El examen directo por ICQ de la expresión de productos pro apoptóticos como Bax, el cual aparece tempranamente durante el proceso, confirman que entre las 6 y las 12 hs la mayor parte de la población celular sometida al estímulo

responde entrando en apoptosis y pudiendo ser visualizadas por todas las técnicas empleadas.

Bibliografía

1. Amsterdam A, Gold RS, Hosokawa K, Yoshida Y, Sasson R, Jung YS, Kotsuji F. Crosstalk among multiple signaling pathways controlling ovarian cell death. *TEM* 1999; 10: 255-262.
2. Angiono GM., Lombardo, DM. Induction of Apoptosis in Bovine Granulosa Cells (CG) by disruption of the Cellular Unions dependent Calcium. *Biocell*. Nº 84 (30) 3: pp. 504 – (5). (2006). ISSN 0327 9545 (print) ISSN 1667-5746 (electronic).
3. Arends MJ, Morris RG, Wyllie AH. Apoptosis. The role of the endonuclease. *Am. J. Pathol.* 1990; 136: 593-608.
4. Asem EK, Feng S, Stingley-Salazar SR, Turek JJ, Peter AT, Robinson JP. Basal lamina of avian ovarian follicle: influence on morphology of granulosa cells in-vitro. *Comp Biochem. Physiol C. Toxicol. Pharmacol.* 2000; 125: 189-201.
5. Blaschuk, OW, Farookhi, R. Estradiol stimulates cadherin expression in rat granulosa cells. *Dev. Biol.* Dec.1989; 136 (2): 564-7.
6. Boise LH, Gonzalez-Garcia M, Postema CE, Ding L, Lindsten T, Turka LA, Mao X, Nunez G, Thompson CB. bcl-x, a bcl-2-related gene that functions as a dominant regulator of apoptotic cell death. *Cell* 1993; 74: 597-608.
7. Farookhi R, Blaschuk OW. E-cadherin may be involved in mediating FSH-stimulated responses in rat granulosa cells. In: Hirshfield AN (ed.), *Growth Factors and the Ovary*. New York, NY: Plenum Press; 1989: 257-265.
8. Farookhi R, Geng CS, MacCalman CD, Blaschuk OW. Hormonal regulation of N-cadherin mRNA levels in rat granulosa cells. *Ann. N. Y. Acad. Sci.* 1997; 816: 165-172.
9. Harandian F, Farookhi R. Contact-dependent cell interactions determine hormone responsiveness and desensitization in rat granulosa cells. *Endocrinology* 1998; 139: 1700-1707.
10. Hirshfield AN. Development of follicles in the mammalian ovary. *Int. Rev. Cytol.* 1991; 124: 43-101.
11. Hsu SY, Hsueh AJ. Intracellular mechanisms of ovarian cell apoptosis. *Mol. Cell Endocrinol.* 1998; 145: 21-25.
12. Hsueh AJW, Billig H, Tsafirri A. Ovarian follicle atresia: a hormonally controlled apoptotic process. *ER* 1994; 15: 707-724.
13. Hughes FM, Jr., Gorospe WC. Biochemical identification of apoptosis (programmed cell death) in granulosa cells: evidence for a potential mechanism underlying follicular atresia. *Endocrinology* 1991; 129: 2415-2422.
14. Hughes, FM., Jr., Gorospe, WC. Biochemical identification of apoptosis (programmed cell death) in granulosa cells: evidence for a potential mechanism underlying follicular atresia. *Endocrinology*. Nov.1991; 129 (5) 2415-22.
15. Johnson AL, Bridgham JT, Witty JP, Tilly JL. Susceptibility of avian ovarian granulosa cells to apoptosis is dependent upon stage of follicle development and is related to endogenous levels of bcl-x long gene expression. *Endocrinology* 1996; 137: 2059-2066.
16. Kaipia A, Hsueh AJ. Regulation of ovarian follicle atresia. *Annu. Rev. Physiol.* 1997; 59: 349-363.
17. Kirkup K.M., Mallin A.M., Bagnell C. A. Inhibition of pig granulosa cell adhesion and growth in vitro by immunoneutralization of epithelial cadherin. *J Reprod Fertil.*; 2000; 120, 275-281
18. Korsmeyer SJ. Bcl-2 initiates a new category of oncogenes: regulators of cell death. *Blood* 1992; 80: 879-886.
19. Linden van der PJQ, Goeij de AFPM, Dunselman GM, Erkens HWH, Evers JLH. Expression of cadherins and integrins in human endometrium throughout the menstrual cycle. *Fertil Steril* 1995; 63; 1210-1216.
20. Lombardo DM, Guaragna C, Soñez MC, von Lawzewitsch I. Immunohistochemical Screening of Cadherin Molecules during Folliculogenesis in Bovine Ovary. *Biocell*. Vol. 28 Nº 2. pp. 245 - (36). (2004). ISSN 0327 - 9545.
21. Makrigiannakis A, Coukos G, Christofidou-Solomidou M, Gour BJ, Radice GL, Blaschuk O, Coutifaris C. N-cadherin-mediated human granulosa cell adhesion prevents apoptosis: a role in follicular atresia and luteolysis? *Am. J. Pathol.* 1999; 154: 1391-1406.
22. Makrigiannakis, A., Coukos, G., Christofidou-Solomidou, M., Gour, BJ., Radice, GL., Blaschuk, O., Coutifaris, C. N-cadherin - mediated human granulosa cell adhesion prevents apoptosis: a role in follicular atresia and luteolysis?. *Am. J. Pathol.* May.1999; 154 (5): 1391-406.

23. Mariana JC, Monniaux D, Driancourt M-A, Mauleon P. Folliculogenesis. In: Cupps PT (ed.), *Reproduction in Domestic Animals*, 4 ed. San Diego, CA: Academic Press; 1991: 119-171.
24. Medina J, Lombardo DM. The role of the Caderins in the Apoptosis of porcine Granulosa Cells (CG)". *Biocell*. Vol. 31 (2): 338 - (50). (2007). ISSN 0327 9545 (print) ISSN 1667-5746 (electronic).
25. Peluso J.J., Pappalardo A., Fernandez G. E-cadherin-mediated cell contact prevents apoptosis of spontaneously immortalized granulosa cells by regulating Akt Kinase activity. *Biol Reprod*. 2001; 64; 1183-1190
26. Peluso, J.J., Pappalardo, A., Trolice, MP. N-cadherin - mediated cell contact inhibits granulosa cell apoptosis in progesterone - independent manner. *Endocrinology*. Apr.1996; 137 (4): 1196-203.
27. Reed JC. Bcl-2 and the regulation of programmed cell death. *J. Cell Biol*. 1994; 124: 1-6.
28. Rowlands T.M., Symonds J.m., Farookhi R. Blaschuk O. W. Cadherins: crucial regulators of structure and function in reproductive tissues. *Reviews of Reprod*. 2000; 5; 53-61
29. Ryan L. Peter, Valentine F. Anthony, Bagnell A. Carol. Expression of epithelial cadherin in the developing and adult pig ovary. *Biol Reprod* 1996; 55, 1091-1097
30. Schwartzman RA, Cidlowski JA. Apoptosis: the biochemistry and molecular biology of programmed cell death. *Endocr. Rev*. 1993; 14: 133-151.
31. Takeichi M. Cadherins: a molecular family important (in selective cell-cell adhesion. *Anu Rev Bioehcm* 1990; 59:237-252.
32. Takeichi M. The cadherins: cell-cell adhesion in molecules controlling animal morphogenesis. *Development* 1988; 102:639-655.
33. Van Wezel I.L. Dharmarajan A. M., Lavranos T.C., Rodgers R.J. Evidence for alternative pathways of granulosa cell death in healthy and slightly atretic bovine antral follicles. *Endocrinology*; 1999; 140; 2602-2612
34. Yi-Te Hsu, Wolter Keith G., Youle Richard J. Cytosol-to-membrane redistribution of Bax and Bcl-XL during apoptosis. *Biochemistry*; 1997; 94; 3668-3672