

UNIVERSIDAD NACIONAL AUTÓNOMA DE MÉXICO

---

---

**POSGRADO EN CIENCIAS  
BIOLÓGICAS**

FACULTAD DE CIENCIAS

“ESTUDIO DE LOS DIFERENTES PROCESOS  
DE MUERTE CELULAR DE OVOCITOS EN  
OVARIOS DE RATAS PREPÚBERES  
(1- 28 DÍAS)”

**T E S I S**

QUE PARA OBTENER EL GRADO ACADÉMICO DE

**DOCTORA EN CIENCIAS**

P R E S E N T A

MARIA LUISA ESCOBAR SÁNCHEZ

DIRECTORA DE TESIS: DRA. OLGA M. ECHEVERRÍA MARTÍNEZ

MÉXICO, D. F.



ENERO 2009



Universidad Nacional  
Autónoma de México

Dirección General de Bibliotecas de la UNAM

**Biblioteca Central**



**UNAM – Dirección General de Bibliotecas**  
**Tesis Digitales**  
**Restricciones de uso**

**DERECHOS RESERVADOS ©**  
**PROHIBIDA SU REPRODUCCIÓN TOTAL O PARCIAL**

Todo el material contenido en esta tesis esta protegido por la Ley Federal del Derecho de Autor (LFDA) de los Estados Unidos Mexicanos (México).

El uso de imágenes, fragmentos de videos, y demás material que sea objeto de protección de los derechos de autor, será exclusivamente para fines educativos e informativos y deberá citar la fuente donde la obtuvo mencionando el autor o autores. Cualquier uso distinto como el lucro, reproducción, edición o modificación, será perseguido y sancionado por el respectivo titular de los Derechos de Autor.

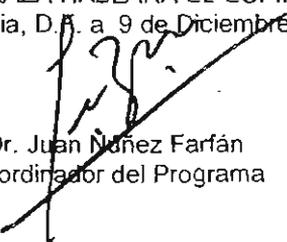
**Dr. Isidro Ávila Martínez**  
**Director General de Administración Escolar, UNAM**  
**Presente**

Me permito informar a usted que en la reunión ordinaria del Comité Académico del Posgrado en Ciencias Biológicas, celebrada el día 20 de Octubre de 2008, se aprobó el siguiente jurado para el examen de grado de DOCTORA EN CIENCIAS de la alumna **MARÍA LUISA ESCOBAR SÁNCHEZ** con número de cuenta **87195295** con la tesis titulada: "Estudio de los diferentes procesos de muerte celular de ovocitos en ovarios de ratas prepúberes (1-28 días)", realizada bajo la dirección de la **DRA. OLGA MARGARITA ECHEVERRÍA MARTÍNEZ:**

Presidente:	DRA. MARÍA ISABEL SOTO CRUZ
Vocal:	DR. ENRIQUE ANTONIO PEDERNERA ASTEGIANO
Vocal:	DRA. REBECA LÓPEZ MARURE
Vocal:	DRA. MARÍA DEL CARMEN MÉNDEZ HERRERA
Secretario:	DRA. OLGA MARGARITA ECHEVERRÍA MARTÍNEZ
Suplente:	DRA. MARÍA DE LOURDES ŠEGURA VALDEZ
Suplente	DR. GERARDO HEBERT VÁZQUEZ NIN

Sin otro particular, me es grato enviarle un cordial saludo.

**Atentamente**  
**"POR MI RAZA HABLARA EL ESPIRITU"**  
Cd. Universitaria, D.F. a 9 de Diciembre de 2008.



Dr. Juan Nuñez Farfán  
Coordinador del Programa

c.c.p. Expediente de la interesada.

## **AGRADECIMIENTOS:**

El presente trabajo se desarrolló dentro del plan de estudios del Posgrado en Ciencias Biológicas, UNAM

El proyecto se realizó en el Laboratorio de Microscopía Electrónica de la Facultad de Ciencias, UNAM, en colaboración con el Departamento de Embriología de la Facultad de Medicina, UNAM.

Durante los estudios de Doctorado recibí el apoyo de Becas CONACYT para Estudios de Posgrado, así como del Programa de Apoyo para la Titulación del Doctorado CONACYT-2006.

Este trabajo fue desarrollado bajo el financiamiento de los proyectos PAPIIT IN211905-3, PAPIIT IN203308-3, CONACYT 36450-N del Laboratorio de Microscopía Electrónica; PAPIIT IN216807, CONACYT 60346 del Departamento de Embriología de la Facultad de Medicina.

Un especial agradecimiento por el uso del microscopio confocal, adquirido dentro del proyecto: Defectos del Nacimiento; que forma parte del Macroproyecto Nuevas Estrategias Epidemiológica, Genómicas y Proteómicas en Salud Pública. SDI-PTID.05.01, en el Laboratorio del Dr. Enrique Pedernera Astegiano.

El trabajo fue valiosamente asesorado por los Miembros del Comité Tutorial:

- Dra. Olga Margarita Echeverría Martínez
  
- Dr. Gerardo Hebert Vázquez Nin
  
- Dr. Enrique Pedernera Astegiano

## **AGRADECIMIENTOS:**

- A la Dra. Echeverría y al Dr. Vázquez-Nin, por su invaluable apoyo, ayuda y confianza depositada en mí. Por todo lo que han llegado a representar para mí tanto en el ámbito profesional como personal, mil gracias.

- A mis compañeras de Laboratorio:

Dra. Rosario Ortiz por su ayuda y enseñanza de técnicas experimentales.

M. en C. Silvia Juárez Chavero por su asistencia técnica.

M. en C. Ernestina Ubaldo por su asistencia técnica y por su gran amistad.

Biólogo Rafael Jaimes, porque siempre está dispuesto a ayudar y a brindar su valiosa amistad.

- A mis amigos del Laboratorio de Biología Molecular del Departamento de Embriología de la Facultad de Medicina:

Dra. Carmen Méndez, por su invaluable amistad, su ayuda y apoyo técnico, por la gran calidez con la que me dio albergue durante la estancia en su Laboratorio, mil gracias.

Dr. Enrique Pedernera A., por su ayuda durante todo el proceso de elaboración de esta tesis y por su gran apoyo durante mi estancia en su Laboratorio.

Esp. en Microscopía Electrónica: Carmen Mondragón, por su ayuda y enseñanza durante el desarrollo de las técnicas moleculares, por su gran amistad y por todo su apoyo, gracias Carmen.

C. D.: María José Gomorra, por su gran apoyo técnico y por su gran amistad.

M. en C. y Esp. en Microscopía Electrónica: Silvia Reyes, por su ayuda en el manejo del Microscopio Confocal y por su invaluable amistad.

A todos los compañeros y amigos del Laboratorio: Jeannette, Alejandro, Elisa, Diego, Eduardo, Marlon, Sra. Celia, todos son un grupo maravilloso.

## AGRADECIMIENTOS:

- A los miembros de otros Laboratorios quienes me han ayudado incondicionalmente:

Dr. Juan Manuel Hernández Castellanos, del Laboratorio de Canales Iónicos de la Facultad de Medicina, UNAM; por toda su ayuda técnica durante la elaboración de micropuntas para el micromanipulador.

M. en C. Hugo López de la UMIEZ de la FES Zaragoza, por su ayuda durante la realización de técnicas de cultivo celular.

Biólogo: J. M. Vicente Hernández de la UMIEZ de la FES Zaragoza, por su apoyo durante la estandarización de técnicas bioquímicas.

## **DEDICATORIA:**

- *Este trabajo, esta dedicado especialmente a mi familia: Luis y Eddy, quienes me han brindado el mayor apoyo durante la realización del mismo y quienes son mi mayor inspiración. Gracias mis muchachos, los amo.*
- *A mis hermanos cuyo ejemplo de tenacidad me ha servido para culminar mi trabajo, siempre están en mi corazón.*
- *A la memoria de mi Madre quien fue la mejor madre que pudimos tener.*
- *A mi Padre.*

<b>ÍNDICE:</b>		
Resumen	.....	2
Abstract	.....	4
Introducción		
- Desarrollo del Ovario	.....	6
- Meiosis	.....	6
- Ovogénesis	.....	8
-Formación de Folículos Primordiales	.....	9
- Crecimiento Folicular	.....	9
- Maduración del Ovocito	.....	15
- Atresia Folicular	.....	17
- Procesos de Muerte Celular	.....	18
Objetivos	.....	39
Material y Métodos	.....	40
Resultados Fase I	.....	48
Resultados Fase II	.....	86
Análisis de Resultados	.....	97
Conclusiones	.....	103
Bibliografía	.....	104

## RESUMEN

En el presente trabajo se analizaron ovocitos de rata pre-púberes para definir los procesos de muerte celular que están implicados en la atresia folicular en esta etapa de desarrollo, utilizando técnicas inmunohistoquímicas y moleculares.

Para realizar las técnicas inmunohistoquímicas de fluorescencia se hicieron cortes seriados de ovarios de rata incluidos en parafina y Lowicryl K4M de las edades de 1 a 28 días de nacidas. Se inmunodetectaron proteínas características de la apoptosis como: pro-caspasa 3, caspasa 3 activa y la técnica de TUNEL. Para visualizar el núcleo se utilizó DAPI. Se identificaron marcadores de autofagia como el incremento sobre el nivel basal de la proteína integral de lisosomas lamp1 y el incremento de la actividad de la fosfatasa ácida con respecto a las células normales, así como la morfología a nivel ultraestructural de autofagosomas.

La identificación de apoptosis y autofagia por medio de las técnicas bioquímicas y moleculares se realizaron en poblaciones de ovocitos aislados. Para apoptosis se identificó por medio de la Anexina V acoplada a FITC a la fosfatidilserina externalizada y se observó el ADN fragmentado mediante la electroforesis en geles de agarosa. Para poner de manifiesto a la autofagia se utilizó al compuesto fluorescente monodansilcadaverina. Se desarrolló la técnica de RT-PCR en poblaciones puras de ovocitos, para analizar la expresión de los genes implicados en el proceso de autofagia como son Lc3 y lamp1, así como de un gen implicado en la apoptosis: el de la enzima caspasa 3.

En las diferentes edades, dependiendo del desarrollo en que se encuentren los folículos en proceso de atresia, los ovocitos son positivos a las diferentes inmunolocalizaciones: a la edad de 1 día, los ovocitos son en su mayoría positivos a TUNEL y pocos son positivos a las otras proteínas. A los 5 y 10 días, los ovocitos son positivos a lamp1 y caspasa 3 activa, pero no a TUNEL. A partir de los 15 días de edad son positivos a caspasa 3 activa, lamp1 y TUNEL, algunos ovocitos en folículos con antro grande son positivos a todas las reacciones. En las edades de 17 a 28 días hay principalmente folículos con antro en formación y antro grande, que son doble positivos a caspasa 3 activa-lamp1 o a pro-caspasa 3-lamp1, también es común que un mismo ovocito sea positivo a las tres proteínas e incluso en los ovocitos ya muy degenerados, se presenta una cuádruple marca positiva que incluye a TUNEL.

En los ensayos *in vitro*, encontramos que a la edad de 5 días, la frecuencia relativa (FR) de células que son positivas a la Anexina-V es de 0.068, a la edad de un día es de 0.57; a los 19 días es de 0.20 y a los 28 días es de 0.15, encontrándose que una diferencia significativa a la edad de 5 con respecto a las edades de 19 y 28 días. Los datos de la incorporación de la monodansilcadaverina indican que no hay una diferencia significativa entre las diferentes edades, mostrando que el compuesto se incorpora con la misma frecuencia en todas las edades. También se encontraron células con ambos marcadores de forma simultánea en las diferentes edades, sin que la frecuencia variara de forma significativa. Se detectó que las poblaciones aisladas de ovocitos, expresan los genes de caspasa 3, lamp1 y Lc3, en todas las edades. La electroforesis de ADN en geles de agarosa de ovocitos de 5 días, no presenta ADN fragmentado; pero a las edades de 1, 19 y 28 días se observó una clara fragmentación de ADN, lo que sugiere que la apoptosis llega a su fase final.

Las pruebas inmunohistoquímicas, bioquímicas y moleculares coinciden en que a la edad de 1 día, los ovocitos mueren fundamentalmente por apoptosis, aunque no presentan los característicos rasgos estructurales del proceso. En las demás edades, una vez que los folículos inician su crecimiento, los ovocitos son positivos a más de una proteína, siendo evidente la presencia simultánea de caspasa 3 (en su forma activa e inactiva) y lamp1, indicando que una vez que los ovocitos inician el proceso de muerte, en ellos se lleva a cabo no sólo el proceso de apoptosis, sino también el de autofagia. La ausencia de un patrón de ADN fragmentado en la edad de 5 días, indica que aunque se llegan a encontrar algunos ovocitos positivos a la Anexina-V, los ovocitos que mueren, no lo hacen fundamentalmente por apoptosis. En los ovocitos de ratas de mayor edad, se ha podido identificar a los procesos de autofagia y apoptosis tanto en las poblaciones celulares aisladas, como en los cortes seriados de un mismo ovocito.

Los resultados inmunohistoquímicos, bioquímicos y moleculares, indican que los ovocitos de ratas pre-púberes, son eliminados por medio de tres diferentes procesos: uno es la apoptosis, el otro la autofagia, y un último, en donde ambos se están llevando a cabo en una misma célula, siendo más evidente a la edad más cercana a la primera ovulación (28 días).

## ABSTRACT

In the present work the processes of cell death of the oocytes of newborn and pre-pubertal rats (1 to 28 days old) were studied by means of TUNEL reaction, immunocytochemical localization of pro-caspase 3, and active caspase 3 as markers of apoptosis. To determine if autophagy was present in dying oocytes, lamp 1 was immunolocalized and acid phosphatase was developed by a classical cytochemical test.

Most of the oocytes in one day old rats were positive only to TUNEL. In 5 and 10 days old oocytes, active caspase 3 and increased level of lamp 1 were present, but TUNEL was not. Ahead of 15 days old the oocytes were positive to caspase 3 active, lamp 1 and TUNEL. Some oocytes in antral follicles were positive to all reactions. In 17 to 28 days old animals numerous oocytes in pre antral and antral follicles were simultaneously positive to caspase 3 active and lamp1 or to pro-caspase 3 and lamp1. In these animals oocytes were frequently positive to three markers and even very degenerate oocytes were positive to the four markers.

In vitro assays we found that the relative frequency ( $RF = \text{number of positives oocytes} / \text{Total number of oocytes studied}$ ) of oocytes positive to Annexin V in 5 days old rats was smaller than in rats of other ages. In oocytes of 1 day old rats  $RF = 0.57$ ; in 19 days old rats  $RF = 0.20$  and in 28 days old rats  $RF = 0.15$ . The monodansylcadaverine incorporation was: 5 days: 0.29; 1 day 0.25, 19 days: 0.25 and 28 days: 0.19, being homogeneous. Both markers were present simultaneous in some oocytes. The smaller frequency of this double labelling was found in 5 days ( $RF = 0.15$ ) and the higher one in 28 days old rats ( $RF = 0.33$ ).

In vitro populations of oocytes of all the ages studied, expressed caspase-3, lamp1 and Lc3 gens. The electrophoresis of the DNA of oocytes of 5 days old rats showed that DNA was not broken. In the oocytes of 1, 19 and 28 days old rats fragmented DNA was observed indicating that the final phase of apoptosis was taking place.

Immunohistochemical, biochemical and molecular procedures coincided that the oocytes of 1 day old rats die fundamentally by means of apoptosis, although they do not present the classical structural features of this process. In the ovaries of rats of other ages the oocytes in growing follicles were positive to more than one marker. The simultaneous localization of caspase 3 (in their active and inactive forms) and lamp1, indicated the presence of metabolic steps of apoptosis and autophagy from the very early steps of cell death process of the

oocyte. The absence of a broken DNA pattern in the oocytes of 5 days old indicates that apoptosis is not their main process of death. In oocytes of older rats the simultaneous presence of markers of autophagy and apoptosis in the same cell was evidenced in two different systems: in isolated cellular populations and in the serial sections of the same oocyte in fixed and embedded samples.

The immunohistochemical, biochemical and molecular results, indicate that the prepubertal rat oocytes are eliminated by means of three different processes: apoptosis, autophagy, and other displaying simultaneously features of both of these processes of cell death in the same cell. The last one is more frequent in 28 days old rats, which are near their first ovulation.

## INTRODUCCIÓN

Durante el desarrollo embrionario de los organismos femeninos, las células germinales primordiales, migran de la parte externa del embrión a las crestas genitales y se dividen por mitosis hasta que colonizan el ovario (1). Una vez que las células germinales se encuentran en las crestas genitales, se diferencian en ovogonias o espermatogonias (2). En el ovario, las divisiones mitóticas de las células germinales primordiales forman los grupos de ovogonias, las cuales están conectadas unas con otras por puentes citoplasmáticos intercelulares. Estas ovogonias son rodeadas por células somáticas, formando grupos de células germinales o cordones corticales. En muchas especies los cordones corticales se fusionan en el último estadio de desarrollo con proyecciones del epitelio superficial (3). Dentro de los cordones, las ovogonias se dividen varias veces por mitosis y después entran a la meiosis para convertirse en ovocitos. Los ovocitos pasan a través de la profase meiótica I, la cual consiste en 5 estadios: leptoteno, zigoteno, paquiteno, diploteno y diacinesis. Los ovocitos se detienen en la profase meiótica I, en el estadio diploteno (4).

Es durante estas fases de la meiosis, cuando se requiere de varias proteínas reparadoras de ADN y de muchos otros factores para que se lleven a cabo el alineamiento correcto de los cromosomas y la recombinación. Durante la profase I de la meiosis, los niveles de transcripción bajan hasta ser casi indetectables durante el paquiteno temprano, pero en el diploteno vuelven a ser elevados (2). Los ovocitos en el estadio diploteno son más grandes que las ovogonias y tienen más organelos citoplasmáticos (4).

### Meiosis

La meiosis es el proceso de división celular que sólo se realiza en las células germinales y tiene por objetivo la producción de gametos o células germinales masculinas y femeninas (espermatozoides y óvulos, respectivamente) cada una de las cuales contiene la mitad de la dotación cromosómica normal. A esa media dotación de cromosomas de cada gameto se le conoce como número haploide ( $n$ ).

La meiosis I tiene una profase I la cual consta de cinco estadios que son el leptoteno, durante el cual se forman los ejes cromosómicos rodeados de asas de cromatina laxa. Zigoteno durante el cual hay un apareamiento de cromosomas llamado sinapsis y es característico de la meiosis. Aunque no se conoce el mecanismo por el cual cada cromosoma reconoce a su homólogo, la sinapsis parece requerir la presencia de la

membrana nuclear y de la formación de una estructura compleja formada por ADN y proteínas denominada complejo sinaptonémico. Este complejo tiene aspecto escaleriforme con un elemento central y dos barras laterales. Durante la siguiente fase llamada paquiteno, se produce el entrecruzamiento o *crossing-over*, proceso mediante el cual los cromosomas homólogos intercambian segmentos. En el diploteno, se desorganiza el complejo sinaptonémico, los cromosomas quedan unidos sólo en algunos puntos llamados quiasmas y en la diacinesis, los cromosomas se desplazan a la periferia del núcleo.

Durante la pro-metafase, la membrana nuclear desaparece. Un cinetocoro se forma por cada cromosoma y los cromosomas adosados a fibras del huso comienzan a moverse.

En la metafase I, los cromosomas aún unidos, son jalados hacia el ecuador por fibras del huso, formando la placa metafásica. Ya en la anafase I, los cromosomas homólogos se separan y las cromátidas hermanas permanecen unidas por sus respectivos centrómeros. En la telofase I, se reorganizan los núcleos y se produce citocinesis. En cada núcleo habrá una sola serie de cromosomas, duplicados y modificados por el entrecruzamiento, después de esta fase, hay una breve interfase, llamada intercinesis, en la cual no ocurre duplicación del material genético (6, 7), ya que la primera división meiótica es reduccional.

La segunda división meiótica es básicamente una división mitótica, en donde las cromátidas de cada cromosoma se dirigen hacia los polos opuestos de la célula. Por cada célula que entra en meiosis I se producen cuatro células en la telofase II. La anafase I separa cromosomas maternos de paternos y la anafase II separa cromátidas hermanas (figura 1). La importancia de la meiosis como proceso biológico radica en primer lugar, en que reduce el material genético a la mitad, de tal manera que cada célula hija recibe un juego cromosómico haploide completo. En segundo lugar, debido al entrecruzamiento existe la posibilidad de aumentar la variabilidad, aumentando las combinaciones alélicas de los gametos. También se producen nuevas combinaciones como resultado del proceso de segregación independiente, por el cual cromosomas maternos y paternos presentan mezclas diferentes de genes. La recombinación es el evento central en la meiosis de la mayoría de los organismos, ya que la segregación adecuada de los cromosomas y la viabilidad dependen de los niveles normales de recombinación. La recombinación involucra una serie de cambios bioquímicos, que comienzan muy temprano en la profase meiótica con el rompimiento de la doble hebra. El rompimiento de la doble hebra tiene la misión de

exponer una hebra sencilla de ADN con terminación 3' que invade secuencias homólogas de una de las cromátidas hermanas de su homólogo. Esta invasión genera una molécula heteroduplex entre cromosomas homólogos, que promueve el intercambio cruzado de hebras o uniones *Holliday*. En una unión *Holliday* las dos hélices de ADN homólogas permanecen juntas por el intercambio recíproco de dos de las cuatro hebras presentes (7).

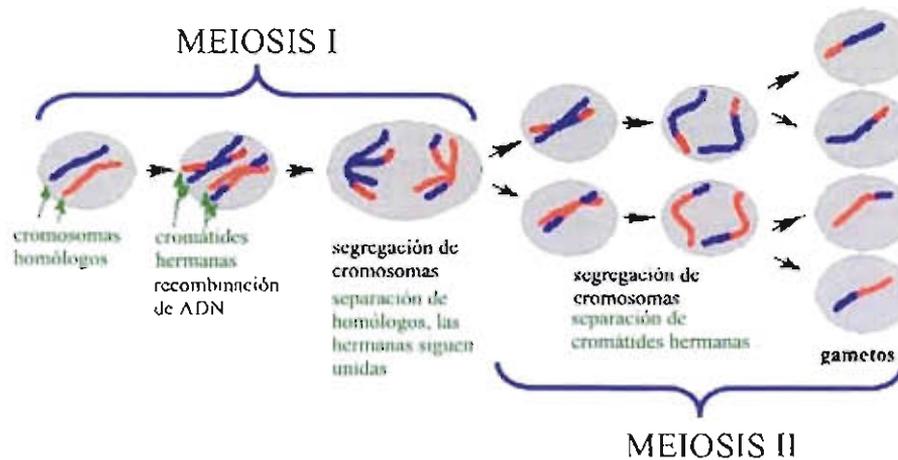


FIGURA 1. Representación gráfica del proceso meiótico, en el cual se originan cuatro células haploides a partir de una célula diploide. Imagen tomada y modificada de ref. (8):

## Ovogénesis

Es el proceso por el cual las células germinales femeninas pre-meióticas se desarrollan en ovocitos maduros. Durante la ovogénesis se forma un núcleo haploide y se acumula una reserva de proteínas citoplasmáticas, ARNm, productos metabólicos y organelos celulares (9). Los mecanismos de la ovogénesis varían entre las especies, en casos como en el erizo de mar y las ranas, la hembra produce cientos o miles de huevos en cada ciclo reproductor, mientras en otras especies, como en humanos y la mayoría de los mamíferos, sólo se producen pocos gametos femeninos (ovocitos) durante toda su vida. Durante el desarrollo embrionario, muere una gran cantidad de ovocitos y los que restan están detenidos en la primera división meiótica. Estas últimas células, denominadas ovocitos primarios, se desarrollan a través de la primera profase meiótica hasta el estadio de diploteno, punto en el que serán mantenidas hasta que inicie la pubertad (9), fase del proceso de maduración del organismo en la cual en respuesta al pico de la hormona luteinizante los ovocitos reanudan la meiosis (10). Con el comienzo de la pubertad, grupos de ovocitos reinician periódicamente la meiosis. En la mujer, la primera parte de la meiosis comienza en el embrión y la señal para reiniciar la meiosis no es dada hasta casi 12 años más tarde.

Algunos ovocitos son mantenidos en la profase meiótica por casi 50 años. De los millones de ovocitos primarios presentes al nacimiento, sólo cerca de 400 maduran durante la vida de una mujer (9). Cuando el ovocito primario se divide, su núcleo denominado la vesícula germinal, se disgrega y el huso de la metafase migra hacia la periferia de la célula. En la telofase, una de las dos células hijas contiene poco citoplasma, mientras que la otra célula retiene casi la totalidad del volumen de los constituyentes celulares. La célula más pequeña es llamada primer cuerpo polar y la célula más grande es el ovocito secundario. Durante la segunda división meiótica, tiene lugar una citocinesis que también es desigual: la mayoría del citoplasma es retenido por el gameto femenino maduro (óvulo) y un segundo cuerpo polar recibe mucho menos. La meiosis conserva un volumen mayor del citoplasma del ovocito en una sola célula en lugar de separarlo equitativamente entre las cuatro células hijas (9).

**Formación de folículos primordiales.** La iniciación de la meiosis se produce en los folículos primordiales, formados por ovocitos primarios rodeados de una capa de células somáticas escamosas denominadas células de la pre-granulosa (2, 11). En los humanos aparecen alrededor de la semana 16 del embarazo. Generalmente se acepta que la formación de los folículos primordiales termina no más allá de las 6 semanas posparto. Este estadio de desarrollo folicular es enteramente independiente de las gonadotrofinas (9). Inmediatamente después de que se ensamblan los folículos primordiales algunos son reclutados del pool de reposo a la población en crecimiento. Los mecanismos por los cuales los folículos primordiales son inducidos a abandonar el pool de reposo no se conocen bien todavía. La activación del folículo primordial es progresiva e iniciada con la proliferación de las células de la granulosa y su cambio de forma escamosa a cúbica (12, 13). En muchas especies las células de la pre-granulosa pueden tener un origen dual, pudiendo provenir de células del epitelio superficial y de células derivadas del mesonefros que migran hacia dentro del ovario (3, 14). Este grupo de folículos primordiales se caracteriza por estar en un relativo reposo transcripcional y traduccional hasta un poco antes de la pubertad cuando el ovario empieza a responder ante las hormonas gonadotrópicas (15).

**Fase de crecimiento preantral.** El cambio de la fase primordial al de inicio del crecimiento folicular, implica la participación de varios factores, ya sea inhibiendo o induciendo esta transición. La hormona anti-Mülleriana (AMH), que es el factor de

crecimiento que dirige la regresión del conducto de Müller en machos, se ha señalado como responsable para mantener a los folículos primordiales en reposo (16, 17). El factor de transcripción tipo *forkhead* O3 (Foxo3) también está implicado en la inhibición de la activación de folículos primordiales (18). La subfamilia FOXO de factores de transcripción tipo *forkhead* son efectores al final de la ruta PTEN/PI3K/AKT. PTEN es una fosfatasa que regula negativamente a la cinasa fosfatidilinositol-3 (PI3K) en la proliferación y sobrevivencia celular (19). También se le ha involucrado en la regulación de la activación de folículos primordiales, ya que su ruta PI3K-AKT-Foxo3, es la misma que el ligando para el receptor kit usa para inducir la activación del ovocito (20, 21). El ligando para el receptor Kit es un factor de crecimiento que se une a su receptor c-Kit (22). El ligando para el receptor Kit es producido por las células de la granulosa, esta involucrado en la activación del folículo primordial (23). Por otro lado, se ha demostrado que c-Kit (producido por el ovocito) y su ligando se requieren en el desarrollo folicular en el ovario en la fase independiente de gonadotropinas (24). Otra ruta de señalización involucrada en la regulación negativa de la activación del folículo primordial es la de la quimosina SDF-1 y su receptor CXCR4 (25). Diversos experimentos realizados en ratones inyectados con el anticuerpo que bloquea la función de c-kit, el ACK-2, concluyeron que la interacción ligando para el receptor Kit/c-Kit es importante para la activación del folículo en los primeros 5 días después del nacimiento (24). El factor inhibidor de la leucemia LIF es una interleucina clase 6 de citosina que afecta el crecimiento y desarrollo celular (26). Este factor es producido por las células de la granulosa para promover la transición de folículo primordial a primario, aumentan la producción de ARNm y del ligando para el receptor Kit en cultivo de células de la granulosa (27). Estudios en cultivos celulares en ausencia o presencia de diversos factores y bloqueo con sus respectivos anticuerpos, han permitido evaluar el efecto de diversas señales en la estimulación de la transición de folículos primordiales a primarios. De esta forma se han realizado los siguientes hallazgos:

- El factor de crecimiento básico para fibroblastos es producido en el ovocito (28).
- La proteína morfogenética de hueso BMP4 miembro de la superfamilia de los TGF- $\beta$ , es producido por células de la teca y del estroma, este factor también es importante para la sobrevivencia del folículo (29).

- El factor de crecimiento de queratinocitos (KGF) un miembro de los factores de crecimiento de fibroblastos que estimula la proliferación celular (30), se produce por las células precursoras de la teca, las células tecales y las estromales (31).
- El factor derivado de plaquetas (PDGF) un factor de crecimiento, es producido por el ovocito (32).
- El BMP7 (también de la familia de los TGF- $\beta$ ), se inyectado directamente al ovario, activa el cambio de folículos primordiales a folículos primarios (33).

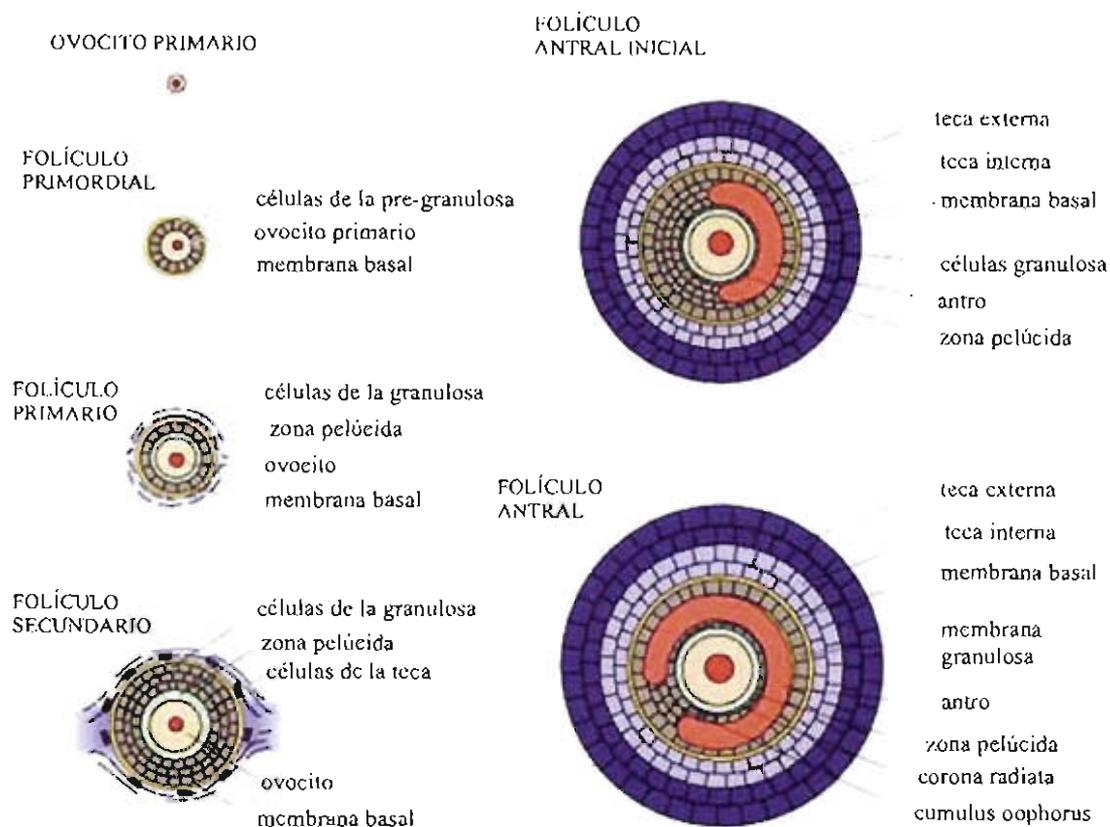
Se ha mostrado la presencia de tres genes específicos en el ovocito que son esenciales para la transición de folículos primordiales a primarios: el gen codificante de ovario de recién nacido homeobox (Nobox) (34, 35), el gen *Sohlh1* y el gen *Lhx8* (36). Nobox es un gen homeobox involucrado en la regulación de desarrollo y se expresa en ovocitos de folículos primordiales, primarios y en crecimiento (34). Nobox regula genes específicos del ovocito como Oct4 y GDF9 (factor de crecimiento y diferenciación) (37). El *Sohlh1* y el *Lhx8* son factores transcripcionales, que son expresados por grupos de células germinales y ovocitos de folículos primordiales (36). La transición de folículos primordiales a folículos primarios es independiente de gonadotropinas (38).

Cuando las células de la granulosa forman una capa que rodea completamente al ovocito este aumenta su tamaño y el folículo se denomina primario (12, 13). En esta fase las células granulosas empiezan a formar uniones gap entre ellas, sintetizan y secretan mucopolisacáridos, con lo que originan un halo translúcido que rodea al ovocito conocido como zona pelúcida. La zona pelúcida está compuesta por glicoproteínas (ZP1, ZP2 y ZP3) y es esencial para el desarrollo normal del folículo (12, 13).

Las prolongaciones citoplasmáticas de las células de la granulosa atraviesan la zona pelúcida para mantener un contacto íntimo con la membrana plasmática del ovocito mediante las uniones gap. En la formación de estos contactos interviene la proteína conexina-37, la que es expresada por los ovocitos en todos los estadios de la foliculogénesis. Estos contactos citoplasmáticos constituyen una vía para la transferencia de información y nutrientes al ovocito.

La proliferación de las células de la granulosa da origen a múltiples capas celulares que causan el agrandamiento folicular y que transforman al folículo primario en un folículo secundario (figura 2). El aumento de diámetro de los folículos en maduración se debe a la

acción combinada de la proliferación y de la diferenciación de las células de la granulosa, la hipertrofia de las células de la teca y el crecimiento de los ovocitos (9).



Copyright © 2002, Elsevier Science (USA). All rights reserved.

**FIGURA 2.** Proceso de maduración folicular. Tomado y modificado de ref. 12.

Mientras se forma el folículo secundario, las células de la granulosa desarrollan receptores para la FSH, los estrógenos y los andrógenos. Durante ésta fase las células de la granulosa también se conectan fisiológicamente mediante uniones gap. El folículo secundario en vías de diferenciación migra a la médula del ovario, donde completa la adquisición del componente tecal. La teca interna temprana se adquiere hacia el final del estadio de folículo primordial. La aparición de la estratificación tecal se asocia con la adquisición de vascularización alrededor del folículo y con el desarrollo de la teca. Dicha vascularización está formada con arteriolas que terminan en una red de capilares espiralados adyacente a la membrana basal. Al mismo tiempo, aparecen los vasos linfáticos. A medida que se forman los capilares, las células del intersticio tecal inician su diferenciación con la adquisición de

receptores a LH y la capacidad de biosíntesis de esteroides. Las células del estroma precursoras de la teca se disponen en estratos concéntricos y se ubican paralelas entre sí dispuestas en formas concéntricas. Son células muy alargadas similares a los fibroblastos que rodea completamente el folículo. Las células de la teca cercanas a la membrana basal, se asemejan a las células epiteliales y adquieren organelos característicos de las células capaces de secretar hormonas esteroides formando la teca interna. Los estratos más periféricos de estas células conservan la configuración alargada y se transforman en células del estroma, conformando la teca externa (9).

En el momento de la formación de la teca interna a los folículos se les define como folículos pre-antrales (41, 42). En esta fase el ovocito inicia su crecimiento extensivo y las células de la granulosa que lo rodean proliferan más (2). En los ovocitos en crecimiento se incrementa la cantidad de ARN, la síntesis de proteínas, el número de ribosomas, mitocondrias y otros organelos. La acumulación de gránulos de glucógeno, proteínas y gotas de lípidos son indicadores de almacenamiento y transporte molecular a través de la membrana del ovocito, así como del aumento de síntesis en el propio ovocito.

El folículo comienza la fase antral inicial cuando la producción y acumulación de fluido forma pequeñas cavidades dentro de las capas de células de la granulosa, posteriormente éstas se unen para formar una cavidad denominada antro que está llena de licor folicular. La formación de una cavidad folicular dentro de una multicapa de granulosa, es la característica de los folículos antrales (43). Los análisis realizados al licor folicular del antro han demostrado la presencia de miembros de la superfamilia de los TGF $\beta$ : la inhibina y la activina; la folistatina, la FSH, la LH y el factor de crecimiento 1 tipo insulina (IGF-1). La inhibina inhibe la producción de FSH y la activina la estimula (44). La folistatina es una glicoproteína de cadena simple similar con las subunidades alfa y beta de la familia de la inhibina y de la activina, la folistatina inhibe la producción de FSH (45). Estos tres reguladores son expresados en células de la granulosa y de la teca de folículos antrales y en células luteinizadas de la granulosa y son escasos en folículos más pequeños (46). Experimentos que demuestran que el IGF-1 aumenta los receptores en las células de la granulosa y en el ovocito, sugieren que este factor tiene una función similar a la activina y regula al receptor de la FSH (47). La FSH funciona como regulador de la comunicación entre las células de la granulosa y el ovocito, puesto que es capaz de inducir la retracción de

las prolongaciones celulares de las células de la granulosa que tienen comunicación con el ovocito (48). Las prolongaciones citoplasmáticas de las células de la granulosa son reguladores importantes en la comunicación ovocito-células de la granulosa y en el sostén del crecimiento del ovocito, ya que los ovocitos dependen del metabolismo de las células de la granulosa para muchas de sus síntesis macromoleculares (49, 50).

En primates y en muchos otros mamíferos, inmediatamente después de que el folículo adquiere una cavidad antral, las células de la granulosa que se encuentran en contacto con la membrana basal, pierden su forma cúbica y asumen una apariencia columnar, mientras las células restantes de la granulosa mantienen su forma cúbica. A través de la acumulación del fluido en la cavidad antral y la proliferación de las células de la granulosa y las células de la teca interna, el folículo crece a través de estadios subsecuentes de desarrollo hasta que llega a ser un folículo seleccionable para la ovulación (51) (figura 2).

En el estadio antral dependiendo de la ubicación las células de la granulosa pueden ser células del *cumulo* y son las que rodean al ovocito, o células murales si forman la pared folicular (52).

Aunque los folículos pre-antrales son capaces de responder a la FSH, esta hormona no es necesaria para la proliferación de las células de la granulosa y para el crecimiento del folículo (53). Sin embargo, la segunda fase de la foliculogénesis, la fase antral, es dependiente de hormonas e involucra un complejo proceso esencial para la meta principal: la ovulación de un ovocito fertilizable. La aparición de las células granulosas que responden a la FSH marca la iniciación de la segunda fase de la foliculogénesis y ésta es dependiente de los receptores de FSH, los cuales son regulados por IGF-1 (47). En adición a IGF-1, el estrógeno actúa para ayudar a la FSH en la proliferación de las células de la granulosa (54). El estrógeno es una hormona esteroide endocrina producida por las células de la granulosa e induce los receptores para la FSH (55).

Se ha observado que en ratones normales la producción de estrógeno por las células de la granulosa en respuesta a FSH y LH provoca una oleada masiva de proliferación en las poblaciones celulares de la granulosa, generando la formación de folículos pre-ovulatorios grandes (56). Una vez que las células de la granulosa han adquirido la capacidad de responder a la LH (vía el receptor de LH), las células de la teca producen grandes cantidades de andrógenos. Estos cambios inducen el pico de LH y el folículo pre-ovulatorio

activa a una cascada de proteínas señalizadoras, las cuales producen una transformación mayor de las células foliculares. La proliferación se detiene y la diferenciación final inicia (luteinización), los ovocitos reanudan la meiosis y se lleva a cabo la ovulación (57).

Durante el crecimiento del folículo, el ovocito está detenido en la profase meiótica I. Previo a la ovulación, se reinicia la meiosis en respuesta al pico de LH (57). Sin embargo, sólo pocos ovocitos que han completado su crecimiento son capaces de reiniciar la meiosis. Cuando el folículo crece y madura, el volumen del ovocito se incrementa debido al almacenamiento masivo de ARN, de sustancias de reserva y a una compleja reorganización de organelos (58).

El folículo pre-ovulatorio hace relieve en la superficie del ovario. Su pared termina por romperse (dehiscencia), expulsando al ovocito rodeado de las células de la corona *radiata* (ovulación). Entonces las paredes del folículo se colapsan y es expulsado el líquido folicular. El óvulo es captado por el infundíbulo de la trompa uterina y se introduce hacia su interior.

**Maduración del ovocito.** En los folículos en crecimiento los ovocitos permanecen detenidos en el estadio diploteno de la profase meiótica I. Los ovocitos meióticamente competentes de los folículos dominantes o pre-ovulatorios reinician la meiosis cuando se produce el pico pre-ovulatorio de la LH. Esta señal no estimula a los ovocitos que no han completado su crecimiento. Durante el período entre el pico de LH y la ovulación, el ovocito lleva a cabo una serie de cambios no sólo en su núcleo sino también en su citoplasma, este proceso es conocido como maduración de ovocito (59).

La maduración de ovocito está acompañada de tres programas de desarrollo que son esenciales para la producción de un huevo competente para la fertilización y la embriogénesis, estos programas son: a) maduración nuclear, b) maduración epigenética y c) maduración citoplasmática (60).

a) **Maduración nuclear:** incluye la continuación y el término de la primera división meiótica y la detención estable en una metafase II. Los ovocitos que han alcanzado su máximo crecimiento reinician la meiosis en respuesta al pico pre-ovulatorio de hormona luteinizante (LH). Los ovocitos detenidos en la profase I se caracterizan por una membrana nuclear intacta en el núcleo llamado vesícula germinal. La manifestación más obvia del reinicio de la meiosis es el rompimiento de la vesícula germinal, la condensación de los cromosomas y

el ensamble de un huso bípolar en la metafase II. Durante la primera división meiótica, los cromosomas homólogos se segregan en grupos, uno es aislado dentro del primer cuerpo polar y otro permanece dentro del ovocito de mayor volumen citoplasmático, generando un genoma haploide. Después se forma un segundo huso meiótico y es cuando los ovocitos entran en la metafase II, fase en la que se detienen hasta la activación por el espermatozoide (60). El ciclo de la meiosis es regulado por oscilaciones en la actividad de la cinasa  $p34^{cdc2}$  (CDK1), la cual está regulada por la ciclina B; que son componentes de una actividad funcionalmente llamada factor promotor de maduración (61, 62). Este factor se describió por primera vez en ovocitos de ranas (63). En los ovocitos, CDK1 se activa poco antes del reinicio de la meiosis y es necesario para el rompimiento de la vesícula germinal, su actividad se incrementa y alcanza un pico máximo en la meiosis I. Durante la transición de la meiosis I a la meiosis II, cuando se separa el primer cuerpo polar, la actividad de CDK1 se incrementa significativamente y los niveles altos son mantenidos durante la detención en metafase II (63-65). Otro factor que regula el reinicio de la meiosis son los niveles de la adenosina monofosfato cíclico (AMPC) en el ovocito. Se ha publicado que en ensayos *in vitro* los análogos de AMPC permean la membrana del ovocito y mantienen el arresto meiótico (66, 67), aunque los ovocitos de roedores de laboratorio son más sensibles a estos compuestos que los de bovinos (68, 69), o los de primates (70).

b) Maduración epigenética: se lleva a cabo durante el crecimiento del ovocito y genera modificaciones de la cromatina que regulan la expresión genética. Los fenómenos epigenéticos son modificaciones de la cromatina estables y heredables que influyen la expresión genética sin cambiar la secuencia de ADN. En la ovogénesis, las modificaciones epigenéticas además regulan la expresión genética durante el proceso de maduración (60). Los mecanismos responsables para la regulación del desarrollo de las modificaciones epigenéticas durante la ovogénesis no son conocidos aún, sin embargo, se ha sugerido que pueden ser similares a los mecanismos que operan durante la inactivación del cromosoma X, en el cual un ARN no codificante, el transcripto específico inactivo X (Xist), induce la represión de un cromosoma completo X (71).

c) Maduración citoplasmática: se define comúnmente como el proceso que se lleva a cabo en el citoplasma de ovocitos en crecimiento, que es esencial para la fertilización y el desarrollo embrionario temprano. Los ovocitos acumulan ARN materno inactivo y

proteínas llamadas factores efecto-materno, que son esenciales para la transición huevo-embrión y para la embriogénesis temprana. Estos factores son codificados por efecto de genes maternos y pueden ser sintetizados durante el crecimiento y maduración del ovocito o después de la fertilización. El ARN materno sintetizado durante el crecimiento del ovocito se almacena en una forma inactiva y se traduce selectivamente en el momento apropiado después de su poli-adenilación en el citoplasma (72).

### **Eliminación del conjunto de células germinales por atresia**

Las hembras de mamíferos nacen con un número finito de folículos primordiales y constituyen a la población total de células germinales disponibles para toda su vida reproductiva (73). El número de los que serán seleccionados para desarrollarse hasta la ovulación es pequeño comparado con el número total de folículos primordiales presentes al nacer. Este recurso de ovocitos es absolutamente esencial para la fertilidad. En muchas especies de mamíferos, mueren grandes cantidades de ovocitos durante el desarrollo temprano, antes de que se formen los folículos (74). Aunque se sabe poco de la función de la muerte de células germinales, algunos autores lo consideran un proceso azaroso que continúa durante vida adulta, y que es exacerbada por limitaciones nutricionales o factores ambientales. La propuesta de Allan y col. (75) indica que una sobreproducción de células germinales puede conducir al suicidio de las mismas para obtener un soporte celular óptimo. Otra posible función de la muerte de células germinales es la eliminación de células germinales con anomalías cromosómicas o genes mitocondriales defectuosos (76). También se ha propuesto que los ovocitos que mueren durante el desarrollo embrionario, tienen la función de una célula nodriza, en donde algunos se sacrifican para que otros sobrevivan (77), proporcionando ARNm, proteínas y organelos a los ovocitos que van a sobrevivir, posteriormente las células nodrizas mueren por apoptosis. Lobascio y col. (78), indican que los ovocitos con defectos en el entrecruzamiento cromosómico, que es un proceso requerido para la segregación de los homólogos en la metafase I, pueden ser eliminados por apoptosis para asegurar un control de calidad del ovocito.

Las células de la línea germinal femenina mueren durante la maduración por un proceso conocido como atresia hasta que todos los folículos son eliminados y se genera la falla ovárica (menopausia en las mujeres). La atresia folicular es el proceso por el cual muchos de los folículos existentes en el ovario degeneran. Las evidencias proporcionadas por

estudios desarrollados en ovario de aves indican que en el proceso de atresia folicular pueden estar participando más de un tipo de muerte celular, ya que en células de la granulosa se identificó la coexistencia de la apoptosis, autofagia y necrosis (79).

La forma por la cual se lleva a cabo la pérdida de ovocitos postnatales en mamíferos es muy compleja, ya que los procesos de depleción de células germinales, referidas como atresia folicular pueden iniciarse como una consecuencia directa de la apoptosis de los ovocitos o como una consecuencia indirecta de la apoptosis de las células somáticas de soporte (granulosa), dependiendo de la fase de desarrollo folicular, ya que se ha observado que en los folículos primordiales y primarios la degeneración del ovocito da como consecuencia la degeneración del folículo (80, 81). Por otro lado, en folículos más maduros, la atresia inicia con las células de la granulosa y posteriormente en las células de la teca, provocando la muerte del folículo (82). La pérdida de células germinales se lleva a cabo tanto en folículos que ya han pasado a través de varias fases del desarrollo, como en los folículos en maduración (pre-antral tardío o antral temprano) o folículos totalmente maduros (pre-ovulatorios) (76).

#### **Procesos de muerte celular**

Se han descrito diferentes formas de muerte celular, en donde algunos autores como Rosales y cols. (83) incluyen a la necrosis como un proceso de muerte celular bien caracterizado el cual origina un hinchamiento de las células y de algunos organelos intracelulares, particularmente mitocondrias y lisosomas. Esta hinchazón es rápidamente seguida de una ruptura de la membrana lisosomal y la liberación de componentes intracelulares, incluyendo enzimas hidrolíticas, afectando a un conjunto de células vecinas ocasionando un proceso inflamatorio; la necrosis puede estar acompañada por picnosis de distribución irregular de cromatina formando áreas de condensación. Este tipo de muerte se caracteriza por no ser genéticamente controlada, es producto de lesiones celulares provocadas por causas biológicas, físicas o químicas. Se han asociado una gran variedad de cambios con la muerte por necrosis, por ejemplo: pérdida del equilibrio osmótico, por la cual el potencial de membrana se ve alterado a causa de una baja en ATP y de esta manera se incrementa su permeabilidad. Otros autores como Majno y Joris (84), el término necrosis lo utilizan para los procesos posteriores a la muerte celular.

Los otros tres tipos de muerte celular que han sido caracterizados son: la oncosis, apoptosis y la autofagia.

**Oncosis.** Majno y Joris (84) proponen el término oncosis para la muerte causada por isquemia. Los autores describen a este tipo de muerte celular, como un proceso en donde la integridad de la membrana se conserva al inicio del mismo, se observan prolongaciones citoplasmáticas que finalmente se desprenden (*blebbling*) y un hinchamiento de las mitocondrias durante las fases iniciales del proceso de muerte. Kato y cols. (85), definen a la oncosis como los pasos iniciales de la necrosis. En general el término oncosis (*ónkos*, significa hinchazón) se caracterizó inicialmente en la muerte celular por isquemia y se ha reintroducido recientemente para definir la muerte celular que ha perdido las características clásicas de la apoptosis. En la literatura se ha definido como una forma de muerte celular caracterizada por un hinchamiento celular, el *blebbling* de la membrana y el incremento de la permeabilidad de la misma (86). Liu y cols. (87) definen a la muerte celular oncótica, como el punto en donde la respiración (la función mitocondrial y la formación de ATP) y la homeostasis iónica no pueden ser restauradas (88-90). Después de la falla mitocondrial, los niveles de ATP bajan, en general, si la disminución de ATP es menor del 80-85%, las células pueden morir por apoptosis o sobrevivir si la función mitocondrial es restaurada. Sin embargo, si la disminución de ATP es mayor del 85%, empieza la oncosis (91) Esta disminución de ATP, explica por otro lado, que no se vea tan frecuentemente el proceso de apoptosis en la enfermedad del síndrome agudo de coronarias, ya que la apoptosis es un proceso que requiere ATP para llevarse a cabo. La reperfusión post-isquémica, incrementa las especies reactivas al oxígeno (ROS), la generación de radicales libres de oxígeno, la oxidación de ácidos grasos, la disminución de oxidación de glucosa y se recobra la producción de ATP (92).

Durante el proceso de oncosis, se genera un incremento del calcio intracelular y pérdida de homeostasis del calcio, ya que en condiciones normales la concentración citosólica de calcio es muy baja. El daño celular incrementa dicha concentración, con desacoplamiento de la respiración-fosforilación mitocondrial y activación de enzimas hidrolíticas. También hay una liberación de enzimas intracelulares y lisosomales, debido al rompimiento general de membranas internas (tabla 1).

**Tabla 1.** Características morfológicas y bioquímicas de la oncosis (tomado de ref. 93)

CARACTERÍSTICAS MORFOLÓGICAS	CARACTERÍSTICAS BIOQUÍMICAS
<ul style="list-style-type: none"> <li>- Hinchamiento celular.</li> <li>- Hinchamiento y ruptura de mitocondrias y organelos.</li> <li>- Cúmulo de cromatina nuclear anormal</li> <li>- Ruptura de lisosomas, vacuolización, cuerpos mitocondriales densos.</li> <li>- Ruptura de membrana.</li> <li>- Afecta a un grupo de células.</li> <li>- Inflamación aguda.</li> <li>- En aproximadamente 24 horas hay una coagulación de proteínas, un encogimiento celular, cariólisis y necrosis.</li> </ul>	<ul style="list-style-type: none"> <li>- No inducida por estímulos patológicos o fisiológicos, sino por isquemia y/o reperfusión.</li> <li>- Genera la formación de especies reactivas derivadas del oxígeno (<math>H_2O_2</math>, <math>OH^-</math>) que causan destrucción de la membrana y estructura celular.</li> <li>- Inicialmente hay daño mitocondrial, incremento en la permeabilidad de la membrana, que generan una disfunción de las bombas de iones.</li> <li>- No hay una fragmentación específica de ADN.</li> <li>- Debido a una disminución o cese de la producción de ATP (mitocondrial, glicolítico o del ciclo de Krebs) hay hinchazón celular, síntesis proteica disminuida, transporte activo disminuido, lipogénesis.</li> <li>- Todos estos cambios contribuyen a la alteración de la membrana celular, es decir a la pérdida de la permeabilidad selectiva de la membrana.</li> </ul>

**Apoptosis.** El término apoptosis (apo-separa y ptosis-caer) fue propuesto y empleado por Kerr en 1972 (94) con el propósito de describir la muerte que se observaba durante el desarrollo embrionario, en la regeneración hepática y la relación entre proliferación y muerte existente en modelos de tumores murinos *in vivo*, la cual es diferente a la que se ocasiona por intoxicaciones y algunas patologías.

La muerte celular por apoptosis es ejecutada por una familia de proteasas denominadas caspasas (95), por ser cisteín-proteasas que hidrolizan a su sustrato junto a un residuo de ácido aspártico. Las caspasas responden al estímulo apoptótico mediante la activación de una cascada intracelular proteolítica que ocasiona la activación o inactivación de diferentes sustratos celulares y provoca la muerte celular.

Las caspasas son un grupo de proteínas pertenecientes a las cisteínas proteasas, se caracterizan por presentar un residuo de cisteína que media la ruptura de otras proteínas. Realizan un corte después de un residuo de ácido aspártico (Asp) (96, 97). Las caspasas son proteínas altamente conservadas. Se conocen actualmente catorce caspasas en mamíferos (95), de las cuales hay siete que están implicadas en el proceso de apoptosis, hay tres



De las 14 caspasas identificadas, 11 se han identificado en humanos: 1-10 y 14. La primera caspasa identificada, la 1 es la responsable de la maduración de la pro-interleucina 1 $\beta$  (ICE, caspasa 1) a su forma pro inflamatoria y biológicamente activa (100).

Las caspasas son reguladas a nivel pos-traducciona para una activación más eficiente, por lo que son sintetizadas como pro enzimas inactivas, denominadas pro-caspasas, que una vez activadas por proteólisis limitada y asociación de subunidades (96), adquieren la actividad catalítica para proteolizar a sus sustratos tras un residuo de ácido aspártico. Reconocen, sin embargo, diferentes motivos tetrapeptídicos (secuencia de 4 aminoácidos reconocida específicamente por las caspasas) lo cual les confiere cierta especificidad de sustrato. Las caspasas inactivas pueden ser sustrato a su vez de las activas, de manera que unas caspasas activan a otras siguiendo un orden jerárquico y en forma de cascada (102).

Las caspasas tienen 3 regiones que consisten de un pro-dominio amino terminal, una subunidad grande (p20) con un centro activo de Cys285, el cual es parte de una secuencia de pentapéptidos conservados: glutamina, alanina, cisteína, X, glicina y una His237 y el extremo carboxilo pequeño de 177 residuos (p10). El pro-dominio y la subunidad larga están separados por un lugar de corte con Asp y la subunidad grande está separada de la pequeña por uno o dos sitios de corte con Asp. La presencia de Asp en los motivos de corte para la maduración es consistente con la capacidad de las caspasas de autoactivarse o de ser activadas por otras caspasas como parte de una cascada de amplificación. Cada caspasa con pro-dominio largo contiene un módulo de interacción proteína-proteína que permite la unión y asociación con sus reguladores. Las caspasas 8 y 10 contienen un dominio efector de muerte (death-effector domain, DED) mientras que las caspasas 2 y 9 contienen un dominio de reclutamiento y activación de caspasas (caspase activation and recruitment domain, CARD). Estos dos dominios tienen secuencias distintas, pero se pliegan en una disposición espacial similar que consiste en seis  $\alpha$  hélices antiparalelas. El mismo plegamiento lo encontramos en el dominio de muerte (death domain, DD), una tercera proteína de interacción presente en varios reguladores iniciales de la apoptosis como CD95 y la molécula adaptadora FADD. Parece que el DD, DED y CARD derivan de un dominio ancestral común (103).

Ya en la forma activa, las caspasas son tetrámeros con dos dominios catalíticos con una Cys-285 en cada dominio (figura 4).

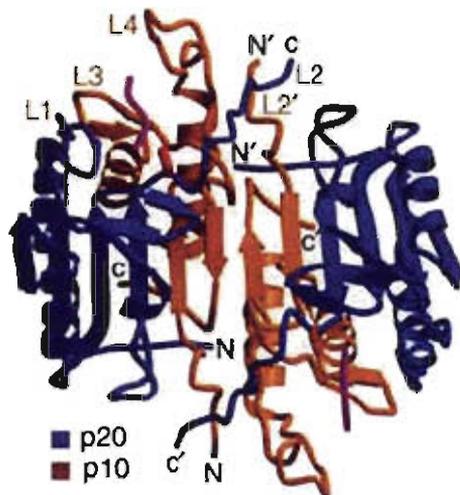


Figura 4. Estructura de caspasas (tomado de ref. 103)

Las caspasas se han clasificado de diversas formas, tomando en cuenta su estructura, su función o la preferencia de sustrato.

A) En humanos de acuerdo a su función, se clasifican de la siguiente forma:

- Caspasas pro-inflamatorias: caspasa 1, 4, 5, 11 y 12.
- Caspasas ejecutoras de muerte: caspasa 3, 6 y 7
- Caspasas iniciadoras de muerte: caspasa 2, 8, 9 y 10.
- Caspasa con posible relación con la maduración de queratinocitos: caspasa 14

B) De acuerdo a su estructura general:

- Prodominio largo con CARD: caspasa 1, 2, 4, 5, 9, 11 y 12
- Prodominio corto con DED: caspasa 8 y 10
- Prodominio corto: caspasa 3, 6, 7 y 14

C) De acuerdo a la especificidad de sustrato:

- Clase I: caspasa 1, 4 y 5 (P4 con secuencia óptima: triptófano, ác. glutámico, histidina y ác. aspártico)
- Clase II: caspasa 6, 8, 9 y 11 (P4 con secuencia óptima (leucina/valina; ác. glutámico, X, ác. aspártico)
- Clase III: caspasa 2, 3 y 7 (P4 con secuencia óptima: ác. aspártico, ác. glutámico, X, ác. aspártico; X=valina o histidina)

La clasificación más utilizada es de acuerdo a su función: caspasas pro inflamatorias (1, 4, 5, 11 y 12) y las caspasas que participan en apoptosis, que a su vez pueden dividirse en dos grandes grupos: caspasas iniciadoras (8, 9, 2 y 10), que se activan en respuesta a señales

apoptóticas y activan a las caspasas efectoras (3, 6 y 7), las cuales proteolizan sustratos celulares provocando la desorganización de la célula y los cambios morfológicos típicos de la apoptosis (95). Además, parece existir especificidad de tejido en cuanto a la caspasa requerida para el proceso apoptótico.

**Activación de las caspasas.** En la activación de las caspasas, se lleva a cabo un procesamiento proteolítico entre dominios, seguido de una asociación entre las subunidades grande y pequeña para formar un heterodímero. La estructura de las caspasas está compuesta de dos heterodímeros para formar un tetrámero, con dos centros activos que parecen funcionar de forma independiente (figura 4).

Tipos de activación:

- a) Activación por otra caspasa, se genera durante la exposición de una pro-caspasa a una caspasa previamente activada. Esta estrategia de activación denominada cascada de caspasas es muy utilizada por las células para la activación de las tres caspasas que tienen pro dominio corto: 3, 6 y 7.
- b) Activación inducida por proximidad: La caspasa 8 es la caspasa iniciadora clave en la vía de los receptores de muerte. Después de la unión del ligando, los receptores de muerte como CD95 (Apo-1/Fas) se agregan y forman un complejo de señalización de membrana. Estos complejos reclutan a través de sus proteínas adaptadoras, varias moléculas de pro-caspasa 8 con lo que se aumenta la concentración local de la pro-caspasa. En estas condiciones, la baja e intrínseca actividad de proteasa de la pro-caspasa 8 es suficiente para permitir que varias moléculas de pro-enzima se corten mutuamente y se activen unas a otras.
- c) Asociación con una subunidad reguladora: El mecanismo de activación más complejo es el utilizado por la caspasa 9. El procesamiento catalítico de la pro-caspasa 9 tiene un efecto mínimo en su activación, el requerimiento clave para su activación es su asociación con un cofactor de proteínas: Apaf-1. También se necesita citocromo-c (cyt-c) liberado por la mitocondria. El cyt-c y Apaf-1 se asocian en un proceso dependiente de ATP. La oligomerización de Apaf-1 recluta pro-caspasa-9 formando el apoptosoma. La activación de la caspasa 9 es debida a un cambio conformacional, no a proteólisis.

Las caspasas efectoras son activadas proteolíticamente por otras caspasas, mientras que las caspasas iniciadoras se activan por interacciones reguladas de proteína-proteína. Actualmente se han descrito con detalle cada una de las rutas activadoras de las caspasas: la ruta extrínseca mediada por receptores de la membrana citoplasmática y la ruta intrínseca en la cual está involucrada la liberación de cyt-c al citoplasma por la mitocondria. En la ruta del receptor de muerte, la unión de miembros agonistas de la superfamilia del factor de crecimiento nervioso con TNF (Tumor Necrosis Factor), puede inducir la activación de la caspasa iniciadora: la caspasa 8, la cual a su vez activa a la caspasa efectora la caspasa 3 (104, 105). En la ruta mediada por el cyt-c, convergen diversos estímulos en la mitocondria y generan la liberación de cyt-c al citoplasma, un evento regulado por la familia de proteínas Bcl-2 (106, 107).

La ruta extrínseca se inicia por la unión de un ligando a su receptor transmembranal para promover el reclutamiento de proteínas adaptadoras. Los receptores CD95/Fas/Apo1, TNFR1 (TNRF, receptor de factor de necrosis tumoral), TNFR2, DR3/Ws1-1/Tramp, DR4/TRAIL-R1, DR5/TRAIL-RR/TRICK2/Killer y DR6 se caracterizan por la presencia de repeticiones múltiples ricas en cisteína en la porción extracelular y en el módulo de interacción conocido como DD en los tallos citoplasmáticos, todos estos pueden ser inducidos por ligandos. Una vez inducido por el ligando, el receptor genera la formación de un complejo inductor de señalización de muerte (DISC) que contiene múltiples moléculas adaptadoras incluyendo FADD (Fas asociado a DD), TRAD (Receptor TNF asociado a DD), DAXX, REIP (receptor interactuante con proteína cinasa), RAIDD (RIP asociado a DD), la granzima B (liberada por los linfocitos T citotóxicos (CD8+)) y FLIP (proteína inhibidora tipo FLICE –enzima convertidora de IL-1 $\beta$  tipo FADD-). FADD es reclutado al DISC a través del DD que tiene en su región carboxilo terminal y luego interactúa a través de su DED en su extremo amino terminal con el DED de la caspasa 8 (108). La caspasa 8 es la caspasa apical en la ruta por receptor de muerte e interactúa con proteínas adaptadoras para generar su propia forma activa. El reclutamiento y oligomerización de la caspasa 8 en el DISC genera su activación autocatalítica (109). Una vez activa, la caspasa 8 puede disparar la activación de las caspasas efectoras como la caspasa 3 (95). Por otro lado, se han hecho observaciones en donde la activación extrínseca también puede interferir con la ruta intrínseca, ya que en respuesta al ligando Fas o TNF la caspasa 8 induce un corte a Bid

(proteína pro-apoptótica de la familia Bcl-2), para formar Yield, un fragmento carboxilo terminal truncado que se transporta del citosol a la membrana mitocondrial externa. Los oligómeros del Bid truncado pueden disparar la permeación de la membrana y provocar la liberación del cyt-c. (110). También hay evidencia de que Bid truncado puede disparar cambios conformacionales en Bax, el cual se localiza en el canal aniónico dependiente de voltaje en la membrana externa de la mitocondria para iniciar la permeación de la membrana (111).

La ruta intrínseca es independiente de receptores de muerte y es inducida por agentes quimioterapéuticos, radiación ultravioleta o las moléculas de estrés (especies reactivas al oxígeno –ROS–, el ON). Implica la permeación de la membrana mitocondrial para liberar proteínas mitocondriales como cyt-c, Omi/Htr2 (serina proteasa) y Smac/diablo. Una vez liberado en el citosol, el cyt-c se puede combinar con Apaf-1 (factor activador de proteasa apoptótica) y caspasa 9 para formar el apoptosoma (112-114). Apaf-1 consiste de tres dominios funcionales: un CARD (caspase recruitment domain) amino terminal, un dominio central de unión a nucleótido y doce o trece repeticiones (triptófano-ác. aspártico) en el carboxilo terminal. Apaf-1 recluta y activa a las pro-caspasas 9 a través de las interacciones de CARD que ambas proteínas tienen. Apaf-1 requiere ATP para la inducción de la ruptura autolítica de la pro-caspasa 9 en caspasa 9 activa. Esta última se libera del apoptosoma para activar a las caspasas 3, 6 y 7, que provocan la ruptura de diversos sustratos y la apoptosis (115, 116).

La ruta intrínseca está regulada por la familia de proteínas Bcl-2, por proteasas o por agentes que promueven la transición de permeabilidad mitocondrial (eg. ceramida, ROS y  $\text{Ca}^{2+}$ ).

Los principales reguladores intracelulares de la muerte celular programada son la familia de proteínas Bcl-2, proteína de mamíferos homóloga estructural y funcionalmente a la proteína CED-9; esencial para la prevención de la muerte celular en *C. elegans* (117). Se conocen 15 miembros de la familia de Bcl-2 en mamíferos hasta el momento (118) y todos ellos presentan al menos uno de los cuatro dominios conservados de homología a Bcl-2 (BH1 a BH4) (figura 5). En condiciones de estrés, los miembros de la familia de proteínas con multidominios anti-apoptóticos Bcl-2 (Bcl-2, Bcl-xL, Mcl-1, Bcl-w y Bfl-1/A1), residentes en la membrana mitocondrial externa bloquean la liberación del cyt-C. Esta acción puede

ser revertida por la disminución de su expresión o por la inducción de miembros de Bcl-2 pro-apoptóticos (Bax, Bim, Bid, Bad, Bik, Hrk y Bak). En este caso, si la concentración de los miembros pro-apoptóticos empieza a ser demasiado alta, comienza la formación de complejos proteicos fuera de los canales de la membrana externa, liberando el cyt-c. (119).

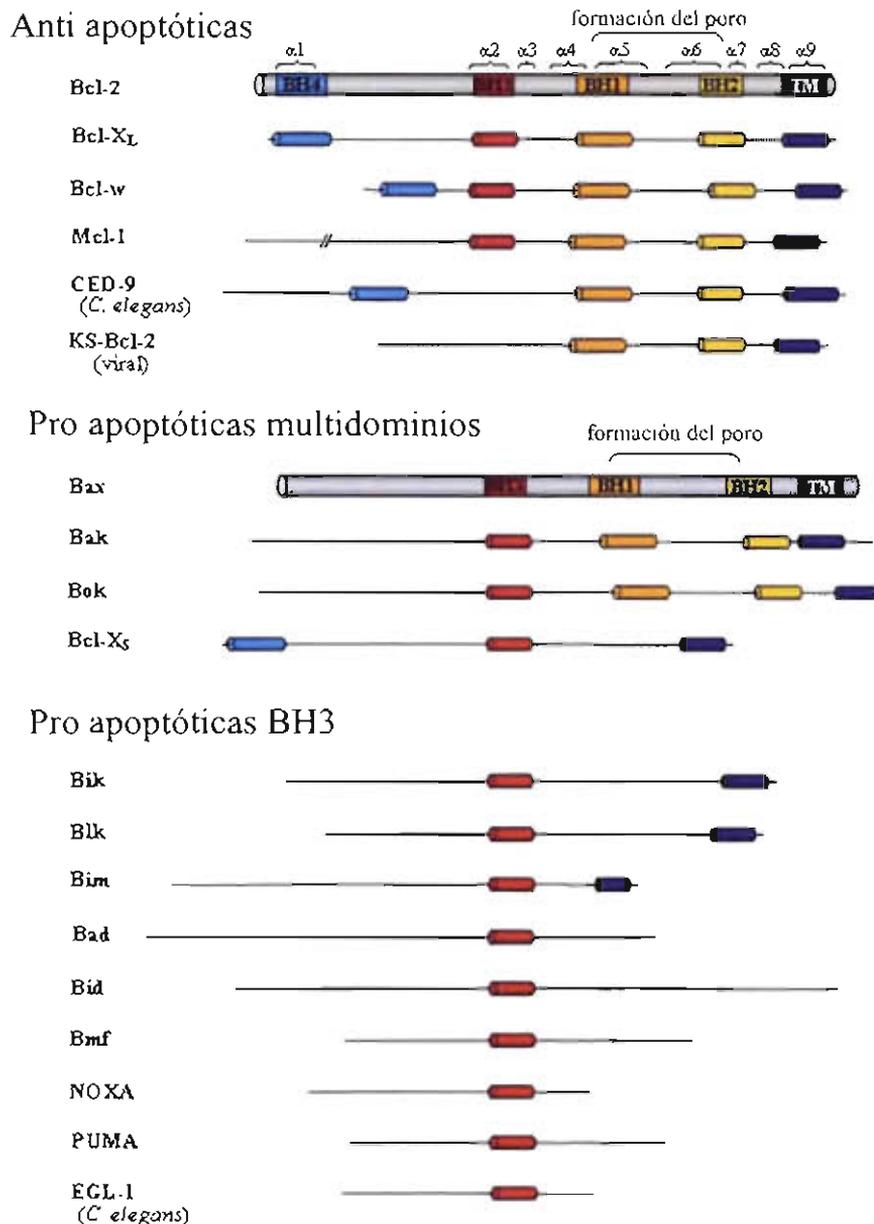


Figura 5. Miembros de la familia Bcl-2 (tomado y modificado de ref. 118)

Los miembros de la familia Bcl-2 pueden tener cuatro dominios BH1, BH2, BH3 y BH4, compuestos de dos  $\alpha$ -hélices. Los anti-apoptóticos tienen los 4 dominios BH. Los pro-

apoptóticos pueden tener multidominios (BH1, BH2 y BH3) o sólo el BH3 (conocidos como *BH3 only*), más un segmento hidrofóbico en el carboxilo terminal, que es el que los dirige hacia las membranas de los organelos. Algunos como Bik, Blk, Bim poseen un extremo C-terminal hidrofóbico y otros como Bad, Bid, Bmf, NOXA y PUMA hidrofílico. Las Bcl-2, como Bax y Bak, pueden activarse directamente por interacción con la proteína Bid que posee un dominio BH3. Por otro lado, Smac/diablo se une y antagoniza a las proteínas inhibidores de la apoptosis (IAPs), promoviendo la ruta apoptótica (120). La liberación regulada de factores pro-apoptóticos de la mitocondria causa la inducción de las caspasas iniciadoras y efectoras o ejecutoras y una pérdida del potencial de membrana mitocondrial.

Existen al menos cinco diferentes IAPs en mamíferos: XIAP (inhibidor de apoptosis unido a X), c-IAP1, c-IAP2, IAP neuronal y survivina. El espectro de estímulos apoptóticos que son bloqueados por las IAPs de mamíferos es amplio e incluye ligandos y transductores de la familia de receptores del TNF, miembros pro-apoptóticos de la familia de Bcl-2, el cyt-c y agentes quimioterapéuticos (121). XIAP, c-IAP1 y c-IAP2 son inhibidores directos de caspasas. Todos ellos se unen e inhiben a las caspasas 3 y 7 activas y también a la pro-caspasa 9, pero no a las caspasas 1, 6, 8 ni 10. La unión y la inhibición de las caspasas por las IAPs son mediadas por BIR (dominios repetidos IAP de baculovirus) que está presente dentro de las IAPs y que es un sitio conservado de unos 70 aminoácidos repetidos en *tandem*. Otra característica de las IAPs es el dominio RING, que actúa como una ligasa de ubiquitina promoviendo la degradación de la propia IAP (122) y presumiblemente, cualquier caspasa unida ella. Cerca del dominio RING, tanto en c-IAP1 como en c-IAP2, existe un dominio CARD que sugiere que estas IAPs podrían regular directa o indirectamente el procesamiento de las caspasas a través de interacciones por el dominio CARD. De esta manera, las IAPs frenan la apoptosis uniéndose, inhibiendo y quizá degradando caspasas.

La caspasa 3 activa, es capaz de romper muchas proteínas celulares incluyendo ICAD (inhibidor de ADNasa activada por caspasa), ROCK1 (cinasa1 formador de *coiled coil* asociados a Rho), poly (ADP-ribosa) polimerasa (PARP, una enzima reparadora de ADN), actina, fodrina y laminina. La caspasa 3 puede generar el burbujeo en la membrana celular (*blebbing*) vía ROCK1, por medio de la fosforilación permanente de la cadena ligera de

miosina, desensambla la estructura celular y fragmenta ADN vía ICAD/DFF45 (inhibidor de ADNasa activada por caspasa), haciendo que CAD (ADNasa activada por caspasas) se mueva libremente en el núcleo y rompa el ADN internucleosomalmente, lo cual genera la característica "escalera de ADN" que se observa en las células apoptóticas.

Durante la apoptosis, la integridad de la membrana plasmática se conserva, sin embargo, la estructura y/o función de esta membrana puede ser modificada por los pasos iniciales de este proceso. Uno de los cambios bioquímicos durante la apoptosis es la externalización de la fosfatidilserina, fosfolípido que forma parte de la membrana citoplasmática, el cual normalmente se restringe a la parte interna de la membrana (123) y se pierde la asimetría de los fosfolípidos de la membrana. Las técnicas actuales permiten identificar este proceso, mediante Annexina-V acoplada a fluorescencia, que se asocia a la fosfatidilserina situada en la cara externa de la membrana celular.

La apoptosis ha sido implicada en un espectro de procesos asociados con el desarrollo y función normales del ovario, incluyendo la muerte de células germinales prenatales (124), atresia folicular postnatal (muerte celular de la granulosa, 125), ovulación (126) y luteolisis (127).

En mamíferos hay evidencia de que Bax, media la muerte de células germinales en ovarios (128). La proteína Bax por sí sola es suficiente para disparar la apoptosis en los ovocitos (129). Hay suficientes datos que apoyan que Bax tiene un papel fundamental en la producción de apoptosis tanto de células de la línea germinal como las células de la granulosa. Se ha observado que en ratones hembras deficientes de Bax, no se altera el número de ovocitos al nacer, pero se reduce de forma significativa la velocidad a la cual los ovocitos son eliminados por apoptosis durante la vida pre-púber y adulta (130). Por otro lado, ovarios de hembras seniles deficientes de Bax tienen muchos ovocitos en todas las fases de desarrollo, en contraste con las hembras seniles tipo silvestre, cuyos ovarios carecen de ovocitos. Además en hembras mutantes de Bax, los úteros muestran un alto nivel de hipertrofia, lo cual indica que la función del ovario se mantiene. Este estudio concluyó que el fenómeno equivalente a la menopausia se puede prevenir, en ausencia de Bax (130).

La caspasa-2 se expresa en los diferentes tipos celulares del ovario incluyendo a los ovocitos (131), sin embargo, cuando se inhibe la expresión de esta caspasa, no se observan

foliculos atrésicos aberrantes, lo cual sugiere que esta enzima no es esencial para el proceso de muerte de las células de la granulosa. Por otra parte, en ensayos con ratones hembras sin caspasa-2, éstas nacen con una gran reserva de ovocitos primordiales (131), que es el resultado de un proceso de apoptosis deficiente. Mientras que la caspasa-2 es claramente importante para la apoptosis que ocurre en los ovocitos carentes de caspasa 3, la enzima no parece ser requerida para la ejecución de la muerte celular programada de los ovocitos en general.

Existe una gran cantidad de evidencias de que la caspasa 3 es el ejecutor principal de la muerte celular programada en el ovario. Por ejemplo, existe una correlación entre la expresión de caspasa 3 y la apoptosis en las células de la granulosa en el ovario de ratas (132).

**Autofagia.** Es un fenómeno fisiológico que consiste en la destrucción de organelos celulares o fragmentos citoplasmáticos. Con este proceso no hay pérdida de los componentes químicos, ya que vuelven a ser utilizados por la célula. Está relacionada con la renovación cíclica de organelos; con la diferenciación celular (ya que aparece durante la misma) y surge como respuesta a sustancias tóxicas. La autofagia y el reciclamiento citosólico por el protosoma son las principales rutas para la degradación de constituyentes celulares. Estas rutas degradativas son particularmente importantes durante el desarrollo y bajo ciertas condiciones de estrés (133).

En células eucarióticas, el lisosoma, es el principal organelo degradativo. Los lisosomas son vesículas que se forman a partir del aparato de Golgi, contienen hidrolasas ácidas y tienen la propiedad de fusionarse con diversos tipos de vesículas fagocíticas (134). Son puntos de encuentro donde convergen diferentes corrientes del tráfico intracelular, las enzimas digestivas son descargadas en ellos mediante una ruta que va por el retículo endoplásmico y el complejo de Golgi. Son organelos rodeados de membrana con un espacio interno ácido conteniendo enzimas hidrolíticas para la degradación de proteínas, lípidos, ácidos nucleicos y sacáridos. Las sustancias que deben ser digeridas llegan a ellos a través de por lo menos tres vías: endocitosis, autofagia y fagocitosis. Durante la endocitosis ocurre la formación de endosomas tempranos y desde ellos, algunas de las moléculas endocitadas son seleccionadas y recicladas a la membrana plasmática, mientras que otras se dirigen a endosomas tardíos, los cuales tienen un pH aproximadamente de 6 y tienen

hidrolasas lisosomales que provienen del complejo de Golgi. El pH óptimo de la catálisis de las enzimas hidrolíticas se correlaciona con el pH bajo del compartimiento lisosomal, que es alrededor de 4.6. La elevada concentración interna de protones se mantiene mediante un transportador de protones (una APTasa de H<sup>+</sup>) presente en la membrana que limita al organelo.

La membrana lisosomal tiene múltiples funciones: es responsable de la acidificación en el interior, del secuestro de enzimas lisosomales activas (135), del transporte y degradación de productos del lumen lisosomal al citosol y de la regulación y fusión entre los lisosomas mismos y con otros organelos (136, 137). Las membranas lisosomales contienen varias proteínas altamente N-glicosiladas de las cuales las mejor conocidas son lamp1 y lamp2. Estas dos glicoproteínas están estructural y evolutivamente relacionadas (138). Lamp1 y 2 son los mayores componentes de la membrana lisosomal, estimaciones basadas en procedimientos de inmuno-purificación calcularon que ambas proteínas constituyen aproximadamente el 50% de las proteínas de membrana de lisosomas (139) y el 0.1% de las proteínas totales de las células (140). Son proteínas transmembranales tipo I, con un dominio luminal grande, un dominio transmembranal y un tallo citoplasmático en el extremo carboxilo terminal. Los tallos citosólicos conservados de lamp1 y 2 son 11 residuos y contienen información necesaria para su destino intracelular después de la biosíntesis (141). A pesar de su homología en la secuencia de aminoácidos (37%) lamp1 y 2 son proteínas distintas, las cuales parece ser que divergieron muy tempranamente en la escala evolutiva, esto es evidenciado por su localización en diferentes cromosomas (137). Lamp1 es un componente proteico abundante de la membrana lisosomal, sin embargo en células deficientes de lamp1, las propiedades lisosomales incluyendo las actividades del lisosoma, el pH, la estabilidad osmótica, la densidad, la morfología, la distribución celular y el procesamiento lisosomal, no se ven afectados. En cambio, se observó una alta expresión de lamp2, llevando a la conclusión de que ante la deficiencia de lamp1, hay una compensación por parte de lamp2. En contraste con lo anterior, en ratones deficientes de lamp2, los daños son más severos, ya que hay una acumulación masiva de vacuolas autofágicas en varios tejidos. Estos hallazgos apoyan la teoría de que lamp2 es crucial en la ruta de señalización y marcado de lisosomas que guían a los autofagosomas en la ruta de degradación y reciclamiento de material citoplasmático (142), ya que las vacuolas

autofágicas se originan de membranas que aíslan contenido citoplasmático para finalmente fusionarse con los endosomas/lisosomas (143). La importancia fisiológica de lamp2 se evidencia en la enfermedad de Danon, ya que la deficiencia de esta proteína origina tal patología (144). Para hacer hincapié en la importancia de estas proteínas, se hicieron estudios con ratones doblemente deficientes de lamp1 y 2 y se observó que los embriones murieron entre los días 14.5 y 16.5, con una variedad de patomorfología caracterizada principalmente por una disgénesis facial. La microscopía electrónica reveló que muchos tejidos acumularon vacuolas autofágicas, hechos que implican a lamp1 y 2 en la autofagia (145). Todo lo anterior redundaba en lo importante que es la presencia de las proteínas lamp1 y 2 como parte de las membranas de los lisosomas, ya que la función primordial del organelo que es la degradación de material citoplasmático, no se lleva a cabo debido a que los lisosomas no tienen la maquinaria necesaria para realizar el contacto con las vacuolas autofágicas.

En eucariontes, durante el proceso de autofagia las células degradan parte de su propio citoplasma y organelos (146). Los estudios morfológicos y bioquímicos han revelado que porciones de citoplasma, primero son secuestradas por una vacuola de doble membrana (autofagosoma) que es originada del retículo endoplásmico (147). La vacuola autofágica naciente está cargada con varias hidrolasas ácidas por una fusión con lisosomas, endosomas o elementos del Golgi, para formar una vacuola degradativa con una sola membrana llamada autolisosoma (148, 149).

Se han descrito tres tipos de autofagia: la macroautofagia, microautofagia y la autofagia mediada por chaperonas. (150). Estos procesos difieren entre sí en los mecanismos por los cuales los sustratos son liberados en los lisosomas, en su regulación y en su selectividad. La macroautofagia o simplemente autofagia y la microautofagia son procesos conservados desde levaduras hasta mamíferos, mientras que la ruta mediada por chaperonas, se ha descrito solo en mamíferos. La macroautofagia es inducida por estrés, en donde organelos intracelulares y citosol son secuestrados por una vacuola de doble membrana (autofagosoma), la fusión de la vacuola con los lisosomas permiten el contacto del contenido vacuolar con las hidrolasas ácidas y forman una vacuola de una sola membrana denominada autofagolisosoma, en el cual se lleva a cabo el proceso de degradación, después, madura a lisosoma secundario o a cuerpo residual (dependiendo si la degradación

es completa o parcial) (142). Los diferentes pasos en la macroautofagia como la formación de la membrana limitante, la elongación, la maduración, la fusión lisosomal y la degradación, están mediados por un grupo de más de 14 proteínas, que fueron descritas primero en levaduras, y genéricamente se conocen como proteínas Atg (151).

La autofagia mediada por chaperonas también se puede inducir igual que la autofagia, ya que se activa principalmente por diferentes agentes estresantes como limitación nutricional, exposición a compuestos tóxicos y estrés oxidativo (152). Bajo esas condiciones, las proteínas sustrato son selectivamente llevadas a los lisosomas después de interactuar con la chaperona citosólica hsc70, que es un miembro constitutivo de la familia de proteínas de choque térmico con peso de 70 kDa. La interacción de la chaperona con el sustrato se lleva a cabo por medio de un sitio de aminoácidos (bioquímicamente relacionado con el pentapéptido: lisina, fenilalanina, ácido glutámico, arginina y glutamina), el cual se presenta en todos los sustratos que van a tomar esta ruta (153). El complejo sustrato-chaperona se une a un receptor en la membrana lisosomal (lamp2A o proteína tipo 2A asociada a membranas de lisosomas) y después de desplegarse, el sustrato atraviesa la membrana lisosomal asistido por una chaperona residente en el lumen lisosomal (154). Este tipo de autofagia es la ruta de degradación de proteínas con mayor especificidad.

En la microautofagia, los componentes citosólicos son secuestrados directamente por el lisosoma, el cual se deforma para crear invaginaciones o tubulaciones atrapando citosol, el contenido es posteriormente degradado en el lumen del lisosoma (155).

La ruta de degradación por autofagia está regulada por varios factores, algunos ejemplos son los siguientes: en células de mamíferos, la fosforilación de la proteína ribosomal S6 se correlaciona fuertemente con la inhibición de la macroautofagia (156). La actividad de la cinasa p70S6 está regulada por la cinasa mTor (157, 158). La inhibición de la fosforilación que se genera de la inactivación de mTor por tratamiento con rapamicina, induce la autofagia bajo condiciones de abundantes nutrientes. En células de mamíferos la inhibición de PP2A (proteína fosfatasa 2) por ácido ocadaico tiene un fuerte efecto inhibitor en la autofagia (159). Los cambios en la localización y/o la actividad de PP2A puede ser un mecanismo que controla la autofagia, además de otras fosfatasas que también están involucradas en ésta regulación (160). La Apg13 es parte de un complejo proteico

dinámico, el cual incluye la serina y treonina cinasa Apg1 (160, 161). La cinasa Apg1 se requiere para la autofagia en eucariontes superiores (133).

La formación del autofagosoma está fuertemente regulada y bajo control de GTPasa, fosfatidilinositol cinasas y varias fosfatasas. La liberación y fusión del autofagosoma completo con el lisosoma, depende de microtúbulos y del mantenimiento de una acidificación adecuada. Lc3 es una proteína asociada a microtúbulos, está implicada en el transporte lisosomal y en la degradación vía autofágica (162), originalmente se identificó como una proteína co-purificada con proteínas 1A y 1B asociadas a microtúbulos de cerebro de rata (163). Lc3 es una proteína soluble con una masa molecular de 17 kDa que está distribuida de forma generalizada en tejidos de mamíferos y células en cultivo. Una forma citosólica de Lc3 (Lc3-I) está conjugada a la fosfatidiletanolamina para formar el conjugado fosfatidiletanolamina-Lc3 (Lc3-II), el cual es reclutado por las membranas autofagosomales (164). La degradación eficiente en los autolisosomas, depende de la proteinasa B, la acidificación del lumen y la proteína Cvt17 (un candidato de lipasa que puede degradar el cuerpo autofágico) (133).

La autofagia tiene un papel crítico en el proceso homeostático del reciclamiento de proteínas y organelos; sin embargo, también se ha relacionado con condiciones de desarrollo y patológicas. La autofagia también ha sido descrita como una característica prominente de muerte celular durante el desarrollo embrionario (165) y durante la regresión en tumores dependientes de hormonas, como el cáncer de mama (166). Existen diversos estudios que indican una función de la autofagia en la muerte celular programada tipo II, o muerte no apoptótica (167, 168, 169). La apoptosis y la autofagia tienen características morfológicas diferentes, ya que en la muerte celular programada autofágica, las cisternas del Golgi, los polirribosomas y el retículo endoplásmico son degradados antes de la destrucción nuclear, el citoesqueleto es conservado durante el evento de degradación nuclear (167). En el desarrollo de las neuronas la muerte celular programada claramente involucra a la apoptosis (170); sin embargo, la muerte celular en neuronas también puede involucrar a la autofagia (171, 172). Asimismo la pérdida de las neuronas Rohon-Beard en la espina dorsal de *Xenopus* requiere la actividad de hidrolasas lisosomales y se cree que ocurre por medio de una muerte relacionada con la autofagia. Enfermedades del corazón como la cardiomiopatía de Danon se ha asociado a la deficiencia de la proteína lamp2

(144). Por otro lado, ratones sin *lamp2* son deficientes en la maduración de autofagosomas (173). De igual forma, se observan bajos niveles de autofagia en algunos tipos de cáncer (174). Una función de la autofagia es controlar el crecimiento desmedido que está asociado con el desarrollo de los tumores utilizando un gen supresor de tumores, la *beclina 1* (175). La *beclina 1* es el gen de autofagia homólogo en humanos del gen APG6 en levaduras. Beclina 1 interactúa con la proteína antiapoptótica Bel-2, la cual previene la liberación del *cyt-c* de la mitocondrias, dependiente de Bax. La autofagia se asocia específicamente con la muerte celular programada tipo II (no apoptótica) (176); sin embargo, hay evidencias de que los estadios tempranos de la autofagia pueden jugar un papel en la muerte celular programada tipo I (apoptótica) (177).

La muerte celular por autofagia es un proceso fisiológico caracterizado por una exacerbada degradación de contenidos celulares, incluyendo organelos esenciales como la mitocondria; ésta se lleva a cabo por una complicada reorganización intracelular de membranas y vesículas, así como por una alta actividad lisosomal (133, 178). Recientemente se ha demostrado que los genes de autofagia *Atg7* y *Beclina-1* son requeridos para la muerte de ciertas células, indicando que el mecanismo de proteólisis está involucrado en la sobrevivencia y muerte celular (179). Los componentes citoplasmáticos son degradados dentro de los lisosomas por microautofagia y por macroautofagia (146, 180, 181).

Muchos genes involucrados en la autofagia participan en la formación del autofagosoma cuyas características de sistemas de conjugación tipo ubiquitinas son conservados en eucariontes: el *Atg12-Atg5* y el *Atg8 (Lc3)-PE* (fosfatidiletanolamina) (182) (figura 6). Aunque se necesitan otros complejos *Atg* para la formación del autofagosoma, los dos sistemas anteriores se han descrito en levaduras y en algunos casos sus ortólogos han sido identificados en mamíferos.

El sistema de conjugación *Atg12-Atg5* es un mecanismo molecular que fue descubierto en levaduras y después se encontró que las células de mamíferos también lo utilizan. La *Atg12* es una proteína pequeña la cual puede unirse covalentemente a *Atg5*. La forma de conjugación de *Atg12-Atg5* es similar a la ubiquitinación, ya que *Atg12* se activa primero por *Atg7* que funciona como una enzima ubiquitina *E1* activadora y después es transferida a *Atg10* (que tiene una función similar a *E2*). En este punto *Atg7* es liberada, después *Atg12* se une de forma covalente a un grupo amino de la lisina de *Atg5* y *Atg10* es liberada.

Atg16L unida a su complejo es necesaria para la elongación de la membrana pre-autofagosomal y para la formación de la membrana autofagosomal. Este complejo finalmente se disocia del autofagosoma maduro. El conjugado Atg12-Atg5 es un proceso constitutivo ya se forma inmediatamente después de la síntesis de Atg12 y Atg5, independientemente del ayuno o de factores inductores de autofagia, de ahí que las formas libres de Atg12 y Atg5 sean vistas raramente (183-187).

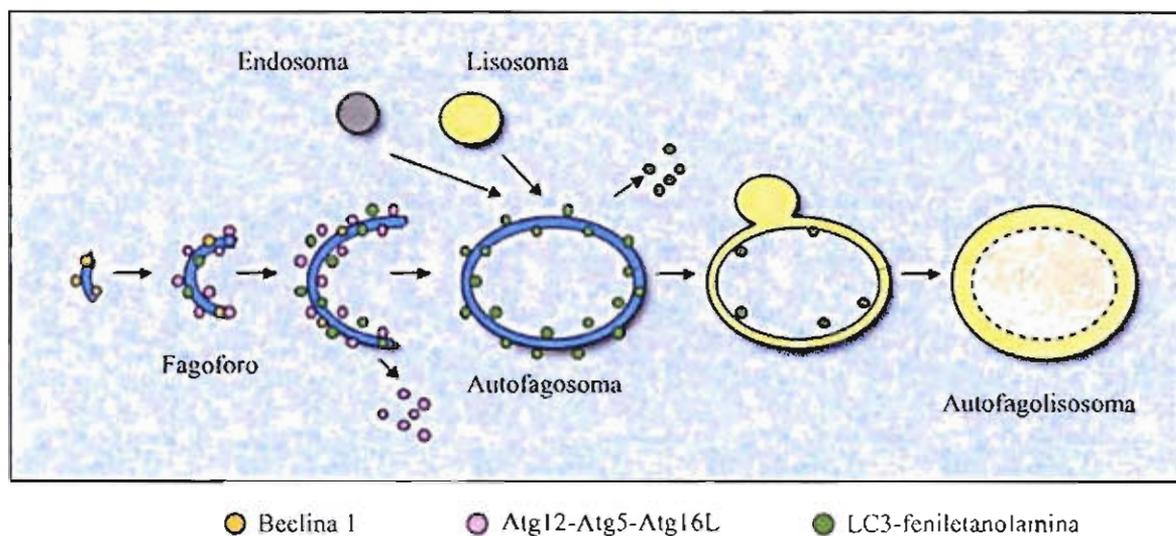


Figura 6. Modelo esquemático de formación y maduración de autofagosomas en células de mamíferos. Una porción del citoplasma es rodeada por una membrana autofágica para formar el autofagosoma. La membrana externa del fagosoma se fusiona con el lisosoma en donde el contenido es degradado. La beclina 1 y dos sistemas tipo ubiquitina (Atg12-Atg5 y Lc3-PE) están involucrados en la formación de autofagosomas (tomado y modificado de ref. 188)

Otra molécula tipo ubiquitina esencial para la autofagia es Atg8 cuyo ortólogo en mamíferos es el MAP1Lc3/Lc3 (proteína tipo 1 asociada a microtúbulos de cadena ligera 3). Lc3 es cortada por la autofagina (Atg4) para producir la forma citosólica activa de Lc3-I (18kDa) la cual es activada por Atg7 y después transferida a Atg3 y modificada en la forma activa de Lc3-II (unida a membrana), la cual interactúa y se conjuga con feniletanolamina. Esta lipidación permite un cambio esencial en la conformación de Lc3 que permite su unión a las membranas de los pre-autofagosomas, los autofagosomas y los cuerpos autofágicos. Este marcado de membranas autofagosomales es dependiente de que Atg5 y Lc3 permanezcan unidos y de que el complejo Atg12-Atg5 se disocie del autofagosoma (188). El complejo Lc3-feniletanolamina se localiza en dos sitios: uno es cuando se ubica en la superficie externa de los autofagosomas y es eliminado antes de la fusión con los

lisosomas; éste es un mecanismo de seguridad que previene la fusión prematura con los lisosomas. El otro es cuando Lc3-feniletanolamina está en la membrana interna de los autofagosomas liberados, en esta parte se puede detectar después de que es degradado por las hidrolasas (189).

Lc3 es el marcador más confiable de formación de autofagosomas en células de mamíferos, la cantidad relativa de Lc3-II refleja la abundancia de autofagosomas (190). Las células autofágicas se caracterizan bioquímicamente por el rompimiento de Lc3 y su distribución punteada dentro de la célula.

Otra forma de identificar a los autofagosomas es por medio del reactivo autofluorescente la monodansilcadaverina, que se ha mostrado tiñe vesículas autofágicas (191). Al igual que los compartimentos lisosomales, las vesículas autofágicas tienen un pH ácido el cual es generado por una ATPasa de H<sup>+</sup> tipo V (192). Se cree que las bases débiles capaces de atravesar membranas biológicas se concentran en los compartimentos ácidos por protonación (193). Este mecanismo de atrapar iones ha sido propuesto por una variedad de sustancias llamadas lisosomotróficas tales como el N-(2-[(2,4-dinitrofenil)-amino]-propil)-N-(3-aminopropil-metilamina)dihidrocloruro (DAMP) (194), la primaquina y la cloroquina (193). La sustancia autofluorescente monodansilcadaverina es una base débil, marca a las vesículas autofágicas *in vivo* (191), es una sustancia efectiva como inhibidor de la enzima transglutaminasa (195), es un inhibidor de la endocitosis (196) y es un estimulador de la síntesis de fosfolípidos tipo fosfatidilinositol (197).

### **Planteamiento del problema.**

La degeneración folicular, ha sido un proceso estudiado de forma parcial, ya que los análisis realizados se han dirigido hacia las células de la granulosa y en algunos casos hacia las células de la teca. Sin embargo, los ovocitos generalmente, han sido menos estudiados y cuando se han tomado como modelo, se han generado diferentes resultados. Debido a la controversia entre algunos investigadores con respecto al proceso involucrado en la muerte de los ovocitos, surge la necesidad de realizar una investigación más profunda para determinar si el proceso de muerte celular de los ovocitos es diferente al de las células foliculares. Por otro lado, ya que al nacer y durante la pubertad se originan las mayores

pérdidas de células germinales, es importante conocer si el proceso de muerte de ovocitos primordiales de ratas recién nacidas es diferente al de los ovocitos de ratas pre-púberes.

Como se ha mencionado, los diferentes estudios que se han hecho sobre la atresia folicular en los ovarios han sido la mayoría de los casos enfocados hacia las células granulosas y mucho menos frecuentemente hacia el ovocito, consideramos necesario aumentar el conocimiento acerca de la participación de diferentes formas por las cuales los ovocitos mueren durante el proceso de atresia folicular; esto aunado a que cada ovocito está bajo una continua amenaza de muerte y existen aquellos que la evitan, todo esto hace de los ovocitos un modelo único para el estudio de muerte celular programada.

## OBJETIVO GENERAL

- Determinar los diferentes procesos de muerte de los ovocitos en ovarios de ratas pre-púberes (1 a 28 días).

## OBJETIVOS PARTICULARES

- Analizar la expresión de proteínas implicadas en procesos de muerte celular programada apoptótica y autofágica.
- Analizar a nivel ultraestructural las alteraciones en los ovocitos durante el proceso de muerte.
- Evaluar la presencia de apoptosis en ovocitos de rata en un ensayo *in vitro* por medio de la Anexina-V.
- Determinar la presencia de lisosomas y autofagosomas, característicos de la muerte autofágica, mediante la incorporación de monodansilcadaverina.
- Evaluar si existe ADN fragmentado en poblaciones purificadas de ovocitos de rata.
- Evaluar la expresión de ARNm de proteínas implicadas en la apoptosis y en la autofagia por medio de la técnica de RT-PCR.

## MATERIAL Y MÉTODOS

El proyecto, se desarrolló en dos fases: en la primera fase *"in Situ"*, se hicieron cortes seriados de tejido incluido en parafina y en resina acrílica Lowicryl K4M, para inmunolocalizar a las proteínas pro-caspasa 3, caspasa 3 activa y lamp1. También se efectuó la técnica de precipitación de plata para identificar la fosfatasa ácida y se detectó la fragmentación del ADN mediante la técnica de TUNEL. Se realizaron las técnicas generales para microscopía electrónica en cortes de material incluido en Epon y Lowicryl K4M, para observar la morfología ultraestructural de los ovocitos en proceso de muerte. En la segunda fase *in vitro*, se obtuvieron fracciones enriquecidas de ovocitos aislados a partir de cultivo celular. A los ovocitos aislados, se les realizaron pruebas de detección de marcadores de apoptosis y autofagia en las células vivas. También utilizando poblaciones celulares puras de ovocitos, se desarrolló la técnica de electroforesis de ADN y la técnica de RT-PCR.

### FASE I. ANÁLISIS *"IN SITU"*

#### I. Obtención de ovarios de rata

Ratas "Wistar" hembra de 1, 5, 10, 15, 17, 18, 19, 20, 21, 25 y 28 días de nacidas.

Extracción de ovarios.

Se anestesia la rata en una cámara saturada con gases de éter y se coloca en una bandeja de disección, sujetando las cuatro extremidades. Se hace una incisión en forma de ojal en la parte baja del abdomen y se descubre la cavidad abdominal. Se identifican los ovarios y se extraen.

#### II. Procesamiento para microscopía electrónica

Los ovarios se fijan de las siguientes formas: paraformaldehído al 4% y se incluyen en las resinas acrílicas: LR White y Lowicryl K4M; paraformaldehído 4% con glutaraldehído al 2.5% y se incluyen en resina epóxica.

##### a) Inclusión en resina Lowicryl K4M

- 1.- Paraformaldehído al 4% en amortiguador de fosfatos 0.16 M. pH 7.2. Durante 1 hora a 4°C.
- 2.-Lavado en amortiguador de fosfatos 0.16 M. pH 7.2. 3 lavados de 10 minutos cada uno.
- 3.-Deshidratación.
  - Metanol 30% durante 10 minutos a -20°C.
  - Metanol 50% durante 10 minutos a -20°C.
  - Metanol 60% durante 10 minutos a -20°C.
  - Metanol 70% durante 10 minutos a -20°C.
  - Metanol 80% durante 10 minutos a -20°C.
  - Metanol 90% durante 30 minutos a -20°C.
- 4.- Pre-inclusión.
  - Metanol-Lowicryl 1:1 durante 60 minutos a -20°C.
  - Metanol-Lowicryl 1:1 durante 60 minutos a -20°C.
  - Lowicryl durante 60 minutos a -20°C.
  - Lowicryl durante toda la noche -20°C.
- 5.- Incluir en cápsulas de gelatina. Polimerizar a -20°C durante 24 horas en cámara de luz ultravioleta y 24 horas a temperatura ambiente en cámara de luz ultravioleta.

**b) Inclusión en resina Epón.**

1. Glutaraldehído 2.5% - Paraformaldehído 4% en amortiguador de fosfatos 0.16 M. pH 7.2. Durante 1 hora.
2. Lavado en amortiguador de fosfatos 0.16 M. pH 7.2. 3 lavados de 10 minutos cada uno.
3. Deshidratación.
  - Etanol 60% durante 10 minutos.
  - Etanol 70% durante 10 minutos.
  - Etanol 80% durante 10 minutos.
  - Etanol 96% durante 10 minutos.
  - Etanol absoluto 2 cambios de 20 minutos cada uno.
4. Oxido de propileno 2 cambios de 15 minutos cada uno.
5. Pre-inclusión.
  - Oxido de propileno + Epon en proporción 2:1 durante 12 horas.
  - Oxido de propileno + Epon en proporción 1:1 durante 12 horas.
  - Oxido de propileno + Epon en proporción 1:2 durante 12 horas.
6. Incluir en moldes de plástico. Polimerizar a 60°C durante 24 horas.

**III. Procesamiento para microscopía óptica.**

1. Paraformaldehído 4% en amortiguador de fosfatos 0.16 M. pH 7.2. Durante 1.5 horas.
2. Lavados en amortiguador de fosfatos 0.16 M. pH 7.2. 6 lavados de 30 minutos cada uno.
3. Deshidratación.
  - Etanol 60% durante 30 minutos.
  - Etanol 70% durante 30 minutos.
  - Etanol 80% durante 30 minutos.
  - Etanol 96% durante 30 minutos.
  - Etanol absoluto 2 cambios de 30 minutos cada uno.
4. Etanol absoluto-xilol 30 minutos.
  - Xilol 15 minutos.
5. Pre-inclusión.
  - Parafina-Xilol 1:1 durante 1 hora.
  - Parafina 1 durante 1 hora.
  - Parafina 2 durante 1 hora.
6. Incluir en moldes de plástico.

**IV. Inmunolocalizaciones en cortes de ovarios incluidos en parafina**

Para identificar a la apoptosis se realizaron las inmunolocalizaciones de las proteínas: procaspasa 3 y caspasa 3 activa, así como la técnica de TUNEL. Para identificar a la autofagia, se inmunodetectó la proteína integral de lisosomas lamp1 y la identificación de las fosfatasa ácidas activas, por medio de la técnica de precipitación de plata de Gomori, el cual es un método citoquímico en donde se incuban los cortes de tejido con un sustrato para la enzima que es el  $\beta$ -glicerofosfato, en presencia de una sal soluble de plomo como el citrato de plomo; cuando la fosfata ácida separa el fosfato orgánico del sustrato se forma un precipitado insoluble de fosfato de plomo en el sitio, el cual puede identificarse en el microscopio electrónico y en el microscopio óptico, como precipitados oscuros.

**a) Inmunolocalización de pro-caspasa 3 y caspasa 3 activa.**

- Desparafinar e hidratar.
- Recuperación antigénica en el microondas con buffer de citratos 3 minutos a potencia 10 y 6 minutos en potencia 3.
- Dejar enfriar durante 30 minutos.
- Tres lavados con buffer salino de tris con Tween (TBST) durante cinco minutos.
- Bloquear con TBS durante una hora a temperatura ambiente.
- Incubar con anti-caspasa 3 (1/20), caspasa 3 activa (1/20) en amortiguador de fosfatos durante toda la noche a 4°C en cámara húmeda.
- Tres lavados con TBST durante cinco minutos.
- Incubar con anticuerpo secundario Multilink (Biogenex) durante 20 minutos a temperatura ambiente.
- Tres lavados con TBST durante cinco minutos.
- Bloqueo con BSA-buffer salino de fosfatos (PBS)-Tween durante 10 minutos.
- Incubar con estreptavidina acoplada con Rojo Texas (1/500) en amortiguador de fosfatos durante 1 hora a temperatura ambiente y protegido de la luz.
- Tres lavados con TBST durante cinco minutos.
- Contrastar con DAPI (1/10) en amortiguador de fosfatos durante 1 minuto.
- Tres lavados con amortiguador de fosfatos durante tres minutos.
- Montar.

**b) Inmunolocalización de lamp1.**

- Desparafinar e hidratar.
- Recuperación antigénica en el microondas con buffer de citratos 3 minutos a potencia 10 y 6 minutos en potencia 3.
- Dejar enfriar durante 30 minutos.
- Tres lavados con TBST durante cinco minutos.
- Ligero enjuague con TBS-Tritón 0.025%.
- Bloquear con TBS durante dos horas a temperatura ambiente.
- Incubar con anti-Lamp1 (1/100-10 µg/ml) en PBS-BSA-Tween durante toda la noche a 4°C en cámara húmeda.
- Tres lavados con TBST durante 3 minutos.
- Incubar con anticuerpo secundario GAR IgG en amortiguador de fosfatos 1/200 durante 2 horas a temperatura ambiente y protegido de la luz.
- Enjuague ligero con TBST-tritón.
- Tres lavados con TBST durante 3 minutos.
- Tres lavados con amortiguador de fosfatos durante tres minutos.
- Contrastar con DAPI (1/10) en amortiguador de fosfatos durante 1 minuto.
- Tres lavados con amortiguador de fosfatos durante tres minutos.
- Montar.

**c) Técnica de precipitación de plomo.**

- Desparafinar e hidratar.
- Incubar con β-glicerofosfato de sodio 0.01M en buffer de citratos 0.05M pH 5 con 4 mM de citrato de plomo, durante 4 horas a 37° C en cámara húmeda.
- Lavar con agua destilada.
- Incubar con sulfito de amonio al 10% durante 30 minutos.
- Teñir con eosina acuosa durante 1 minuto y montar con medio de gelatina.

## **FASE II. ANÁLISIS *IN VITRO*.**

Para realizar técnicas bioquímicas y moleculares, que no se pueden desarrollar en ovarios enteros o en cortes de los mismos, se obtuvieron fracciones enriquecidas de ovocitos de ovarios de ratas de 1, 5, 19 y 28 días de edad, mediante una separación por adhesión celular. Las fracciones son de una pureza del 85 al 92% y una viabilidad del 75-96%.

### **I. Obtención de fracciones celulares de ovocitos de rata**

- Disecar ovarios y pasarlos a solución salina balanceada libre de  $\text{Ca}^{++}$  y Magnesio.
- Lavar 2 veces con solución salina balanceada libre de  $\text{Ca}^{++}$  y  $\text{Mg}^{++}$  para remover restos de sangre en el tejido.
- Incubar en 10 ml de tripsina al 0.1% en solución salina balanceada libre de  $\text{Ca}^{++}$  y  $\text{Mg}^{++}$ . Mantener a 37° C en baño de agitación a 90 ciclos/ minuto, durante 5 minutos
- Disgregar el tejido con una pipeta Pasteur bajo la lupa.
- Recuperar las células en un volumen igual de Dulbecco's Modified Eagle Medium (DMEM, Sigma) con 0.1% albúmina (Sigma labs.) + 0.2% de inhibidor de tripsina de soya.
- Centrifugar a 1.2 g por 10 min. a temperatura ambiente.
- Decantar el medio con cuidado y resuspender en 1 ml de DMEM-albúmina, observar las células en el hematocitómetro para determinar viabilidad y pureza.
- Sembrar todas las células en cajas de 2.5 cm de diámetro con DMEM albúmina 0.1%, 4% suero fetal bovino y 10  $\mu\text{l}$  de antibiótico por ml de medio. Dejar al menos 24 horas en la incubadora.
- Al día siguiente las células somáticas de la gónada forman una monocapa sobre la superficie de la caja, sobre los que se observan unos cúmulos de células más grandes y redondeadas, que corresponden a las células germinales.
- Decantar el medio y hacer 3 lavados con 15 ml de DMEM albúmina, esto con el fin de remover restos celulares y células no adheridas.
- Después del último lavado, despegar las células germinales con DMEM con micropipeta de 1 ml. Es importante pipetear de arriba abajo muy suavemente y asegurarse de "lavar" toda la superficie, ver bajo el microscopio para asegurarse que sólo se han despegado las células germinales. Es recomendable no excederse en este paso pues se corre el riesgo de desprender células somáticas del fondo, hay que tener cuidado de no pasar la pipeta sobre la monocapa de células somáticas.
- Pasar la suspensión de células a un ependorf o tubo Falcon de 15 ml (centrifugar a 1000 rpm por 10 min.).
- Decantar el medio y resuspender en un volumen adecuado de medio (0.2-1 ml) y ver bajo el microscopio.

Para asegurar que las células con las cuales se realiza el presente trabajo, son ovocitos, además de la identificación morfológica de las células, se desarrolló la inmunodetección del antígeno VASA, que es una proteína citoplasmática de células germinales, con el anticuerpo VASA.

### **II. Inmunodetección de VASA.**

- Lavar el botón celular con amortiguador de fosfatos.
- Decantar y resuspender en el sobrenadante.
- Poner las alícuotas sobre porta objetos con poli-l-lisina y dejar secar protegiéndolos del polvo.

- Fijar con Methacarn (ácido acético 10%, metanol 60% y cloroformo 30%) durante 20 minutos a  $-20^{\circ}\text{C}$ .
- Lavar 2 veces con PBS frío durante 10 minutos.
- Bloquear con albúmina al 1% en PBS durante 2 horas a temperatura ambiente en cámara húmeda.
- Incubar con anticuerpo primario anti-VASA 1/500 en amortiguador de fosfatos/albúmina 1% toda la noche a  $4^{\circ}\text{C}$  en cámara húmeda.
- Lavar 4 veces con amortiguador de fosfatos durante 5 minutos.
- Incubar con anticuerpo secundario anti-conejo con fluoresceína (ZYMED)1/100 en albúmina al 1% durante 1 hora a temperatura ambiente.
- Lavar con amortiguador de fosfatos durante 5 minutos 4 lavados.
- Incubar con DAPI 1 minuto.
- Lavar con amortiguador de fosfatos durante 5 minutos 4 lavados.
- Montar con medio de montaje para fluorescencia.

El proceso de apoptosis en células aisladas se realiza mediante la incorporación de la Anexina-V marcada con FITC a la fosfatidilserina citoplasmática externalizada, en un ambiente rico en calcio proporcionado por el buffer de unión. Se utiliza el yoduro de propidio como colorante supravital, de tal forma que la incorporación de Anexina-V sin tinción nuclear con yoduro de propidio, es el indicativo de que las células están vivas. Las células con yoduro de propidio y Anexina-V, se definen como muertas, por lo que no son tomadas en cuenta para el análisis. Las observaciones se hacen con un microscopio confocal Leica.

### **III. Ensayo de incorporación de anexina-V-FITC/yoduro de propidio en células vivas.**

- Preparar 500  $\mu\text{l}$  de buffer de unión con 5  $\mu\text{l}$  de Anexina-V-FITC más 9  $\mu\text{l}$  de yoduro de propidio.
- Agregar al botón de células y resuspender muy suavemente.
- Incubar en oscuridad durante 10 minutos a  $37^{\circ}\text{C}$  o a temperatura ambiente.
- Centrifugar a 1600 rpm durante 3 minutos.
- Retirar el sobrenadante con una pipeta con cuidado y no perder de vista el botón de células.
- Lavar las células con amortiguador de fosfatos 3 veces y centrifugar. Resuspender muy suavemente las células en PBS y finalmente ponerlas en el centro de un portaobjetos nuevo, colocarle el cubreobjetos cuidadosamente y observar con el microscopio confocal.

Una de las características de la muerte autofágica es la alta actividad lisosomal, lo que permite identificar al proceso mediante marcadores específicos de la presencia de los cuerpos lisosomales, como la monodansilcadaverina, la cual ha sido utilizada como un marcador para vacuolas autofágicas. La intensidad de tinción con monodansilcadaverina incrementa en las células que están en autofagia.

### **IV. Incorporación de monodansilcadaverina en células vivas**

- Preparar medio de cultivo con monodansilcadaverina a una concentración 0.1 mM.
- Agregar al botón de células y resuspender muy suavemente.
- Incubar en oscuridad durante 10 minutos a  $37^{\circ}\text{C}$ .

- Centrifugar a 1600 rpm durante 3 minutos.
- Retirar el sobrenadante con una pipeta sin perder de vista el botón de células.
- Lavar con medio de cultivo.
- Lavar las células con amortiguador de fosfatos 3 veces y centrifugar. Resuspender muy suavemente las células en amortiguador de fosfatos y finalmente depositarlas en el centro de un portaobjetos nuevo, colocarle el cubreobjetos cuidadosamente y observar al microscopio de fluorescencia.

Para identificar la fase final de la apoptosis, la cual está dada por la fragmentación de ADN, se realizó una electroforesis del ADN de los ovocitos de 1, 5, 19 y 28 días.

#### V. Electroforesis de ADN.

- Homogenizar las células en 1 ml de DNAzol durante 3 minutos.
- Pasar el sobrenadante a un tubo limpio.
- Precipitar el ADN del homogenizado agregando 1 ml de etanol al 100%.
- Mezclar por inversión 3 minutos y dejar reposar 10 minutos a 4°C.
- Centrifugar a 14000 rpm durante 10 min. a 4°C y decantar.
- Lavar el ADN dos veces con 1 ml de etanol al 75 % invirtiendo los tubos de 3 a 6 veces.
- Centrifugar a 14000 rpm durante 10 min. a 4°C.
- Secar al aire de 5 a 15 segundos, después de quitar el etanol.
- Solubilizar en NaOH 8 mM.
- Correr el ADN en gel de agarosa al 2% con bromuro de etidio, a 37V durante 1.5 a 2 horas.

Se realizó la técnica molecular de RT-PCR para identificar a los mensajeros de caspasa 3 (apoptosis), lamp1 y Lc3 (ambos para autofagia). Para realizar lo anterior, requerimos una fracción celular de ovocitos 100% pura, por lo que se utilizó la técnica de separación individual, manejando un micromanipulador y micropuntas de vidrio. De esta forma, se toman los ovocitos uno por uno y se reciben en un tubo estéril y libre de ARNasas, para realizar la extracción de ARN. Las micropuntas, se han hecho de diferentes diámetros (30 a 100 µm), hasta lograr obtener las del diámetro adecuado. Se extrajo el ARN total de cada fracción celular para poder obtener el ADNc por medio de la transcriptasa reversa. Una vez obtenido el ADNc, se incubó con los oligos diseñados para la reacción de la polimerasa en los diferentes genes: lamp1, Lc3 y caspasa 3. Las secuencias de los iniciadores fueron:

Gen Bank	Gen	Secuencia
NM_001100778	Caspasa 3	5'-GCCTGTCCTGGATAAGACCA-3' ( <i>forward</i> )
NM_001100778	Caspasa 3	5'-TTGACTCAGAAGCCGAAGGT-3' ( <i>reverse</i> )
NM_012857	lamp1	5'-AGGATCAACCTTCCCCAACT-3' ( <i>forward</i> )
NM_012857	lamp1	5'-CACCTTCAGGGTCACCAACT-3' ( <i>reverse</i> )
NM_134394	Lc3	5'-TGGCCCTGAAATACGAAGTC-3' ( <i>forward</i> )
NM_134394	Lc3	5'-GGCAGTAGTCGCCTCTGAAG-3' ( <i>reverse</i> )
NM_012605	β-actina	5'-AAATCGTGCCGTGACATTAA-3' ( <i>forward</i> )
NM_012605	β-actina	5'-CTCGTCATACTCCTGCTTG-3' ( <i>reverse</i> )

Los tamaños de los fragmentos amplificados fueron: para caspasa 3, 209 bp; para lamp1, 245bp; para Lc3, 240 bp y para  $\beta$ -actina, 455 bp. La PCR se realizó con un paso inicial de desnaturalización a 94° C por 40 segundos, alineación a 61° C por 40 segundos y la elongación a 72° C por 40 segundos. La reacción fue completada por una elongación final a 72° C por 5 minutos. La PCR para  $\beta$ -actina se desarrolló de la misma forma, excepto que la temperatura de alineamiento fue a 60° C. Se desarrollaron 30 ciclos.

## VI- RT-PCR

### a) Obtención de ARN.

- Homogenizar las células en 1 ml de Trizol durante 3 minutos.
- Homogenizar los ovocitos en 1ml de Trizol.
- Incubar durante 5 minutos a temperatura ambiente.
- Agregar 200  $\mu$ l de cloroformo.
- Tapar muy bien y agitar vigorosamente durante 15 segundos (vortex).
- Incubar a temperatura ambiente durante 2-3 minutos.
- Centrifugar a 11500 rpm a 4° C durante 15 minutos.
- Pasar la fase acuosa a un tubo limpio, cuidar que no se contamine con la interfase.
- Agregar 500  $\mu$ l de alcohol isopropílico.
- Incubar a temperatura ambiente durante 10 minutos.
- Centrifugar a 11500 rpm a 4° C durante 10 minutos (El ARN aparecerá como un botón ligeramente blanco).
- Lavar el botón con 1 ml de etanol EtOH al 75%.
- Vortex.
- Centrifugar a 8500 rpm a 4° C durante 5 min.
- Secar al aire (pero no completamente para facilitar su disolución).
- Disolver el ARN en 10-20  $\mu$ l de agua DEPC. Se puede pasar ligeramente por una pipeta pasteur estéril.
- Tomar 10  $\mu$ l y agregar 990  $\mu$ l de agua para checar pureza y cuantificar el ARN en el espectrofotómetro con UV en una cubeta de cuarzo a ADNc 0/240nm.
- Cuantificar en contenido de ARN con la siguiente relación:  
1 densidad óptica de ARN aprox. A 40  $\mu$ g /ml.

### b) Síntesis de ADNc a través de la reacción de la transcriptasa reversa.

- Colocar 2  $\mu$ g de ARN en un tubo libre de ARNasas y agregar: Agua grado PCR, oligos dT, para obtener un volumen final de 13 $\mu$ l.
- Incubar a 65° C por 10 minutos pasar inmediatamente a hielo.
- Posteriormente, agregar buffer 5X, inhibidor de ARNasas, dNTP-Mix (10mM) y la enzima transcriptasa reversa (Roche).
- Mezclar por vortex y centrifugar.
- Incubar por 30 min. a 55° C y 5 min a 85° C.

### c) Reacción en cadena de la polimerasa

- Colocar en un tubo libre de ARNasas, los reactivos: H<sub>2</sub>O grado PCR, Buffer 10X, MgCl<sub>2</sub>, dNTP's, oligo forward 5', oligo reverse 3', DMSO, la enzima Amp Taq (Applied) y el ADNc.
- Incubar durante 30 ciclos.
- Cargar los productos de la PCR en un gel de agarosa al 2% teñido con bromuro de etidio, correr a 85 V durante 1 hora. Visualizar en cámara UV.

Para verificar la correcta amplificación de los genes deseados, se purificaron los productos de PCR y se secuenciaron en el Instituto de Fisiología Celular, UNAM, por medio de un secuenciador automático ABI PRISM 310 Genetic Analyzer de Perkin-Elmer Applied Biosystems que permite secuenciar ADN de diferentes tipos utilizando técnicas de electrofóresis capilar. El equipo está acoplado a una computadora Macintosh en la que se colectan y analizan los datos. Los datos son obtenidos como electroferograma.

#### **d) Purificación y secuenciación de productos PCR (*MinElute Gel Extraction Kit Protocol*)**

- Cortar el fragmento del gel de agarosa que contiene el ADN con un escalpelo.
- Pesar el fragmento de gel en un ependorf. Añadir 3 volúmenes de Buffer QG por volumen de gel (100 mg aprox. 100  $\mu$ l).
- Incubar a 50°C durante 10 minutos (o hasta que el gel se haya disuelto completamente). Para ayudar a disolver el gel, mezclar con vortex de 2 a 3 minutos durante la incubación. Para geles cuya concentración sea mayor de 2%, incrementar el tiempo de incubación.
- Cuando el gel se haya disuelto completamente, verificar que el color de la mezcla sea amarillo (similar al Buffer QG sin agarosa disuelta). Si el color de la mezcla es naranja o violeta, añadir 10  $\mu$ l de acetato de sodio 3 M, pH 5.0, y mezclar. El color debe ser amarillo.
- Añadir 1 volumen del gel de isopropanol a la muestra y mezclar invirtiendo el tubo varias veces.
- Colocar una columna *MinElute* en un tubo colector, el volumen máximo del tubo es de 800  $\mu$ l.
- Colocar la muestra en la columna *MinElute* y centrifugar por un minuto. Para mejores resultados, transferir todos los restos de la muestra a la columna. El volumen máximo del reservorio es de 800  $\mu$ l.
- Desechar el filtrado y colocar de nuevo la columna en el tubo de colecta.
- Agregar 500  $\mu$ l de Buffer QG a la columna y centrifugar por un minuto.
- Desechar el filtrado y volver a colocar la columna.
- Para lavar, agregar 750  $\mu$ l de buffer PE a la columna y centrifugar por 1 minuto. NOTA: Si el ADN se va a utilizar para aplicaciones sensibles a las sales, tales como ligación y secuenciación directa, deje reposar la columna de 2 a 5 minutos antes de añadir el Buffer PE, antes de centrifugar.
- Desechar el filtrado y centrifugar la columna por un minuto más a 13000 rpm. IMPORTANTE: puede que el etanol residual del Buffer PE no se elimine completamente hasta la centrifugación adicional.
- Colocar la columna en un ependorf de 1.5 ml.
- Para diluir el ADN agregar 10  $\mu$ l de H<sub>2</sub>O en el centro de la membrana, dejar reposar durante 1 minuto y centrifugar por 1 minuto.

#### **ESTADÍSTICA.**

Los resultados obtenidos son sometidos a pruebas estadísticas utilizando una prueba de ANDEVA ( $P < 0.05$ ) y la prueba de t de Student ( $P < 0.05$ ).

## RESULTADOS

### PRIMERA FASE: ENSAYOS *IN SITU*

Las observaciones morfológicas, indican que hay varios estadios de desarrollo folicular en los ovarios, que cambian con respecto a la edad de los organismos. En las imágenes las barras de calibración corresponden a 10  $\mu\text{m}$ .

#### 1 DÍA

A la edad de 1 día, los ovarios presentan principalmente folículos primordiales, los cuales están rodeados por una sola capa de células alargadas, incluso hay ovocitos aún desnudos. A esta edad, los ovocitos son positivos a pro-caspasa 3, a TUNEL y algunos otros a lamp1, Sin embargo, en los ovocitos positivos a la técnica de TUNEL, se detectan con mayor frecuencia con respecto a pro-caspasa 3 y lamp1. También hay algunos ovocitos que son simultáneamente positivos a pro-caspasa 3 y a TUNEL (imagen 1).

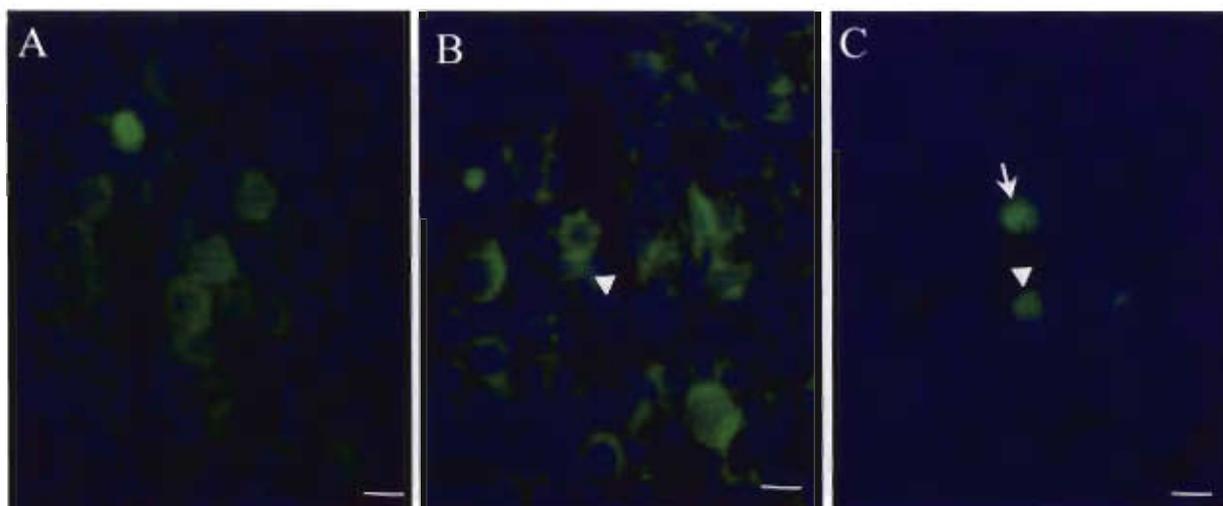


Imagen 1. Cortes seriados de ovario de rata de 1 día de nacida. Todas las imágenes con sobreposición de DAPI. A: lamp1, se observan algunos ovocitos positivos. B: pro-caspasa 3, la punta de flecha indica a un ovocito que es positivo C: TUNEL la flecha indica a un ovocito positivo y la punta de flecha un ovocito positivo a TUNEL y pro-caspasa 3 (1B).

Los resultados de la identificación de caspasa 3 activa, lamp1 y fosfatasa ácida a esta edad, indican una menor cantidad de ovocitos con respecto a los ovocitos positivos a TUNEL. También se observan ovocitos que tienen elevada señal de lamp1 y de fosfatasa ácida al mismo tiempo (imagen 2). Es evidente que a esta edad, una gran mayoría de los ovocitos que están en proceso de degeneración, son positivos a TUNEL.

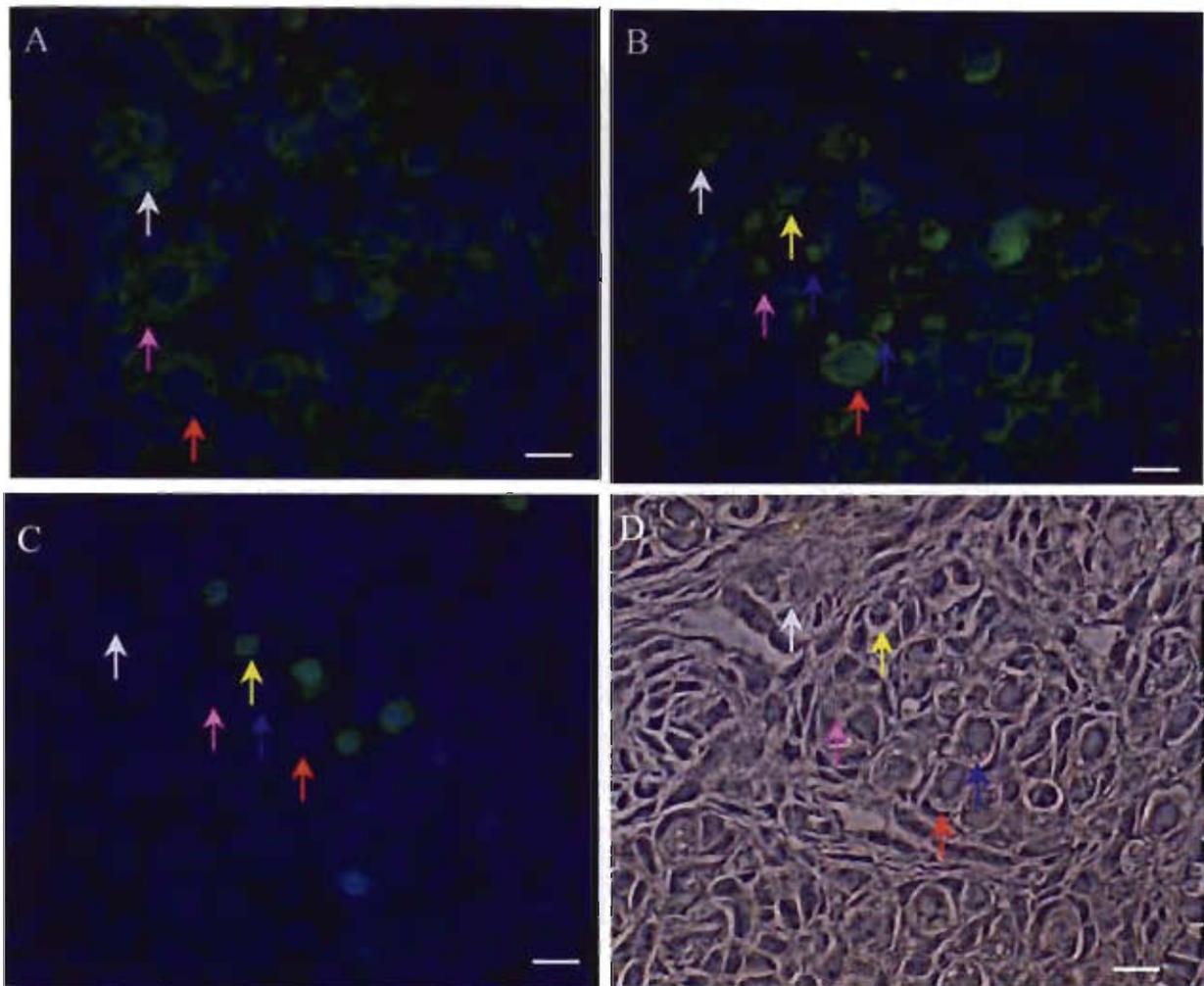


Imagen 2. Ovario de rata de 1 día. Los cuadros con imágenes fluorescentes son inmunolocalizaciones y el campo claro es una localización de la actividad enzimática de la fosfatasa ácida. Las flechas rojas indican a un ovocito que es positivo a caspasa 3 activa (A), lamp1 (B) y fosfatasa ácida (D), pero no a TUNEL (C). La flecha amarilla indica un ovocito que únicamente es positivo a TUNEL, pero no a las otras técnicas. La flecha blanca muestra un ovocito positivo sólo a caspasa 3 activa. Las flechas azules muestran a ovocitos que son positivos sólo a una técnica.

## 5 DÍAS

A los 5 días se observaron ovocitos primordiales, primarios y secundarios. Los primarios están rodeados por una sola capa de células granulosas que van tomando forma cúbica. Algunos ovocitos fueron positivos a pro-caspasa 3, caspasa 3 activa y lamp1, pero no a TUNEL. Las células de la granulosa que rodean a los ovocitos tienen menor cantidad de marcado que los ovocitos.

Se presentaron ovocitos que de forma simultánea tenían caspasa 3 activa y lamp1. Por otra parte, la técnica citoquímica para fosfatasa ácida y la inmunolocalización de lamp1, coinciden en el citoplasma de muchos ovocitos, indicando la presencia de lisosomas activos

en el citoplasma de los ovocitos con alteraciones que indican un proceso de degradación (imagen 3).

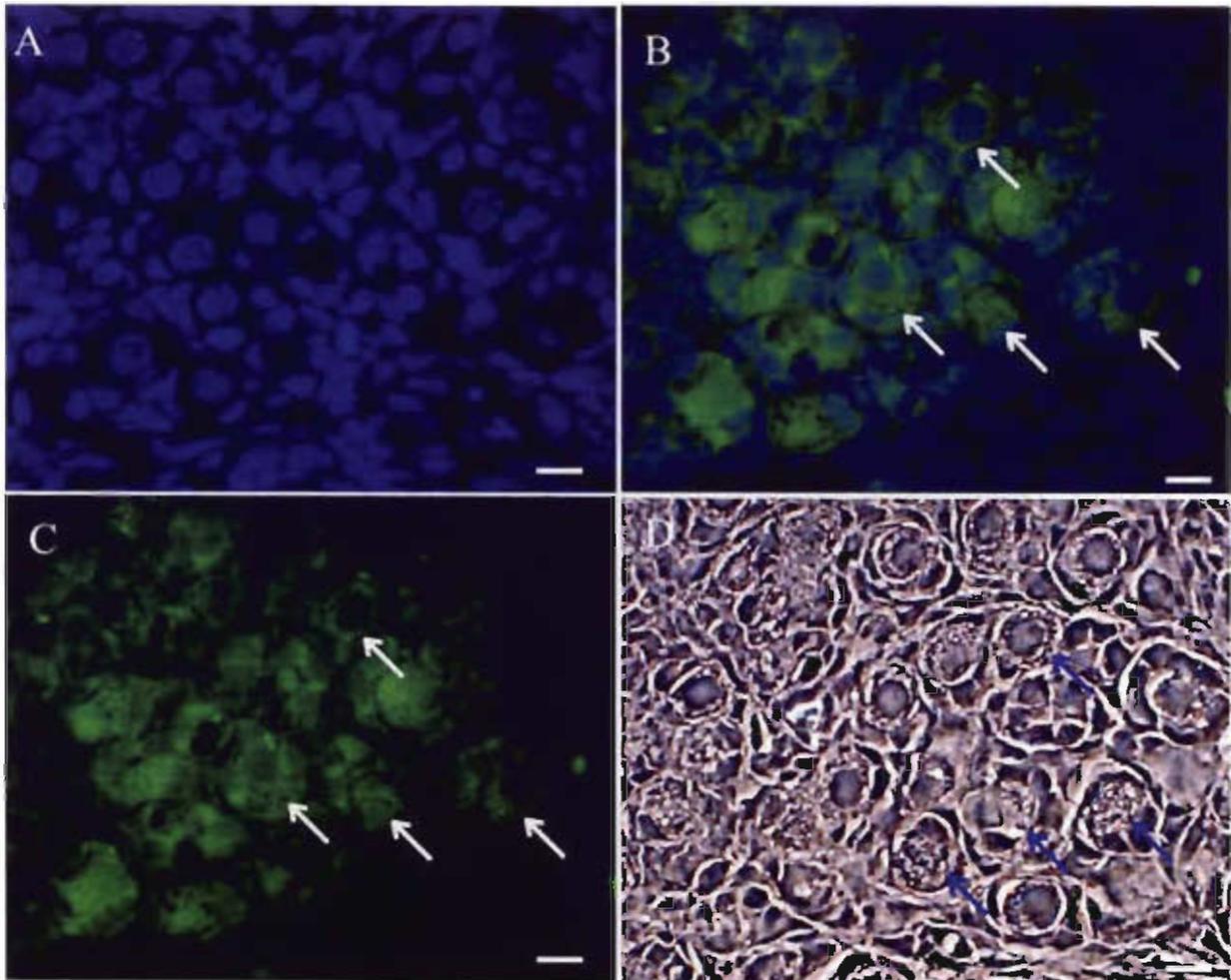


Imagen 3. Ovario de 5 días. A: muestra la reacción positiva para DAPI, B: lamp1 y DAPI sobrepuestas, para evidenciar que la marca de lamp1 es citoplasmática. C: lamp1 sola. D: fosfatasa ácida. Las flechas indican ovocitos positivos tanto a lamp1 como a fosfatasa ácida.

## 10 DÍAS

A los 10 días, ya hay folículos secundarios rodeados por más de una capa de células de la granulosa e incluso algunos folículos están iniciando la formación del antro. La presencia de las proteínas identificadas en los ovocitos es diversa, ya que unos son positivos a sólo una de las técnicas, pero hay varios, que son positivos a pro-caspasa 3 y a lamp1 de forma simultánea. Otro patrón de marcado está dado por aquellos ovocitos que son positivos a pro-caspasa 3, lamp1 y TUNEL, ilustrado en la imagen 4. Esta imagen permite observar un folículo con antro en formación muy alterado, un ovocito que ha perdido la clásica forma esférica para tomarse más bien ovalada, por otro lado, las células de la granulosa ya han

perdido el contacto con el *oolema* y se ven un tanto alteradas, con un patrón nuclear compacto (evidenciado con DAPI). El núcleo del ovocito tiene una importante condensación nuclear, que coincide con la marca positiva de TUNEL.

La imagen 5 muestra ovocitos secundarios positivos a caspasa 3 activa y a lamp1. Los folículos están en estado atrésico inicial, cuyas alteraciones son evidenciadas por la deformación del ovocito y el desprendimiento de las células de la granulosa. De éstas, las que se sitúan más próximas a los ovocitos, también son positivas a ambas proteínas.

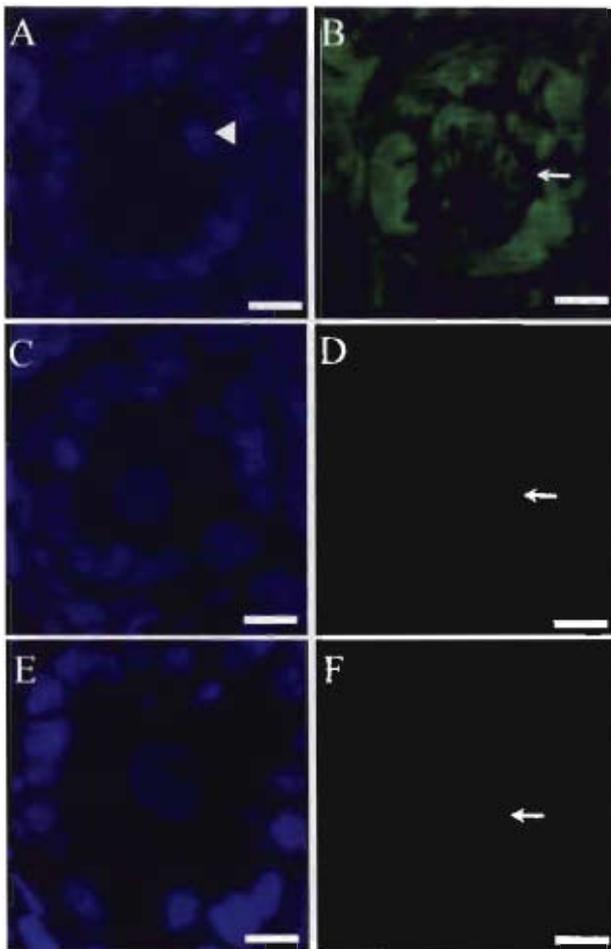


Imagen 4. Ovario de rata de 10 días de nacida. A, C y E muestran la reacción positiva para DAPI, evidenciando a los núcleos. La punta de flecha en A indica el núcleo de una célula de la granulosa. Las flechas señalan a un ovocito en folículo con antro en formación, el cual es positivo a pro-caspasa (B), lamp1 (D) y TUNEL (F).

## 15 DÍAS

El aumento de la edad va acompañado con una mayor variedad de estadios foliculares en el ovario, a los 15 días de nacidas, hay folículos desde primordiales hasta con antro, cuyos

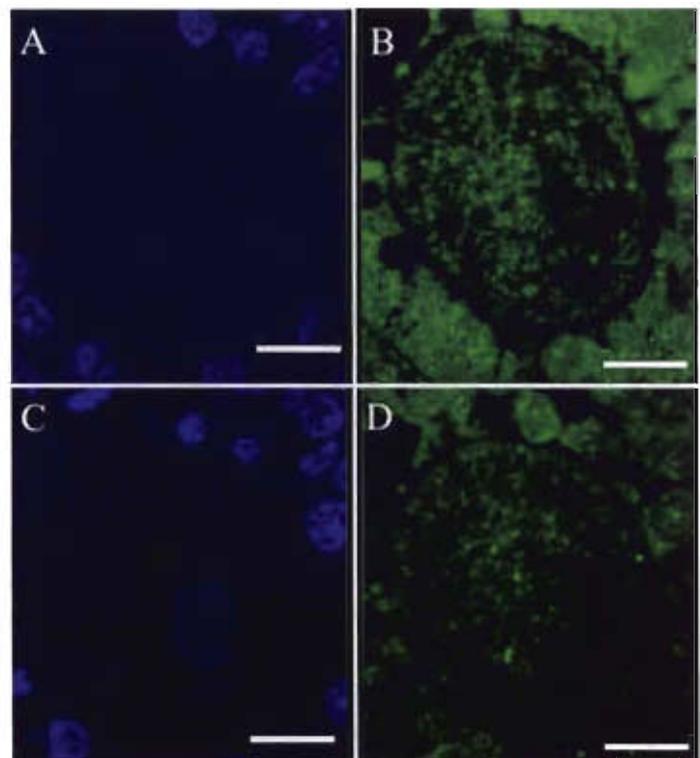


Imagen 5. Ovocito de ovario de rata de 10 días de nacidas (folículos secundarios): A y C muestran la reacción positiva para DAPI, (B) caspasa 3 activa y (D) lamp1.

ovocitos pueden tener más de un marcador de apoptosis o autofagia al mismo tiempo. En la imagen 6 se observa un folículo con antro, el ovocito es positivo a pro-caspasa 3 y lamp1, pero no a TUNEL. La cromatina de este ovocito es abundante como puede observarse con DAPI y además sin tinción se pueden observar a dos nucleolos redondos. Las células de la granulosa de este folículo antral tienen una mayor reacción positiva a pro-caspasa 3 y algunas a lamp1, una es positiva a TUNEL.

A esta edad, encontramos folículos primarios y con antro en formación, con caspasa 3 activa, lamp1 y TUNEL en una misma célula; algunos con antro grande son positivos a todas las reacciones.

La imagen 7, evidencia un ovocito en un folículo en crecimiento, positivo a lamp1 y a TUNEL. También se puede observar un nucleolo positivo a lamp1 (7B, flecha). Por otro lado, las células de la granulosa también tienen lamp1. La reacción positiva a TUNEL corresponde con una alta compactación de la cromatina.

En esta etapa de desarrollo, también se encuentran ovocitos que son positivos a todas las técnicas destinadas a identificar el proceso de apoptosis y el de autofagia. La imagen 8 muestra un ovocito en folículo antral inicial, muy alterado, cuyo citoplasma presenta zonas totalmente degradadas. Es importante señalar que la zona más alterada del citoplasma, corresponde a una reacción positiva a fosfatasa ácida. El ovocito es positivo a lamp1, caspasa 3 activa y TUNEL. La imagen sobrepuesta de TUNEL-DAPI (8C), muestra claramente que la marca de TUNEL corresponde a la cromatina nuclear tanto de las células de la granulosa como del ovocito. Por otro lado, también se puede ver que las células de la granulosa son positivas a lamp1, a caspasa 3 activa y a TUNEL, pero no a fosfatasa ácida.

A esta edad, en material incluido en resina Lowicryl, también se observan ovocitos con reacción positiva múltiple; en la imagen 9 se observa un folículo antral en formación con ovocito positivo a caspasa 3 activa, lamp1 y fosfatasa ácida de manera simultánea.

## **17 DÍAS**

Las edades de 17 a 28 días, muestran resultados muy interesantes, ya que es cuando se puede observar una mayor diversidad de etapas de crecimiento folicular como son folículos primordiales, primarios, en crecimiento inicial y los más evidentes son los de antro en formación y los antrales.

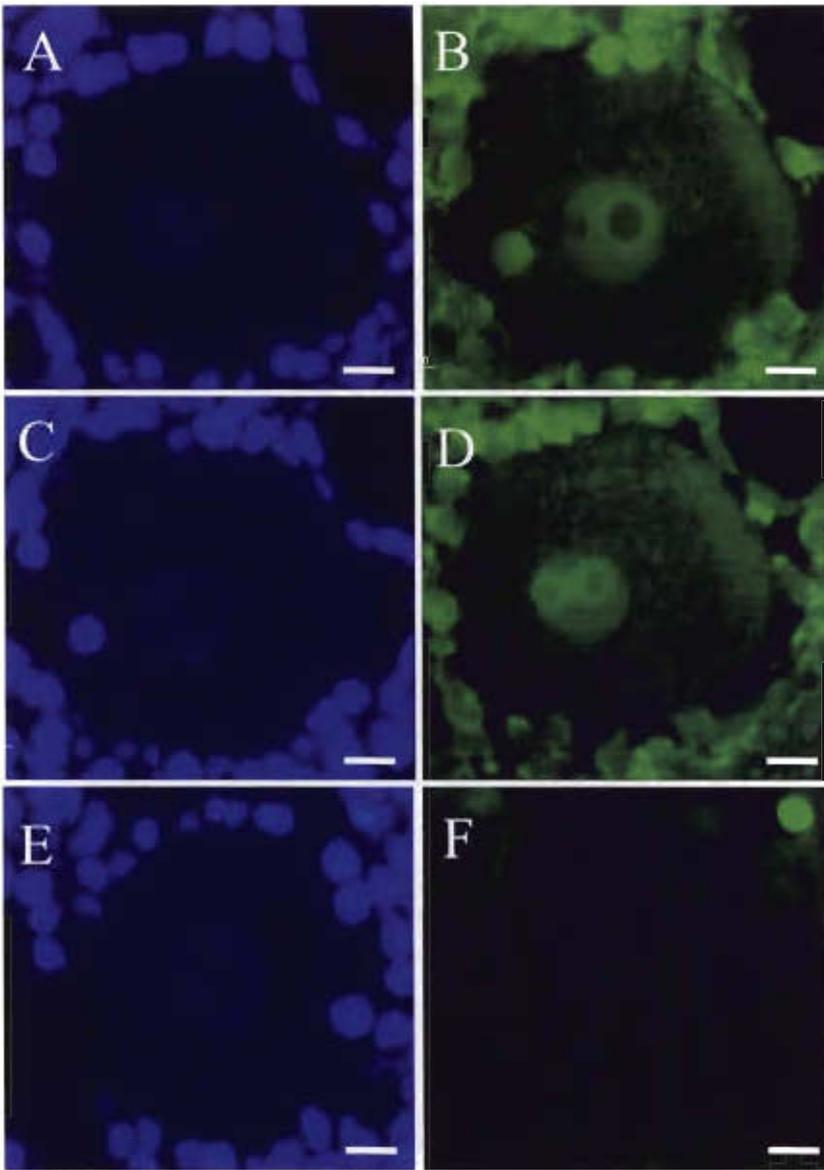


Imagen 6. Folículo de 15 días con antro. A, C y E muestran la reacción positiva para DAPI, evidenciando a los núcleos. Ovocito positivo a pro-caspasa 3 (B) y a lamp1 (D), pero no a TUNEL (F).

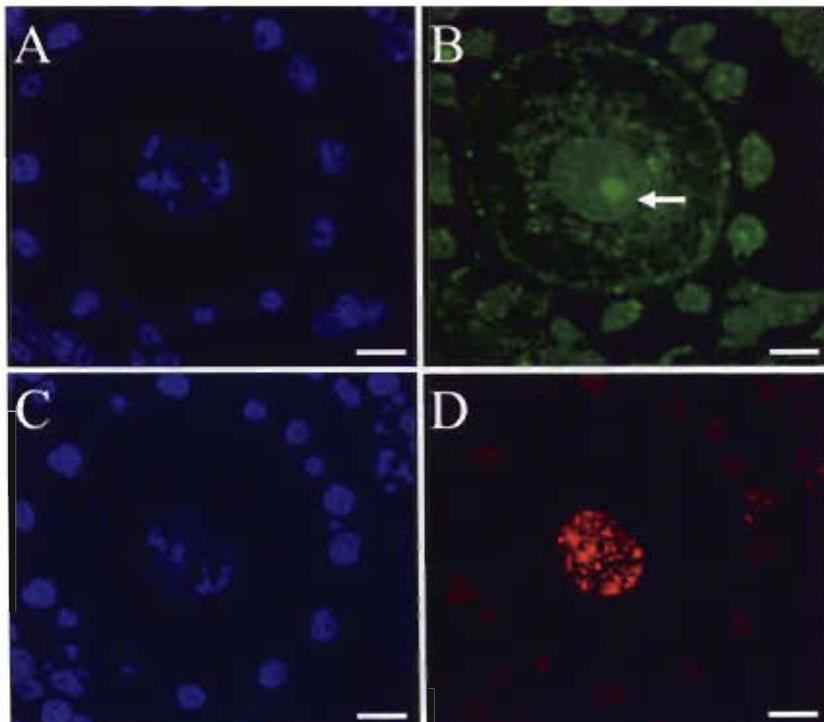


Imagen 7. Ovocito de ovario de rata de 15 días. A y C muestran la reacción positiva para DAPI, mostrando la cromatina. Folículo con antro en crecimiento, positivo a lamp1 (B), la flecha indica al nucleolo con marca positiva. (D) TUNEL.

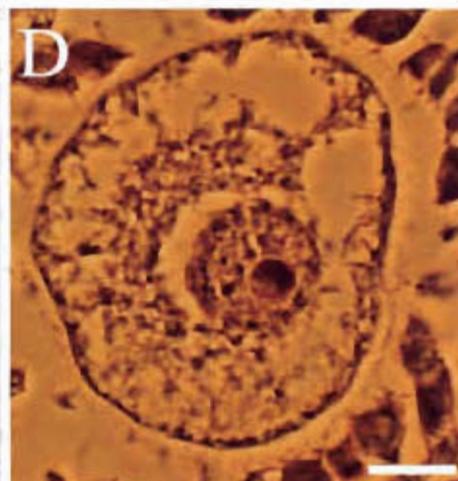
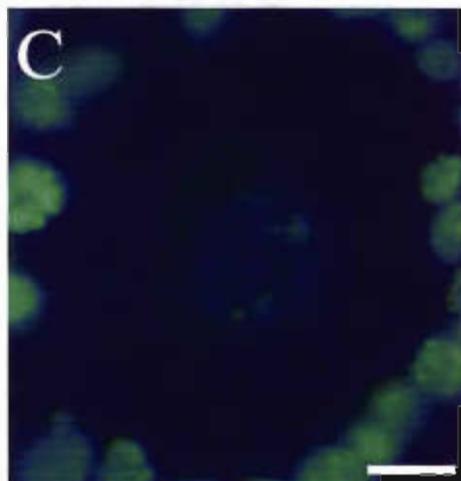
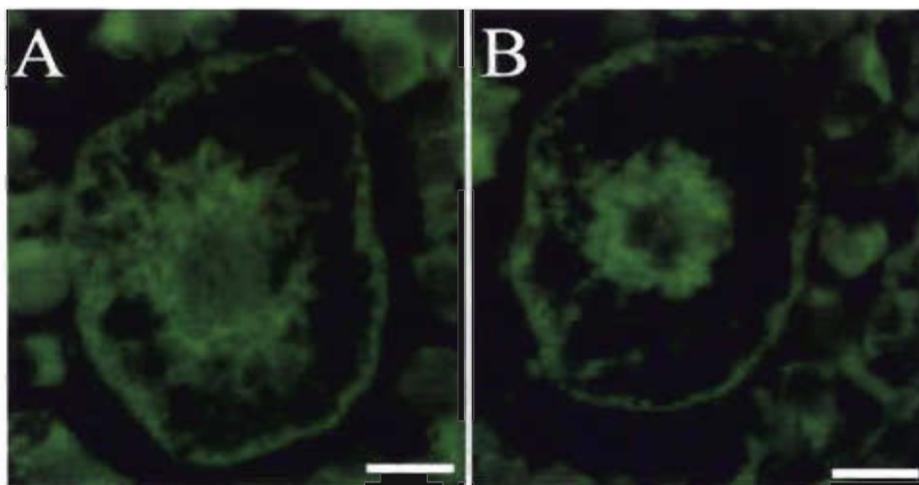


Imagen 8. Ovario de 15 días. Ovocito antral en fase muy temprana, altamente degenerado y positivo para todas las reacciones utilizadas. Caspasa 3 activa (A) y lamp1 (B), ambas marcas están distribuidas en el citoplasma tanto del ovocito como de las foliculares. En el ovocito en forma irregular, la señal es más intensa en la región perinuclear y en la periferia junto a la membrana celular. C: sobreposición de TUNEL y DAPI, evidenciando la marca nuclear de la técnica. D: fosfatasa ácida, el citoplasma está altamente degradado y con precipitados de plomo.

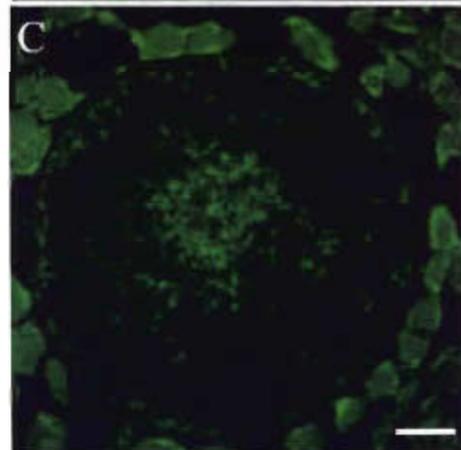
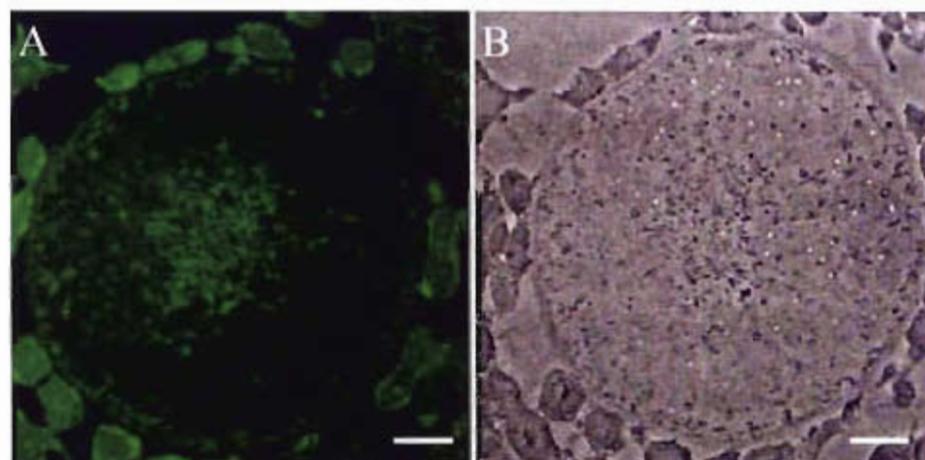


Imagen 9. Ovario de 15 días. Cortes de Lowicryl. Folículo con antro en formación, el ovocito es positivo a caspasa 3 activa (A), lamp1(C) y fosfatasa ácida (B).

A los 17 días, algunos ovocitos son positivos a las diversas inmunodetecciones, estos folículos están muy alterados; francamente atrésicos. Algunas células de la granulosa, también son positivas a las proteínas identificadas, sobre todo las de los folículos con mayor grado de alteración.

En la imagen 10, se ve un folículo antral grande, en atresia avanzada, evidenciada por la deformación del ovocito, el desprendimiento de las granulosa y el nucleolo altamente compacto, esta célula es positiva a pro-caspasa 3, caspasa 3 activa y lamp1 pero no a TUNEL. Las células de la corona radiata también son positivas.

Es muy frecuente encontrar que los ovocitos son positivos a lamp1 y a caspasa 3 activa e incluso, un mismo ovocito puede presentar ambas proteínas a la vez. En la imagen 11 se presenta un ovocito primario positivo a caspasa 3 activa, a lamp1 y a la técnica de fosfatasa ácida. Caspasa 3 activa y lamp1, se encuentran distribuidas en el citoplasma del ovocito y en el de las células de la granulosa, estas últimas no son positivas a fosfatasa ácida, como se muestra en la imagen de campo claro. En el ovocito se ven zonas positivas a fosfatasa ácida, las cuales son señaladas con flechas, haciendo una comparación con lamp1, se indican las mismas zonas y coinciden el depósito de plomo con la señal de lamp1 en el mismo ovocito.

## **18 DÍAS**

A los 18 días los ovocitos también presentan triple marcado, algunos tienen pro-caspasa3, lamp1 y TUNEL, como en la imagen 12 y otros tienen pro-caspasa 3, caspasa 3 activa y lamp1, como en la imagen 13. La imagen 12 muestra un folículo atrésico, el núcleo del ovocito está altamente compacto. Se ha visto que los folículos con mayor grado de alteración, tienen células de la granulosa positivas a la pro-caspasa 3 y a lamp1, pero no a TUNEL. En la imagen 14, observamos un ovocito en un folículo antral en atresia avanzada, las células de la granulosa también son positivas a caspasa 3 activa y a lamp1.

También hay ovocitos en folículos con antra en formación son positivas a más de una proteína como puede ser caspasa 3 activa-lamp1, caspasa 3 activa-TUNEL, o en su caso a todas como en la imagen 14, en donde el ovocito es positivo a todas las técnicas. El ovocito de esta imagen se encuentra alterado, ya que una parte del citoplasma está degradado y con gran actividad de enzimas lisosomales como muestra el precipitado de plomo en la imagen

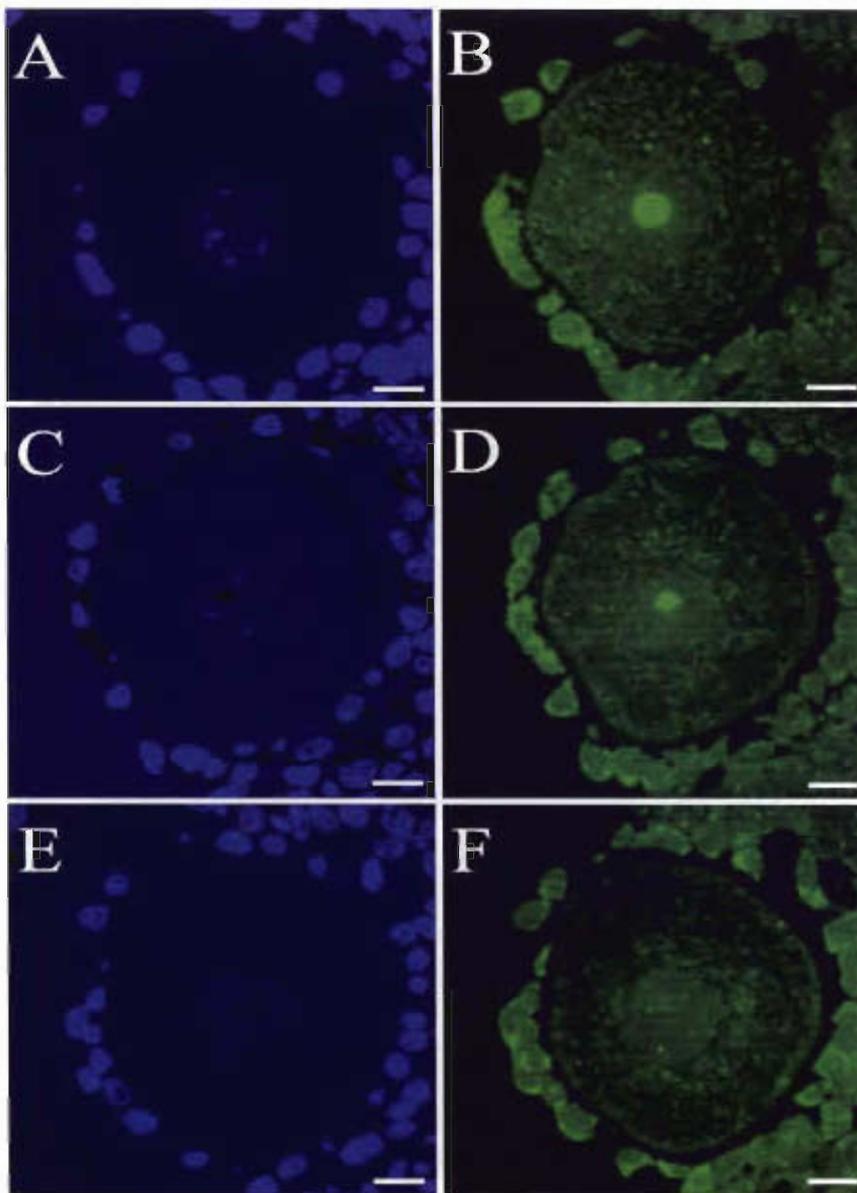


Imagen 10. Ovocito de ovario de rata de 17 días. A, C y E: muestran la reacción positiva para DAPI. Folículo antral grande, citoplasma del ovocito positivo a pro-caspasa 3 (B), caspasa 3 activa (D) y lamp1 (F). En el núcleo del ovocito un nucleolo positivo a pro-caspasa 3 y a caspasa 3 activa. Las células de la corona radiata y de la granulosa también son positivas.

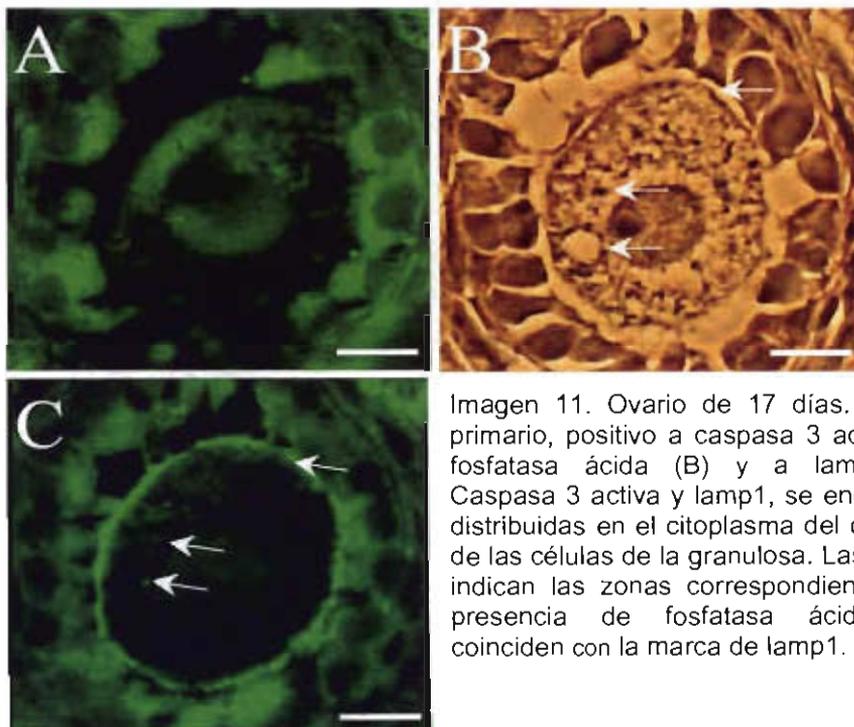


Imagen 11. Ovario de 17 días. Ovocito primario, positivo a caspasa 3 activa (A), fosfatasa ácida (B) y a lamp1 (C). Caspasa 3 activa y lamp1, se encuentran distribuidas en el citoplasma del ovocito y de las células de la granulosa. Las flechas indican las zonas correspondientes a la presencia de fosfatasa ácida, que coinciden con la marca de lamp1.

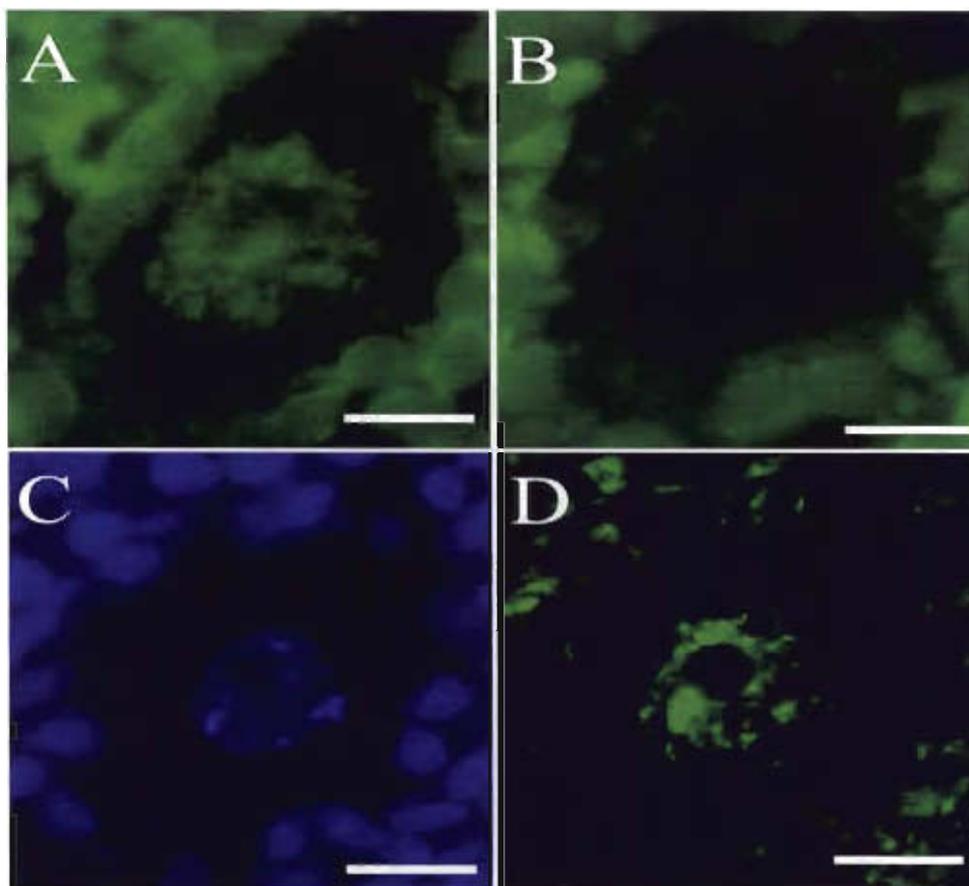


Imagen 12. Ovario de rata de 18 días de nacida. Folículo con antro chico, cuyo ovocito es positivo a pro-caspasa (A) y TUNEL (D), pero no a lamp1 (B), se observa a las células de la granulosa altamente positivas. C: muestra la reacción positiva para DAPI

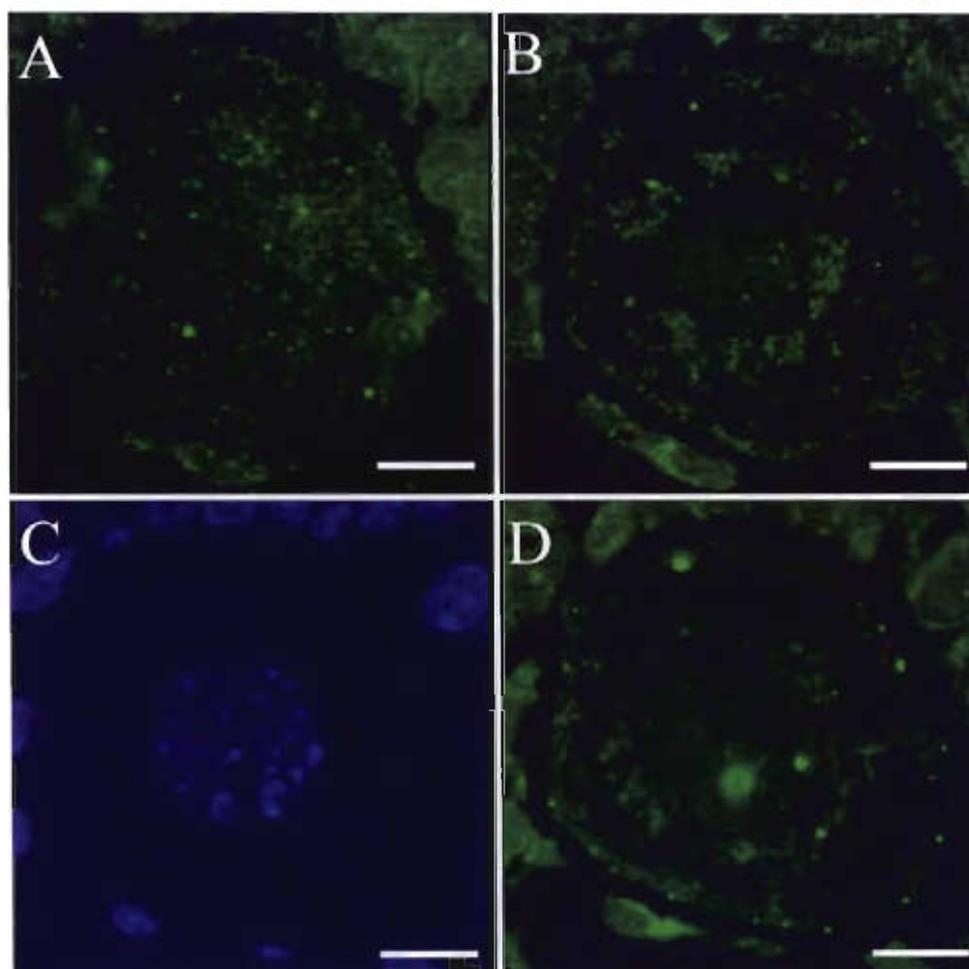


Imagen 13. Ovocito de ovario de rata de 18 días. Folículo antral, con ovocito positivo a pro-caspasa 3 (A), caspasa 3 activa (B) y lamp1 (D). (C) muestra la reacción positiva para DAPI. Las células de la granulosa también son positivas en todos los casos.

de campo claro. Este ovocito también presenta una región citoplasmática mas conservada, la cual es más positiva a lamp1, indicando una alta concentración de cuerpos lisosomales en esa zona, para su posible degradación posterior.

## **19 DÍAS**

En los ovarios de 19 días, también hay toda una gama de las etapas de desarrollo folicular. Hemos encontrado ovocitos que son positivos a más de una proteína o ensayo a la vez. La imagen 15, muestra un folículo con antro en formación en donde el ovocito es positivo a pro-caspasa 3, a lamp1 y a TUNEL, el contraste para ADN, coincide con el marcado de la técnica para ADN fragmentado (TUNEL).

En la imagen 16 observamos un ovocito en antro en formación, el cual es positivo a todas las técnicas: caspasa 3 activa presente en el citoplasma del ovocito y de las granulosa, sobre todo las más cercanas al ovocito; TUNEL positivo en el núcleo del ovocito. Lamp1 positivo en el citoplasma del ovocito y de las células foliculares, coincidiendo con una alta cantidad de marca para la fosfatasa ácida en el ovocito como se ilustra en la imagen de campo claro, las células de la granulosa no son positivas a fosfatasa ácida.

La imagen 17 es un ovocito en folículo en crecimiento inicial o secundario de ovario incluido en Lowicryl. Aquí se muestra un ovocito positivo a lamp1 y a fosfatasa ácida; la alta concentración de la marca de la proteína lamp1 distribuida en el citoplasma, se puede correlacionar con una amplia cantidad de precipitados de plomo indicando fosfatasa ácida (imagen de campo claro). Por otro lado es muy notorio que el ovocito tiene un nucleolo altamente compacto y positivo a lamp1. Las células de la granulosa que rodean al ovocito son positivas a lamp1, pero cuando se observa la reacción de Gomori en las mismas células, sólo algunas son positivas.

Es importante mencionar que un evento que se ha repetido con relativa frecuencia, es la doble tinción positiva de un mismo ovocito a caspasa 3 activa y a lamp1, en ovocitos de folículos en diferentes etapas de desarrollo.

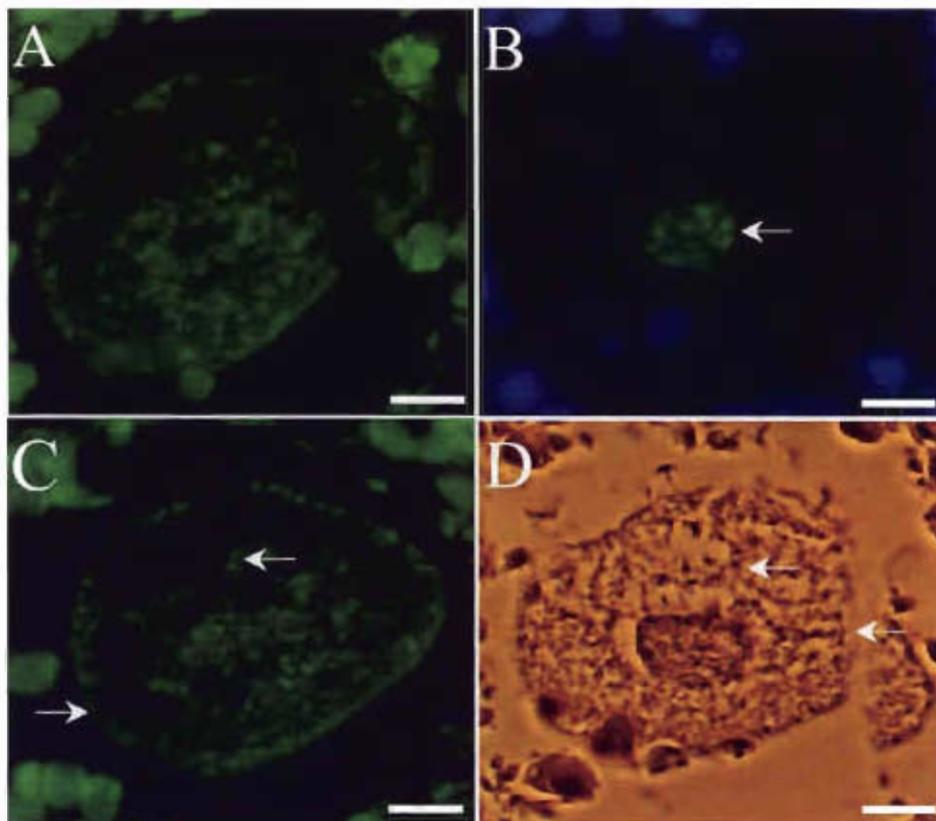


Imagen 14. Ovario de 18 días. Ovocito en folículo con antro en formación, con múltiples reacciones positivas. Caspasa 3 activa (A) en citoplasma de ovocito y foliculares. B: TUNEL positivo en el núcleo del ovocito. En lamp1 (C), las flechas muestran la distribución alrededor de zonas negativas del citoplasma, indicando lisosomas presentes en la periferia. La imagen de fosfatasa ácida (D), muestra zonas positivas a la técnica en la periferia del citoplasma altamente degradado.

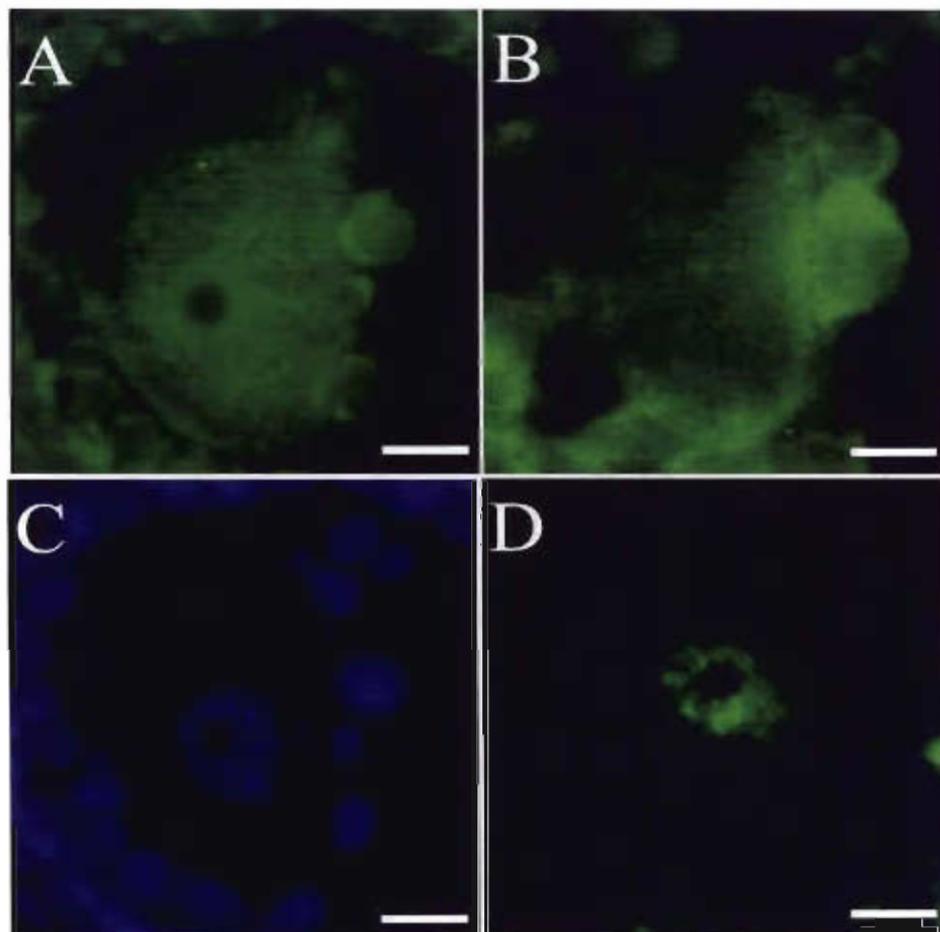


Imagen 15. Ovario de rata de 19 días. Folículo con antro grande, el ovocito es positivo a pro-caspasa 3 (A), lamp1 (B) y a TUNEL (D), las células de la granulosa también tienen una elevada marca a pro-caspasa 3 y a lamp1. (C) muestra la reacción positiva para DAPI.

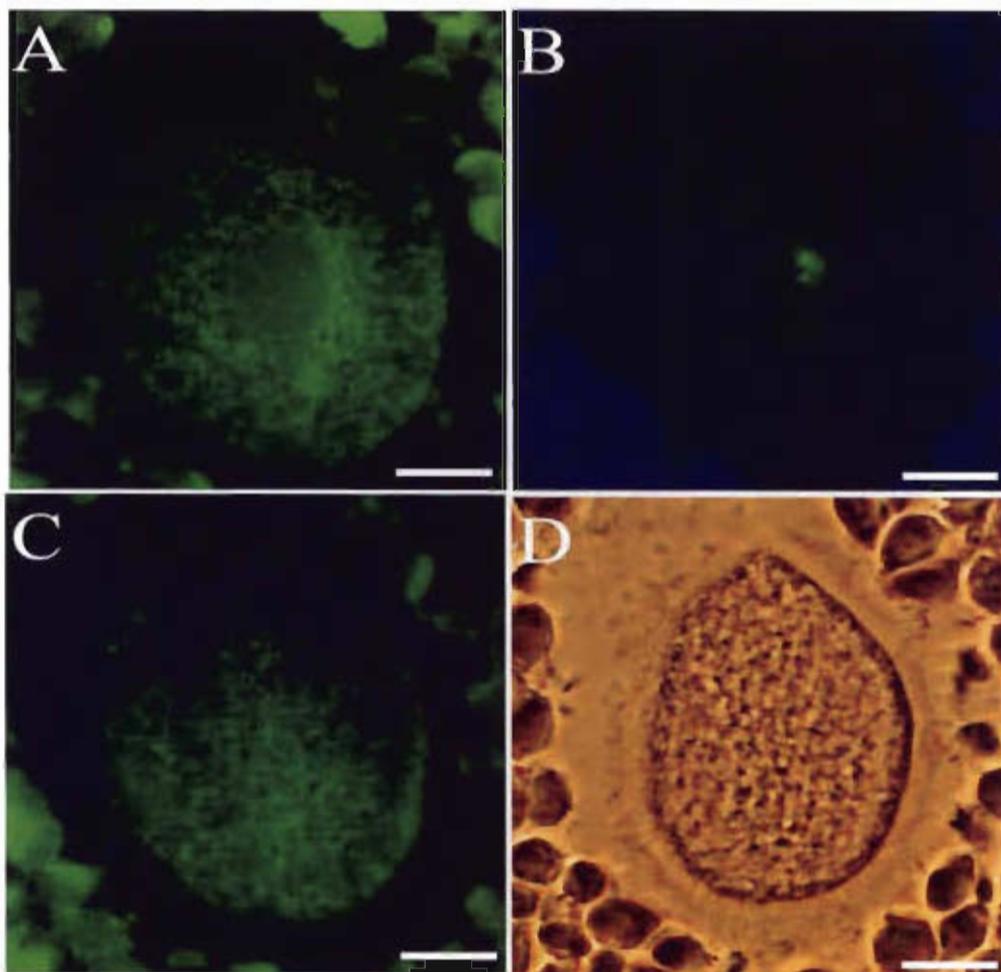


Imagen 16. Ovocito 19 días, antro en formación, positivo a caspasa 3 activa (A), TUNEL (B) con un fragmento del núcleo del ovocito positivo, lamp1 (C) y fosfatasa ácida (D).

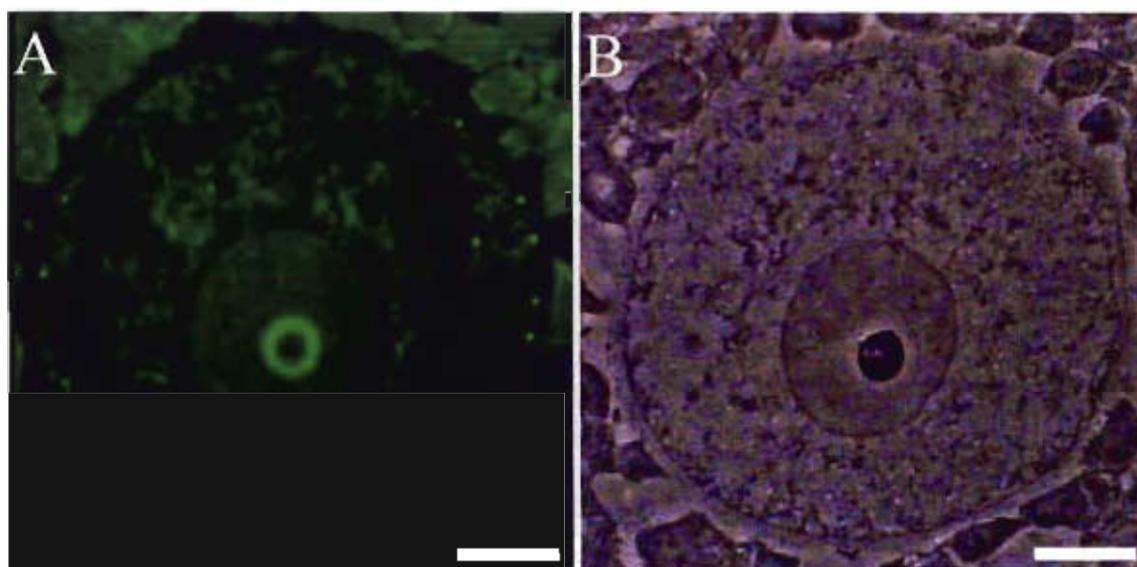


Imagen 17. Ovario de 19 días. Folículo en crecimiento inicial, positivo a lamp1 (A), con nucleolo también positivo. B: muestra los sitios de precipitación del plomo, indicando la reacción positiva para la fosfatasa. Ambas marcas se encuentran ampliamente distribuidas en el citoplasma del ovocito. Las células de la granulosa sólo son positivas a lamp1.

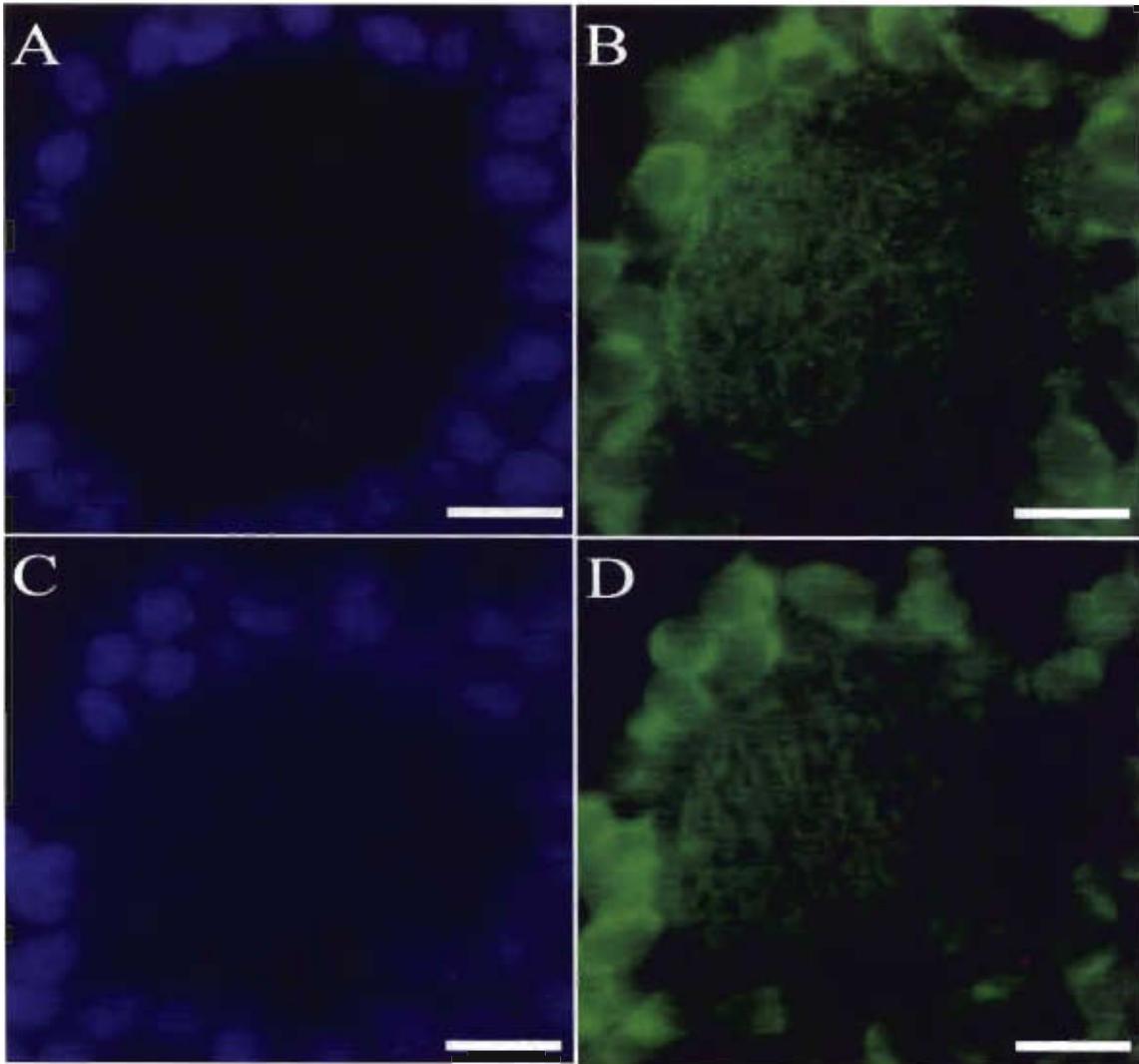


IMAGEN 18. Ovario de rata de 20 días. Folículo con antro. A y C: muestran la reacción positiva para DAPI. Ovocito positivo a pro-caspasa 3 y lamp1. Las granulosa también son positivas.

## 20 DÍAS

En las edades de 20 a 28 días, los ovarios presentan un mayor número de folículos en estado atrésico, esto provoca que haya una mayor cantidad de ovocitos con marca positiva a las diferentes técnicas realizadas. A estas edades, se pueden encontrar todo tipo de folículos, desde primordiales, que son los menos frecuentes, hasta los de antro muy grande.

En las edades de 20 y 21 días se observan varios ovocitos que son positivos a pro-caspasa 3 y a lamp1 al mismo tiempo, esto es común en ovocitos de folículos muy alterados. Las células de la granulosa que los rodean también son positivas, como se ve en la imagen 18. También es importante mencionar que, aunque no se ilustra aquí, algunos ovocitos son positivos a una sola proteína.

Algunos folículos atrésicos tienen ovocitos positivos a pro-caspasa 3 y lamp1 al mismo tiempo. En la imagen 19, se muestra un folículo antral muy degenerado, el citoplasma del ovocito ya presenta una gran deformación y las granulosa también están muy alteradas, con la tinción DAPI se ve la cromatina de estas células muy condensada, el núcleo del ovocito también se ve muy compactado, sin embargo en este caso, el ovocito no es positivo a la técnica de TUNEL.

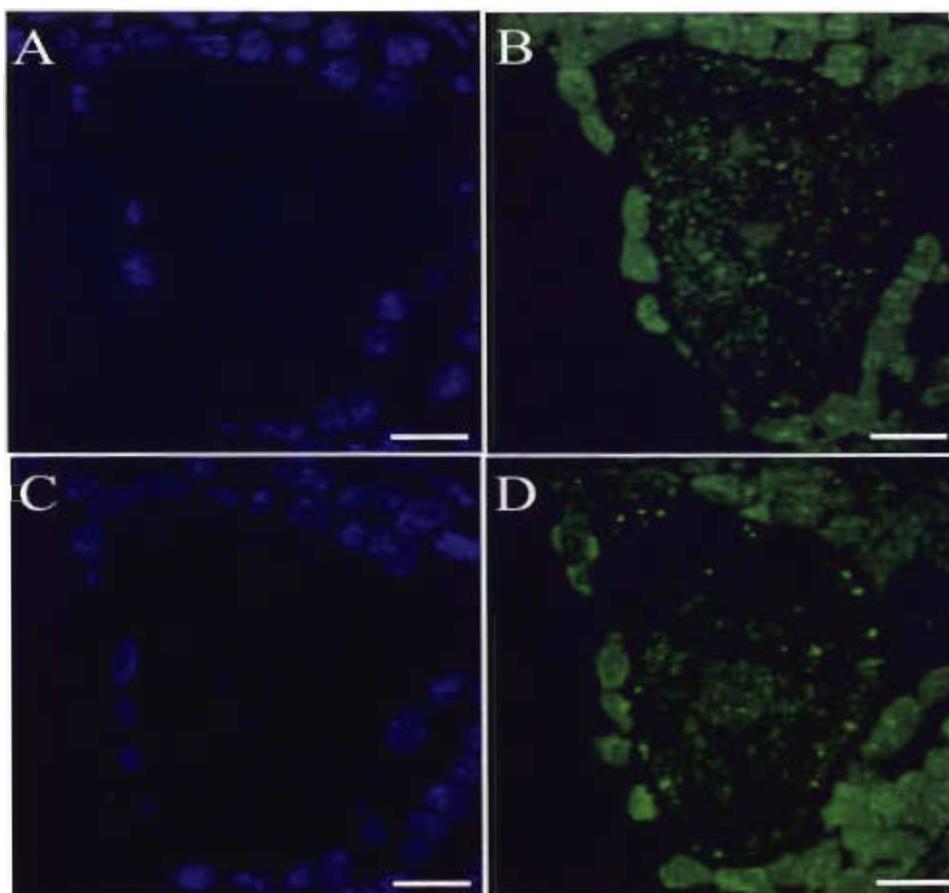


Imagen 19. Ovocito de ovario de rata de 20 días. Folículo antral, altamente degenerado con ovocito positivo a pro-caspasa 3 (B) y lamp1 (D). Las células de la granulosa también son positivas. A y C: muestran la reacción positiva para DAPI.

Es frecuente encontrar en folículos antrales o con antra en formación ovocitos positivos a más de una técnica a la vez. En la imagen 20 se puede ver a un ovocito en folículo con antra en formación muy alterado, ya que las células de la granulosa están prácticamente desprendidas del ovocito, por otro lado, el ovocito tiene una forma irregular y es positivo a todas las técnicas. La caspasa 3 activa está presente tanto en el ovocito como en las células de la granulosa cercanas al ovocito, el ovocito también es positivo a TUNEL, a lamp1 y presenta una gran cantidad de precipitados de plomo indicando alta cantidad de fosfatasa ácida. Es muy interesante ver que la señal de lamp1 se encuentra distribuida hacia la periferia del ovocito al igual que la señal de fosfatasa ácida.

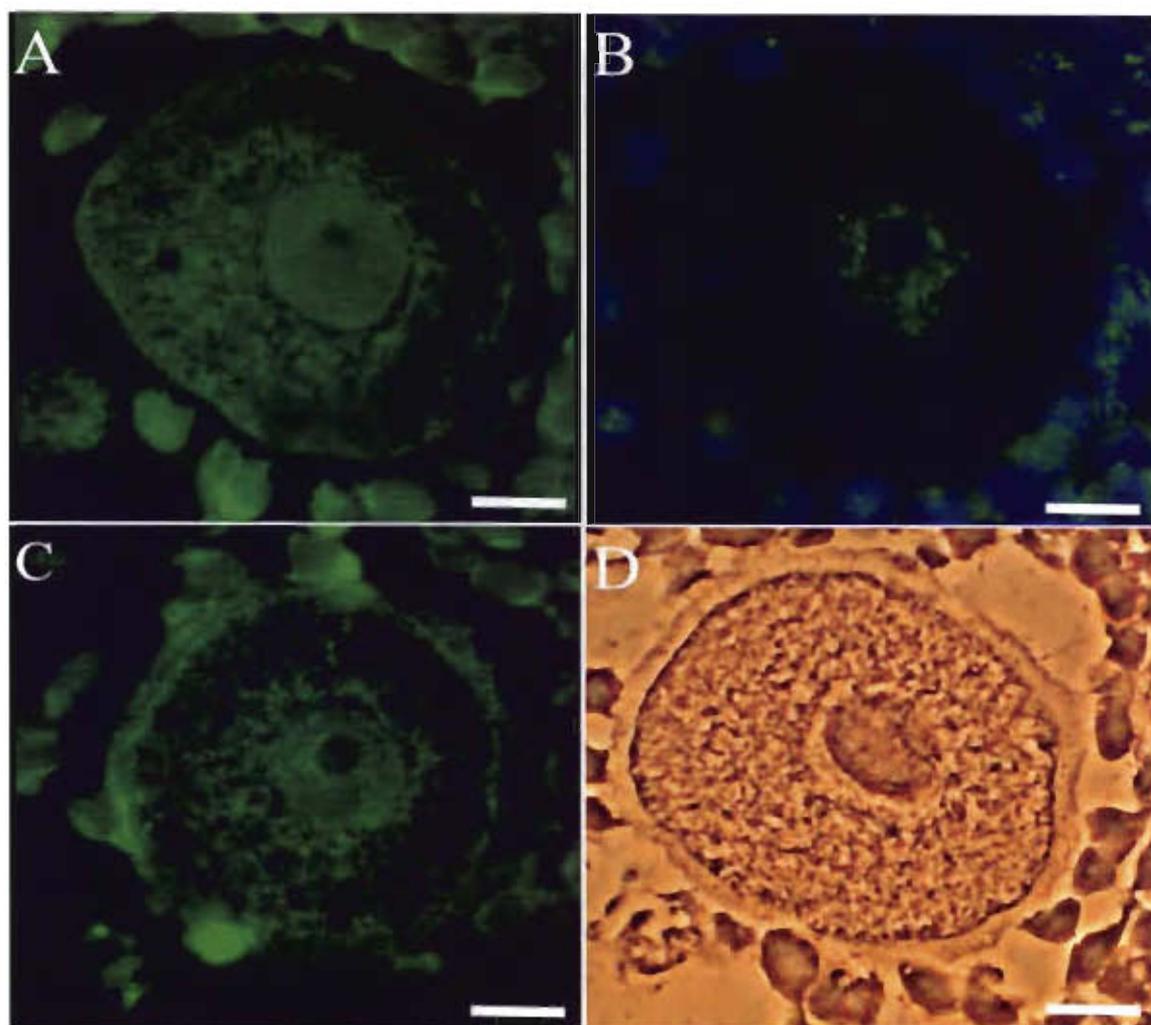


Imagen 20. Ovario de 20 días. Folículo con antro en formación, ovocito positivo a caspasa 3 activa (A), TUNEL (B), lamp1 (C) y fosfatasa ácida (D). La distribución de la fosfatasa en el citoplasma del ovocito al igual que lamp1 evidencia la presencia de lisosomas sobre todo hacia la periferia del ovocito.

La imagen 21 también de la edad 20 días obtenidas a partir de cortes de Lowicryl, muestra un ovocito muy degenerado en folículo antral con reacción positiva a lamp1, fosfatasa ácida y caspasa 3 activa, cuya marca se encuentra distribuida en el citoplasma. Por otro lado, las células de la granulosa son positivas a lamp1 y caspasa 3 activa, pero no a fosfatasa ácida.

### 21 DÍAS

La diversidad de fases foliculares a la edad de 21 días abarca desde la fase folicular primordial, hasta la fase de folículo antral. Los ovocitos en estado atrésico de esta edad, también presentan marcado múltiple. La imagen 22 muestra un ovocito alterado, con presencia de lamp1 y pro-caspasa 3.

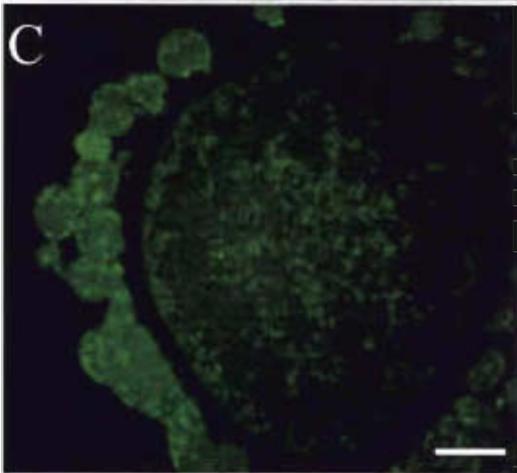
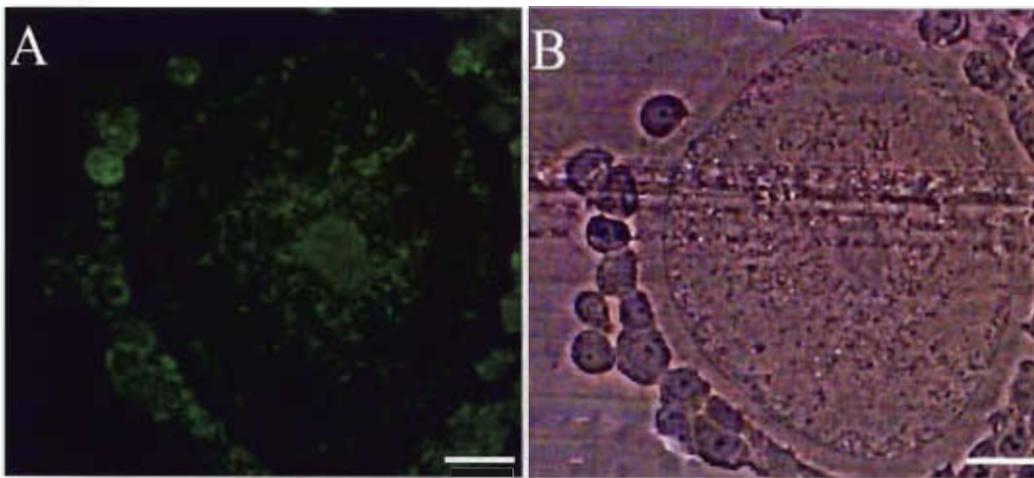


Imagen 21. Ovario de 20 días. Folículo antral. Ovocito positivo a: lamp 1 (A), fosfatasa ácida (B) y caspasa 3 activa (C). Todas las marcas se encuentran distribuidas en el citoplasma del ovocito. lamp1 y caspasa 3 activa, también se encuentran en las células de las granulosa, no así la fosfatasa ácida.

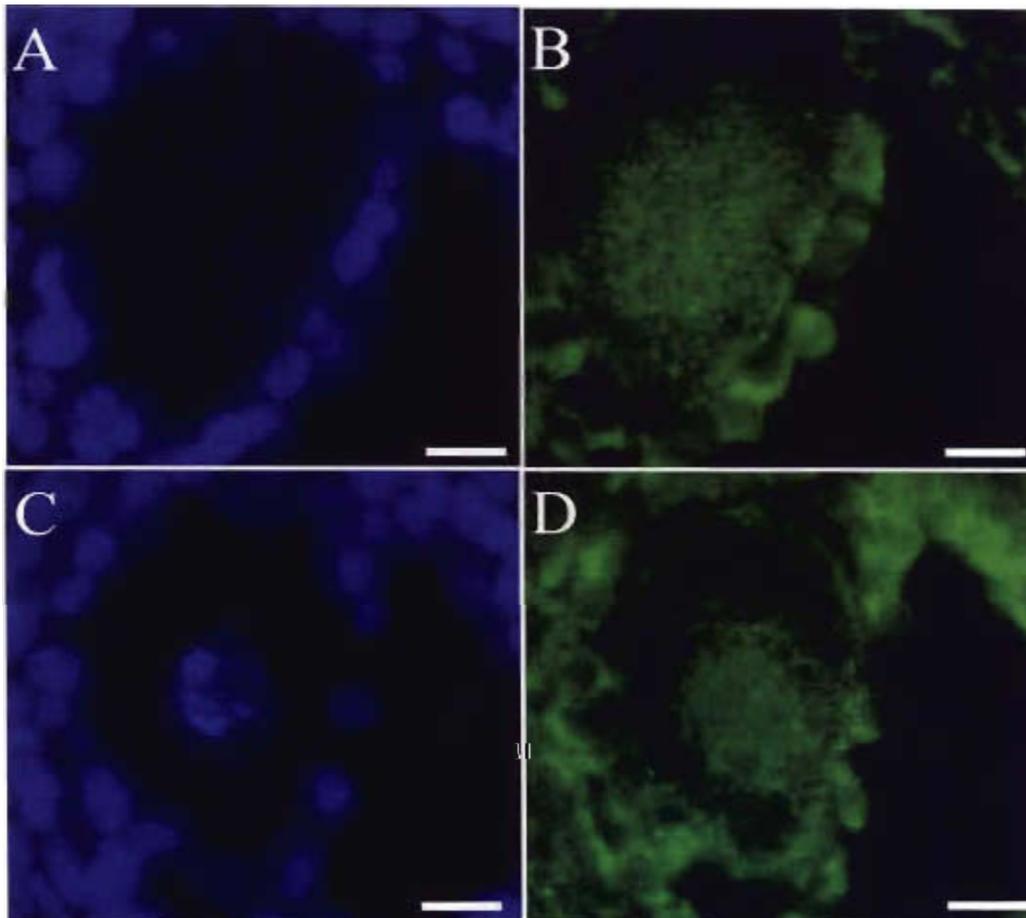


Imagen 22. Ovario de ratón de 21 días. Folículo atrésico antral. Ovocito positivo a procaspasa 3 (B) y a lamp1 (D). Las granulosa también son positivas. A y C: muestran la reacción positiva para DAPI.

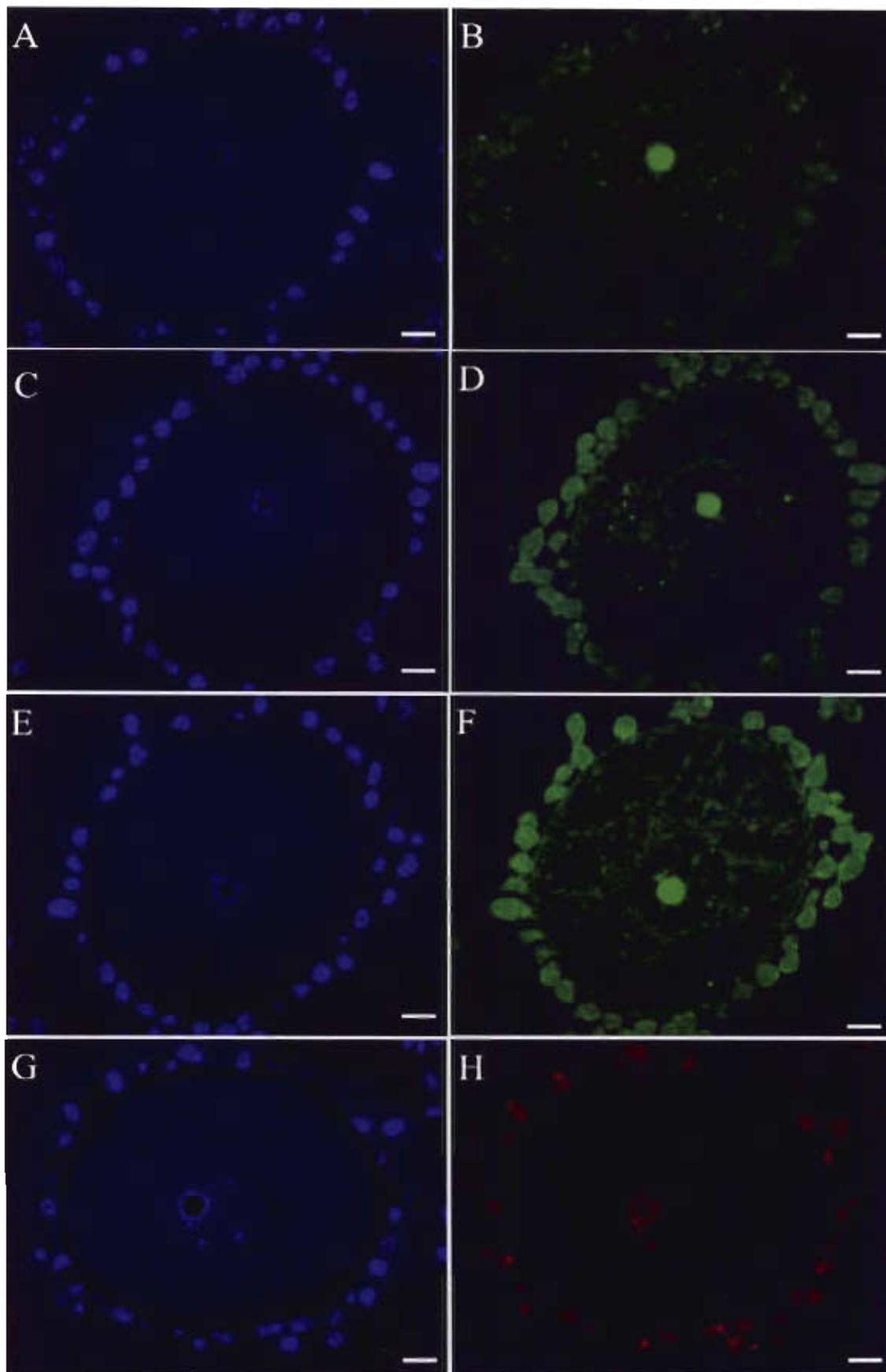


Imagen 23. Ovocito de 21 días. Folículo antral grande, citoplasma del ovocito positivo a pro-caspasa 3 (B), caspasa 3 activa (D) y lamp1 (F). En el centro del ovocito el nucleolo, positivo a pro-caspasa 3, caspasa 3 activa y lamp1. Las células de la corona radiata y de la granulosa también son positivas. Ovocito positivo a TUNEL (H). A, C, E y G: muestran la reacción positiva para DAPI.

En la imagen 23, se ilustra un folículo antral grande de 21 días, cuyo ovocito es intensamente positivo a pro-caspasa 3, caspasa 3 activa y lamp1 al mismo tiempo. El nucleolo está fuertemente compactado y es muy positivo a las tres inmunodetecciones y también a TUNEL.

Las imágenes 24 y 25 corresponden a cortes de ovarios de 21 días, de material incluido en parafina y Lowicryl respectivamente, los cuales presentan reacción positiva múltiple. En la imagen 24 observamos a un ovocito en folículo en crecimiento inicial, positivo a caspasa 3 activa, TUNEL, lamp1 y fosfatasa ácida. Las células de la granulosa también son positivas a caspasa 3 activa, TUNEL y lamp1, sobre todo aquellas más cercanas al ovocito, pero no son positivas a fosfatasa ácida. La imagen de lamp1 (24C), muestra puntos más brillantes que son cúmulos de la proteína en el citoplasma que corresponde con la abundancia de fosfatasa ácida (24D).

La imagen 25 muestra un ovocito positivo a lamp1, fosfatasa ácida y caspasa 3 activa, en folículo con antro grande; las células que rodean al ovocito son positivas a lamp1 y a caspasa 3 activa. En el ovocito hay una alta marca positiva a fosfatasa ácida, lo cual coincide con la amplia distribución de lamp1 en el mismo ovocito, evidenciando la presencia de una elevada cantidad de lisosomas en algunas zonas citoplasmáticas

## **25 DÍAS**

La imagen 26 (ovario de rata de 25 días de nacida), muestra la marca positiva a pro-caspasa 3, lamp1 y TUNEL de un ovocito sumamente alterado. La marca de TUNEL, coincide perfectamente con cúmulos de cromatina altamente compactada en el núcleo del ovocito. Pro-caspasa y lamp1 son positivos tanto en el citoplasma del ovocito como en las células que lo rodean que también ya se encuentran muy alteradas.

La imagen 27 muestra a un ovocito con múltiple marcaje, en este caso el ovocito está pseudosegmentado y la segmentación, ha dotado de un fragmento de núcleo a cada zona e incluso en un segmento, se logró distinguir una fracción de nucleolo (27D).

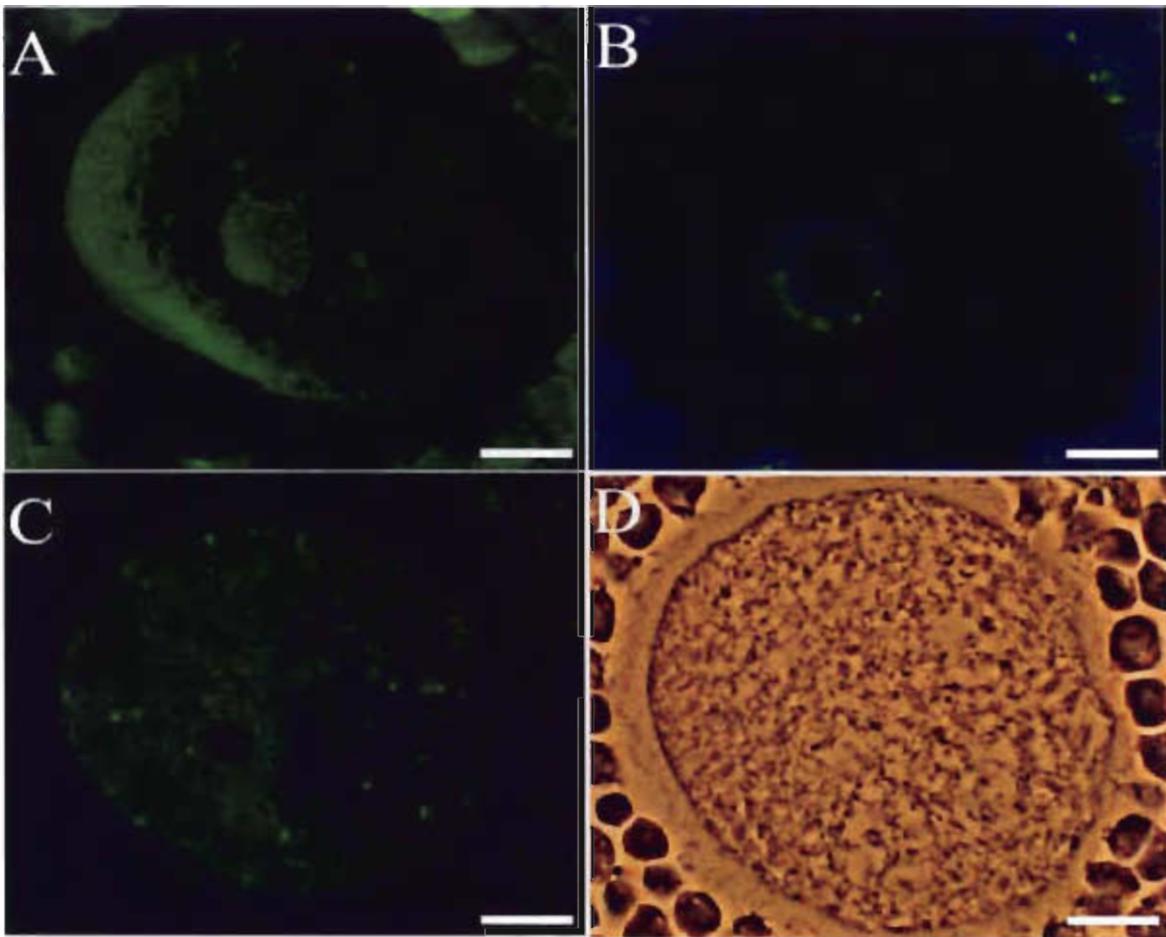


Imagen 24. Ovario de 21 días. Antro en formación muy inicial, ovocito muy alterado, positivo a todas las técnicas: lamp1 en cúmulos citoplasmáticos, los cuales tienen correspondencia con la fosfatasa ácida. (A): caspasa 3 activa, (B): TUNEL/DAPI, (C): lamp1 y (D): fosfatasa ácida.

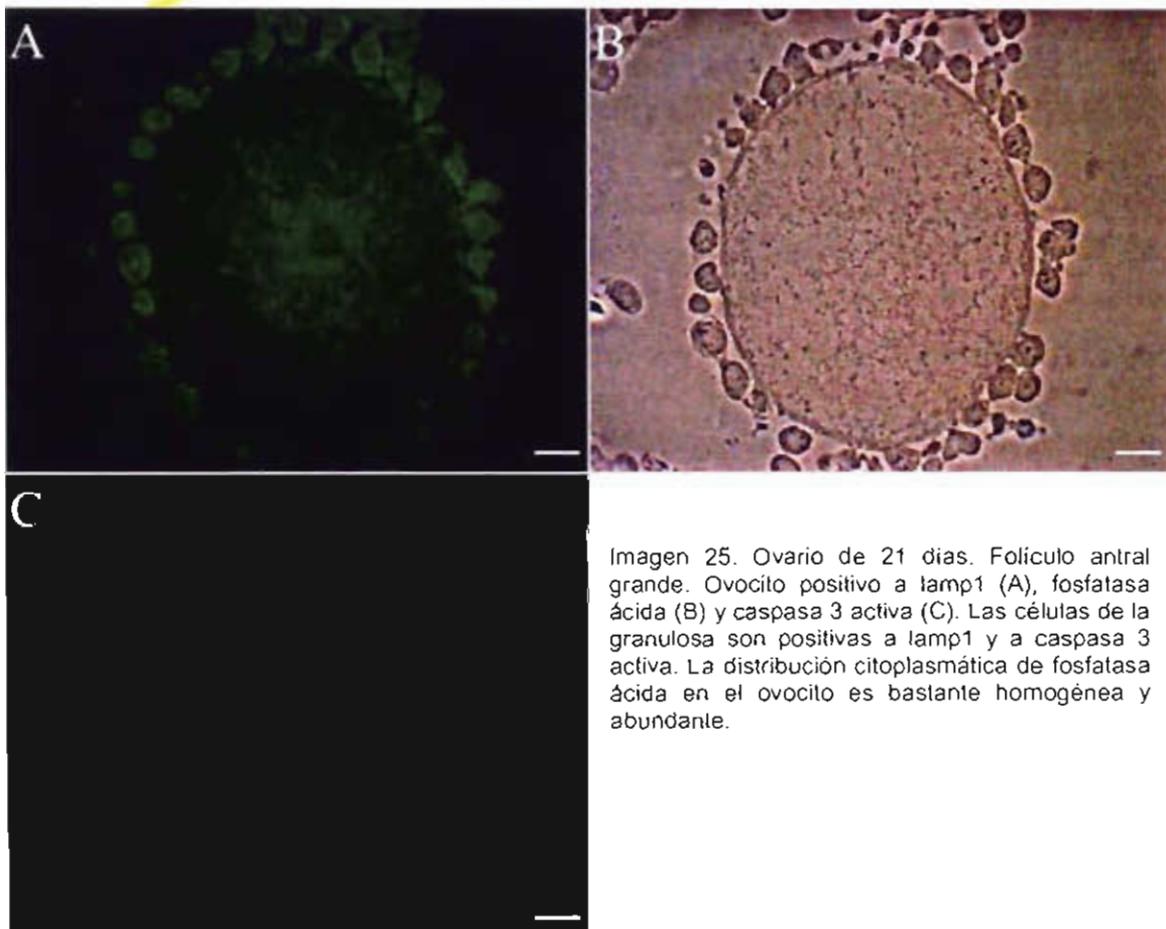


Imagen 25. Ovario de 21 días. Folículo antral grande. Ovocito positivo a lamp1 (A), fosfatasa ácida (B) y caspasa 3 activa (C). Las células de la granulosa son positivas a lamp1 y a caspasa 3 activa. La distribución citoplasmática de fosfatasa ácida en el ovocito es bastante homogénea y abundante.

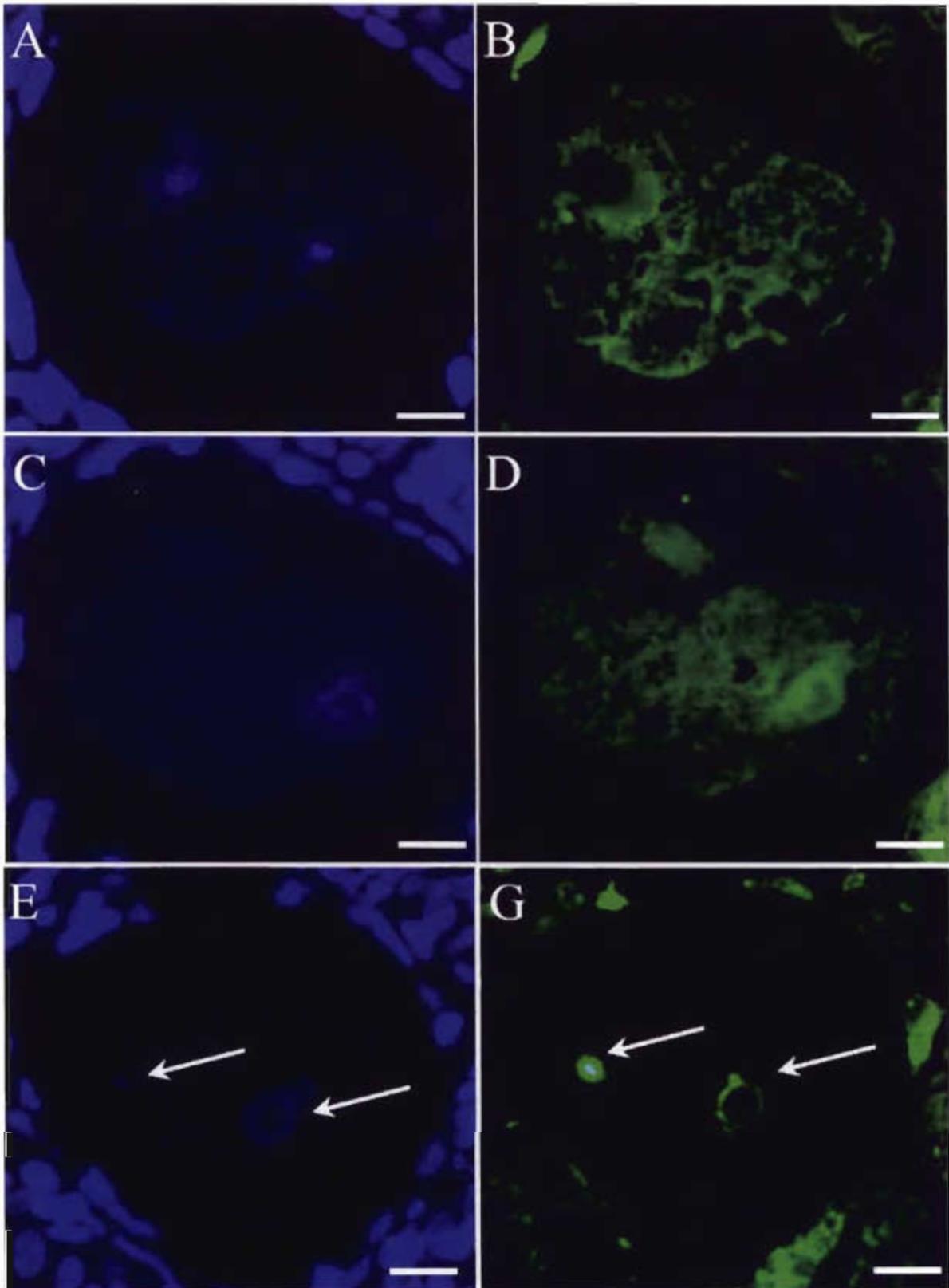


Imagen 26. Ovario de rata de 25 días de nacida. Foliculo en alto grado de degeneración, citoplasma del ovocito muy positivo a pro-caspasa 3 (B) y lamp1 (D). También positivo a TUNEL (G), las flechas indican el núcleo positivo como se ve en el DAPI (E).

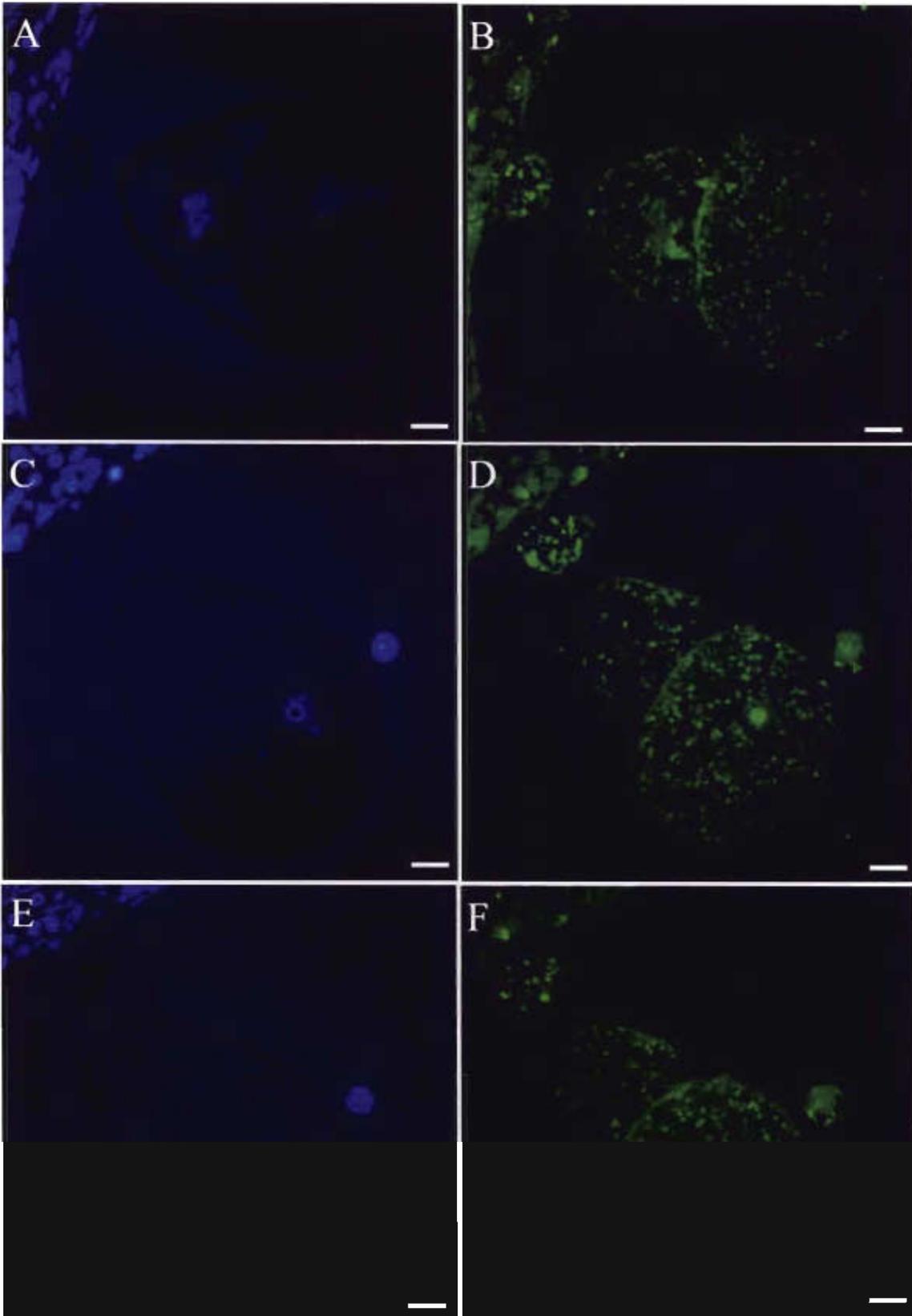


Imagen 27. Ovocito de ovario de rata de 25 días. A, C y E: muestran la reacción positiva para DAPI. Folículo antral grande, restos de ovocito pseudo-segmentado, positivo a pro-caspasa 3 (B), caspasa 3 activa (D) y lamp1 (F).

En las imágenes 28 y 29 los ovocitos ilustrados son positivos a varias inmunolocalizaciones, incluyendo a la fosfatasa ácida. En la imagen 28 observamos un ovocito en folículo antral el cual presenta una región citoplasmática altamente degradada y cuyas reminiscencias son positivas a fosfatasa ácida; por otra parte, tiene una región más conservada y menos positiva a fosfatasa ácida; sin embargo, justamente esa zona más conservada es donde lamp1 es más abundante. También es importante notar que el núcleo ya empieza a tener ADN fragmentado evidenciado por TUNEL. En cuanto a la caspasa, la mayor reacción positiva se encuentra en la región más conservada del citoplasma del ovocito.

En la imagen 29 observamos a un ovocito en folículo con antro grande, positivo a lamp1, fosfatasa ácida y caspasa 3 activa. La abundancia de la marca de lamp1 coincide con la gran cantidad de fosfatasa ácida, indicando una alta cantidad de lisosomas. La caspasa 3 activa y lamp1 también se encuentran presentes en algunas células de la granulosa.

## **28 DÍAS**

La última edad analizada que es la de 28 días, tiene diversos estadios de desarrollo folicular, con una gran cantidad de folículos alterados. Es muy frecuente encontrar ovocitos positivos a pro-caspasa 3 y lamp1, así como los positivos a las tres técnicas: pro-caspasa 3, lamp1 y TUNEL.

A los 28 días, abundan los folículos de mayor desarrollo, sin que esto implique que no se encuentren presentes las otras fases foliculares. La mayoría de los folículos que ya han alcanzado una fase avanzada de desarrollo, a tal punto de tener características de folículos seleccionables, están en proceso de degeneración, lo que permite que a esta edad, se puedan ver una buena cantidad de ovocitos con reacciones positivas a más de un indicador en la misma célula. La doble tinción positiva involucra a lamp1 ya sea con pro-caspasa 3 o con caspasa 3 activa. De igual forma, se pueden ver ovocitos positivos a las tres anteriores e incluso a TUNEL.

La imagen 30 ejemplifica a un ovocito positivo a todas las técnicas y aunado a esto, tiene un nucleolo altamente compactado positivo a TUNEL. Las células de la granulosa también son muy positivas a caspasa 3 activa y a lamp1.

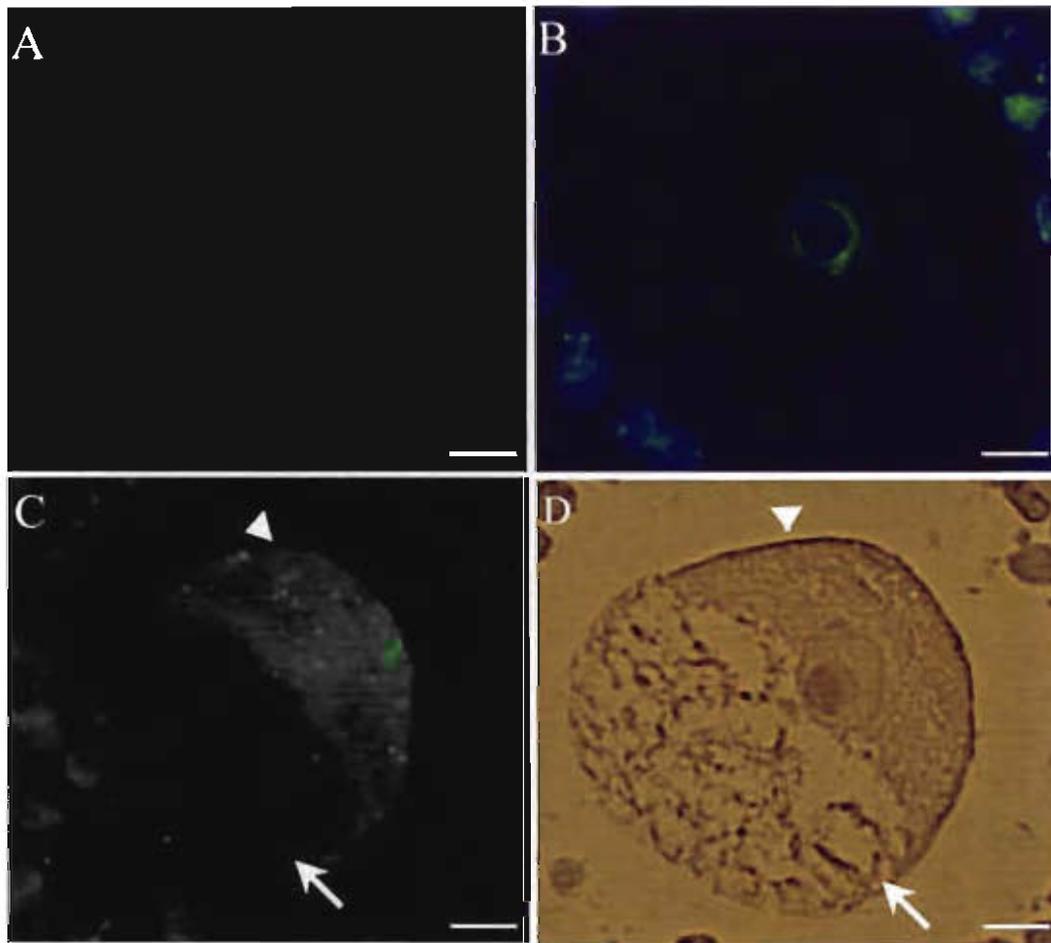


Imagen 28. Ovario de 25 días. Ovocito antral muy degenerado. Ovocito y granulosa positivos a caspasa 3 activa (A), TUNEL/DAPI (B), lamp1 (C) y fosfatasa ácida (D). En la imagen D puede observarse una gran zona del citoplasma del ovocito muy degradada, y que es positiva a la fosfatasa ácida (flecha), la zona mejor conservada es la positiva a lamp1 (cabeza de flecha)

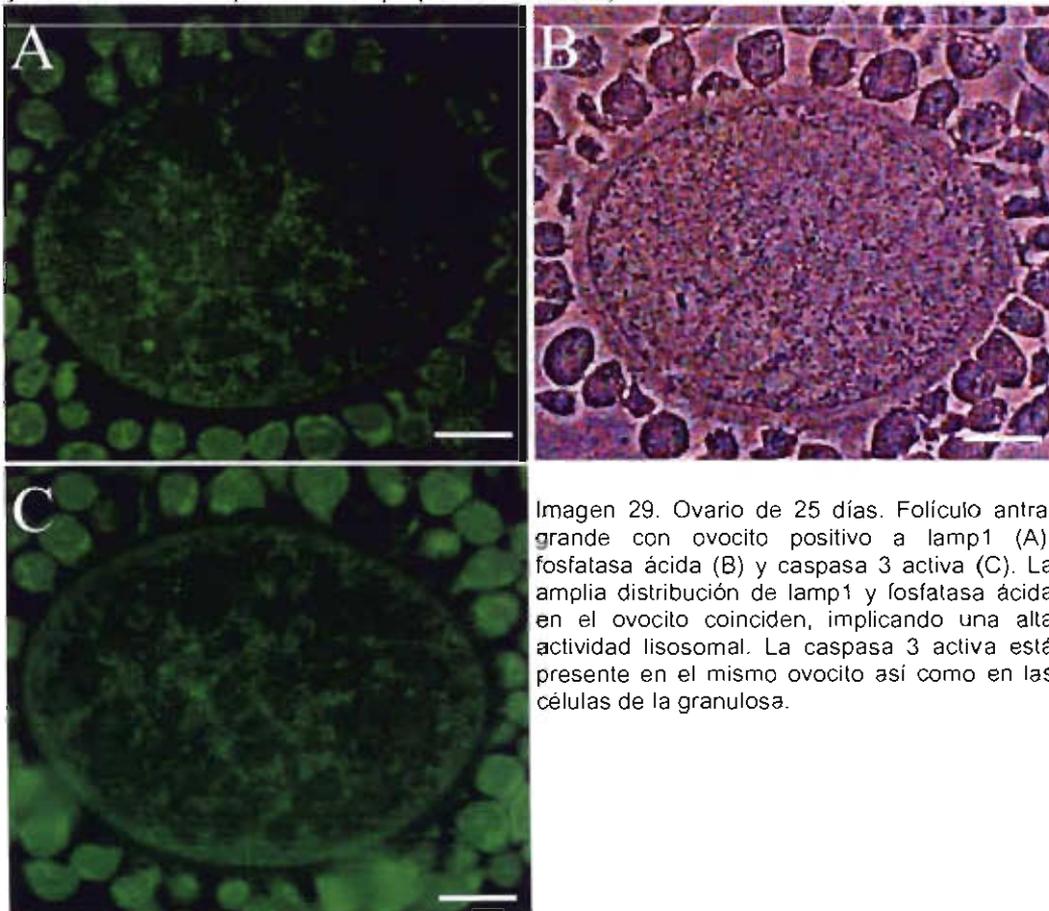


Imagen 29. Ovario de 25 días. Folículo antral grande con ovocito positivo a lamp1 (A), fosfatasa ácida (B) y caspasa 3 activa (C). La amplia distribución de lamp1 y fosfatasa ácida en el ovocito coinciden, implicando una alta actividad lisosomal. La caspasa 3 activa está presente en el mismo ovocito así como en las células de la granulosa.

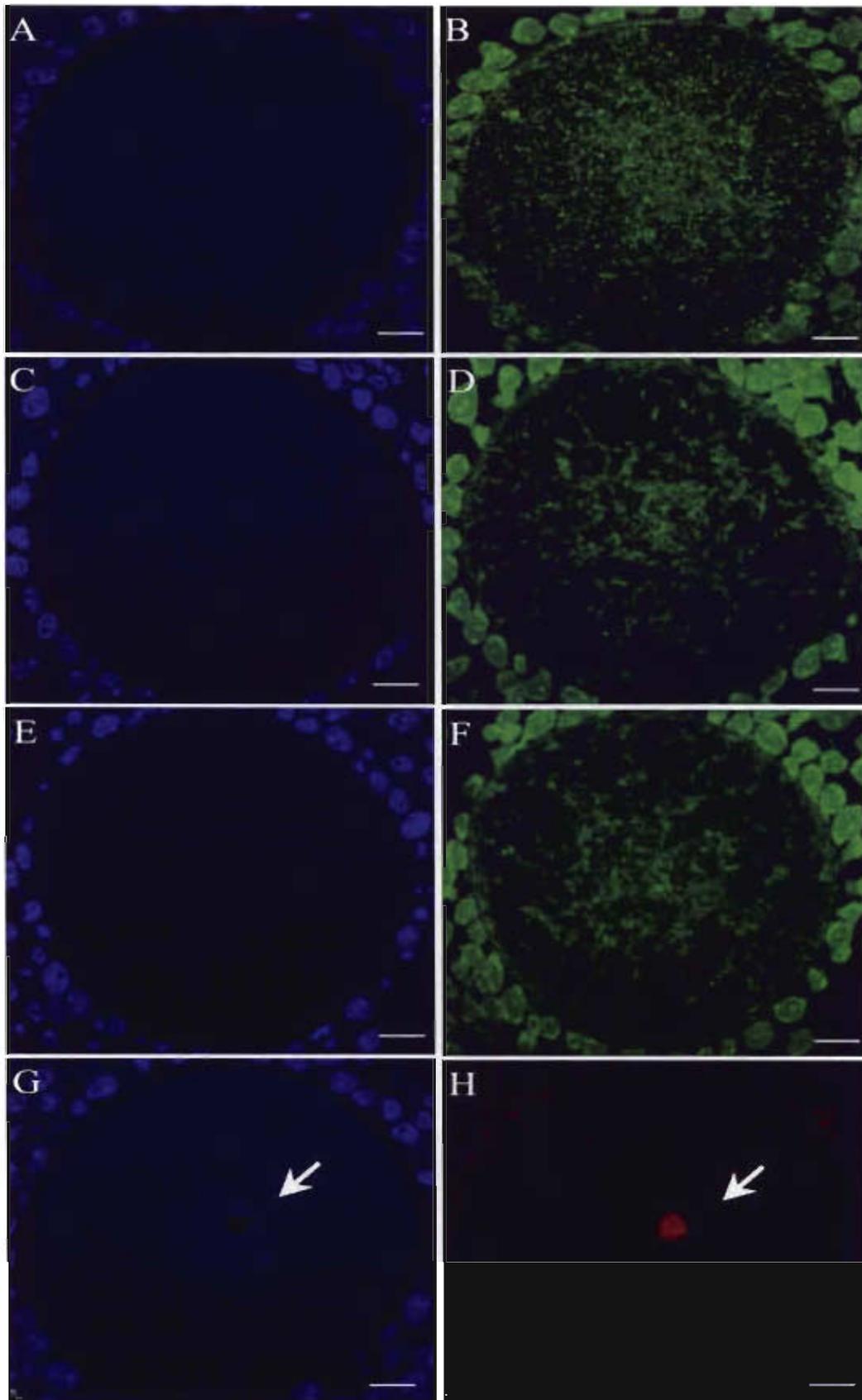


Imagen 30. Ovocito de rata de 28 días de nacida en folículo antral. A, C, E y G: muestran la reacción positiva para DAPI. B: pro-caspasa 3, D: caspasa 3 activa, F: lamp1, H: TUNEL. Ovocito con marca positiva múltiple, la flecha indica la zona positiva a TUNEL, en las otras fotos se puede observar la reacción positiva del ovocito y de las granulosa a las diferentes proteínas.

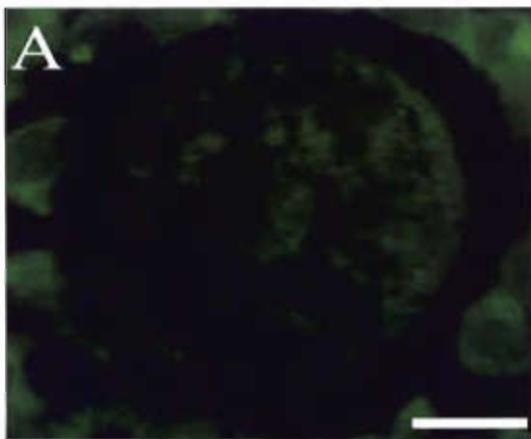


Imagen 31. Ovario de 28 días. Ovocito en folículo con antro en formación. Ovocito y granulosa positivos a caspasa 3 activa (A) y lamp1 (B). En la imagen C, puede observarse una gran zona del citoplasma del ovocito muy degradada, que es positiva a la fosfatasa ácida.

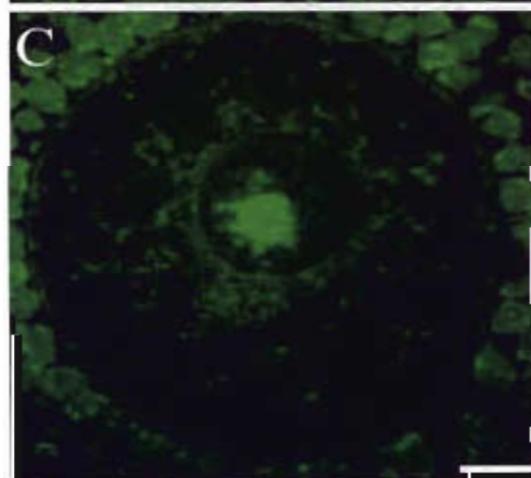
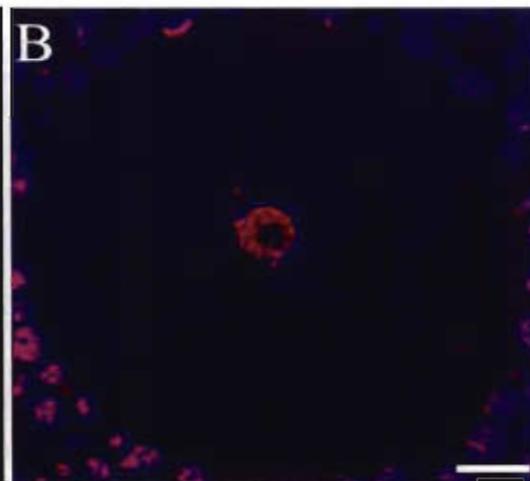
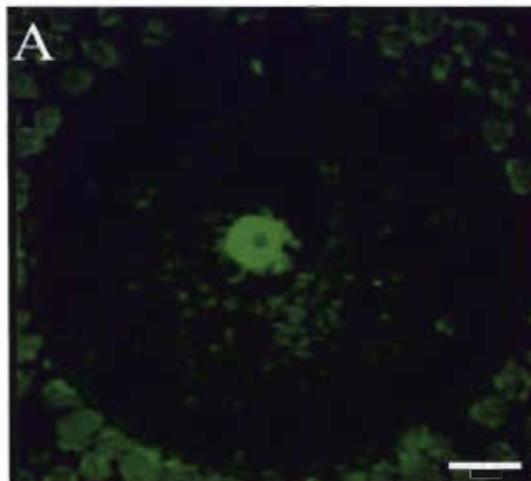
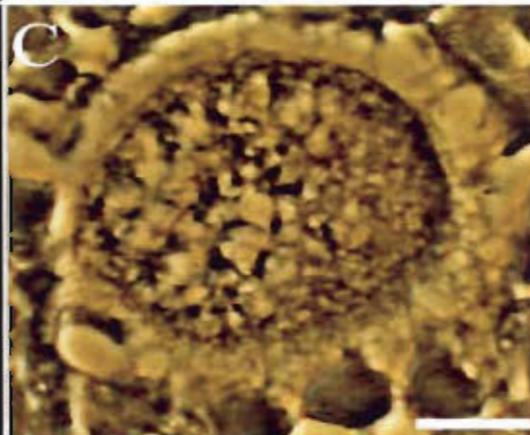
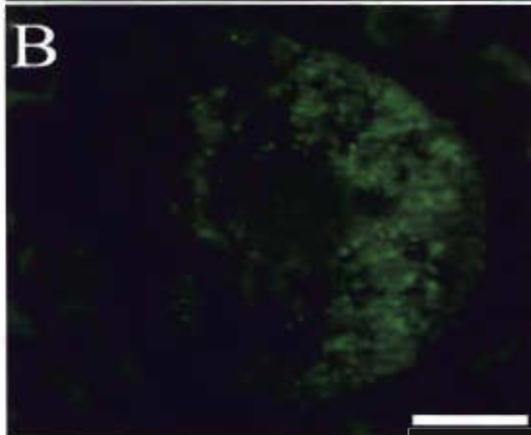


Imagen 32. Ovario de 28 días. Ovocito en folículo con antro grande. Positivo a todas las detecciones: caspasa 3 activa (A), TUNEL/DAPI (B), lamp1 (C) y fosfatasa ácida (D). El ovocito tiene un nucleolo altamente compacto positivo a caspasa 3 activa, TUNEL y lamp1. Las células de la granulosa también son positivas a todo excepto a fosfatasa ácida.

En la imagen 31 se ilustra un folículo con antro en formación, cuyo ovocito y granulosas son positivos a caspasa 3 activa, lamp1 y a fosfatasa ácida. La zona más conservada del citoplasma de este ovocito, tiene una mayor cantidad de lamp1; sin embargo, la región degradada, tiene una mayor cantidad de fosfatasa ácida.

El ovocito de la imagen 32 corresponde a un folículo con antro grande. El ovocito es positivo a todas las técnicas. Las células de la granulosa que rodean al ovocito también son positivas a caspasa 3 activa, TUNEL y lamp1. Es muy notorio que el ovocito tiene un nucleolo altamente compacto y que es positivo a caspasa 3 activa, TUNEL y lamp1.

Las pruebas realizadas para identificar los procesos de muerte celular apoptosis y autofagia, indican que los ovocitos son positivos a alguno de ellos o en algunos casos a ambos. Los datos obtenidos muestran que dichos procesos están presentes en los ovocitos a cualquier edad del organismo (tabla 1).

Tabla 1. Procesos de muerte celular identificados en los ovocitos de diferentes edades.

EDAD (DÍAS)	OVOCITOS CON APOPTOSIS	OVOCITOS CON AUTOFAGIA	OVOCITOS CON APOPTOSIS Y AUTOFAGIA
1	+++++	+	+
5	+	+++	+++
10	+	+	++
15	++	++	++
17	++	++	++
18	++	++	++
19	++++	++	+++
20	+++	++	+++
21	+++	+++	+++
25	+++	+++	++++
28	+++	+++	+++++

## MICROSCOPIA ELECTRÓNICA.

La ultraestructura de los ovocitos en folículos con atresia inicial y avanzada de las diferentes edades estudiadas, muestra alteraciones a nivel del citoplasma y nucleares. En la edad de 1 día, se observa que los ovocitos alterados, tienen compactaciones de cromatina y muchos de ellos, presentan restos de complejos sinaptonémicos (imagen 33A). En ovocitos de 5 días se pueden observar vesículas autofágicas en el citoplasma (imagen 33 B). Las vesículas son un evento constante a lo largo del desarrollo pre-púber de la rata, ya que se presentan en las diversas edades estudiadas y en ovocitos de diferentes fases de desarrollo folicular.

Otra característica ultraestructural es la fragmentación del citoplasma de ovocitos en atresia muy avanzada (34A). Los fragmentos de los ovocitos, presentan prolongaciones citoplasmáticas, el contenido citoplasmático parece estar repartido de forma indiscriminada en los fragmentos, e incluso en algunas ocasiones puede verse una parte de núcleo en cada sección y un nucleolo altamente compacto (imagen 34B).

Se han podido identificar vesículas autofágicas con diversos niveles de degradación de su contenido, las vesículas se han observado en ovocitos de las diferentes edades estudiadas (imagen 35).

La técnica de tinción específica para ADN con amina de osmio, ha permitido observar que el ADN se encuentra distribuido en el núcleo como pequeños fragmentos (imagen 36A y C), la cromatina no es tan compacta como para formar el clásico cuerpo apoptótico, sin embargo, los fragmentos son equiparables a los observados con un gran aumento de la cromatina en cuerpos apoptóticos de las células de la granulosa (imagen 36B), que tienen el ADN fragmentado en secciones cortas evidenciadas también con la técnica de amina de osmio.

La identificación de la fosfatasa ácida activa en los espacios lisosomales y autofagolisosomas a nivel de microscopía electrónica, permitió observar la precipitación de plomo en sitios del citoplasma correspondientes a vesículas cuyo contenido estaba en proceso de degradación (imagen 36C).

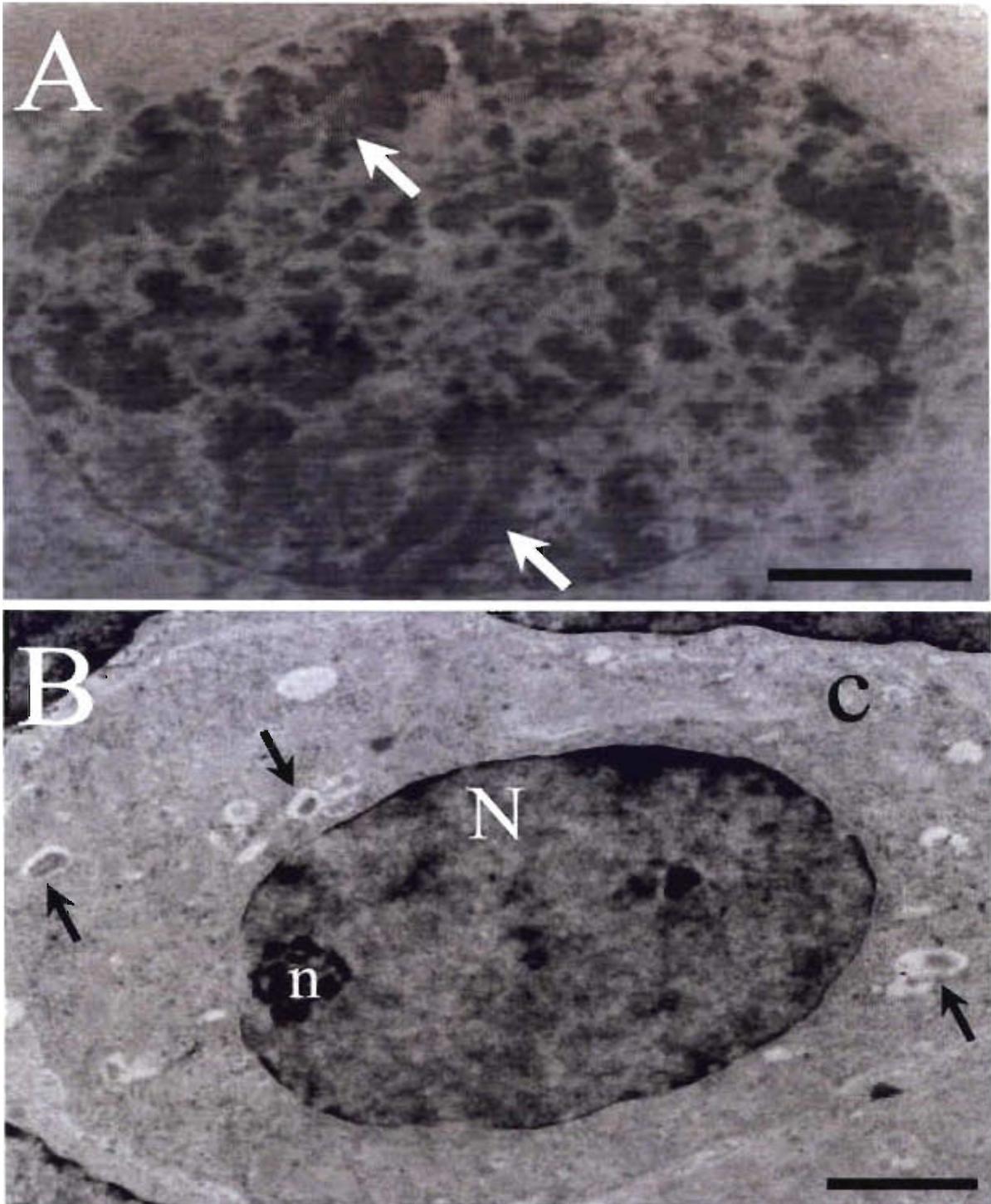


Imagen 33. Micrografías electrónicas. A: ovocito de 1 día, célula muy alterada, con restos de complejos sinaptonémicos (flechas). B: ovocito de 5 días, el citoplasma presenta varias vesículas autofágicas (flechas) en una célula en proceso de degeneración. Tinción general con acetato de uranilo y citrato de plomo. c: citoplasma; N: núcleo, n: nucleolo. Barras: 2 micras

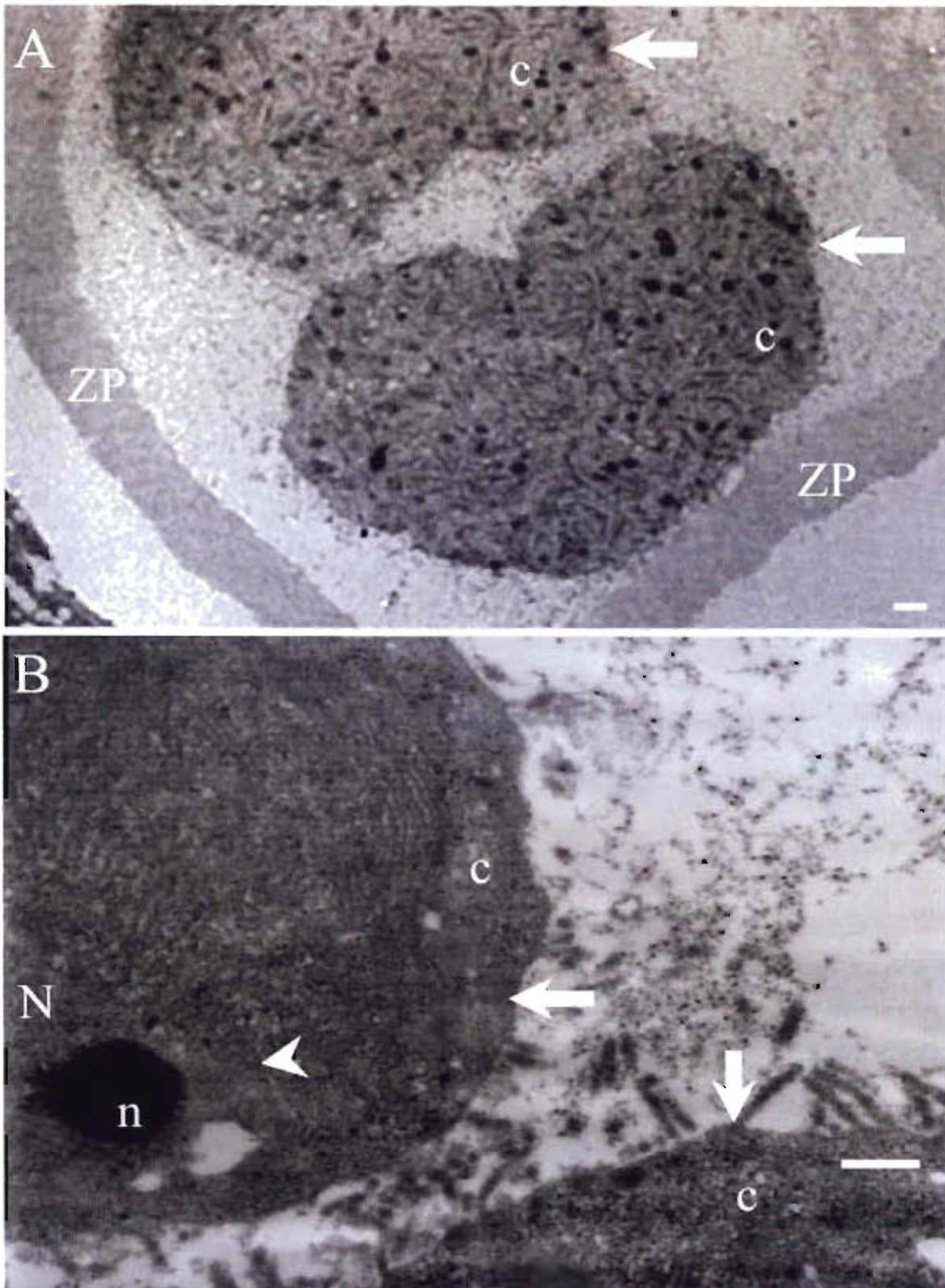


Imagen 34. Ovocitos pseudosegmentados de 25 días. A: ovocito a bajo aumento, la zona pelúcida (ZP) se ha desprendido del ovocito, el cual está dividido en dos (flechas). B: vista a mayor aumento de otro ovocito con dos secciones (flechas), en el de mayor tamaño se ve el núcleo con nucleolo muy compacto (punta de flecha). Tinción general con acetato de uranilo y citrato de plomo. c: citoplasma; N: núcleo, n: nucleolo. Barras: 500 nm

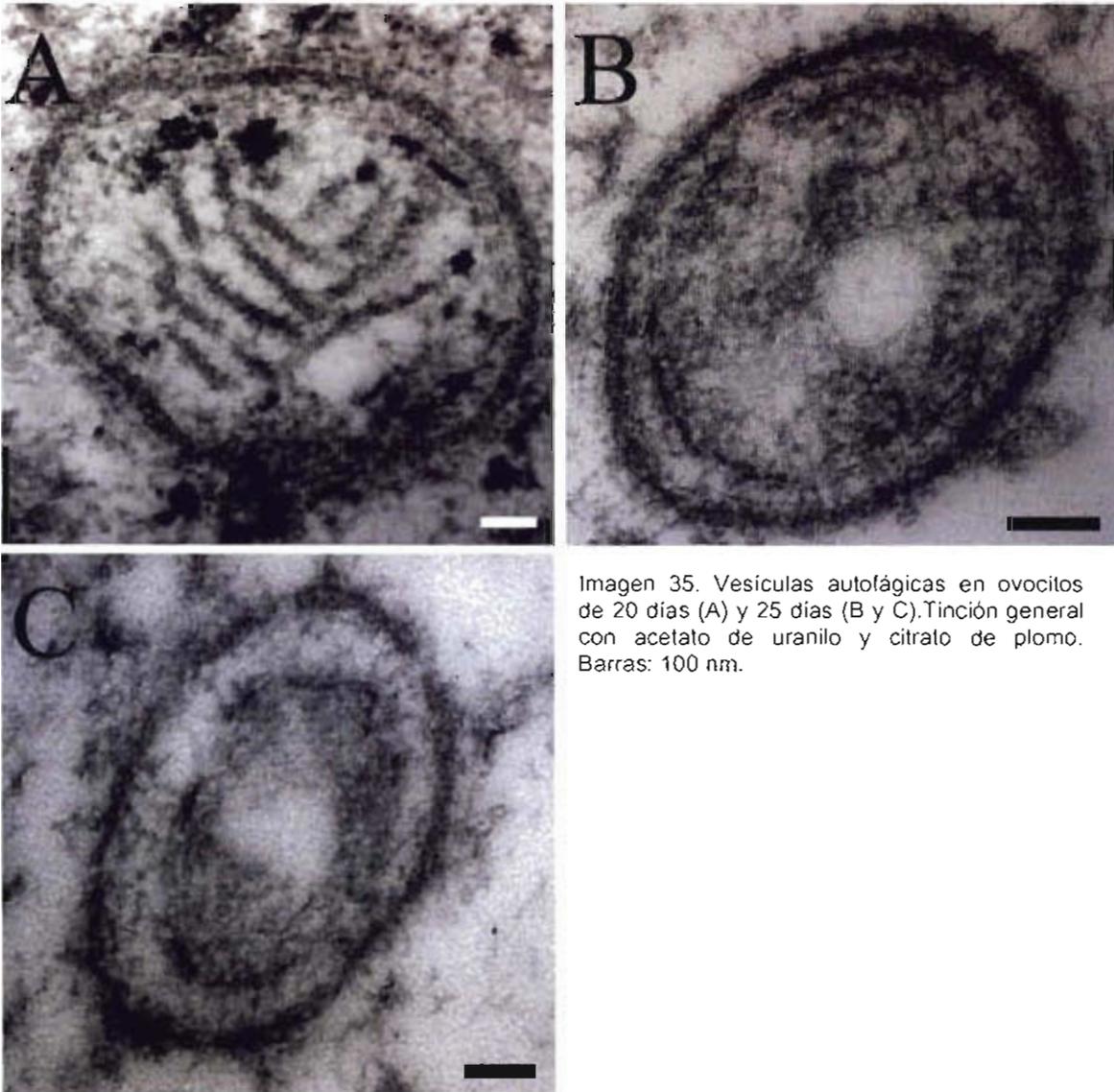


Imagen 35. Vesículas autofágicas en ovocitos de 20 días (A) y 25 días (B y C). Tinción general con acetato de uranilo y citrato de plomo. Barras: 100 nm.

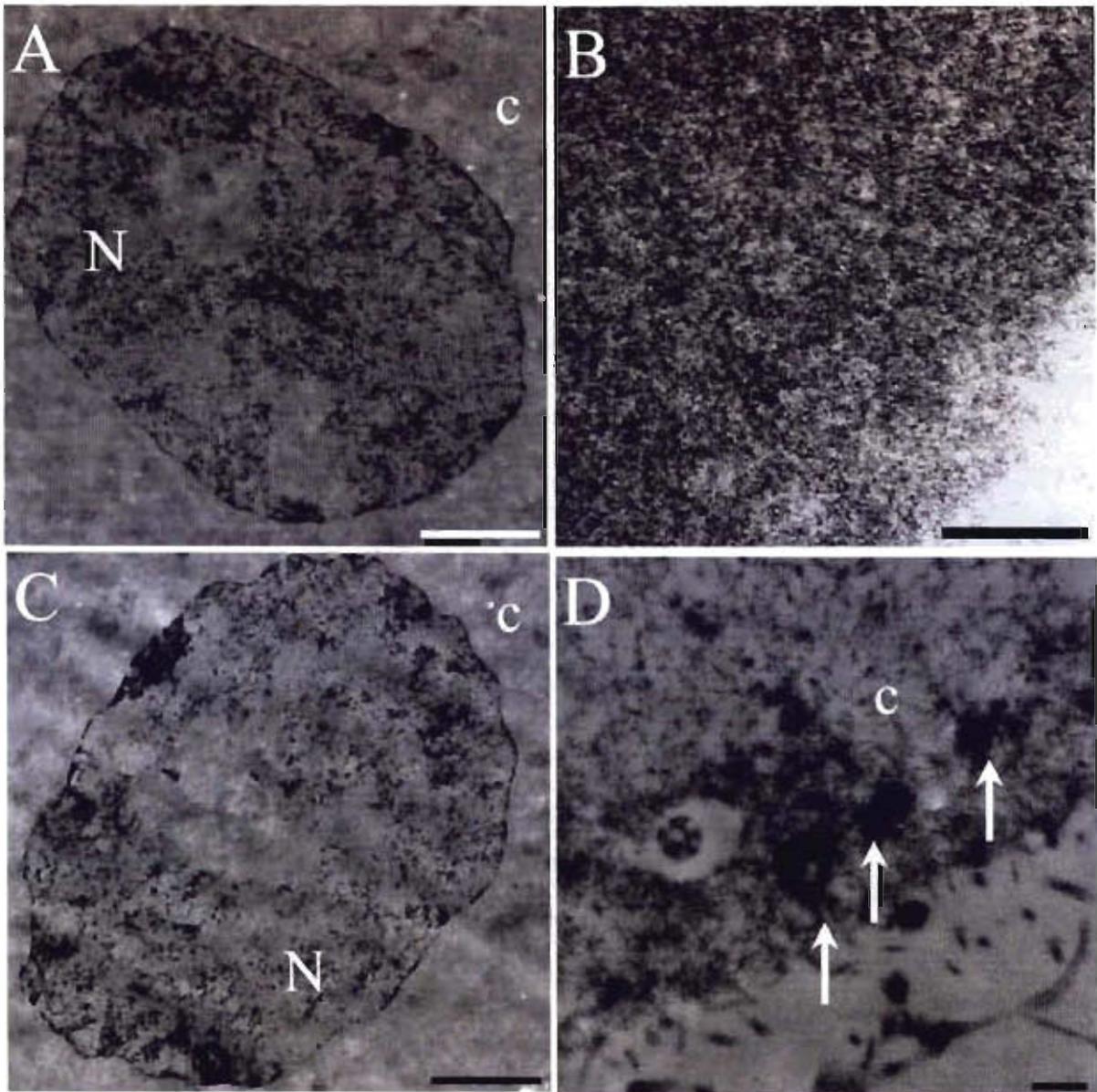
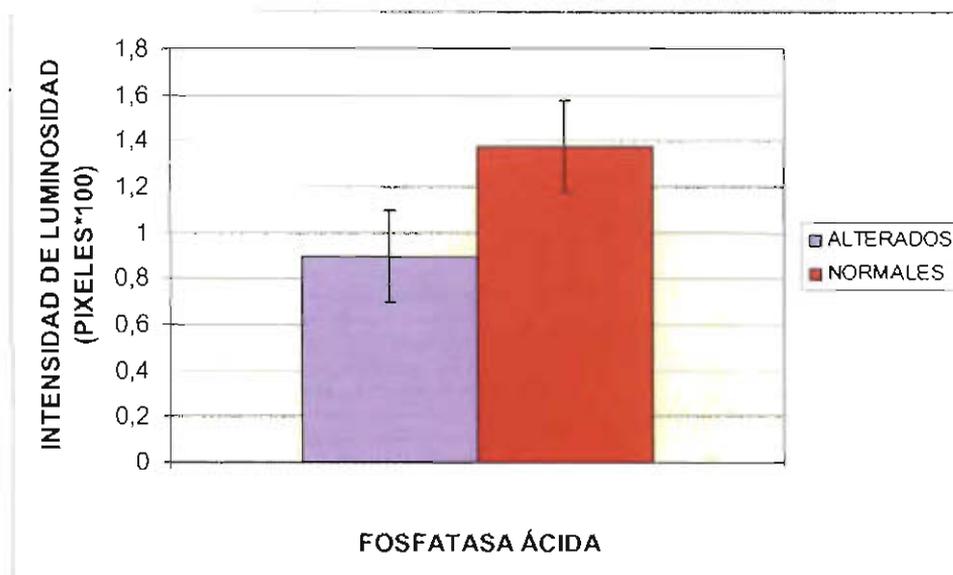


Imagen 36. Micrografías electrónicas de: A: 19 días, B, C y D: 28 días. Las imágenes A-C son ovocitos contrastados con la técnica específica para ADN amina de osmio. A y C muestran la cromatina contrastada; B: cromatina fragmentada de un cuerpo apoptótico de una célula de la granulosa. D: técnica de fosfatasa ácida, la imagen muestra los precipitados de plomo sobre los lisosomas (flechas). c: citoplasma, N: núcleo. Barras: A y C: 2 micras; B: 100 nm y D: 500 nm.

## ANÁLISIS CUANTITATIVO

Tomando en cuenta las características morfológicas de los ovocitos, se clasificaron de acuerdo a su nivel de alteración en normales o alterados, para poder cuantificar la intensidad de marcado de los ovocitos que presentaron lamp1 y fosfatasa ácida. Se analizaron 189 ovocitos de diferentes edades y por medio del programa PhotoShop SC, se hizo un análisis de la intensidad de luminosidad para fosfatasa ácida y de intensidad de fluorescencia para lamp1 en el área total de cada citoplasma.

Se observó que los ovocitos alterados tienen una mayor cantidad de precipitados de plomo (que indican fosfatasa ácida activa) que los normales, indicando una cantidad más alta de lisosomas en los ovocitos alterados, lo que provoca que el citoplasma sea más oscuro y por consecuencia la luminosidad disminuya en los ovocitos con mayor marca (gráfica 1).



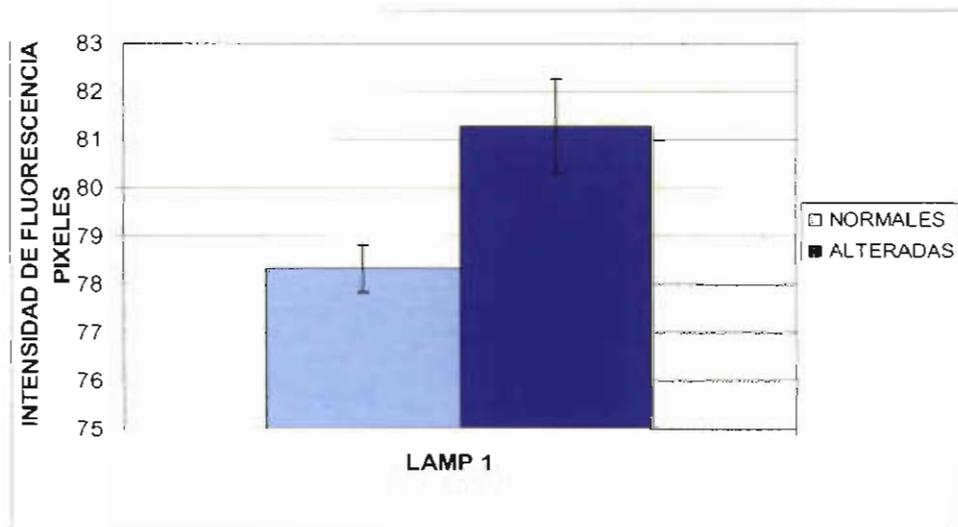
Gráfica 1. La intensidad de marcado mostrando a la fosfatasa ácida activa es significativamente menor en los ovocitos estructuralmente normales que en los alterados. Los ovocitos alterados tienen menor luminosidad que los normales, indicando una mayor cantidad de precipitado oscuro. Diferencia estadísticamente significativa. Comparación de las normales con las alteradas, analizadas por medio de una prueba de t ( $P < 0.05$ ),  $n=189$ ; barras: Desv. Standard.

La marca de lamp1 presente en los ovocitos alterados es significativamente mayor que en los ovocitos normales, indicando también una alta actividad lisosomal en los ovocitos en proceso de degeneración (gráfica 2).

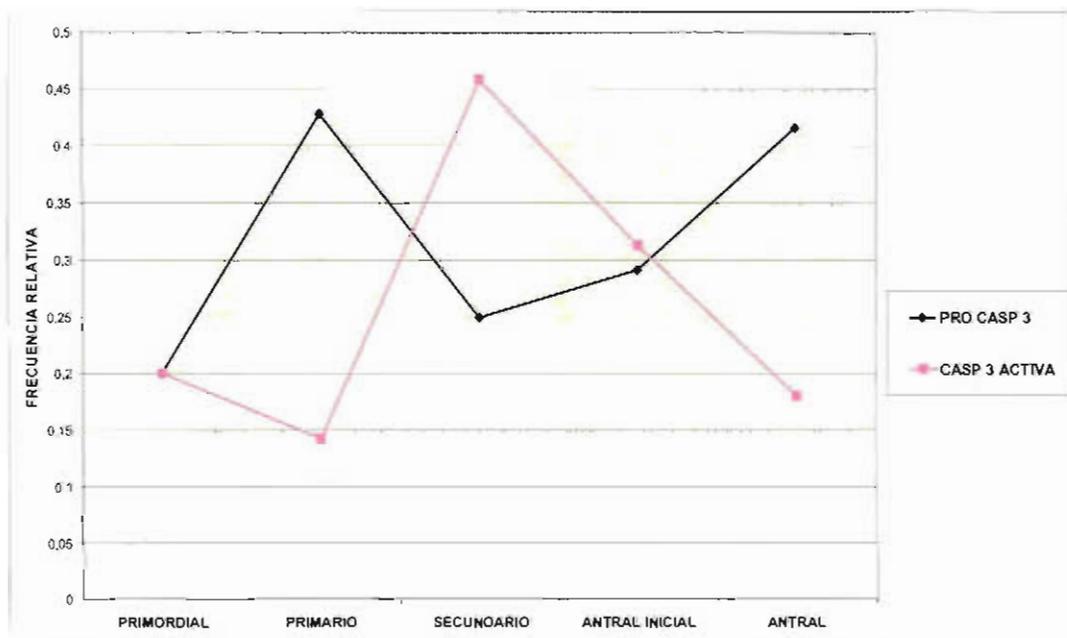
El 78% de la población total de aquellos en proceso de muerte, son positivos a más de una reacción y casi la mitad son positivos a tres diferentes marcadores de forma simultánea.

La expresión de la caspasa 3 activa y la pro-caspasa 3 (gráfica 3), mantienen una relación inversamente proporcional, ya que cuando la caspasa 3 activa se encuentra en su punto más

alto, la pro-caspasa 3 mantiene sus niveles más bajos. Esto indica que cuando la pro-caspasa está en los niveles más bajos, es porque ya ha pasado a su forma activa, lo cual se corrobora con el marcado incremento de caspasa 3 activa. Por otro lado, cuando la forma inactiva de la proteasa está en los niveles más bajos es debido a que aún no ha recibido la señal de activación, lo que es evidenciado por los bajos niveles de la caspasa 3 activa.



Gráfica 2. La intensidad de la señal de fluorescencia correspondiente a la inmunolocalización de lamp1 es mayor en los ovocitos alterados que en los normales. Diferencia estadísticamente significativa. Comparación de las normales con las alteradas, analizadas por medio de una prueba de t ( $P < 0.05$ ),  $n=189$ ; barras: Desv. S.



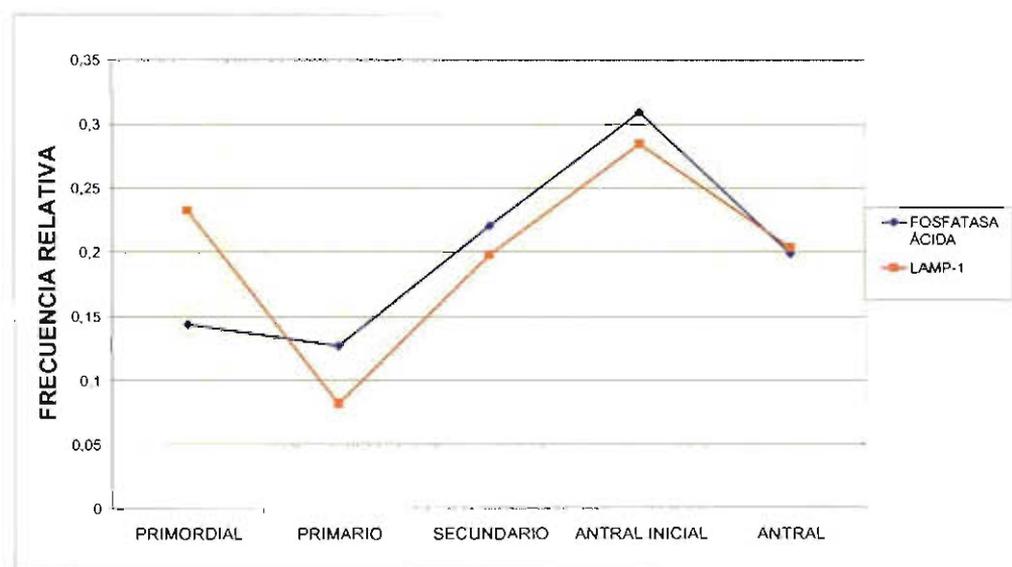
Gráfica 3. Los cambios de la frecuencia de pro-caspasa 3 y la de la caspasa 3 activa muestran una relación inversa en los diferentes tipos de ovocitos.

Al analizar las frecuencias relativas de los ovocitos que resultaron ser doblemente positivos a las diferentes proteínas detectadas y técnicas desarrolladas, ha sido evidente que la principal asociación está dada por los dos marcadores de autofagia lamp1 y fosfatasa ácida (tabla 2), poniendo de manifiesto que está involucrada la autofagia durante el proceso de eliminación de los ovocitos.

Tabla 2. Frecuencia relativa de la asociación de dos marcadores en la población de ovocitos doble positivos.

	Frecuencia Relativa
Lamp1-caspasa activa	0.119
Lamp1-fosfatasa ácida	0.595
Lamp1-TUNEL	0.095
Caspasa activa-fosf. ácida	0.095
Caspasa activa-TUNEL	0.024
Fosfatasa ácida-TUNEL	0.071

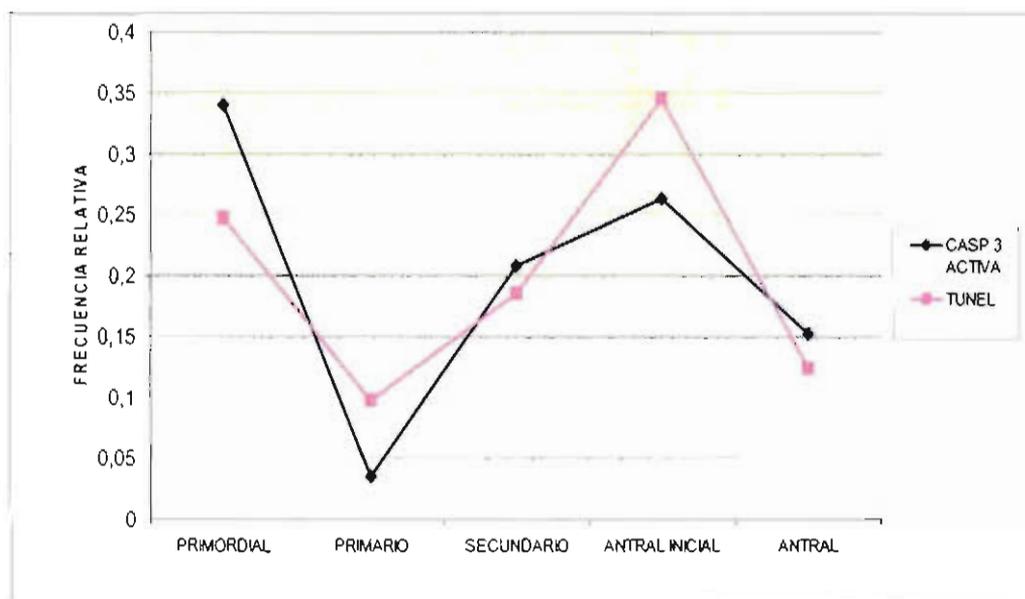
El comportamiento de la frecuencia relativa de la fosfatasa ácida y de lamp1, con respecto a la fase de desarrollo folicular, son paralelos, ya que ambos siguen la misma tendencia y manifiestan su máxima frecuencia en los ovocitos de folículos con antro inicial (gráfica 4).



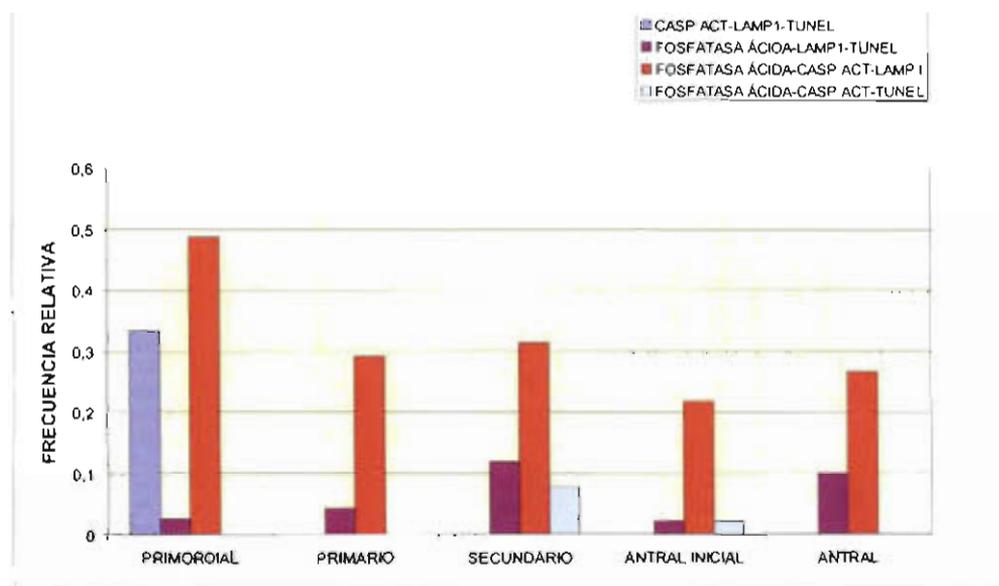
Gráfica 4. Frecuencia relativa de fosfatasa ácida y lamp1, los cambios son paralelos en los diferentes tipos de ovocitos.

La frecuencia relativa de los marcadores para el proceso de apoptosis: TUNEL y caspasa 3 activa, también tienen un comportamiento paralelo a lo largo del desarrollo folicular,

presentando sus picos máximos en los ovocitos de folículos primordiales y con anro inicial, la frecuencia más baja se encontró en los de folículos primarios (gráfica 5). Estos ovocitos también son los que tienen menor porcentaje de fosfatasa ácida y de lamp1, lo que demuestra una menor incidencia de muerte celular en ese grupo.



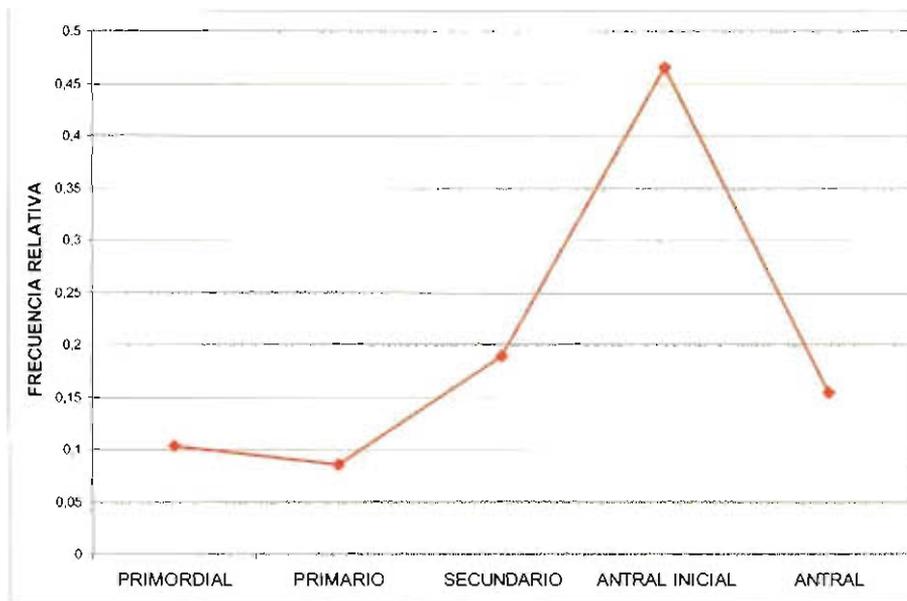
Gráfica 5. Las frecuencias de los dos marcadores de apoptosis son similares en cada grupo de ovocitos.



Gráfica 6. Cambios en la frecuencia de la presencia simultánea de los tres marcadores de muerte celular en diferentes tipos de ovocitos.

La triple asociación más frecuente está dada por caspasa 3 activa, fosfatasa ácida y lamp1, en cualquier fase de desarrollo folicular (gráfica 6). La triple asociación de caspasa 3 activa, TUNEL y lamp1 sólo se presentó en ovocitos de folículos primordiales.

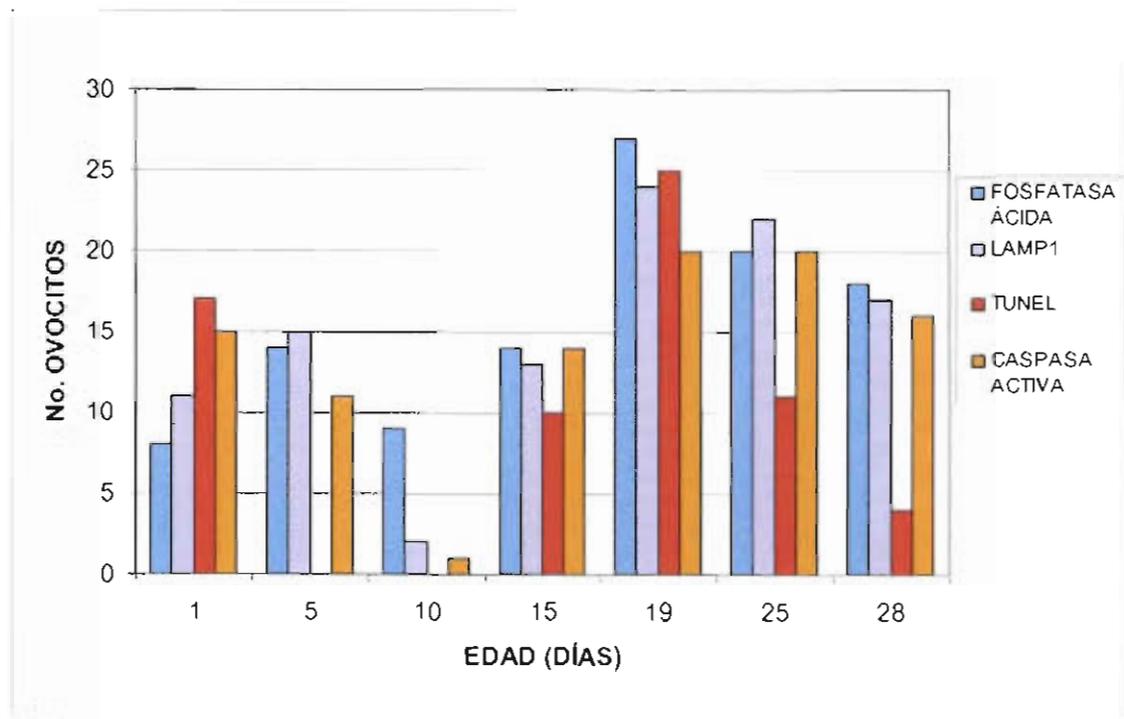
Los dos marcadores de autofagia y los dos de apoptosis, estuvieron presentes en ovocitos en proceso de muerte. Casi la mitad de los ovocitos en folículos de antro pequeño fueron positivos a los cuatro marcadores de forma simultánea. En otros tipos de folículos la frecuencia del marcado cuádruple es menor (gráfica 7).



Gráfica 7. Cambios en la frecuencia de TUNEL, caspasa 3 activa, lamp1 y fosfatasa ácida en el mismo ovocito en diferentes tipos de folículos.

Los marcadores de autofagia y apoptosis varían a lo largo del periodo estudiado, ya que en los ovocitos de ovarios de un día es característica la presencia de altos niveles de indicadores de apoptosis como la caspasa 3 activa y TUNEL (gráfica 8). La frecuencia de TUNEL, disminuye rápidamente y no está presente en ovocitos de 5 y 10 días, en los cuales la fosfatasa ácida activa y lamp1 son más frecuentes. Sin embargo, en los ovocitos de estas edades también puede haber un cierto número de ovocitos con caspasa 3 activa. A los 15 días los marcadores están presentes en cantidades moderadas. En ovarios de 19 días una gran cantidad de ovocitos en proceso de degeneración son positivos a caspasa 3 activa y a TUNEL. En 25 y 28 días la señal de TUNEL disminuye, pero no la de caspasa 3 activa. En los ovocitos de estas edades las marcas predominantes son las de lamp1 y fosfatasa ácida.

Una reacción que siempre está presente en los ovocitos en proceso de degeneración es la fosfatasa ácida.



Gráfica 8. Ovocitos positivos a lamp1, fosfatasa ácida, TUNEL y caspasa 3 activa en las diferentes edades estudiadas.

## FASE 2. ENSAYOS *IN VITRO*

La inmunodetección del antígeno VASA con el anticuerpo anti-VASA, para identificar células post-migratorias, en las fracciones celulares obtenidas por medio de disgregación enzimática del ovario y cultivo celular, fueron en su mayoría positivas al anticuerpo VASA (imagen 37).

La morfología que presentaron las células germinales fue la clásica forma esférica de los ovocitos; las células germinales también se distinguieron por la no adherencia al plato de cultivo, a diferencia de las células somáticas que forman una monocapa en el fondo de la caja.

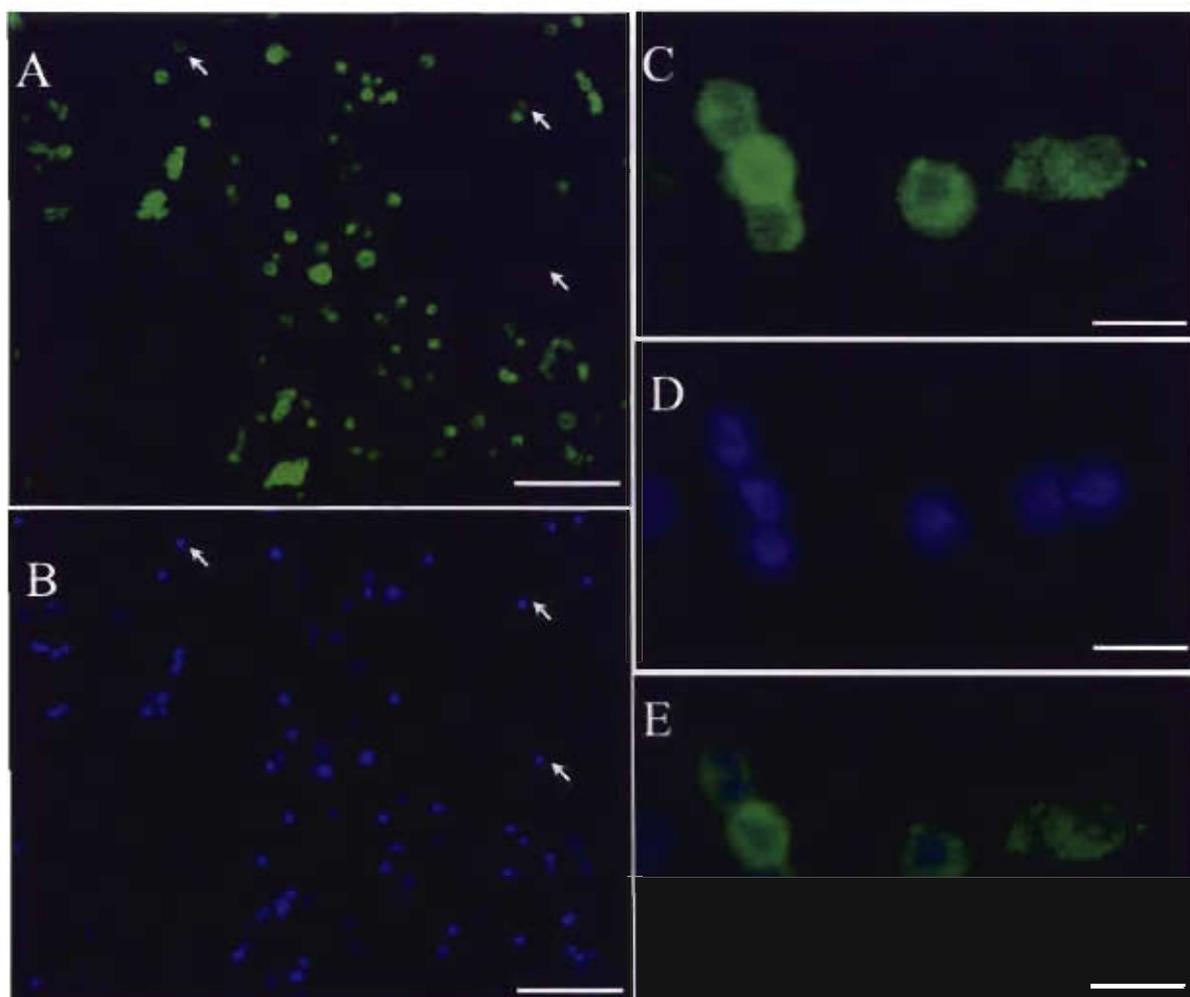


Imagen 37. Inmunodetección de VASA. A y C: VASA; B y D: DAPI; E: sobreposición. Las flechas indican células negativas a la técnica. C-E vista aumentada de células positivas a VASA. La marca fluorescente sólo se encuentra en el citoplasma, excluyéndose en el núcleo (E). Barras: A y B 50  $\mu\text{m}$ ; C, D y E 10  $\mu\text{m}$ .

En las diferentes edades analizadas, hay diversos tamaños de ovocitos, lo cual es concordante con el hecho de que en los ovarios existen folículos en diferente etapa de desarrollo, lo que influye en el tamaño del ovocito. En la edad de 1 día, los ovocitos, presentan un tamaño muy homogéneo, ya que en los ovarios de esta edad, sólo hay ovocitos primordiales o desnudos, el núcleo es grande con respecto al citoplasma. A esta edad, hay pocas células somáticas, por lo que en el plato de cultivo se observan pocas células adheridas. A los 5 días, hay ovocitos de diferentes tamaños y el volumen citoplasmático aumenta con respecto al tamaño de los de 1 día, hay un incremento en la cantidad de células somáticas, que es evidenciado por la población de células adheridas al plato de cultivo. A los 19 y 28 días hay ovocitos de diversos tamaños, los mayores de ellos poseen un enorme volumen citoplasmático con respecto al núcleo. Las células somáticas son muy numerosas y están adheridas al plato de cultivo (imagen 38).

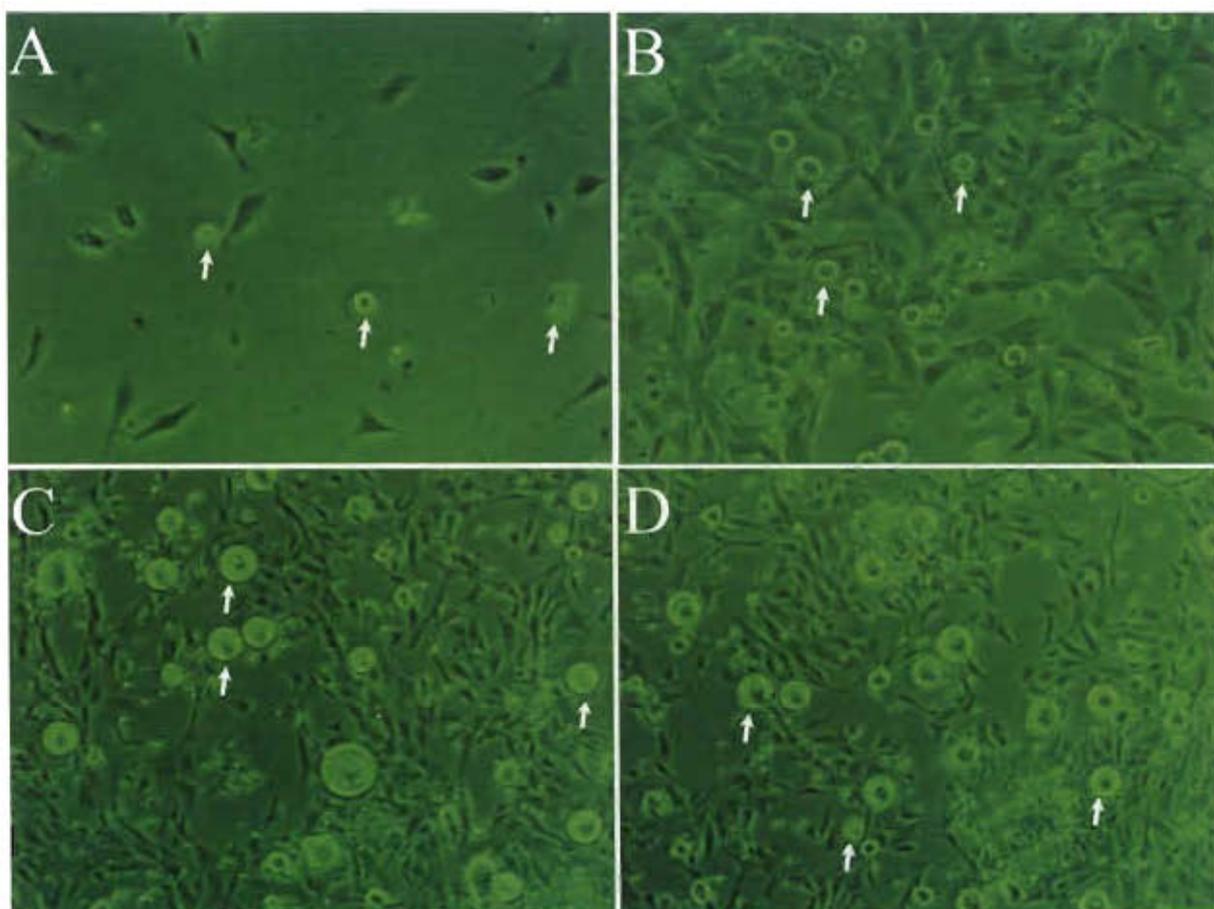


Imagen 38. Ovocitos observados en las cajas de cultivo, las células somáticas están adheridas al fondo y se observan de forma extendida. Los ovocitos en cambio (flechas) son completamente esféricos y no se adhieren a la caja. (A) ovocitos de rata de 1 día, (B) 5 días, (C) 19 días y (D) 28 días.

Para realizar la técnica de RT-PCR los ovocitos se aislaron por medio de un micro manipulador con micropuntas de vidrio de diámetros variables entre 30 y 200  $\mu\text{m}$  (imagen 39).

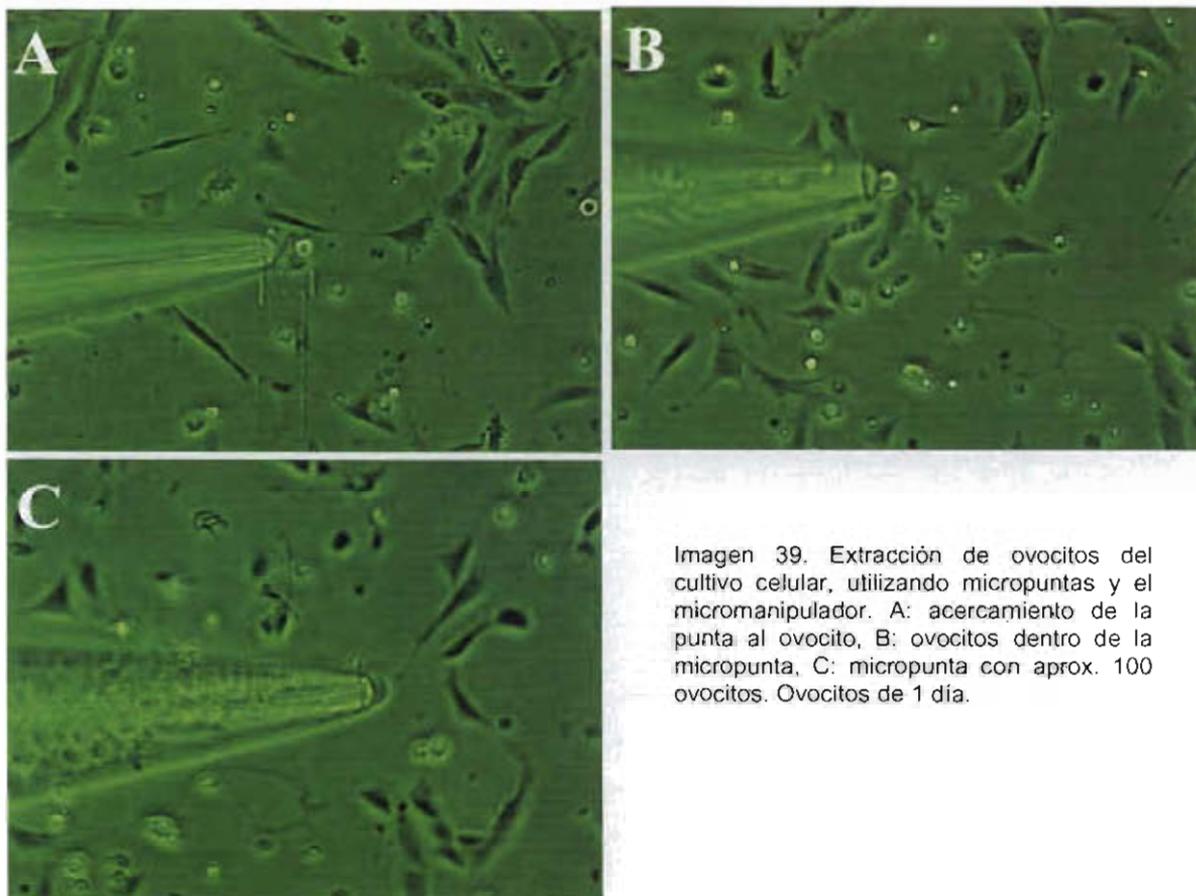


Imagen 39. Extracción de ovocitos del cultivo celular, utilizando micropuntas y el micromanipulador. A: acercamiento de la punta al ovocito, B: ovocitos dentro de la micropunta, C: micropunta con aprox. 100 ovocitos. Ovocitos de 1 día.

### Anexina-V

La identificación de la Anexina-V marcada con FITC, incorporada a la fosfatidilserina externalizada en la membrana citoplasmática de los ovocitos, se realizó empleando un microscopio confocal Leica.

En este ensayo, se utilizó el yoduro de propidio que es un colorante supravital que penetra únicamente a las células muertas, de tal forma que la incorporación de Anexina-V sin tinción nuclear con yoduro de propidio, fue la indicación de que las células estaban vivas. Las células con yoduro de propidio y Anexina-V, se definieron como muertas, por lo que no fueron tomadas en cuenta para el análisis. La técnica nos permitió identificar a las células con marcado verde, que ya han iniciado su proceso de eliminación por medio de la apoptosis.

La imagen 40 muestra a los ovocitos en las diferentes edades con la marca de Anexina-V únicamente en la membrana citoplasmática.

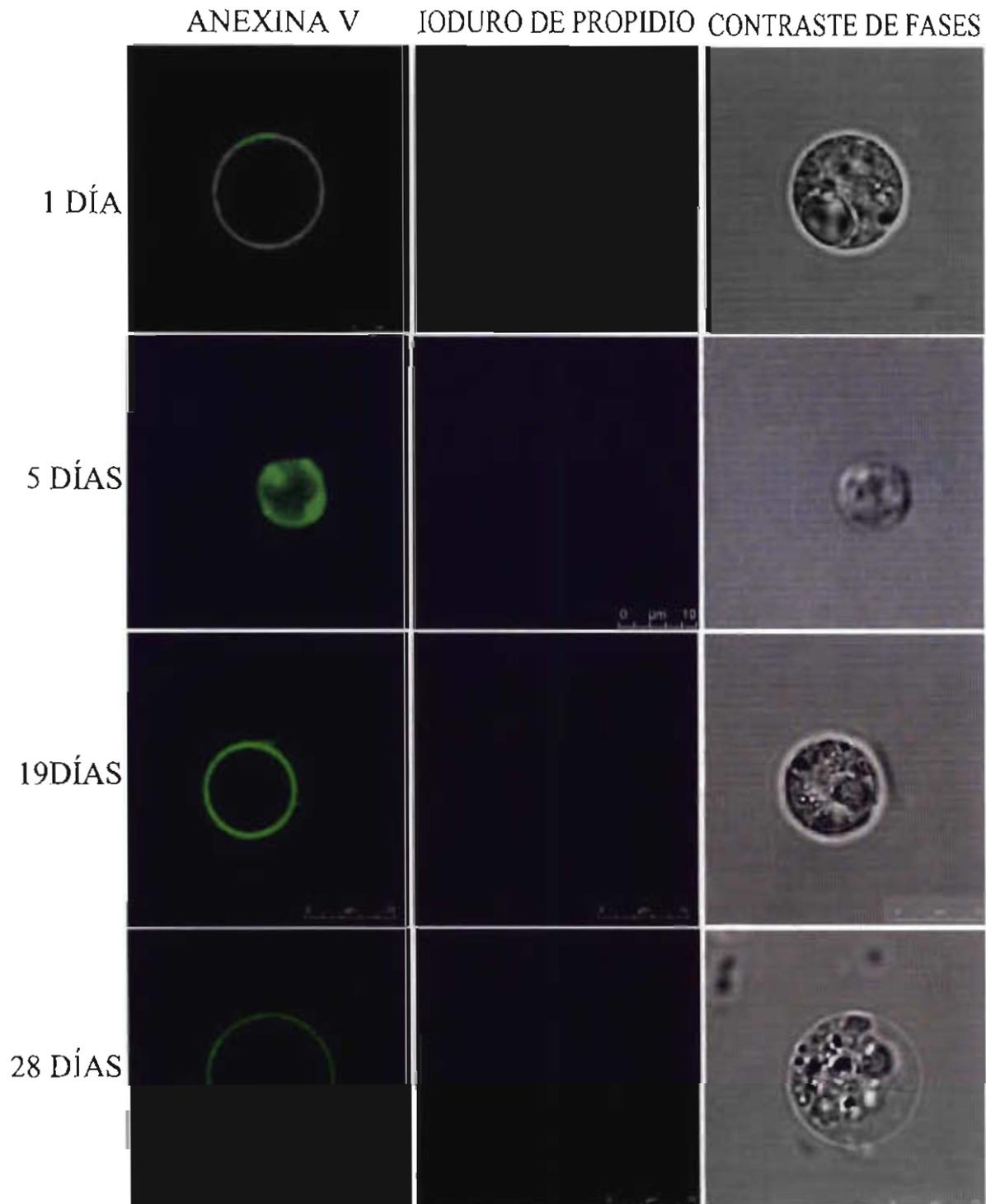
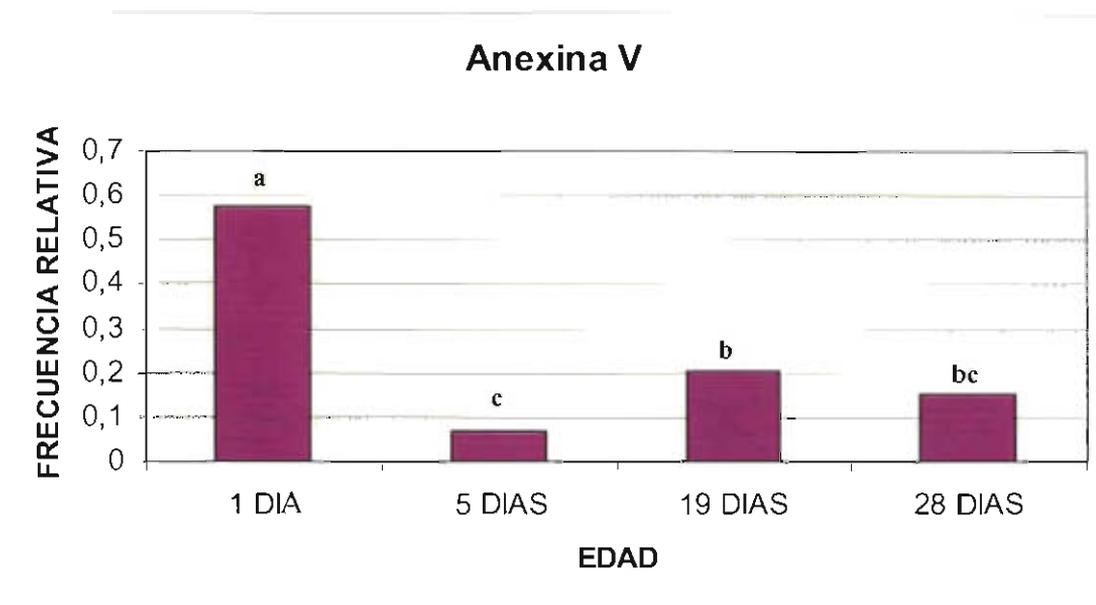


Imagen 40. Detección de fosfatidilserina externalizada, en ovocitos de diferentes edades. La Anexina-V acoplada con FITC, se encuentra unida a la membrana citoplasmática de los ovocitos que ya han iniciado el proceso de apoptosis, las células son negativas a ioduro de propidio. A la edad de 5 días, difícilmente se encuentran ovocitos con marcado de Anexina-V la marca se encuentra en la periferia del citoplasma.

La frecuencia relativa de ovocitos positivos a la Anexina-V varía de acuerdo a la edad, siendo menos frecuente encontrar células positivas a la edad de 5 días. A esta edad la frecuencia relativa es de 0.06, la cual es inferior con respecto a las edades de 1 y 19 días (gráfica 1). La frecuencia relativa más alta es a la edad de 1 día con respecto a todas las edades (prueba de ANDEVA).



Gráfica 1. Frecuencia relativa de células positivas a la incorporación de Anexina-V. Los ovocitos con mayor frecuencia con respecto a las demás edades son los de 1 día (**a** vs. **b**, **c** y **bc**;  $P < 0.05$ ). Los ovocitos de 5 días tienen una frecuencia menor que los ovocitos de las edades de 1 y 19 días (**c** vs. **a** y **b**;  $P < 0.05$ ) Prueba de ANDEVA.

#### Monodansilcadaverina (MDC).

El ensayo de incorporación de monodansilcadaverina a los lisosomas y autofagolisosomas de ovocitos aislados, permitió observar diferentes patrones de intensidad de distribución del compuesto en el espacio citoplasmático. Las células tienen diferentes patrones de intensidad de marcado con monodansilcadaverina como se observa en la imagen 41. En algunos ovocitos, la marca es más intensa indicando una mayor actividad lisosomal (imagen 41E, 41F, 41J, 41L).

La frecuencia relativa de ovocitos con marca de monodansilcadaverina es similar en todas las edades, aunque a la edad de 5 días la frecuencia es ligeramente mayor, la diferencia no es significativa de acuerdo a la prueba estadística ANDEVA (gráfica 2).

### Anexina-V/Monodansilcadaverina

Con el fin de identificar ambos marcadores de los dos procesos de muerte celular que estamos analizando (apoptosis y autofagia) en una misma célula, se diseñó un ensayo en donde se incorporaron ambos marcadores al mismo tiempo. Los resultados obtenidos con este ensayo, indican que una célula puede tener ambos marcadores al mismo tiempo. Algunas células son positivas sólo a alguna de las técnicas (imagen 42).

Estos resultados no son distintivos para alguna edad en particular, pues los dos eventos se localizan a cualquier edad y en ovocitos de diversos tamaños (gráfica 3).

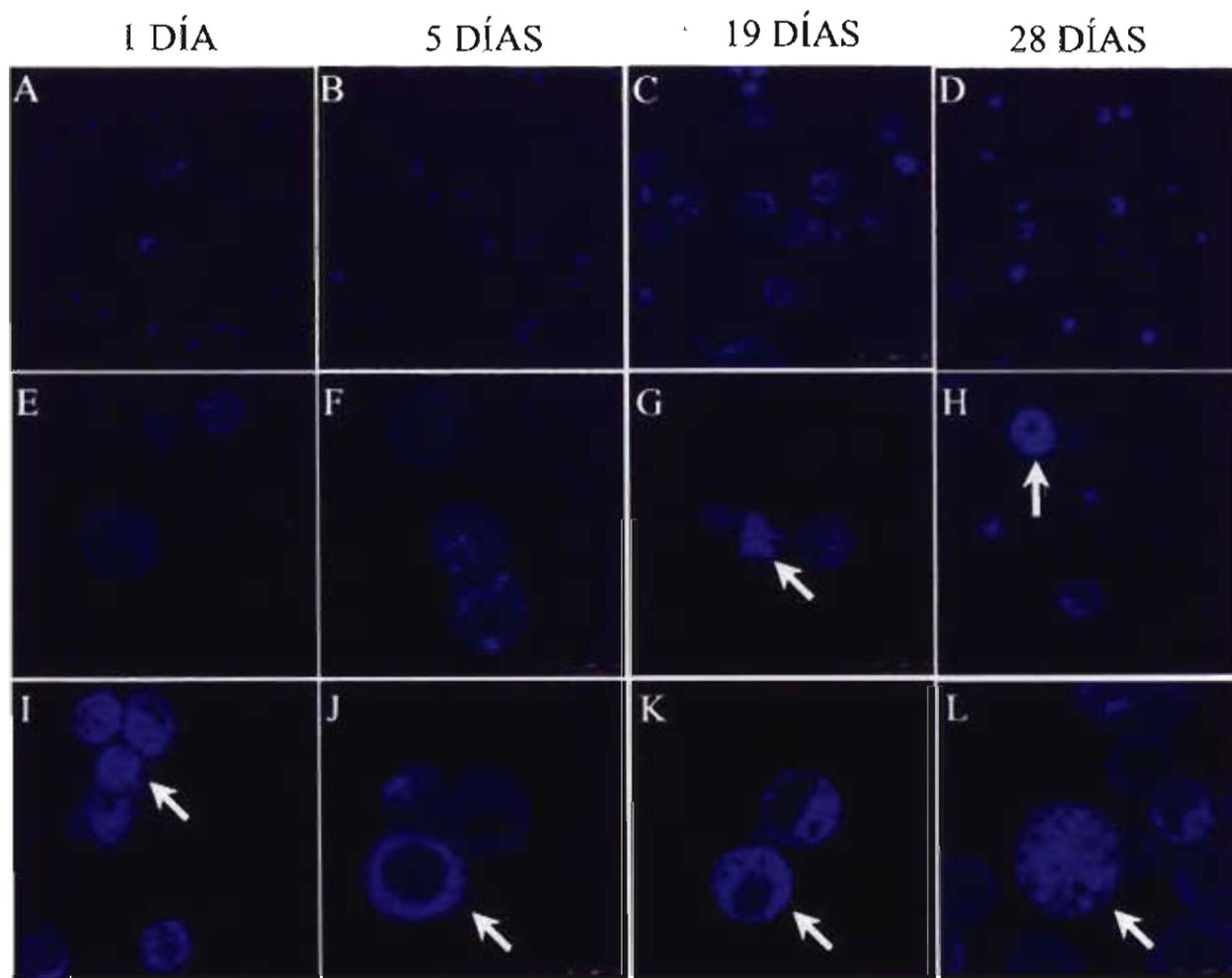
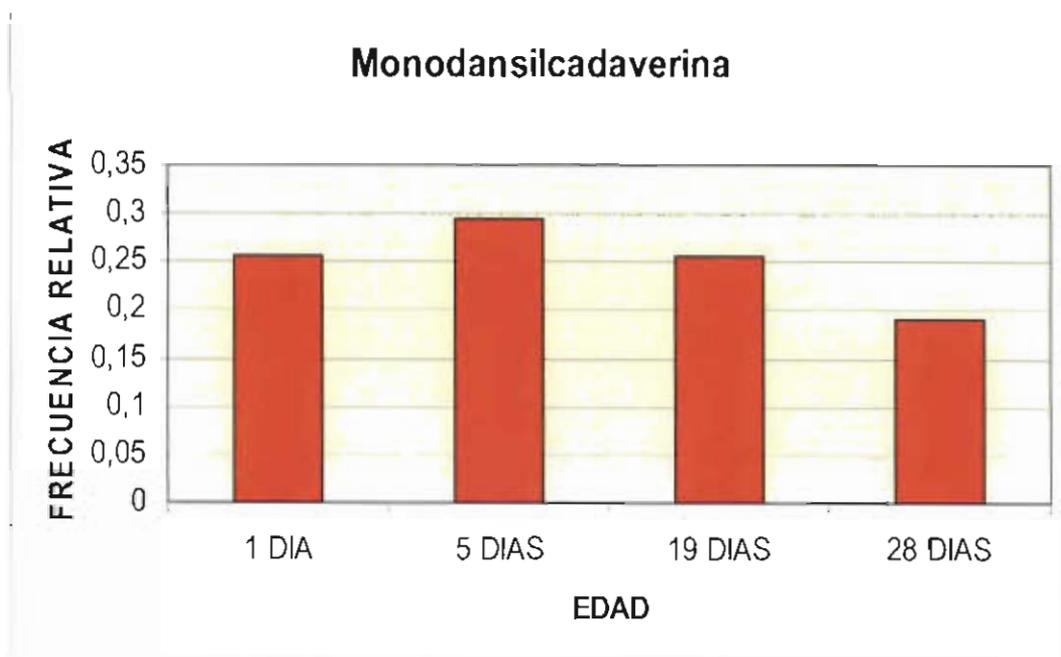


Imagen 41. Identificación de lisosomas y autofagosomas por medio de la monodansilcadaverina en ovocitos de 1, 5, 19 y 28 días de edad. A: la marca del compuesto es de menor intensidad que en otras edades. B: La incidencia de marcado es similar que a 1 día de edad, algunos ovocitos presentan mayor cantidad de marcado. C y D: una gran cantidad de ovocitos tienen mayor incorporación de la sustancia, indicando una alta actividad lisosomal y autofágica. Las flechas indican a los ovocitos que tienen mayor intensidad de marcado.



Gráfica 2. Frecuencia relativa de células positivas al compuesto monodansilcadaverina. No hay diferencia estadísticamente significativa. Prueba ANDEVA ( $P < 0.05$ ).

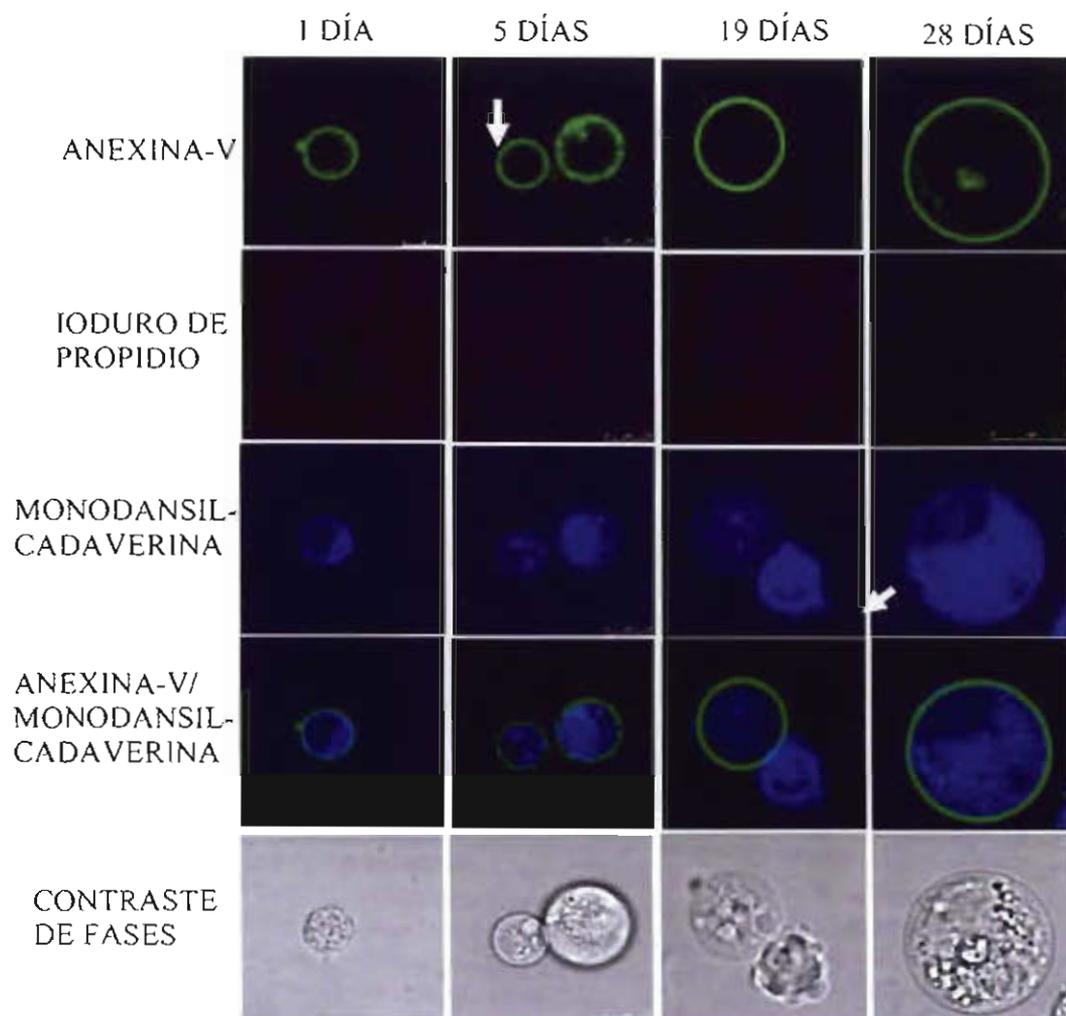
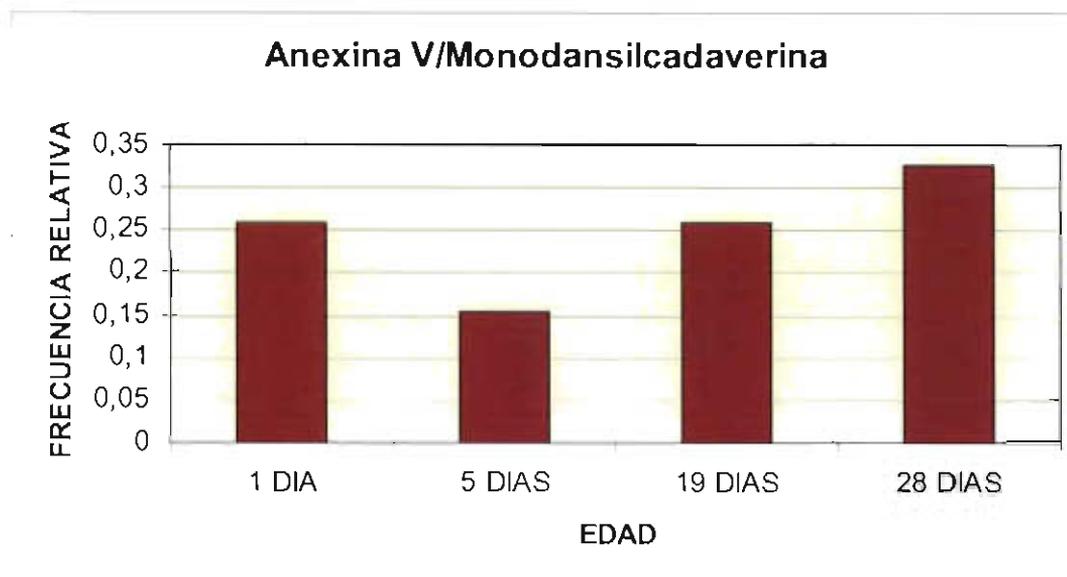


Imagen 42. Anexina-V (verde) y monodansilcadaverina (azul). La mayoría de los ovocitos son positivos a ambos marcadores, sin embargo también se encuentran algunos que lo son solamente a una de las marcas (flechas). La hilera de sobreposición de las imágenes, permite apreciar que ambas marcas coinciden. Todas las células son negativas al yoduro de propidio.



Gráfica 3. Frecuencia relativa de ovocitos positivos de forma simultánea a Anexina-V y a monodansilcadaverina. No hay diferencia estadísticamente significativa. Prueba estadística ANDEVA ( $P < 0.05$ ).

#### Electroforesis de ADN.

La técnica bioquímica de electroforesis para ADN en geles de agarosa, permite detectar el ADN fragmentado, evento clásico del proceso de apoptosis.

Nuestros resultados del ADN fragmentado de ovocitos por medio de la electroforesis en gel de agarosa, indica que en las edades de 1, 19 y 28 días, hay una ruptura de ADN en fragmentos de aproximadamente 180-200 pares de bases, denotando la clásica “escalera de la muerte” propia del proceso apoptótico (imagen 43).

El corrimiento del ADN obtenido de ovocitos de ovarios de rata de 5 días no presenta fragmentación, evidenciando que el proceso de apoptosis no es el principal actor en la ejecución de muerte de estas células, lo que coincide con la baja frecuencia de ovocitos positivos a la Anexina-V.

#### RT-PCR

Los resultados indican la expresión de los tres genes involucrados en los procesos de apoptosis y autofagia, en las edades de 5, 19 y 28 días (imagen 44). En las muestras de la edad de 1 día, se amplificó durante 40 ciclos para lograr la amplificación del gen Lc3 (imagen 45).

Se verificó que la secuencia de los segmentos amplificados correspondiera a la secuencia que construimos, para lo que se purificaron los productos de PCR y se enviaron a secuenciar (imagen 46). La secuenciación corresponde a los genes que identificamos.

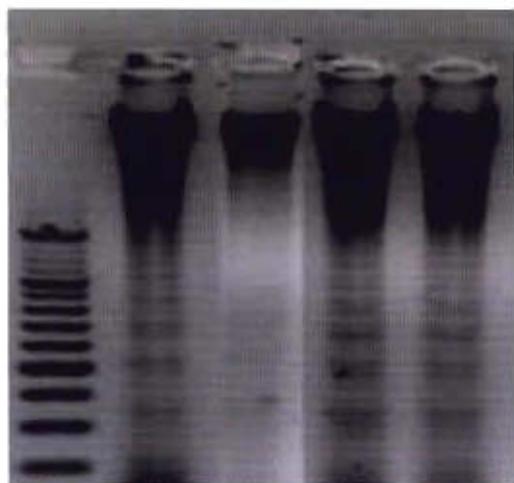
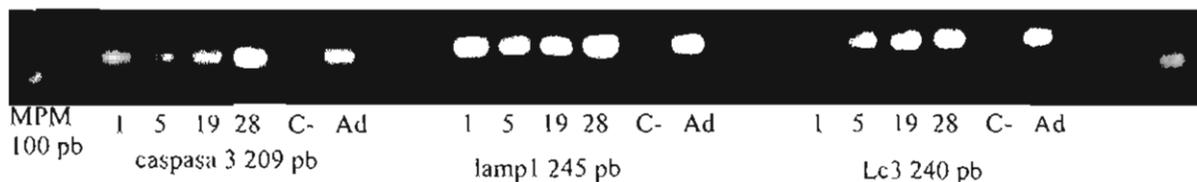


imagen 43. Electroforesis de ADN en gel de agarosa al 2%, con bromuro de etidio. ADN de fracciones enriquecidas de ovocitos de 1, 5, 19 y 28 días.

A



B



Imagen 44. A) Productos de PCR de los genes caspasa 3, lamp1 y Lc3 en las edades de 1, 5, 19 y 28 días. El carril C- indica el control negativo de la técnica, Ad es muestra de un ovario completo de rata adulta. Se puede observar la expresión de todos los genes mencionados en las edades de 5, 19 y 28 días, ya que en los ovocitos de 1 día sólo se observa a caspasa 3 y lamp1. Estos resultados son obtenidos por medio de 30 ciclos de amplificación. B) Productos de PCR del gen  $\beta$ -actina.

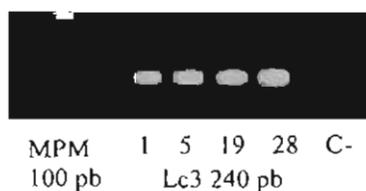


Imagen 45. Productos de PCR del gen Lc3 en ovocitos de 1, 5 19 y 28 días. Se puede observar la expresión de los genes por medio de 40 ciclos de amplificación.

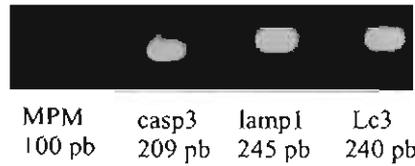


Imagen 46. Productos de PCR purificados, preparados para enviarse a secuenciar.

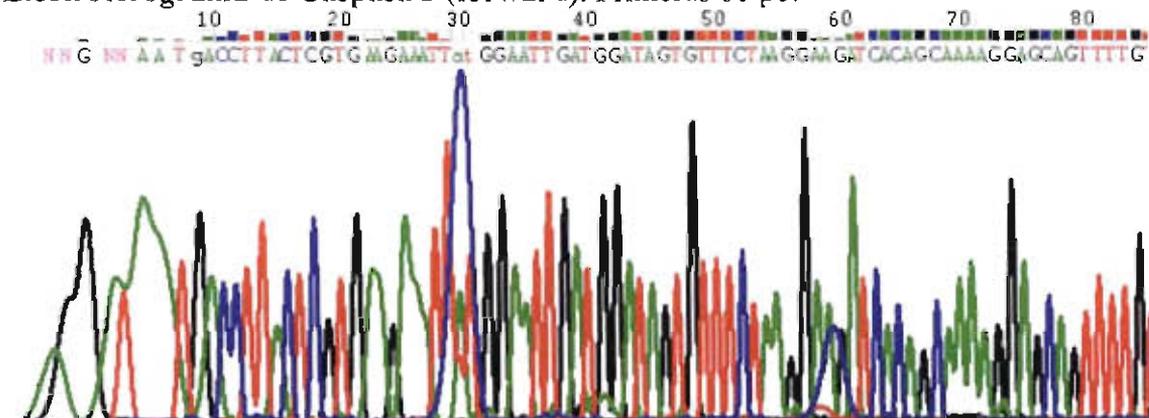
## SECUENCIACIÓN DE PRODUCTOS DE PCR

Los productos de PCR para los genes de Caspasa 3, lamp1 y Lc3 se secuenciaron y se hizo una alineación por medio del programa BLAST, para analizar la homología de los productos de PCR con la secuencia reportada por el *GenBank*. La secuencia de los productos de PCR pertenece a las secuencias reportadas para los genes de Caspasa 3, lamp1 y Lc3.

### Secuencia de Caspasa 3 (forward)

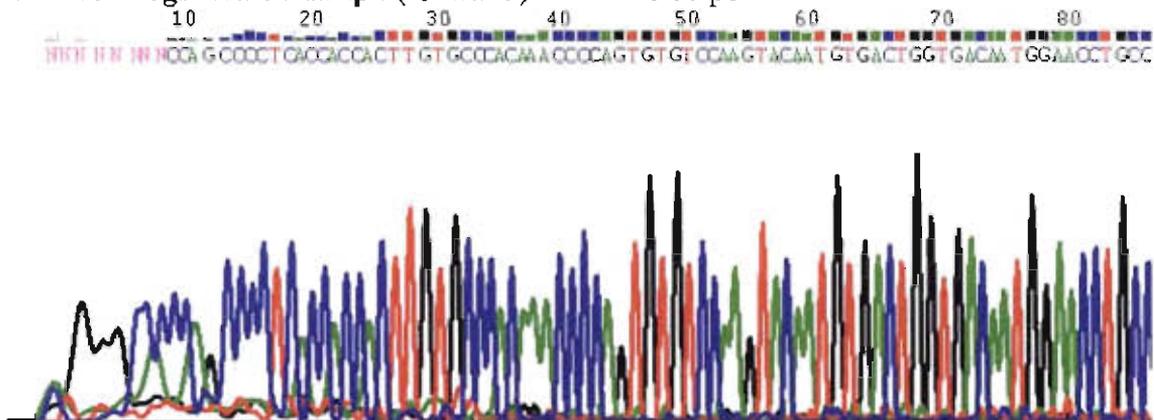
NNGNNAATgACCTTACTCGTGAAGAAATTatGGAATTGATGGATAGTGTTTCTAA  
GGAAGATCACAGCAAAGGAGCAGTTTTGTGTGTGTGATTCTAAGTCATGGAG  
ATGAAGGAGTAATTTTTGGAACGAACGGACCTGTGGACCTGAAAAACTAACT  
AGTTTCTTCAGAGGCGACTACTGCCA

### Electroferograma de Caspasa 3 (forward). Primeras 80 pb.

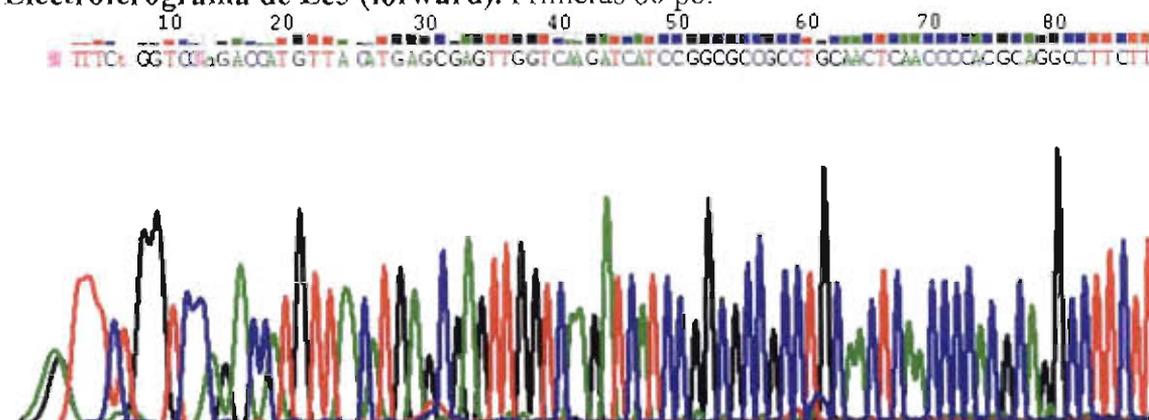


**Secuencia de lamp1 (forward)**

NNNNNNNNCCAGCCCCTCACCACCACTTGTGCCACAAACCCAGTGTGTCCA  
 AGTACAATGTGACTGGTGACAATGGAACCTGCCTGCTGGCCTCTATGGCACTGC  
 AACTCAACATCACCTACATGAAGAAGGACAACACGACTGTGACCAGAGCATTC  
 AACATCAACCCAAGTGACAAATATAGTGGGACTTGCGGTGCCCAGTTGGTGAC  
 CCTGAAGGTGANTTNNNNNNNAGCNNAGTCTNNGAGCTGCNTTTGGGAAAGNT  
 GANCCTANNNGGNNNNN

**Electroferograma de lamp1 (forward). Primeras 80 pb.****Secuencia de Lc3 (forward).**

NNTTTCGGTCCNaGACCATGTTACATGAGCGAGTTGGTCAAGATCATCCGGCG  
 CCGCCTGCAACTCAACCCACGCAGGCCTTCTTCTGCTGGTGAACCAGCACAG  
 CATGGTGAGTGTATCCACACCCATCGCTGACATCTATGAACAGGAGAAGGATG  
 AAGACGGATTCTCTACATGGTCTATGCCTCCCAAGAAACCTTCNNNNTCTGAG  
 TCAA

**Electroferograma de Lc3 (forward). Primeras 80 pb.**

## ANALISIS DE RESULTADOS.

Los cortes seriados de parafina, muestran que en los ovarios de ratas de 1 día de nacidas, tienen folículos primordiales que son positivos a pro-caspasa 3 y a TUNEL, pero no lo son a lamp1, indicando que el principal proceso que se lleva a cabo para la eliminación de las células germinales después de nacer, es la apoptosis, ya que la pro-caspasa 3 (114) y TUNEL, son pruebas para identificar el proceso. A este respecto, existen una gran cantidad de evidencias de que la caspasa 3 es el ejecutor principal de la muerte celular programada en el ovario. Por ejemplo, hay una relación directa entre la expresión de caspasa 3 y la apoptosis en las células de la granulosa en el ovario de ratas (132), por lo que la caspasa 3 es necesaria para la progresión de la muerte celular programada en células de la granulosa durante la atresia folicular.

A los 5 días los ovarios presentan folículos primordiales y primarios; en los folículos primarios, las células de la granulosa, empiezan a tomar su clásica forma cúbica. A ésta edad, los ovocitos son positivos a dos reacciones: a pro-caspasa 3/TUNEL y otros a pro-caspasa 3/lamp1. Lamp1 es una glicoproteína de membrana de lisosomas lo que la hace un buen indicador de alta actividad y/o presencia lisosomal. La doble reacción positiva a lamp1/pro-caspasa 3 indica que a partir de los 5 días, en los ovocitos se puede estar llevando a cabo el proceso de autofagia al mismo tiempo que el de apoptosis. Lo mismo sucede a los 10 días, ya que se pueden observar ovocitos en folículos primordiales, primarios y secundarios, los cuales son doblemente positivos a lamp1/pro-caspasa 3. En esta edad, la baja o nula presencia de ADN fragmentado evidenciado por TUNEL, indica que aunque se presenten proteínas pro-apoptóticas y pro-autofágicas, la apoptosis no avanza hasta su etapa final que es la formación de cuerpos apoptóticos. A las edades de 15 a 28 días la reacción positiva con lamp1-pro-caspasa 3-TUNEL, indica que la apoptosis y la autofagia, se pueden estar llevando a cabo en diferentes edades del organismo y en diferentes etapas de desarrollo folicular. A este respecto, se han realizado estudios en ovarios de aves, proporcionando evidencias que indican que en el proceso de atresia folicular puede estar participando más de un tipo de muerte celular, ya que en células de la granulosa se identificó la coexistencia de la apoptosis, autofagia y necrosis (79); en el citado trabajo, los eventos de muerte se identificaron en diferentes células, ya sea que una

estaba en apoptosis y la otra en autofagia, pero no se hizo el estudio en una misma célula para definir si se llevaban a cabo de forma simultánea.

Las caspasas son sintetizadas como pro-enzimas inactivas, denominadas pro-caspasas, que, una vez activadas por proteólisis limitada y asociación de subunidades (96), adquieren la actividad catalítica para proteolizar a su vez a sus sustratos (198) y siendo la caspasa 3 una ejecutora, es importante conocerla en su estado activo. Los datos obtenidos indican que dentro de las dobles inmunolocalizaciones en una misma célula, la mayor frecuencia está dada por la lampl-caspasa 3 activa y lampl-pro-caspasa 3, confirmando la participación simultánea de ambos procesos: apoptosis y autofagia en una misma célula.

Hemos visto la presencia de un nucleolo altamente compacto en varios ovocitos en los diferentes tipos foliculares, que es simultáneamente positivo a diferentes inmunodetecciones realizadas. El nucleolo es un organelo de gran importancia para su desarrollo y puede servir como un marcador morfológico que indica el fin del crecimiento del ovocito, En éste la inactivación del nucleolo coincide con la adquisición de la capacidad para iniciar la segunda división meiótica, un parámetro que puede ser de importancia para la maduración del ovocito *in vitro* (145).

Las alteraciones nucleolares aquí observadas, indican la presencia de proteínas localizadas normalmente en el citoplasma como lampl y caspasa 3 activa. La presencia de estas proteínas en el nucleolo del ovocito en proceso de muerte celular, puede involucrar alteraciones en al menos dos pasos de regulación de la distribución de macromoléculas en compartimentos celulares. Uno es el transporte de proteínas a través del poro nuclear y otro en la captura de las proteínas por el nucleolo. El transporte de moléculas de más 40 kDa requiere una señal de importación nuclear, la cual es una secuencia específica de aminoácidos, así como de un receptor de transporte. El receptor de transporte puede unirse a las nucleoporinas, que tienen dominios con múltiples repeticiones de fenilalanina-glicina. Este tipo de transporte emplea energía por hidrólisis de GTP. Nuestras inmunolocalizaciones demuestran que la importación de caspasa 3 y lampl al nucleolo, no tiene lugar en ovocitos normales ni en células de la granulosa. La importación de esas enzimas al nucleolo puede implicar una importante alteración de estos mecanismos de transporte. El nucleolo ha sido considerado como el lugar en donde son ensamblados los ribosomas, sin embargo, evidencias recientes indican que está relacionado con la biogénesis

de pequeños ARNs transcritos por la ARN polimerasa II y con la codificación de genes localizados fuera del nucleolo como 5S ARNr, ARNt, ARNasa P, SRP ARN y U6 ARNsn (199). Cerca de 7000 proteínas humanas fueron identificadas recientemente en nucleolos purificados, muchas de estas proteínas están relacionadas con procesos diferentes a la producción de ribosomas, como es la regulación del ciclo celular, reparación de ADN, procesamiento de pre-ARNm, edición de ARN, metabolismo de telómeros, procesamiento de ARNt y regulación de la estabilidad de proteínas (200). Se ha propuesto al nucleolo como una región que secuestra moléculas que normalmente operan fuera de este organelo (principalmente en el nucleoplasma) (201). Este fenómeno puede estar involucrado en la regulación del ciclo celular normal y en otras funciones celulares normales (202). Así que el secuestro de la caspasa 3 y de lamp1 en el nucleolo puede estar relacionado a algunos procesos específicos de la muerte celular del ovocito, que todavía no se conocen. Por ello, inferimos que la reacción positiva múltiple nucleolar implica un alto grado de alteración celular, indicando un ovocito en proceso de muerte.

La apoptosis ha sido implicada en un espectro de procesos asociados con el desarrollo y función normales del ovario, incluyendo la muerte del ovocito (124), la atresia folicular postnatal (125), ovulación (126) y luteolisis (127). En este trabajo, se ha encontrado que es probable que la degradación autofágica sea uno de los mecanismos de muerte celular que esté participando en la eliminación de los ovocitos en la etapa pre púber en ovarios de rata Wistar de forma simultánea con la apoptosis.

Los resultados obtenidos con la técnica citoquímica de Gomori para fosfatasa ácida, ha proporcionado datos que sustentan los resultados de las inmunodetecciones de la proteína lisosomal lamp1, ya que la reacción positiva entre ambos ensayos es totalmente correspondiente.

Hemos observado ovocitos muy degenerados, positivos a fosfatasa ácida y a lamp1, que presentan una zona citoplasmática muy degradada en la cual hay una mayor cantidad de enzimas activas, en comparación a la zona mejor conservada, indicando una alta degradación por parte de las enzimas lisosomales del material que existió ahí en un momento dado. Por otro lado, la elevada marca de lamp1 en zonas más conservadas del citoplasma, sugiere la presencia de una mayor cantidad de lisosomas en ese lugar, los cuales una vez que reciban la señal iniciará el proceso de degradación de esa región. Lo que

estamos apreciando en las zonas menos degradadas del citoplasma, es la acumulación de lisosomas para llevar a cabo la eliminación del ovocito.

La presencia de marcadores de los dos eventos de muerte celular, genera dos panoramas de eliminación celular:

- El primero es que una vez que el proceso de muerte en los ovocitos se inicia, se activan ambas rutas, de la apoptosis o la autofagia; sin embargo, el proceso de eliminación es realizado por un solo tipo de muerte. Al respecto, se ha propuesto que la muerte celular autofágica es un mecanismo que se enciende bajo condiciones en las cuales la apoptosis no se puede llevar a cabo (203).

- El otro, es que en los ovocitos se activan ambos procesos y los dos participan en la eliminación celular al mismo tiempo en una misma célula.

Los estudios que se han realizado de la autofagia *in situ*, indican que la manera más certera de identificar la autofagia es por medio de la microscopía electrónica de transmisión, en donde se pueden identificar los autofagosomas (146). Nuestros resultados de microscopía electrónica para identificar la formación de autofagosomas y la reacción positiva a la técnica citoquímica clásica para la identificación de la fosfatasa ácida, ha permitido observar la formación de vesículas autofágicas en ovocitos de diferentes etapas de desarrollo del animal y del desarrollo folicular. También hemos evidenciado inmunocitoquímicamente que aunque a la edad de 1 día el fenómeno más frecuente es la apoptosis, no hay presencia de las características ultraestructurales clásicas del proceso (204); sin embargo, se observan ovocitos muy alterados y con cúmulos de cromatina compacta y restos de complejos sinaptonémicos. La fragmentación de ADN observada en los ovocitos de diferentes edades por medio de la técnica de amina de osmio, permite observar que esos fragmentos guardan la misma apariencia de fragmentación que la observada en los cuerpos nucleares de las células foliculares, indicando que aunque no hay una alta compactación de la cromatina, el corte del material genético también se está llevando a cabo. La segmentación observada tanto a nivel de microscopía óptica como electrónica en los ovocitos de folículos en atresia avanzada, es un proceso previamente descrito por Vázquez-Nin y Sotelo (205). Estos segmentos de ovocitos no son cuerpos apoptóticos, ya que no se observa un *blebbling* en la superficie de los fragmentos y no tienen una alta densidad electrónica, además en algunas ocasiones estos segmentos

presentan segregaciones del núcleo sin llegar a ser altamente compactos para poder definirlos como cuerpos apoptóticos. En el citoplasma de ovocitos en degeneración, se puede ver una serie de laminas a nivel ultraestructural, las cuales también fueron descritas por Vázquez-Nin y Sotelo (205).

El estudio realizado por Devine y col. (206), cuyo modelo involucra ratas pre-púberes, describe la presencia de lisosomas secundarios en ovocitos durante el proceso de atresia folicular, sin embargo, no se lleva a cabo una caracterización de las vesículas observadas. El presente estudio involucra técnicas de inmunohistoquímica e inmunocitoquímica a nivel de microscopía óptica y de biología molecular, así como el análisis a nivel ultraestructural que permite definir de mejor manera el proceso por el cual se lleva a cabo la eliminación de las células germinales durante la atresia folicular en organismos pre-púberes.

En la apoptosis, uno de los eventos tempranos es la pérdida de la asimetría de la membrana citoplasmática. Durante la muerte apoptótica, la fosfatidilserina queda expuesta hacia el exterior y puede ser identificada por medio de la Anexina-V. En nuestro caso, se observó que a las edades de 1, 19 y 28 días de edad, se presenta el proceso de apoptosis en los ovocitos; sin embargo, a los 5 días por lo general son negativos a la técnica, indicando una baja o nula incidencia de la apoptosis en este tipo de células.

Esto corrobora nuestros resultados obtenidos con los ensayos *in situ* en ratas de las mismas edades, en donde se observa que los ovocitos son positivos a la técnica de inmunodetección de la caspasa 3 activa y algunos de los mismos son TUNEL positivos.

Los ovocitos de 1, 19 y 28 días de edad, presentaron fragmentación de ADN, indicando que en esas edades la apoptosis es un proceso que se está llevando a cabo. En conjunto con los ensayos de Anexina-V, los resultados de ADN fragmentado, indican la presencia del proceso de apoptosis. En los ovocitos de 5 días, la ausencia de ADN fragmentado y la escasa marca de Anexina-V, indica que el proceso que se está llevando a cabo a esta edad para la eliminación de los ovocitos, no es la apoptosis preferentemente.

La autofagia es en principio, un proceso que las células utilizan como estrategia de sobrevivencia, sin embargo, cuando el fenómeno se exagera, el proceso cambia radicalmente su función, conduciendo hacia la muerte celular por autofagia. Las estrategias diseñadas para estudiar al proceso de autofagia *in vitro*, implican el empleo de sustancias que tienen la propiedad de incorporarse a los cuerpos lisosomales. Se ha propuesto que la

monodansilcadaverina es un buen marcador autofagosomal (207). En nuestros resultados, hemos observado la clara incorporación de la monodansilcadaverina a los cuerpos lisosomales, ya que se observan vesículas positivas en el citoplasma de varios ovocitos. La presencia de abundante marcado con monodansilcadaverina, implica la actividad autofágica en los ovocitos, evento más evidente a la edad de 5 días, en donde la frecuencia de ovocitos positivos a monodansilcadaverina es mayor que a las demás edades.

La incorporación simultánea de Anexina-V y monodansilcadaverina en los ovocitos *in vitro* puso en evidencia la existencia de los procesos de apoptosis y autofagia en una misma célula. Estos resultados refuerzan los datos obtenidos en un ambiente *in situ*, en donde se observa que un mismo ovocito puede ser eliminado por los dos procesos de muerte al mismo tiempo (208).

El análisis de la expresión de los genes implicados en los dos procesos de muerte celular programada, indica que aunque los ovocitos se encuentren en un ambiente *in vitro*, la eliminación de las células germinales se lleva a cabo por vías que implican mecanismos autofágicos y apoptóticos simultáneamente.

Los resultados del presente estudio, indican la presencia de características inmunocitoquímicas, morfológicas, bioquímicas y moleculares, de los procesos de muerte celular apoptótica y autofágica, en nuestro modelo de estudio y que a pesar de que los mecanismos que siguen ambos procesos de muerte (apoptosis y autofagia) son distintos, estos pueden converger en un mismo sistema para un proceso de eliminación celular más eficiente, como es en el caso de los ovocitos en la etapa pre-púber de ovarios de rata Wistar, generando las evidencias de que ambos procesos se llevan a cabo para la eliminación de los ovocitos durante la etapa pre púber, ya sea de forma individual o simultánea en una misma célula.

## CONCLUSIONES.

- Los ovocitos de 1 día mueren primordialmente por el proceso de apoptosis.
- En los ovocitos de 5 días la eliminación celular no es llevada a cabo fundamentalmente por la apoptosis, sino que presentan las características de muerte autofágica.
- Los ovocitos que son positivos a las pruebas de apoptosis, no presentan las características morfológicas ultraestructurales de tal proceso,
- Los ovocitos que mueren durante la etapa pre-púber utilizan tres vías de eliminación celular: apoptosis, autofagia y un proceso en donde convergen ambas rutas de muerte celular.
- Los procesos de eliminación celular en ovocitos de rata pre-púber, son conservados tanto en un ambiente *in situ* como en un sistema *in vitro*, lo que refuerza que ambos procesos coexisten en la misma célula.

## BIBLIOGRAFÍA

- 1.- Monk M. y A. McLaren. 1981. X-chromosome activity in foetal germ cell of the mouse. *J. Embryol. Exp. Morphol.* 63:75-84.0
- 2.- Picton H., D. Briggs y R. Gosden. 1998. The molecular basis of oocyte growth and development. *Mol. Cell. Endocrinol.* 145:27-37
- 3.- Sawyer H. T., P. Smith, D. A. Heath, J. L. Juengel y S. J. McNatty. 2002. Formation of ovarian follicles during fetal development in sheep. *Biol. Reprod.* 66:1134-1150
- 4.- Borum K. 1961. Oogenesis in the mouse. A study of the origin of the mature ova. *Exp. Cell. Res.* 45:39-47.
- 5.- Rüsse J., y F. Sinowatz. 1991. En: Lehrbuch der Embryologie der haustiere. Rüsse J., F. Sinowatz eds. Berlin, Paul Parey. P. 42-92
- 6.- Watson J. D., T. A. Baker, S. P. Bell, A. Gann, M. Levine y R. Losick. 2004. Molecular Biology of the gene. 5th. Ed. Pearson Education Inc.
- 7.- De Meeûs T., Prognolle F. y P. Agnew. 2007. Asexual reproduction: Genetics and evolutionary aspects. *Cell Mol Life Sci.* 64:1355-1372.
- 8.- Forsburg S. L. 2000. The Forsburg Lab pombe Pages. *Biochim Biophys Acta.* 1470(1):R13-6.
- 9.- Gilbert S. F. 2003. Developmental Biology. 7<sup>th</sup>. Ed. Swathmore Collcge. 750pp.
- 10.- Hunt P. A. y T. J. Hassold. 2007 Human female meiosis: what makes a good egg go bad? *Trends in Gen.* 24(2):86-93
- 11.- Juengel J. L., H. R. Sawyer, P. R. Smith, L. D. Quirke, D. A. Heath, S. Lun, S. J. Wakefield y K. P. McNatty. 2002. Origins of follicular cells and ontogeny of steroidogenesis in ovine fetal ovaries. *Mol. Cell. Endocrinol.* 191:1-10
- 12.- Hirshfield AN. 1991. Development of follicles in the mammalian ovary. *Int Rev Cytol* 124: 43-101.
- 13.- Braw-Tal R. 2002. The initiation of follicle growth: The oocyte or the somatic cells? *Mol Cell Endocrinol* 187: 11-18.
- 14.- Garrett W. M. y H. D. Guthrie. 1999. Expression of Bcl-2 and 3-hydroxysteroid dehydrogenase protein during oocyte and follicle development in foetal and post-natal pig ovaries. *Reprod. Fertil. Dev.* 11:463-4670.

- 15.- Eichenlaub-Ritter U: y M. Peschke. 2002. Expression in in-vivo and in-vitro growing and maturing oocytes: focus on regulation of expression at the translational level. *Hum. Reprod.* 8:21-41.
- 16.- Durlinger A. L., P. Kramer, B. Karels, F. H. de Jong, J. T. Uilenbroek, J. A. Grootegoed y A. P. Themmen. 1999. Control of primordial follicle recruitment by anti-Mullerian hormone in the mouse ovary. *Endocrinol.* 140: 5789-5796.
- 17.-Durlinger A. L., M. J. Gruijters, P. Kramer, B. Karels, H. A. Ingraham, M. W. Nachtigal, J. T. Uilenbroek, J. A. Grootegoed y A. P. Themmen. 2002. Anti-Mullerian hormone inhibits initiation of primordial follicle growth in the mouse ovary. *Endocrinol.* 143: 1076-1084.
- 18.- Castrillon D. H., L. Miao, R. Kollipara, J. W. Horner y R. A. DePinho. 2003. Suppression of ovarian follicle activation in mice by the transcription factor Foxo3a. *Science* 301: 215-218.
- 19.- Cantley L. C. y B. G. Neel. 1999. New insights into tumor suppression: PTEN suppresses tumor formation by restraining the phosphoinositide 3-kinase/AKT pathway. *Proc Natl Acad Sci USA* 96: 4240-4245.
- 20.- Liu K., S. Rajareddy, L. Liu, K. Jagarlamudi, K. Boman, G. Selstam y P.Reddy. 2006. Control of mammalian oocyte growth and early follicular development by the oocyte PI3 kinase pathway: New roles for an old timer. *Dev Biol* 299: 1-11.
- 21.- Reddy P., L. Shen, C. Ren, K. Boman, E. Lundin, U. Ottander, P. Lindgren, Y. X., Liu, Q. Y. Sun y K. Liu. 2005. Activation of Akt (PKB) and suppression of FKHL1 in mouse and rat oocytes by stem cell factor during follicular activation and development. *Dev Biol* 281: 160-170.
- 22.- Hutt K. J., E. A. McLaughlin y M. K. Holland. 2006. KIT/KIT ligand in mammalian oogenesis and folliculogenesis: Roles in rabbit and murine ovarian follicle activation and oocyte growth. *Biol Reprod* 75: 421-433.
- 23.- Parrott J. A. y M. K. Skinner. 1999. Kit-ligand/stem cell factor induces primordial follicle development and initiates folliculogenesis. *Endocrinology* 140: 4262-4271.
- 24.- Yoshida H., N. Takakura, H. Kataoka, T. Kunisada, H. Okamura y S. I. Nishikawa. 1997. Stepwise requirement of c-kit tyrosine kinase in mouse ovarian follicle development. *Dev Biol* 184: 122-137.

- 25.- Holt J. E., A. Jackson, S. D. Roman, R. J. Aitken, P. Koopman y E. A. McLaughlin. 2006. CXCR4/SDF1 interaction inhibits the primordial to primary follicle transition in the neonatal mouse ovary. *Dev Biol* 293: 449-460.
- 26.- Taupin J. L., V. Pitard, J. Dechanet, V. Miossec, N. Gualde y J. F. Moreau. 1998. Leukemia inhibitory factor: Part of a large ingathering family. *Int Rev Immunol* 16: 397-426.
- 27.- Nilsson E. E. y M. K. Skinner. 2002. Role of transforming growth factor beta in ovarian surface epithelium biology and ovarian cancer. *Reprod Biomed* 5: 254-258.
- 28.- Nilsson E. y M. K. Skinner. 2001. Cellular interactions that control primordial follicle development and folliculogenesis. *J Soc Gynecol Investig* 8: S17-S20.
- 29.- Nilsson E. E. y M. K. Skinner. 2003. Bone morphogenetic protein-4 acts as an ovarian follicle survival factor and promotes primordial follicle development. *Biol Reprod* 69: 1265-1272.
- 30.- Rubin J. S., Osada H., Finch P. W., Taylor W. G. , Rudikoff S., Aaronson S. A. 1989. Purification and characterization of a newly identified growth factor specific for epithelial cells. *Proc Natl Acad Sci USA* 86: 802-806.
- 31.- Kezele P., Nilsson E. E., Skinner M. K. 2005. Keratinocyte growth factor acts as a mesenchymal factor that promotes ovarian primordial to primary follicle transition. *Biol Reprod* 73: 967-973.
- 32.- Nilsson E. E., Detzel C., Skinner M. K. 2006. Platelet-derived growth factor modulates the primordial to primary follicle transition. *Reproduction* 131: 1007-1015.
- 33.- Lee W. S., Otsuka F., Moore R. K., Shimasaki S. 2001. Effect of bone morphogenetic protein-7 on folliculogenesis and ovulation in the rat. *Biol Reprod* 65: 994-999.
- 34.- Suzumori N., Yan C., Matzuk M. M., Rajkovic A. 2002. Nobox is a homeobox-encoding gene preferentially expressed in primordial and growing oocytes. *Mech Dev* 111: 137-141.
- 35.- Pangas S. A., Yan W., Matzuk M. M., Rajkovic A. 2004. Restricted germ cell expression of a gene encoding a novel mammalian HORMA domain-containing protein. *Gene Expr Patterns* 5: 257-263.

- 36.- Pangas S. A., Choi Y., Ballow D. J., Zhao Y., Westphal H., Matzuk M. M., Rajkovic A. 2006. Oogenesis requires germ cell-specific transcriptional regulators *Sohlh1* and *Lhx8*. *Proc Natl Acad Sci USA* 103: 8090-8095.
- 37.- Rajkovic A., Pangas S. A., Ballow D., Suzumori N., Matzuk M. M. 2004. *NOBOX* deficiency disrupts early folliculogenesis and oocyte-specific gene expression. *Science* 305: 1157-1159.
- 38.- Fortune J. E. 2003. The early stages of follicular development: Activation of primordial follicles and growth of preantral follicles. *Anim Reprod Sci* 78: 135-163.
- 39.- Lee V. H. y B. S. Dunbar. 1993. Developmental expression of the rabbit 55-KDa zona pellucida protein and Messenger RNA in ovarian follicles. *Dev. Biol.* 155:371-382.
- 40.- Amsterdam, A. y S. Roitman. 1987. Structure-function relationships during granulosa cell differentiation. *Endocr. Rev.* 8:309-337.
- 41.- Gougeon A. 1996. Regulation of ovarian follicular development in primates. Facts and hypotheses. *Endocr. Rev.* 17:121-155.
- 42.- Amleh A. y J. Dean. 2002. Mouse genetics provides insight into folliculogenesis, fertilization and early embryonic development. *Hum. Reprod.* 8:395-403
- 43.- Simon, A. M., D. A. Goodenough, E. Li y D. L. Paul. 1997. Female infertility in mice lacking connexin-37. *Nature.* 385:525-528.
- 44.- Lin S. Y., J. R. Morrison, D. J. Phillips y D. M de Kretser. 2003. Regulation of ovarian function by the TGF-beta superfamily and follistatin. *Reproduction.* 126: 133-148.
- 45.- Ueno N. 1987. Isolation and structural characterization of ovarian follicular fluid inhibin. *Tanpakushitsu Kakusan Koso* 32: 1-19.
- 46.- Roberts V. J., S.Barth, A. El-Roeiy y S. S.Yen 1993. Expression of inhibin/activin subunits and follistatin messenger ribonucleic acids and proteins in ovarian follicles and the corpus luteum during the human menstrual cycle. *J Clin Endocrinol Metab* 77: 1402-1410.
- 47.- Zhou J., T. R. Kumar, M. M. Matzuk y C. Bondy 1997. Insulin-like growth factor 1 regulates gonadotropin responsiveness in the murine ovary. *Mol Endocrinol* 11: 1924-1933.
- 48.- Combelles C. M., M. J. Carabatsos, T. R. Kumar, M. M. Matzuk y D. F. Albertini. 2004. Hormonal control of somatic cell oocyte interactions during ovarian follicle development. *Mol Reprod Dev* 69: 347-355.

- 49.- Plancha C. E., A. Sanfins, Rodrigues P. y D. Albertini 2005. Cell polarity during folliculogenesis and oogenesis. *Reprod Biomed* 10: 478-484.
- 50.- McNatty K.P., K. Reader, P. Smith, D. A. Heath y J. L. Juengel. 2007. Control of ovarian follicular development to the gonadotrophin-dependent phase: A 2006 perspective. *Soc Reprod Fertil Suppl* 64: 55-68.
- 51.-Van den Hurk R. y J. Zhao. 2005. Formation of mammalian oocytes and their growth, differentiation and maturation within ovarian follicles. *Theriogenology*. 63:1717-1751
- 52.- Peters H, McNatty KP. 1980. The ovary. Berkeley and Los Angeles, CA: University of California Press. 175 p.
- 53.- McGee E. A., E. Perlas, P. S. LaPolt, A. Tsafiriri y A. J. Hsueh 1997. Follicle-stimulating hormone enhances the development of preantral follicles in juvenile rats. *Biol Reprod* 57: 990-998.
- 54.- Richards J. S. 2001. Perspective: The ovarian follicle - A perspective in 2001. *Endocrinology* 142: 2184-2193.
- 55.- Drummond A. E. 2006. The role of steroids in follicular growth. *Reprod Biol Endocrinol* 4:16.
- 56.- Robker R. L. y J. S. Richards. 1998. Hormone-induced proliferation and differentiation of granulosa cells: A coordinated balance of the cell cycle regulators cyclin D2 and p27Kip1. *Mol Endocrinol* 12: 924-940.
- 57.- Mehlmann L. M. 2005. Stops and starts in mammalian oocytes: Recent advances in understanding the regulation of meiotic arrest and oocyte maturation. *Reproduction* 130: 791-799.
- 58.- Wassarman P. M. y D.F. Albertini. 1994. The mammalian ovum. En: Knobil EaN JD , editor. The physiology of reproduction. 2nd Ed. New York: Raven Press. pp 79-122.
- 59.-Wassarman P. M. 1988. The mammalian ovum. En: Physiology of Reproduction. Vol.1 (eds) E. Knobil, J.D. Neill, L. L. Ewing, C. L. Markert, G. S. Greenwald y D. W. Pfaff. Pp 69-102. New York. Raven Press.
- 60.- Eppig J. J., M. M Viveiros, C. M. Bivens y R. de la Fuente. 2003. Regulation of Mammalian Oocyte Maturation. Capter 7. En: The Ovary. P. C. K. Leung y E. Y. Adashi Eds. Academic Press. 2 nd. ed.

- 61.- Norbory C. y P. Nurse. 1992. Animal cell cycles and their control. *Ann. Rev. Biochem.* 61:441-470.
- 62.- Murray A. 1995. Cyclin ubiquitination: the destructive end of mitosis. *Cell.* 81:149-152.
- 63.- Masui Y. y C. L Markert. 1971. Cytoplasmic control of nuclear behaviour during meiotic maturation of frog oocytes. *J. Exp. Zool.* 177:129-146.
- 64.- Kubiak J. Z., M. Weber, G. Géraud y B. Maro. 1992. Cell cycle modification during the transitions between meiotic M-Phase in Mouse oocytes. *J. Cell Sci.* 102:457-467.
- 65.- Polanski Z., E. Ledan, S. Brunet, S. Louvet, M. H. Verlhac, J. Z. Kubiak y B. Maro. 1998. Cyclin synthesis controls the progression of meiotic maturation in mouse oocytes. *Dev.* 125:925-933.
- 66.- Cho W. K., S. Stern y J. D. Biggers. 1974. Inhibitory effect of dibutyryl cAMP on mouse oocyte maturation in vitro. *J. Exp. Zool.* 187:383-386.
- 67.- Deker N y W. H. Beers. 1978. Rat oocyte maturation in vitro. Relief of cAMP inhibition with gonadotropins. *Proc. Nat. Acad. Sci. USA* 75:4369-4373.
- 68.- Homa S. T. 1988. Effect of cyclic AMP on the spontaneous meiotic maturation of cumulus-free bovine oocytes cultured in chemically defined medium. *J. Exp. Zool.* 248:222-231.
- 69.- Sirard, M. A. y N. L. First. 1988. In Vitro inhibition of oocyte nuclear maturation in the bovine. *Biol. Reprod.* 39:229-234.
- 70.- Warikoo P. K. and B. D. Bavister. 1989. Hypoxanthine and cyclic adenosine 5'-monophosphate maintain meiotic arrest of rhesus monkey oocytes in Vitro. *Fert. Steril* 51:886-889.
- 71.- Surani M. A. 1998. Imprinting and the initiation of gene silencing in the germ line. *Cell.* 93:309-312.
- 72.- Oh B., S. Hwang, J. McLaughlin, D. Solter, y B. B. Knowles. 2000. Timely translation during the mouse oocyte to embryo transition. *Development.* 127:3795-3803.
- 73.- Kezele P., Nilsson E., Skinner M. K. 2002. Cell-cell interactions in primordial follicle assembly and development. *Front. Biosci.* 7:1990-1996.
- 74.- Baker T. G. 1972. Oogenesis and ovarian development. In: Reproductive Biology. Amsterdam. Excerpta Medica. Pp. 398-437.

- 75.- Allan d. J., Harmon B. V., Kerr J. F. R. 1987. Cell death in spermatogenesis. In: Perspectives on Mammalian Cell Death. Ed. C. S. Potten. London: Oxford University Press. London. Pp. 229-258.
- 76.- Morita Y., Tilly J. L. 1999. Oocyte apoptosis: like sand through an hourglass. *Dev. Biol.* 211:13:1-17.
- 77.- Pepling M. E., Spradling A. C. 2001. Mouse ovarian germ cell cysts undergo programmed breakdown to form primordial follicles. *Dev. Biol.* 234:339-351.
- 78.- Lobascio A. M., Klinger F. G., Scaldaferrri M L., Farini D., De Felici M. 2007. Analysis of programmed cell death in Mouse fetal oocytes. *Rep.* 134:241-252.
- 79.- D'Herde K., B. De Prest y F. Roels. 1996. Subtypes of active cell death in the granulosa of ovarian atretic follicles in the quail (*coturnix coturnix japonica*). *Reprod. Nutr. Dev.* 36:175-189.
- 80.- Markstrom E., E. Svensson, R. Shao, B. Svanberg y H. Billig. 2002. Survival factors regulatin ovarian apoptosis-dependece on follicle diferenciacion. *Reproduction.* 123:23-30.
- 81.- Depalo R., L. Nappi, G. Loverro, S. Bettocchi, M. L. Caruso, A. M. Valentini y N. Selvaggi. 2003. Evidence of apoptosis in human primordial and primary follicles. *Hum. Reprod.* 18:2678-2682.)
- 82.- Tilly J. L. 2001. Emerging technologies to control oocyte apoptosis are finally treading on fertile ground. *Scientific World Journal.* 1:181-183.
- 83.- Rosales A. M., A. Avalos, M. Vergara, O. Hernández, L. M Ballesteros, R. García, V. Ortiz y A. Rosado. 2000. Multiparametric study of atresia in ewe antral follicles: histology, flow cytometry, internucleosomal DNA fragmentation, and lisosomal enzyme activities in granulosa cells and follicular fluid. *Mol. Rep. Dev.* 55:270-281.
- 84.- Majno G y I. Joris. 1995. Apoptosis, oncosis, and necrosis. An overview of cell death. *Amer. J. Pathol.* 146:3-15.
- 85.-Kato S, G. Takemura, R. Maruyama, T. Aoyama, K. Hayakawa, M. Koda, Y. Kawase, Y. Li, S. Minatoguchi, T. Fujiwara y H. Fujiwara. 2001. Apoptosis. Rather than oncosis, is the predominant mode of spontaneous death of isolated adult rat cardiac myocytes in culture. *Jpn Circ J.* 65:743-478

- 86.- Zhang Ch., Y. Xu, J. Gu, y S. F. Schlossman. 1998. A cell surface receptor defined by a mAb mediates a unique type of cell death similar to oncosis. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 95:6290–6295.
- 87.- Liu X., Van V. T. y R. G. Schnellman. 2004. The role of calpain in oncotic cell death. *Annu. Rev. Pharmacol. Toxicol.* 44:349-370
- 88.- Moran J. H. y R. G. Schnellmann. 1997. Diverse cytoprotectants prevent cell lysis and promote recovery of respiration an ion transport. *Biochem. Biophys. Res. Common.* 234:275-277.
- 89.- Liu X., J. J. Raincy, J. F. Harriman y R. G. Schnellmann. 2001. Calpains mediate acute renal cell death: role of autolysis and translocation. *Am. J. Pysiol. Renal Physiol.* 81:F728-738.
- 90.- Liu X. J. F. Arriman y R. G. Schnellmann. 2002. Cytoprotective properties of novel nonpeptide calpain inhibitors in renal cells. *J. Pharmacol. Exp. Ther.* 302:88-94
- 91.- Lieberthal, W., Menza S. A. y J. S. Levine. 1998. Graded ATP depletion can cause necrosis or apoptosis of cultured Mouse proximal tubular cells. *Am. J. Physiol. Renal Physiol.* 274:F315-327.
- 92.- Wang W. y G. D. Lopaschuk. 2007. Metabolic therapy for the treatment of ischemic heart disease: reality and expectations. *Exp. Rev. Cardiovasc. Ther.* 5(6):1123-1134.
- 93.- Jugdutt B. I. y H. A. Idilio. 2005. Apoptosis and oncosis in acute coronary syndromes: Assessment and implications. *Mol. Cell. Biochem.* 270:177-200.
- 94.- Kerr J., A. H. Willie y A. R. Curie.1972. Apoptosis: a basic biological phenomenon with wide -ranging implications in tissue kinetics. *Br J Cancer.* 26:239.
- 95.- Thornberry, N. A. y Y. Lazebnik. 1998. Caspases: enemies within. *Science.* 281:1312–1316.
- 96.- Stennicke, H.R. y G. S. Salvesen. 1998. Properties of caspases. *Biochem Biophys Acta* 1387:17-31.
- 97.- Kumar S. 2007. Caspase function in programmed cell death. *Cell Death Diff. Nature.* 14:32-47.
- 98.- Nicholson, D.W. y N. A. Thornberry. 1997. Caspases: killer proteases. *Trends Biochem. Sci.* 22:299-306.

- 99.- Yuan, J.Y., S. Shaham, S. Ledoux, M. H. Ellis y H. R. Horvitz. 1993. The *C. elegans* cell death gene *ced-3* encodes a protein similar to mammalian interleukin-1 $\alpha$  converting enzyme. *Cell*. 75:641-652.
- 100.- Thornberry, N.A., H. G. Bull, J. R. Calycay, K. T. Champan, A. D. Howard, M. J. Kostura, D. K. Miller, S. M. Molineaux, J. R. Weidner, J. Aunins, K. O. Elliston, J. M. Ayala, F. J. Casano, J. Chin, J. F. Ding, L. A. Egger, E. P. Gaffney, G. Limjuco, O. C. Palyha, S. M. Raju, A. M. Rolando, J. P. Salley, Y. Yamin, T. D. Lee, J. E. Shively, M. M. MacCross, R. A. Mumford, J. A. Schmidt, y M. J. Tocci. 1992. A novel heterodimeric cysteine protease is required for interleukin-1 processing in monocytes. *Nature* 356: 768-774.
- 101.- Ellis, R.E., D. M. Jacobson y H. R. Horvitz. 1991. Genes required for the engulfment of cell corpses during programmed cell death in *Caenorhabditis elegans*. *Genetics* 129:79-94.
- 102.- Salvesen, G.S & Dixit, V.M. 1997. Caspases: intracellular signaling by proteolysis. *Cell* 91:443-446.
- 103.- Degterev A., M. Boyce y Y. Junying. 2003. A decade of caspases. *Oncogene*. 22:8543-8567.
- 104.- Ashkenazi, A. y V. M. Dixit. 1998. Apoptosis control by death and decoy receptors. *Science*. 281:1305-1308.
- 105.- Peter, M. E. y P. H. Krammer. 2003. The CD95 (APO-1/Fas) DISC and beyond. *Cell Death Differ.* 10:26-35.
- 106.- Chao, D. T. y S. J. Korsmeyer. 1997. BCL-XL-regulated apoptosis in T cell development. *Int. Immunol.* 9:1375-1384.
- 107.- Adams, J. M. y S. Cory. 2001. Life-or-death decisions by the Bcl-2 protein family. *Trends Biochem. Sci.* 26:61-66.
- 108.-Muzio M., B. R. Stockwell, H. R. Stennicke, G. S. Salvesen y V. M. Dixit. 1998. An Induced Proximity Model for Caspase-8 Activation. *J. Biol. Chem.* 273:2926-2930.
- 109.- Juo P. C. J. Kuo, J. Yuan y J. Blenis. 1998. Essential requirement for caspase-8/FLICE in the initiation of the Fas-induced apoptotic cascade. *Curr. Biol.* 8:1001-1008.

- 110.- Lou X., C. N. Kim, J. Yang, R. Jemmerson, X. Wang. 1998. Bid, a Bcl2 interacting protein, mediates cytochrome c release from mitochondria in response to activation of cell surface death receptors. *Cell*. 94:481-490.
- 111.- Shimizu S., M. Narita y Y. Tsujimoto. 1999. Bcl-2 family proteins regulate the release of apoptogenic cytochrome c by the mitochondrial channel VDAC. *Nature*. 399:483-487.
- 112.- Hu, Y., M. A. Benedict, D. Wu, N. Inohara, y G. Nuñez. 1998. Bcl-X<sub>L</sub> interacts with Apaf-1 and inhibits Apaf-1-dependent caspase 9 activation. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 95: 4386-4391.
- 113.- Budihardjo, I., H. Oliver, M. Lutter, X. Luo y X. Wang. 1999. Biochemical pathways of caspase activation during apoptosis. *Annu. Rev. Cell Dev. Biol.* 15:269–290.
- 114.- Jiang, X. y Wang, X. 2004. Cytochrome C-mediated apoptosis. *Ann. Rev. Bioch.* 73:87–106.
- 115.- Green D. y G. Kroemer. 1998. The central executioners of apoptosis: Caspases or mitochondria? *Trends. Cell Biol.* 8:267-271.
- 116.- - Bao Q. y Y. Shi. 2007. Apoptosome: a platform for the activation of initiator caspases. *Cell Death Diff. Nature*. 14:56-65.
- 117.- Hengartner, M.O. y H. R. Horvitz. 1994. *C. elegans* cell survival gene ced-9 encodes a functional homolog of the mammalian protooncogene bcl-2. *Cell*. 76:665-676.
- 118.- Chao, D.T. & Korsmeyer, S.J. 1998. Bcl-2 family: regulators of cell death. *Annu. Revv Immunol.* 16:395-419.
- 119.- Tsujimoto Y. 2003. Cell Death Regulation by the Bcl-2 Protein Family in the Mitochondria. *J. Cell Physiol.* 195:158-167.
- 120.- Greenwood J. y J. Gautier. 2007. XLX is an IAP family member regulated by phosphorylation during meiosis. *Cell Death Diff.* 14:559-657.
- 121.- Deveraux Q.L. y J. C. Reed. 1999. IAP family proteins suppressors of apoptosis. *Genes Dev.* 13:239-252.
- 122.- Yang Y.L. y X. M. Li. 2000. The IAP family: endogenous caspase inhibitors with multiple biological activities. *Cell Res.* 103:169-177.

- 123.- Fadok V. A., D. R. Voelker, P. A. Campbell, J. J. Cohen, D. L. Bratton y P. M. Henson. 1992. Exposure of phosphatidylserine on the surface of apoptotic lymphocytes triggers specific recognition and removal by macrophages. *J Immunol.* 148:2207-16.
- 124.- Chen, P. y J. M. Abrams. 2000. Drosophila apoptosis and Bcl-2 genes: outliers fly in. *J. Cell Biol.* 148:625-627.
- 125.- Tilly J. L. y R. Robles. 1999. Apoptosis and its impact in clinical reproductive medicine. In: Molecular Biology in reproductive Medicine. Parthenon, New York. Pp. 79-101.
- 126.- Murdoch W. J. 2000. Proteolytic and cellular death mechanisms in ovulatory ovarian rupture. *Biol. Sings. Recept.* 9:102-114.
- 127.- Rueda B. R., P. B. Hoyer, D. L. Hamemlk y J. L. Tilly. 1997. Potential regulators of physiological cell death in the corpus luteum. In: Cell Death in Reproductive Physiology. Springer-Verlag, New-York. Pp. 161-181.
- 128.- Pru, J. K. Y J. L. Tilly. 2001. Programmed cell death in the ovary: insight and future prospects using genetic technologies. *Mol. Endo.* 15:845-853.
- 129.- Morita Y., G. I. Perez, F. Paris, S. Miranda, D. Ehleiter, A. Haimovitz-Friedman, Z. Fuks, Z. Xie, J. C. Reed, E. H. Schuchman, R. N Kolesnick y J. L. Tilly. 2000. Oocyte apoptosis is suppressed by disruption of the acid sphingomyelinasa gene or by sphingosine-1-phosphate therapy. *Nat. Med.* 6:1109-1114.
- 130.- Pérez G. I., R. Robles, C. M. Knudson, J. A. Flaws, S. J. Korsmeyer y J. L. Tilly. 1999. Prolongation of ovarian lifespan into advanced chronological age by Bax-deficiency. *Nature Genet.* 21:200-203.
- 131.- Bergeron L., G. I. Perez, G. Mcdonald, L. Shi, Y Sun, A. Jurisicova, S. Varmuza, K. E. Latham, J. A. Flaws, J. Salter, H. Hara, M. A. Moskowitz, E. Li, A. H. Greenberg, J. L. Tilly y J. Yuan. 1998. Defects in regulation of apoptosis in caspasa-2-deficient mice. *Genes Dev.* 12:1304-1314.
- 132.- Boone D. L. y B. K. Tsang. 1998. Caspase-3 in the rat ovary: localization and possible role in follicular atresia and luteal regression. *Biol. Reprod.* 58:1533-1539.
- 133.- Klionsky, D. J. y S. D. Emr. 2000. Autophagy as a regulated pathway of cellular degradation. *Science.* 290:1717-1721.

- 134.- González-Noriega A. 2003. *Lisosomas* en: Biología Celular y Mol. Eds. Jiménez L. F. y H. Merchant. Ed. Pearson Educación. México.
- 135.- Mellmann, I., R. Fuchs y A. Helenius. 1986. Acidification of the endocytic and exocytic pathways. *Annu. Rev. Biochem.* 55:663–700
- 136.- Peters, C. y K. von Figura. 1994. Biogenesis of lysosomal membranes. *FEBS Lett.* 346:108–114
- 137.- Fukuda, M. 1991. Lysosomal membrane glycoproteins. Structure, biosynthesis, and intracellular trafficking. *J. Biol. Chem.* 266: 21327–21330.
- 138.- Granger, B. L., S. A. Green, C. A. Gabel, C. L. Howe, I. Mellman, y A. Helenius. 1990. Characterization and cloning of lgp110, a lysosomal membrane glycoprotein from mouse and rat cells. *J. Biol. Chem.* 265:12036–12043
- 139.- Marsh, M. S. Schmid, H. Kern, E. Harms, P. Male, I. Mellmann y A. Helenius. 1987. Rapid analytical and preparative isolation of functional endosomes by free flow electrophoresis. *J. Cell Biol.* 104:875-886.
- 140.- Chen, J. W., W. Pan, M. P. D'Souza y J. T. August. 1985. Lysosome-associated membrane proteins: characterization of LAMP-1 of macrophage P388 and mouse embryo 3T3 cultured cells. *Arch. Biochem. Biophys.* 239, 574–586
- 141.- Hunziker, W., T. Simmen y S. Honing. 1996. Trafficking of lysosomal membrane proteins in polarized kidney cells. *Nephrologie* 17: 347–350.
- 142.- Mizushima, N., Y. Ohsumi y T. Yoshimori. 2002. Autophagosome formation in mammalian cells. *Cell Struct. Funct.* 27:421–429.
- 143.- Mizushima, N., T. Yoshimori y Y. Ohsumi. 2003. Role of the Apg12 conjugation system in mammalian autophagy. *Int. J. Biochem. Cell Biol.* 35:553–561
- 144.- Nishino I. J. Fu, K. Tanji, T. Yamada, S. Shimojo, T. Koori, M. Mora, J. E. Riggs, S. H. Oh, Y. Koga, C. M. Sue, A. Yamamoto, N. Murakami, S. Shanske, E. Byrne, E. Bonilla, I. Nonaka, S. DiMauro y M. Hirano. 2000. Primary LAMP-2 deficiency causes X-linked vacuolar cardiomyopathy and myopathy (Danon disease). *Nature.* 406:906-910.
- 145.- Eskelinen, E. L., C. Schmidt, S. Neu, M. Willenborg, G. Fuertes, N. Salvador, Y. Tanaka, R. Lullmann-Rauch, D. Hartmann, J. Heeren, von Figura, E. Knecht y P. Saftig. 2004. Disturbed cholesterol traffic but normal proteolytic function in LAMP-1/LAMP-2 double-deficient fibroblasts. *Mol. Biol. Cell.* 15:3132–3145.

- 146.- Dunn W. A. 1994. Autophagy and related mechanisms of lysosome-mediated protein degradation. *Trends Cell Biol.* 4:139-143.
- 147.- Dunn, W. A. Jr. 1990a. Studies on the mechanisms of autophagy: maturation of the autophagic vacuole. *J. Cell Biol.* 110:1923-1933.
- 148.- Dunn, W. A. Jr. 1990b. Studies on the mechanisms of autophagy: maturation of the autophagic vacuole. *J. Cell Biol.* 110:1935-1945.
- 149.- Aubert, S, E. Gout, R. Bligny, D. Marty-Mazars, F. Barrieu, J. Alabouvette, F. Marty y R. Douce. 1996. Ultrastructural and biochemical characterization of autophagy in higher plant cells subjected to carbon deprivation: control by mitochondria with respiratory substrates. *J. Cell. Biol.* 133:1251-1263.
- 150.- Mizushima N. 2007. Autophagy: process and function. *Genes Dev.* 21:2861-2873
- 151.- Klionsky, D. J., Cregg J. M., Duna Jr W. A., Emr S. D., Sakai Y., Sandoval I. V., Sibirny A., Subramani S, Thumm M. Vecnhuis M. Ohsumi Y. 2003. A unified nomenclature for yeast autophagy-related genes. *Dev Cell* 5:539-545
- 152.- Cuervo A. M. 2004. Autophagy: Many pathways to the same end. *Mol. Cell Biochem.* 263:55-72
- 153.- Dice J. F. 1990. Peptide sequences that target cytosolic proteins for lysosomal proteolysis. *Trens Biochem Sci.* 15:305-309
- 154.- Cuervo A., Dice J. 1996. A receptor for the selective uptake and degradation of proteins by lysosomes. *Science.* 273:501-5033
- 155.- Ahlberg J., Glaumann H. 1985. Uptake-microautophagy and degradation of exogenous proteins by isolated rat liver lysosomes. Effects of pH, ATP, and inhibitors of proteolysis. *Exp Mol. Pathol.* 42:78-88
- 156.- Blommaert E. F, J. J. Luiken, P. J. Blommaert, G. M. van Woerkom y A. J. Meijer. 1995. Phosphorylation of ribosomal protein S6 is inhibitory for autophagy in isolated rat hepatocytes. *J Biol Chem.* 270:2320-6
- 157.- Thomas G. y M. N. Hall. 1997. TOR signalling and control of cell growth. *Curr Opin Cell Biol.* 9:782-7
- 158.- Brown E. J., P. A. Beal, C. T. Keith, J. Chen, T. B. Shin y S. L. Schreiber. 1995. Control of p70 s6 kinase by kinase activity of FRAP in vivo. *Nature.* 377:441-6

- 159.- Holen I., P. B. Gordon y P. O. Reglen. 1992. Protein kinase-dependent effects of okadaic acid on hepatocytic autophagy and cytoskeletal integrity. *Biochem J.* 284:633-6
- 160.- Kamada, Y., T. Funakoshi, T. Shintani, K. Pagano, M. Ohsumi y Y. Ohsumi. 2000. Tor-mediated induction of autophagy via an Apg1 protein kinase complex. *J. Cell Biol.* 150:1507-1513.
- 161.- Scott S. V., D.C. Nice, J. J. Nau, L. S. Weisman, Y. Kamada, I. Keizer-Gunnink, T. Funakoshi, M. Veenhuis, Y. Ohsumi y D. J. Klionsky. 2000. Apg13p and Vac8p are part of a complex of phosphoproteins that are required for cytoplasm to vacuole targeting. *J. Biol. Chem.* 275:25840-9.
- 162.- Tanida I., T. Ueno y E. Kominami. 2004. LC3 conjugation system in mammalian autophagy. *Int. J. Biochem. Cell Biol.* 36:2503-2518.
- 163.- Mann S. y J. Hammarback. 1994. Molecular characterization of light chain 3. A microtubule binding subunit of MAP1A and MAP1B. *J. Biol. Chem.* 269:11492-11497.
- 164.- Tanida I., U. Takashi y E. Kominami. 2008. Lc3 and autophagy. *Meth. Mol. Biol.* 445:77-78.
- 165.- Bowen, I. D., K. Mullarkey y S. M. Margen. 1996. Programmed cell death during meta-morphosis in the blowfly *Calliphora vomitoria*. *Micros. Res. Techn.* 34:202-217
- 166.- Baha'uddin M., M. Pietro, A. Manni y O. Pearson. 1980. Effect of Ovariectomy on Hormone Receptors and Growth of V-Nitrosomethylurea-induced Mammary Tumors in the Rat. *Cancer Res.* 4628-4630.
- 167.- Bursh W., A. Ellinger, C. Gerner, U. Fröhwein y R. Schulte-Hermann. 2000. Programmed cell death (PCD). Apoptosis, autophagic PCD, or others? *Ann. N. Y Acad. Sci.* 926:1-12
- 168.- Tolkovsky A. M., L. Xue, G. C. Fletcher y V. Borutaite. 2002. Mitochondrial disappearance from cells: a clue to the role of autophagy in programmed cell death and disease? *Biochimie* 84:233-240.
- 169.- Larsen K. E y D. Sulzer. 2002. Autophagy in neurons: a review. *Histol. Histopathol.* 17:897-908.
- 170.- Dudek H., S. Datta, T. Franke, M. Birnbaum, R. Yao, G. M. Cooper, R. A. Segal, D. R. Kaplan y M. E. Greenberg. 1997. Regulation of neuronal survival by the serine-threonine protein kinase Akt. *Science.* 275:661-665.

- 171.- Xue L., G. C. Fletcher y A. M. Tolkovsky. 1999. Autophagy is activated by apoptotic signaling in sympathetic neurons: an alternative mechanism of death execution. *Mol. Cel. Neurs.*14:180-198.
- 172.- Isahara K., Y. Ohsawa, S. Kanamori, M. Shibata, S. Waguri, N. Sato, T. Gotow, T. Watanabe, T. Momio, K. Urase, E. Kominami y Y. Uchiyama. 1999. Regulation of a novel pathway for cell death by lysosomal aspartic and cysteine proteinases. *Neuroscience.* 91:233-249.
- 173.- Tanaka Y., G. Guhde, A. Suter, E. Eskelinen, D. Hartmann, R. Lallman-Rauch, P. Janssen, J. Blanz, K. Von Figura y P. Saftig. 2000. Accumulation of autophagic vacuoles and cardiomyopathy in LAMP-2-deficient micc. *Nature.* 406:902 – 906.
- 174.- Schulte-Hermann, R., W. Bursh, B. Grasl-Kraupp, B. Marian, L. Torok, P. Kahl-Rainer y A. Ellinger. 1997. Concepts of cell death an application to carcinogenesis. *Toxicol. Pathol.* 25:89-93.
- 175.- Liang X. H., S. Jackson, M. Seaman, K. Brown, B. Kempkes, H. Hibshoosh y B. Levine. 1999. Induction of autophagy and inhibition of tumorigenesis by beclin 1. *Nature.* 402:672-676.
- 176.- Bursch W., K. Hochegger, L. Torok, B. Marian, A. Ellinger y R. S. Hermann. 2000. Autophagic and apoptotic types of programmed cell death exhibit different fates of cytoskeletal filaments. *J. Cell. Sci.* 113:1189-98.
- 177.- Pullen N., P. B. Dennis, M. Andjelkovic, A. Dufner, S. C. Kozma, B. A. Hemmings y G. Thomas. 1998. Phosphorylation and activation of p70s6k by PDK1. *Science.* 279:707-710.
- 178.- Bursch, W. 2001. The autophagosomal-lysosomal compartment in programmed cell death. *Cell Death Differ.* 8:569–581.
- 179.- Lu Y., M. J. Lenardo y E. H. Baechrecke. 2004. Autophagy and caspases: a new cell death program. *Cell cycle.* 3:1124-1126.
- 180.- Cuervo, A. M. y J. F. Dice. 1998. Lysosomes, a meeting point of proteins, chaperones, and proteases. *J. Mol. Med.* 76:6-12.
- 181.- Kim, J., y D. J. Klionsky. 1999. Autophagy, cytoplasm-to-vacuole targeting pathway, and pexophagy in yeast and mammalian cells. *Annu. Rev. Biochem.* 69:303-342.

- 182.- Levine B. y D. Klionsky. 2004. Development by self-digestion: molecular mechanisms and biological functions of autophagy. *Dev. Cell.* 6:463-477.  
(7-11)
- 183.- Mizushima N., T. Noda, T. Yoshimori, Y. Tanaka, T. Ishii, M. D. George, D. J. Klionsky, M. Ohsumi y Y. Ohsumi. 1998. A protein conjugation system essential for autophagy. *Nature* 395:395-398
- 184.- Mizushima N., A. Yamamoto, M. Hatano, Y. Kobayashi, Y. Kabeya, K. Suzuki, T. Tokuhiya, Y. Ohsumi, y T. Yoshimori. 2001. Dissection of autophagosome formation using Apg5-deficient mouse embryonic stem cells. *J Cell Biol.* 152:657-68.
- 185.- Tanida I., E. Tanida-Miyake, T. Ueno y E. Kominami. 2001. The human homolog of *Saccharomyces cerevisiae* Apg7p is a Protein-activating enzyme for multiple substrates including human Apg12p, GATE-16, GABARAP, and MAP-LC3. *J Biol Chem.* 276:1701-1706.
- 186.- Kuma A., N. Mizushima, N. Ishihara y Y. Ohsumi. 2002. Formation of the approximately 350-kDa Apg12-Apg5.Apg16 multimeric complex, mediated by Apg16 oligomerization, is essential for autophagy in yeast. **J Biol Chem.** 277:18619-18625.
- 187.- Nemoto T., I. Tanida, E. Tanida-Miyake, N. Minematsu-Ikeguchi, M. Yokota, M. Ohsumi, T. Ueno, y E. Kominami. 2003. The mouse APG10 homologue, an E2-like enzyme for Apg12p conjugation, facilitates MAP-LC3 modification. *J Biol Chem.* 278:39517-39526.
- 188.- Ferraro E y F. Cecconi. 2007. Autophagic and apoptotic response to stress signals in mammalian cells. *Arch. Of Bioch. Bioph.* 462:210-219.
- 189.- Yang Y., Z. Liang, Z. Gu y Z. Qin. 2005. Molecular mechanism and regulation of autophagy. *Acta Pharmacol Sin.* 26:1421-34.
- 190.- Yorimitsu T. y D. Klionsky 2005. Autophagy: molecular machinery for self-eating. *Cell Death Differ. Suppl 2:*1542-52.
- 191.- Biederbick A. H. F. Kern y H. P. Elsässer. 1995. Monodansilcadaverine (MDC) is a specific in vivo marker for autophagic vacuoles. *Eur J. Cell Biol.* 66:3-14.
- 192.- Al-Awqati Q. 1986. Proton-translocating ATPases. *Annu Rev. Cell Biol.* 2:179-199.
- 193.- DeDuve C., T. DeBary, B. Poole, A. Trouet, P. Tulkens y F. van Hoof. 1974. Commentary: lysosomotropic agents. *Biochem. Pharmacol.* 23:2495-2531.

- 194.- Anderson R. G., J. R. Falck, J. L. Goldstein y M. S. Brown. 1984. Visualization of acidic organelles in intact cells by electron microscopy. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 81:4838-4832.
- 195.- Lorand L., G. e. siefring, Y. s. Tong, J. Bruner-Loran y A. J. Gray. 1979. Dansylcadaverine specific staining for transamidating enzymes. *Anal. Biochem.* 93:453-458.
- 196.- Davies P. J. A., M. M. Cornwell, J. D. Johnson, A. Reggiani, M. Myers y M. P. Murtaugh. 1984. Studies on the effects of dansylcadaverine and related compounds on receptor-mediated endocytosis in cultured cells. *Diabet. Care* 7:35-41.
197. Gracia Gil M., M: van Lockeren Campagne, P. Esbrit, F. Navarro y J. M: Mato. 1984. Effect of monodansylcavcrine on the síntesis of phosphatidylinositol by Rabbit neutrophils. *Biochim. Biophys. Acta.* 794:234-239.
- 198.- Salvesen, G.S y Dixit, V.M. 1997. Caspases: intracellular signaling by proteolysis. *Cell* 91:443-446.
- 199.- Carmo-Fonseca M., L. Mendes-Suarez e I. Campos. 2000. To be or not to be in the nucleolus. *Nat Cell Biol* 2:E107-E112.
- 200.- Lam Y. W., L. Trinkle-Mulcahy y A. I. Lamond. 2005. The nucleolus. *J Cell Sci* 118:1335-1337.
- 201.- Sirri V., S. Urcuqui-Inchima, P. Roussel y D. Hernandez-Verdun. 2008. Nucleolus: the fascinating nuclear body. *Histochem Cell Biol* 129(1):13-31.
- 202.- Visintin R. y A. Amon. 2000. The nucleolus: the magician's hat for cell cycle tricks. *Curr Opin Cell Biol* 12:372-377.
- 203.- Yousefi, S., R. Perozzo, I. Schmid, A. Ziemiecki, T. Schaffner, L. Scapozza, T. Brunner y H. U. Simon. 2006. Calpain-mediated cleavage of Atg5 switches autophagy to apoptosis. *Nature Cell Biol.* 8:1124-1132.
- 204.- Ortíz R, O. M. Echeverría, R. Salgado, M: L: Escobar y G. H: Vázquez-Nin. 2006. Fine structural and cytochemical analysis of the processes of cell death of oocytes in atretic follicles in new born and prepubertal rats. *Apoptosis.* 11(1):25-37.**
- 205.- Vázquez-Nin G. H. and Sotelo J. R. 1967. Electron microscope study of the atretic oocytes of the rat. *Z. Zellforsch Mikrosk. Anat.* 80:518-533

- 206.- Devine P. J., Payne C. M, McCuskey M. K. and Hoyer P. B. 2000. Ultrastructural evaluation of oocytes during atresia in rat ovarian follicles. *Biol. Rep.* 63:1245-1252.
- 207.- Niemann A, Takatsuki A, Elsasser HP. 2000. The lysosomotropic agent monodansylcadaverine also acts as a solvent polarity probe. *J Histochem Cytochem* 48:251-8.
- 208.- Escobar M. L., O. M. Echeverría, R. Ortiz y G. H. Vázquez-Nin. 2008. Combined apoptosis and autophagy, the process that eliminates the oocytes of atretic follicles in immature rats. *Apoptosis*. 13(10):1253-66.**

## Combined apoptosis and autophagy, the process that eliminates the oocytes of atretic follicles in immature rats

M. L. Escobar · O. M. Echeverría ·  
R. Ortiz · G. H. Vázquez-Nin

Published online: 9 August 2008  
© Springer Science+Business Media, LLC 2008

**Abstract** We studied the alterations of dying oocytes in 1–28 days old rats using TUNEL method, immunolocalizations of active caspase 3, lamp1, localization of acid phosphatase, and DAPI staining. All procedures were performed in adjacent sections of each oocyte. In most dying oocytes exist simultaneously features of apoptosis as active caspase 3 and DNA breaks, and a large increase of lamp I and acid phosphatase characteristic of autophagy. Large clumps of compact chromatin and membrane blebbing were absent. Electron microscope observations demonstrated the presence of small clear vesicles and autophagolysosomes. All these features indicate that a large number of oocytes are eliminated by a process sharing features of apoptosis and autophagy. In dying oocytes of new born rats the markers of apoptosis predominate over those of autophagy. However, fragmentation and apoptotic bodies were not found. These features suggest that in different cytophysiological conditions the processes of cell death may be differently modulated.

**Keywords** Autophagy · Apoptosis · Oocyte · Pre-puberty · Normal rats

### Introduction

Follicular atresia is a key phenomenon for the removal of follicles that are not selected for ovulation. More than 99% of follicles undergo atresia in mammalian ovaries, thus

only a few follicles ovulate during active sexual life [1]. Apoptosis has been implicated in a spectrum of processes associated with normal ovarian development and function, including prenatal germ cell death [2], granulosa cell death in postnatal follicular atresia [3], ovarian surface epithelial cell death [4] and luteolysis [5]. The metabolic and morphologic features of apoptosis result from the activation of caspases (cysteine proteases). The caspases that participate in apoptosis process can be divided in two large groups: activator caspases (–8, –9, –2 and –10) which activate the effectors caspases (–3, –6 and –7), that hydrolyse various cellular proteins, causing the typical metabolic and morphological changes of the apoptosis process [6]. These changes are typically, nuclear condensation and fragmentation, cleavage of chromosomal DNA into polynucleosomal fragments and packaging of the deceased cell into apoptotic bodies without plasma membrane breakdown [7]. Apoptosis has been called programmed cell death type I, depending of proteases activity.

Autophagy has been proposed as an important not apoptotic cell death mechanism [8–10] as autophagic cell death or type II programmed cell death. Autophagy is a cell response to stress, which under certain circumstances can lead to cell death [11, 12]. Cells dying by autophagy digest themselves to death as a suicide strategy [13]. Autophagy means literally, to eat oneself. It is carried out by an intracellular reorganization of membranes and vesicles, as well as by an increased lysosomal activity [14, 15]. Autophagy involves the sequestration of cytosol or cytoplasmic organelles within double membranes, thus creating autophagosomes or autophagic vacuoles. Autophagosomes subsequently fuse with lysosomes, thereby forming autophagolysosomes also called autolysosomes. The content of these vesicles is degraded by lysosomal hydrolases (like acid phosphatase) [16, 17].

M. L. Escobar · O. M. Echeverría · R. Ortiz ·  
G. H. Vázquez-Nin (✉)  
Department of Cell Biology, Faculty of Sciences, National  
Autonomous University of Mexico UNAM, Avenida  
Universidad 300, Mexico, D.F. 04510, Mexico  
e-mail: ghvn@hp.ciencias.unam.mx

The limiting membranes of lysosomes are enriched in a specific set of integral membrane proteins called lysosomal associated membrane proteins (lamps). Lamp1 and lamp2 are homologous C-type transmembrane proteins with 37% identity in humans. They are ubiquitously expressed in different cells types [18]. These proteins are the most abundant of lysosomal membrane glycoproteins, they may play a role in creating a barrier to lysosomal hydrolases protecting the membranes from hydrolytic destruction [19, 20].

Previous studies have characterized oocyte death in ovulated oocytes that are maintained *in vitro* and they concluded that these oocytes undergo degeneration by apoptosis [21, 22]. However, the process by which oocyte degeneration occurs during atresia *in vivo* remains unknown. Ultrastructural observations and immunofluorescence analyses had revealed autophagic vacuoles in oocytes during follicular atresia in prepubertal organisms [23]. Therefore, we speculated that the oocytes in prepubertal rats may be dying by a new process different to apoptotic cell death.

In order to test this hypothesis we determine whether the markers of both processes of cell death (autophagy and apoptosis) are present in the same oocyte. We use lysosomal markers like lamp1 and acid phosphatase and apoptotic markers like active caspase 3 and TUNEL, all of these localizations were performed in serial sections of the same cell. To characterize the autophagic vacuoles we used electron microscopy methods.

## Materials and methods

In the manipulation of the animals we followed the ethical guidelines as recommended in the Guide for Care and Use of Laboratory Animals [24].

Ovaries of 1–28 days old Wistar rats were fixed in 4% paraformaldehyde in phosphate-buffered saline (PBS), embedded in paraffin and serial sectioned. In order to identify different proteins in the same cell, serial sections were carried out. Consecutive sections were mounted in numbered specimen holders and processed for different cytochemical localizations (active caspase 3, lamp1, acid phosphatase, TUNEL) and stained with DAPI. Paraffin was removed with xylene and sections were hydrated through a series of graded ethanol solutions before further treatment.

Series of 0.5  $\mu\text{m}$  thick sections of Lowicryl K4M embedded samples were also used.

Sections were observed in a Nikon Eclipse Microscopy E600, and the images were recorded with a Digital Nikon Camera DXM1200F, and processed with the ACT-1 program.

## TUNEL procedure

The localization of DNA fragmentation was performed using Apoptag Red In Situ Apoptosis Detection Kit (Chemicon International). The sections were treated with proteinase K for 15 min at room temperature, then they were labelled with biotin-dUTP by incubation with reaction buffer containing terminal deoxynucleotidyl transferase enzyme for 1 h at 37°C. Biotinylated nucleotides were detected with a streptavidin-FITC conjugate. Tissue was counterstained with DAPI (Sigma Labs.) to evaluate DNA distribution. The slides were covered with a mounting media for fluorescence microscopy (Vectashield Mounting Medium).

## Immunolocalizations

Paraffin embedded samples were used to localize active caspase 3 and lamp1 using polyclonal antibodies (Abcam and Affinity Bioreagents, respectively). Antigen unmasking was performed by microwaving tissue sections in citrate-buffer (0.1 M, pH 6) in a Panasonic oven for 3 min at 1,300 W and 6 min at 780 W. After cooling, tissue sections were washed in phosphate-buffered saline (PBS), and then incubated with primary antibody anti-active caspase 3 or anti-lamp1 for 18 h at 4°C. After washing, the slides were incubated with an anti-rabbit immunoglobulin coupled to Alexa fluor 488 (Invitrogen) for 1 h in darkness at room temperature. Then the preparations were washed and counterstained with DAPI (Sigma Labs.) to evaluate DNA distribution. The slides were covered with mounting media for fluorescence microscopy (Vectashield Mounting Medium).

Sections of tissue embedded in Lowicryl K4M were treated with 10%  $\text{H}_2\text{O}_2$  for 30 min and washed in PBS before the incubation.

## Gomori's method for acid phosphatase [25]

The paraffin and Lowicryl sections were incubated for 4 and 24 h, respectively, in freshly prepared solution containing 0.01 M  $\beta$ -glycerophosphate in 0.05 M acetate buffer (pH 5.0) containing 4 mM lead citrate. They were washed briefly and immersed in 10% ammonium sulphide for 10 min. Then the sections were washed and counterstained with 1% aqueous eosin for 1 min, washed once more and mounted in glycerine jelly. The presence of acid phosphatase in the sections was indicated by a black precipitate of lead sulphide.

## Electron microscopy

Samples of ovary were fixed in 2% glutaraldehyde and 4% paraformaldehyde or only with 4% paraformaldehyde.

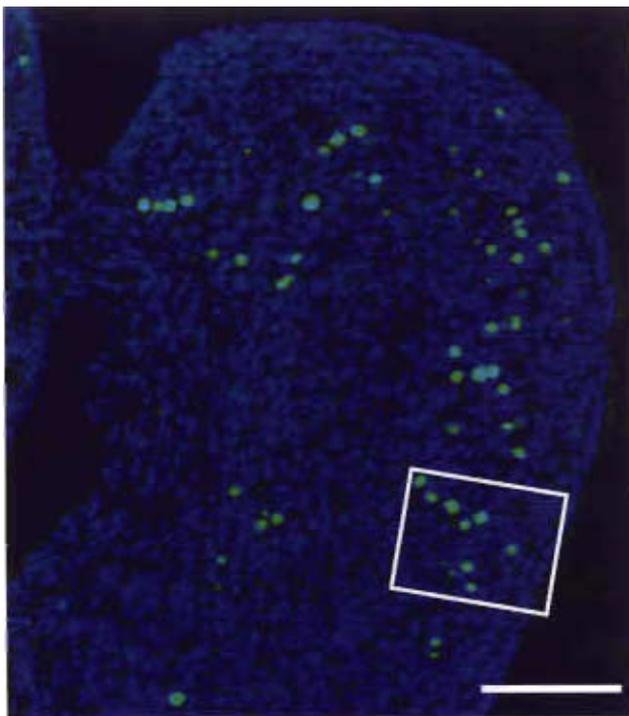
Then the samples were embedded in Epon or Lowicryl K4M. Ultrathin sections were stained with uranyl acetate and lead citrate. The preparations were studied in a Jeol 1010 electron microscopy provided with a digital camera Hamamatsu.

Quantitative estimations were carried out by taking into account all oocytes in the sections studied. They were divided into groups according to the type of the follicle: primordial, primary, developing without antrum (secondary), small antral, and large antral follicles. Data are presented as the Relative Frequency (number of positive oocytes/total number of oocytes in this group).

## Results

The structural features we used to characterize follicular atresia were the loss of the spherical shape of the follicle, the alteration of the shape of follicular cells, their detachment from the surface of the oocyte, the loss of the spherical shape of the oocyte as well as its vacuolization.

In the ovaries of one-day-old rats oocytes are either incompletely surrounded by granulosa cells (pre-follicular stage) or surrounded by one layer of flat granulosa cells (primordial follicles). Frequently the oocytes in the process of cell death are TUNEL positive (Fig. 1). Two



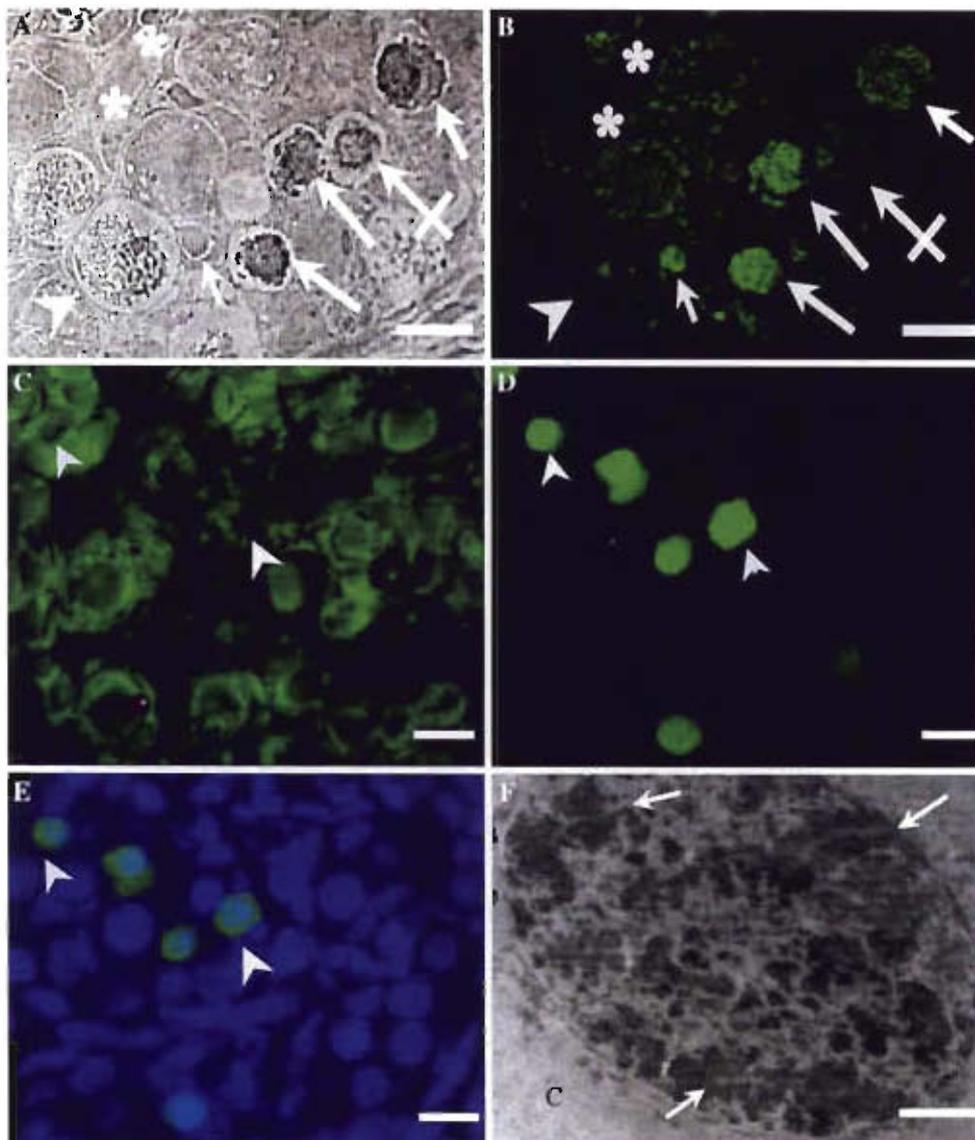
**Fig. 1** One-day-old rat. Superposition DAPI staining (blue) for DNA and TUNEL method for DNA breaks (green). The DNA is broken in numerous oocytes. The square indicates the oocytes displayed in Fig. 2c, d and e. Bar 100  $\mu$ m

patterns of cell death can be distinguished by their nuclear morphology. One of them is characterized by the presence of dark elongated chromosomal structures (Fig. 2a, arrow head), that correspond to parallel dense elongated structures of altered lateral elements of the synaptonemal complex of pachytene chromosomes that can be seen in electron microscopical preparations (Fig. 2f, arrows). Acid phosphatase activity is scarce in this stage of development. Lamp1 is frequently found in these oocytes (Fig. 2b). The other pattern of cell death is characterized by compact chromatin associated to the nuclear envelope as dark granules as seen in dictyotene state (Fig. 2a, arrows). Some oocytes in primary or primordial follicles are TUNEL and active caspase 3 positive (Fig. 2c–e, arrow heads).

Altered oocytes contain small clear vesicles in their cytoplasm (Fig. 2a, asterisk), large unstructured areas or clear vesicles and dark small granules indicating acid phosphatase activity (Fig. 2a, arrows). Numerous oocytes not involved in the process of cell death are negative to all reactions.

In order to establish whether an oocyte is in process of death we take into account morphological traits as loss of the spherical shape, high number of cytoplasmic vesicles and cytochemical features as active caspase 3 and TUNEL reaction, which are characteristic of apoptosis. However, the presence of lamp1 and active acid phosphatase per se are not signs of cell death as lysosomes are normal in small numbers in the cytoplasm of the oocytes. In order to obtain quantitative data two groups of oocytes were selected by their normal or altered morphological traits. The intensity of acid phosphatase and lamp1 labelling of structural altered cells are significantly higher than those of structural normal cells (Graphs 1, 2). Primordial, primary and follicles in initial stages of growth are frequent in the ovary of 5 days old rats. Decaying oocytes in the same ovary and in follicles with the same degree of development express lamp1 at different intensities (Fig. 3a) and their structural alterations may be different (Fig. 3b). Each oocyte may express different combinations of apoptosis and autophagy markers as, lamp1 (Fig. 3d) and acid phosphatase (Fig. 3e), indicating the presence of a high number of active lysosomes and also of active caspase 3 (Fig. 3c) a marker of apoptosis. DAPI staining demonstrates abundant extended chromatin and the absence of large clumps of compact chromatin typical of apoptotic cell death (Fig. 3f). Electron microscopic observations demonstrated numerous small clear vacuoles, autophagolysosomes containing altered mitochondria and other cytoplasmic structures. Interestingly large clumps of compact chromatin are always absent (Fig. 3g).

In the ovaries of 17 days old rats small and medium size antral follicles are present in addition to primordial,

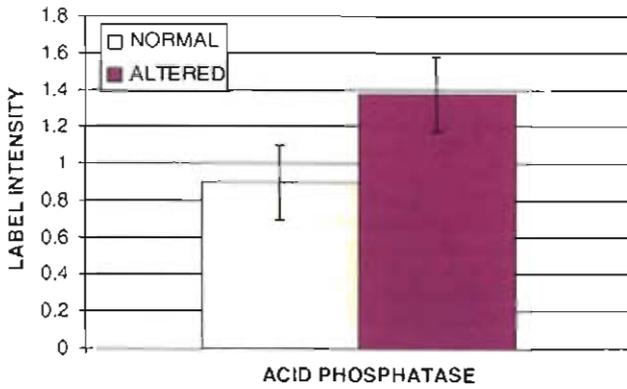


**Fig. 2** One-day-old rat. (a) Acid phosphatase, phase contrast. Most oocytes are decaying. Arrows point to oocytes with peripheral clumps of compact chromatin, which are probably in dictyotene stage of meiotic prophase I. Dark precipitates of lead phosphate are present in their cytoplasm, other decaying oocytes are slightly labelled or completely unlabelled. The crossed arrow points to an oocyte in an advanced stage of the process of death. The arrow head points to a decaying oocyte. Its cytoplasm contains numerous clear and a small number of dark precipitates. Nuclear dark elongated structures are arranged in parallel. The asterisks indicate larger oocytes with small clear vesicles. The small arrow points to a dying granulosa cell. (b) Immunolocalization of lamp1. The three oocytes pointed by arrows in the previous figure are intensely positive to lamp1. The oocytes

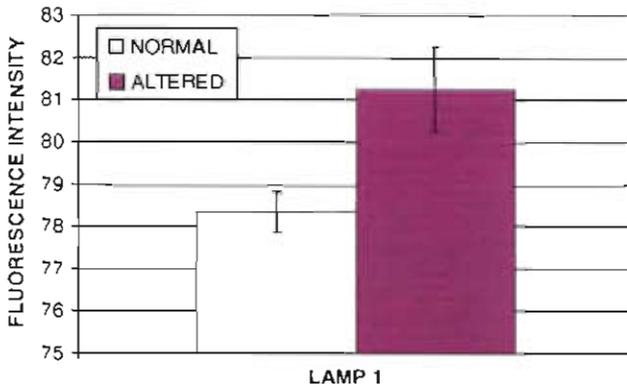
pointed by an arrow head, a crossed arrow and by an asterisk are positive to a lower extent. The small arrow points to an intensively labelled dying granulosa cell. Most other the cells are negative. (c) The cytoplasm of several oocytes are positive to active caspase 3, those pointed by the arrow heads are also positive to TUNEL method as shown by the arrow heads in d. (e) DAPI and TUNEL method merged. Most of stained nuclei correspond to normal oocytes negative to active caspase 3 and to TUNEL reaction. (f) Low power electron micrograph of a highly altered oocyte. No normal structures can be seen in the cytoplasm (c). Chromatin is compacted in large clumps. Some of them are paired chromosomes with remains of synaptonemal complexes (arrows). Bars a–e 10  $\mu$ m; f 2  $\mu$ m

primary and growing follicles developing an antrum (Fig. 4a). Most of dying oocytes are simultaneously positive to active caspase 3 and TUNEL, and also heavily labelled by lamp1 and active acid phosphatase. Figure 4b–f are sections of the oocyte indicated by a square in Fig. 4a. It is positive to active caspase 3 (Fig. 4b) and TUNEL

procedure for fragmented DNA (4e), which are typical alterations of apoptotic cell death and also it is intensively labelled by lamp1 (Fig. 4c) and by active acid phosphatase (Fig. 4d), which are autophagy markers. DAPI staining demonstrates the almost all the chromatin contained in the section is TUNEL positive (Fig. 4f). Electron micrographs



**Graph 1** The activity of acid phosphatase is significantly lower in structurally normal oocytes than in altered ones



**Graph 2** The intensity of the fluorescent signal corresponding to the immunolocalization of lamp1 is higher in altered oocytes than in normal ones

demonstrate the presence of clear vesicles and autophagolysosomes containing altered mitochondria and other cytoplasmic structures (Fig. 4g).

In the ovaries of 18–28 days old rats, in addition to small growing follicles, large antral follicles are also present (Figs. 5a and 6a). In 19 days old rats a large number of oocytes and follicular cells of atretic follicles in different stages of development from antral (Fig. 5a) to primordial follicles (Fig. 5c) are TUNEL positive (Fig. 6e).

The presence of active caspase 3 and TUNEL reaction is frequently simultaneous with increased lamp1 and acid phosphatase localizations in the same dying oocyte in growing follicles, of 25 days old rats (Fig. 6). Oocytes positive only to some of these markers are also frequently found. Two types of alterations are present simultaneously in different regions of the cytoplasm of oocytes in advanced stages of degradation: large clear areas only positive to acid phosphatase, in which no normal cytoplasmic structures can be discerned (arrows in Fig. 6b–d), and other regions of the cytoplasm with numerous small clear vesicles in which caspase 3 active and lamp1 are

localized (arrow heads in Fig. 6b–d). As in preceding developmental stages few granulosa cells surrounding the oocyte are caspase 3 or lamp1 positive, none is acid phosphatase positive, but they are frequently TUNEL positive.

In oocytes in early stages cell death lamp1 and acid phosphatase signals may be present in the same zones the cytoplasm (Fig. 4b, c). However, in highly degraded oocytes, lysosomal enzymes, as acid phosphatase, are located in the cytosol in the most altered region of the cytoplasm vesicles (Fig. 6c, d, arrows) while a protein of lysosomal membrane as lamp1 is present in a more conserved region plenty of small clear vesicles (Fig. 6c, d, arrows heads).

Decaying nucleoli containing simultaneously positive signals to active caspase 3, lamp1, active acid phosphatase, and TUNEL, are found in oocytes in process of cell death of 15–28 days old rats. These oocytes are frequently in large antral follicles of the ovaries. Most of these nucleoli resemble holed spheres, they are very dense at their periphery as demonstrated by phase contrast observations, but their central region is devoid of most of the components of at the periphery (Fig. 7a–f). DAPI stained chromatin was always located surrounding a central negative region (Fig. 7b, d, f), which is larger than that negative regions to active caspase 3 (Fig. 7a), lamp1 (Fig. 7c) and TUNEL positive signal (Fig. 7e). The Ag-NOR reaction (Fig. 7g) ascertains that these dense spherical body corresponds to a nucleolus. Adjacent sections are positive to active caspase 3 (Fig. 7h) and to lamp1 (Fig. 7i).

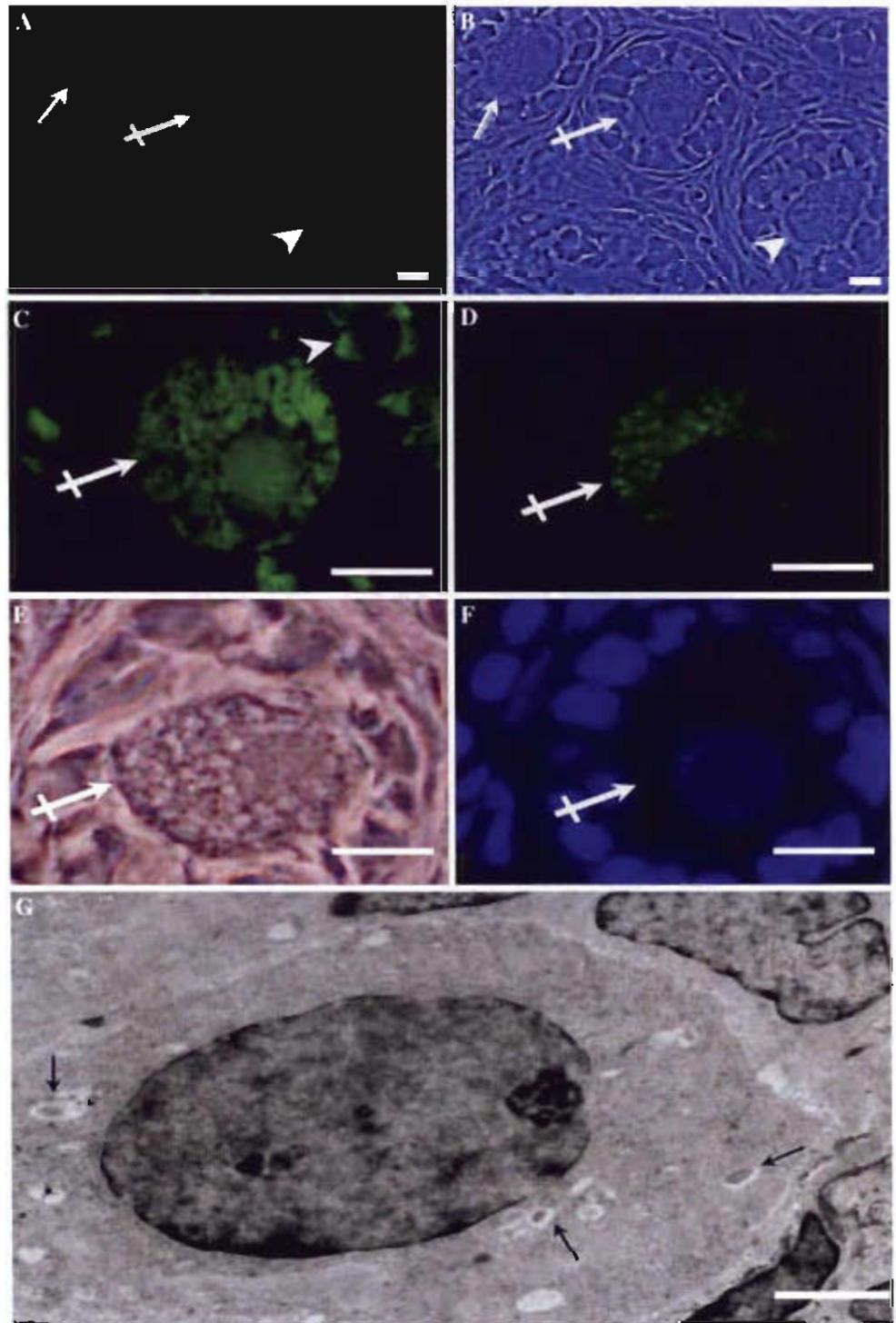
The use of osmium ammine procedure which contrasts DNA specifically, allowed the visualization of very small DNA fragments in the nucleoplasm of decaying oocytes (Fig. 8). The fragmentation was not accompanied by the condensation of chromatin; most fragments remain dispersed (Fig. 8a). Most of these small pieces of DNA were well under the resolution of light microscope (Fig. 8b).

The results of the cytochemical and immunocytochemical methods are the same in samples embedded in paraffin or in the acrylic resin Lowicryl K4M.

#### Quantitative data

In order to validate our quantitative procedures we studied the relationships between the signal of pro-caspase and that of active caspase in oocytes in the process of cell death in five different types of follicles; primordial, growing follicles without antrum (secondary), growing follicles with antrum (small antral) and large antral follicles. Graph 3 shows an inverse relation between both forms of caspase, as expected between the precursor and the active form of the same enzyme.

**Fig. 3** Five days old rat. (a) The cells of primary follicles are labelled to a different extent by anti-lamp1 antibody. Two oocytes are heavily labelled (arrow and crossed arrow). Another oocyte in process of cell death is labeled to a lesser extent (arrow head). Granulosa cells are negative. The oocyte pointed by the crossed arrow is the same in a to f. It is positive to active caspase 3 (c), lamp1 (d), numerous clear vesicles and intense active acid phosphatase reaction—dark granules (e), however most of its chromatin is not compacted (f). (b) Phase contrast images showing numerous clear vesicles in the cytoplasm of the oocytes pointed by the arrows. The oocyte pointed by an arrow head is deformed. Granulosa cells are negative to all reactions except for a few cells which are positive to active caspase 3 (c, arrow head). (g) Low power electron micrograph of an oocyte in process of death. Cytoplasmic organelles cannot be recognized. Clear vesicles and autophagic vacuoles are frequent (arrows). Bars a–f 10  $\mu$ m; g 2  $\mu$ m

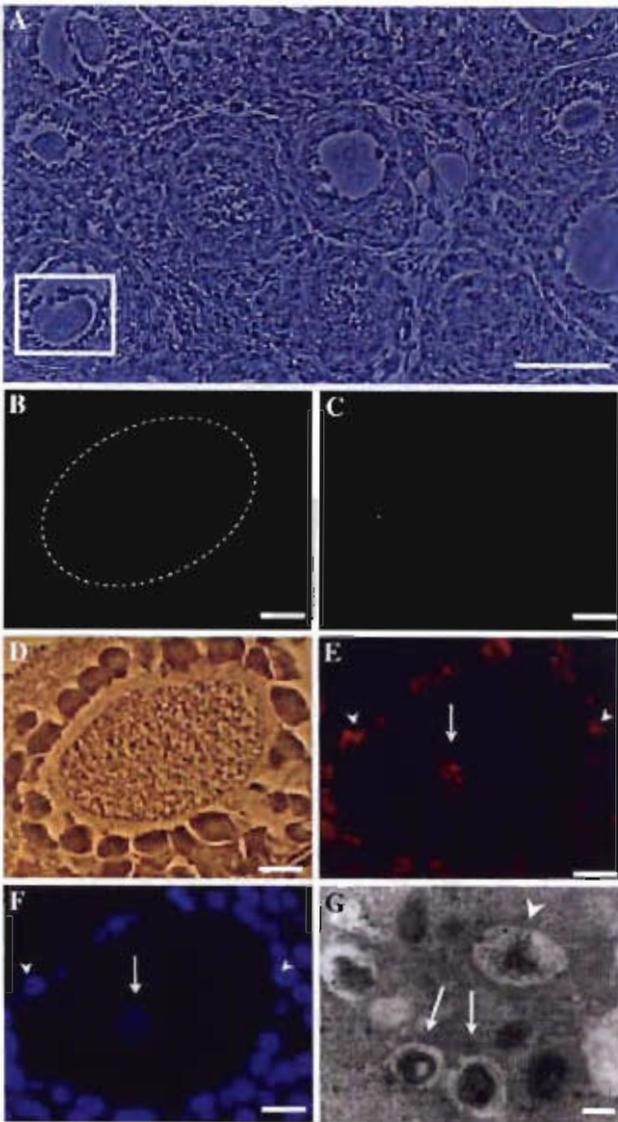


The most frequent double association of markers of degradation processes in altered oocytes is the simultaneous presence of small clear vacuoles, which probably correspond to lysosomes, and the activity of acid phosphatase ( $\approx 90\%$ ).

Incremented active acid phosphatase and lamp1 were the two cytochemical markers more frequently found in the population of decaying oocytes studied (Table 1).

Table 2 shows that 78% of the population of dying oocytes positive to more than one reaction is positive to three or four different signals simultaneously. Almost half of the decaying oocytes are positive to three markers.

Table 3 shows that the most frequent double association of markers, irrespectively of the presence of other signals in the same oocyte, is that of acid phosphatase with lamp1, two autophagic features.



**Fig. 4** Seventeen days old rat ovary. (a) Low magnification showing oocytes in small growing follicles. All oocytes are in advanced stages of cell death. The oocyte indicated by a square is analyzed in the following figures. (b–f) Four adjacent sections of a growing atretic pre-antral follicle. The oocyte is in an advanced stage of cell death and it is simultaneously positive to active caspase 3 (b), lamp1 (c), acid phosphatase (d) and TUNEL reaction (e). The dashed line surrounds the oocyte. Some regions of the cytoplasm of the oocyte are positive to active caspase 3 (b) and intensively labelled by anti-lamp1 (c). (d) Dark granules of lead phosphate are located in numerous small clear vesicles distributed in a large portion of cytoplasm. (e) TUNEL demonstrates small regions of DNA fragmentation in the nucleus of the oocyte (arrow). (f) DAPI shows that most of the DNA clumps of the oocyte are also TUNEL positive (arrow). Most granulosa cells are not labelled by anti-lamp1, anti-active caspase 3 and by acid phosphatase, but some of them are positive to the TUNEL reaction (e, f, arrows heads). (g) Electron micrograph showing clear vesicles containing altered mitochondria (arrows) and other cytoplasmic structures (arrow head). Bars a 200  $\mu$ m; b–f 10  $\mu$ m; g 100  $\mu$ m

The changes of the fraction of the total number of oocytes positives to acid phosphatase and lamp1 are roughly in parallel in different types of follicles. This

strengthens the possibility that these oocytes are involved in an autophagic process of cell death, but does not preclude the possibility that some apoptotic markers were also present (Graph 4).

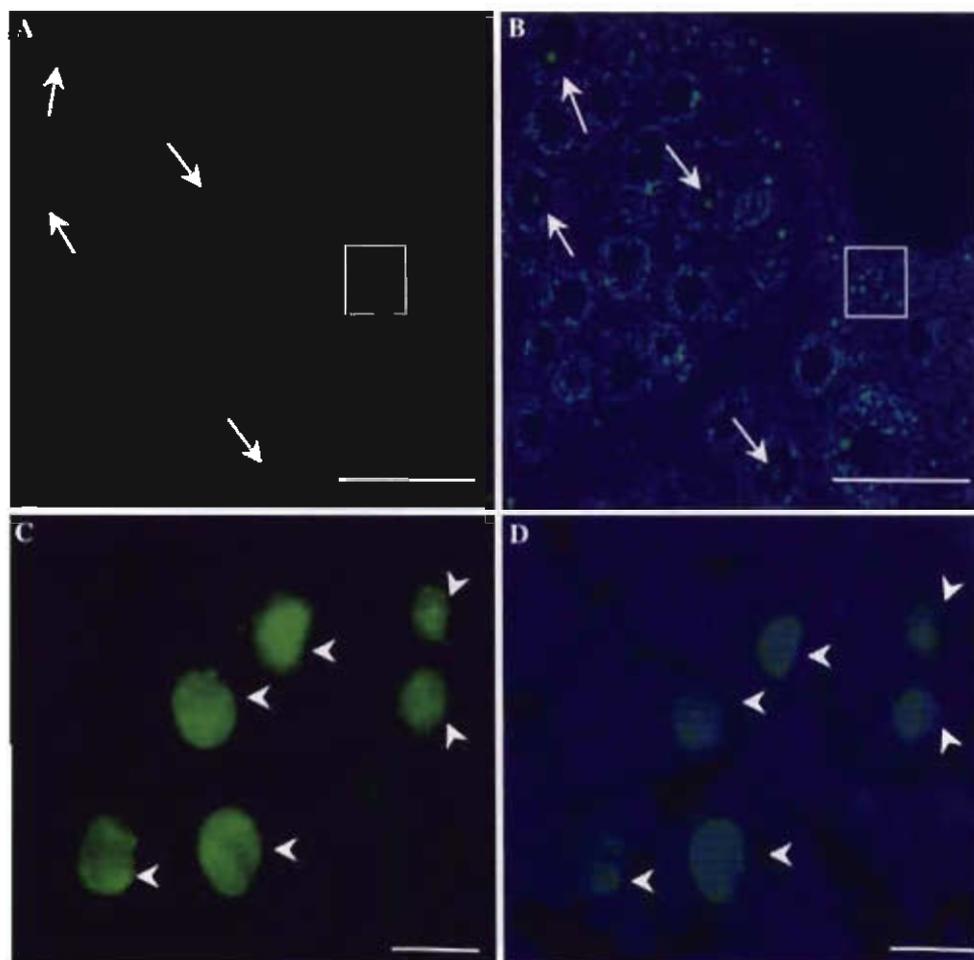
Two markers of apoptosis, active caspase 3 and TUNEL reaction, also change in the same sense in oocytes in different type of follicles. This suggests that both reactions are reliable markers of the presence of an apoptotic process in these oocytes. However, it is possible that markers of autophagy were also present (Graph 5). The lower frequency of the four individual markers was found in primary follicles and their higher frequencies correspond to small antral and primordial follicles. The frequency of double association of markers show that active caspase is almost five times more frequently associated to lamp1 than to TUNEL reaction for broken DNA, which is one of the products of the protease cascade in apoptosis (Table 3). This data suggest that early in the process of oocyte death some features of autophagy and apoptosis are simultaneously present.

Almost half of the oocytes in process of death are positive simultaneously to three markers (Table 2). The association of active caspase 3 with increased acid phosphatase and lamp1 is the most frequent triple association in dying oocytes in all kind of follicles (Graph 6). The active caspase 3 is more frequently associated to proteins involved in autophagy than to fragmented DNA, which is one of the final products of the proteolytic cascade. The triple association of active caspase 3, lamp1 and TUNEL is only present in oocytes in primordial follicles (Graph 6). A number of these oocytes are dying with structural signs of meiotic prophase I in one-day-old rats (Fig. 2).

The four markers studied, two of apoptosis and two markers of autophagy, are frequently present simultaneously in oocytes in process of cell death (Graph 7). Almost half of the oocytes in small antral follicles are positive to the four markers simultaneously. In other types of follicles the frequency of the quadruple labelling is smaller (Graph 7).

The markers of apoptosis and those of autophagy also varies along the pre-pubertal period studied. The dismiss of the oocytes in the ovaries of one-day-old rats is characterized by the presence of high levels of markers of apoptosis as active caspase 3 and TUNEL (Graph 8). The frequency of TUNEL rapidly diminish and it is not present in decaying oocytes of 5 and 10 days old rats, in which active acid phosphatase and lamp1 are the two most frequent markers. However, in these ovaries active caspase is present in a variable number of oocytes. In 15 days old rats all markers are present in moderate amounts. In the ovaries of 19 days old rats a large proportion of decaying oocytes are active caspase 3 and TUNEL positive. In 25 and 28 days old rats the TUNEL signal diminishes but not that

**Fig. 5** Nineteen days old rat. (a) Numerous granulosa cells of antral follicles are positive to TUNEL procedure. The arrows point to TUNEL positive oocytes in follicles with different degree of development. (c) Enlargement of the framed portion of a. The arrow heads correspond to the oocytes in primordial or primary follicles which are positive to TUNEL method. (b and d) TUNEL and DAPI merged. Bars a and b 200  $\mu$ m; c and d 10  $\mu$ m

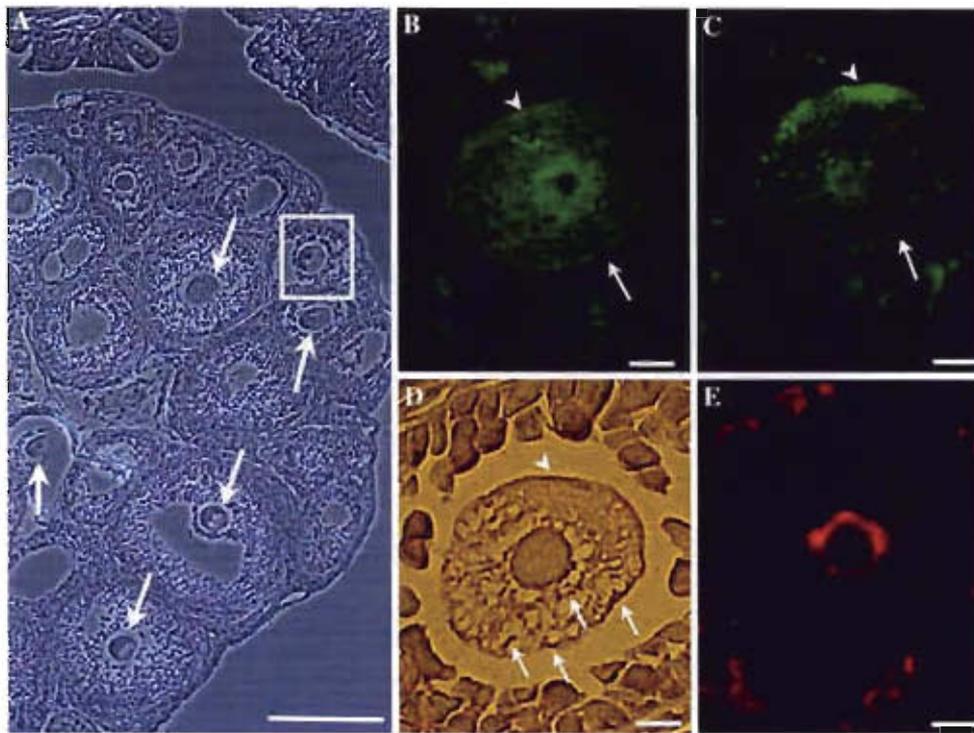


of active caspase. In these oocytes lampl and acid phosphatase predominate. Active acid phosphatase is always abundant in decaying oocytes except in 1-day-old rats (Graph 8).

## Discussion

Our structural, cytochemical and immunocytochemical observations demonstrate the following points:

- The most constant structural traits of the oocytes in process of death are the presence of cytoplasmic clear vesicles, as well as the complete absence of apoptotic bodies, membrane blebbing, and large clumps of compact chromatin including those associated with nuclear envelope.
- Acid phosphatase activity and clear vesicles are associated in the same region of the cytoplasm in more than 90% of oocytes in the early stages of the process of death. Both traits are characteristic of autophagic dismissal.
- It is remarkable that in advanced stages of oocyte death active acid phosphatase is located mainly in highly altered regions in which lampl positive vesicle have already disappeared.
- During oocyte cell death the DNA is cut to extremely short fragments without compaction of chromatin.
- Active caspase 3 and an increased signal of lampl co-exist in the cytoplasm in 73% of oocytes in process of death, indicating a frequent simultaneous presence of proteins characteristic of apoptosis and autophagy.
- The four markers (anti-active caspase 3, TUNEL, increased signal anti-lampl and increased activity of acid phosphatase) are simultaneously positive in one-third (31%) of the oocytes in the process of cell death analyzed.
- In the oocytes of rats of different ages the ratio of autophagy markers to apoptosis markers changes, probably due to different physiological conditions associated to development and the formation of antral follicles of different sizes.
- Granulosa cells are frequently internal negative control in several immunolocalizations, because a number of them are negative to the marker.



**Fig. 6** Twenty-five days old rat. (a) Phase contrast. Most growing pre-antral and antral follicles are undergoing atresia (arrows). The square indicates the oocyte analyzed in the following figures. (a–e) Four adjacent sections of an oocyte in an atretic antral follicle. (b) The arrow points to a region of the cytoplasm positive to active caspase 3. (c) The arrow head points to a region in which lampl1 signal is present as a diffuse fluorescence and also as brilliant points, which possibly

correspond to lysosomes. (d) The acid phosphatase activity is mainly distributed in the most damaged region of the cytoplasm (arrows). The arrow head, as in preceding figures points to a region of the cytoplasm without large vesicles. (e) TUNEL procedure demonstrates that most of the fragmented DNA is surrounding the nucleolus. Few granulosa cells are positive to active caspase 3 and lampl1, however, several are TUNEL positive. Bars a 200  $\mu\text{m}$ ; b–e 10  $\mu\text{m}$

Several studies demonstrate that apoptosis participates in various physiological processes in the ovary of insects as well as in mammals [3–5, 26]. In mammals apoptosis is the main process of granulosa cell deletion [27–30]. In caspase 3 knock out mice the process of granulosa cells death is altered, while that of oocytes remains normal [31]. However, there are evidences that in adults oocytes caspase 3 is expressed [29, 30], and that selective inhibitors of caspase 3 repress the oocyte death [31].

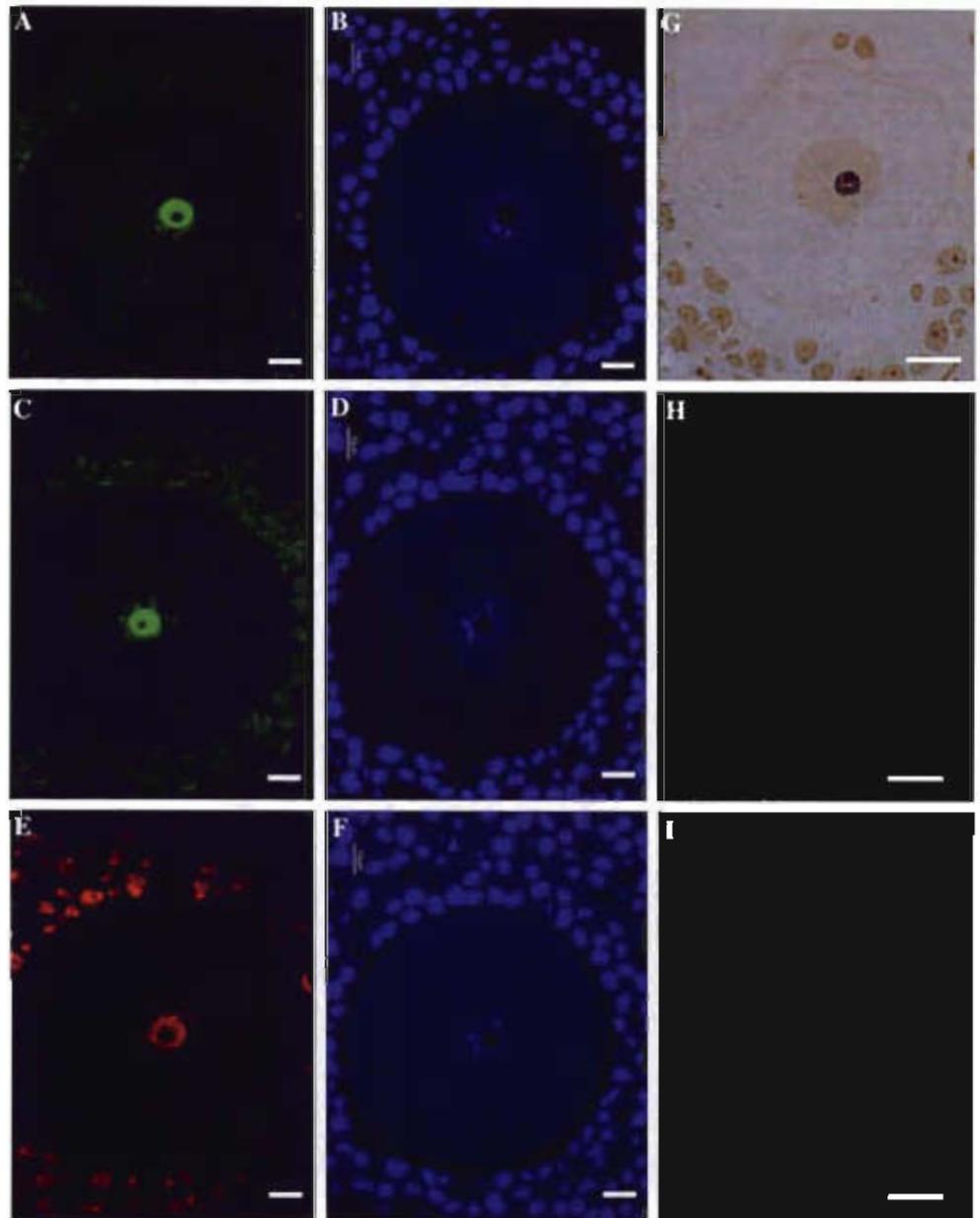
Apoptosis was thought to be the only process of follicular atresia [32]. However, in the goose and quail ovary, two other forms of programmed cell death, autophagy and necrosis-like form, coexist with apoptosis in the dismiss of granulosa cells [33, 34].

Autophagy may be induced by a stress of the metabolism of the energy. In several organisms as flies, plants, and worms, autophagy is primarily an adaptive response to survive to food deprivation. Several reports indicate the role of autophagy in maintenance of cellular homeostasis. In mice lacking autophagy, neural cell death is increased leading to neurological disorders [35]. In most situations, autophagy probably functions initially as a cytoprotective mechanism, but if cellular damage is too extensive, or if

apoptosis is compromised, an increase in autophagy may kill the cell [36, 37]. Crosstalking between autophagic and apoptotic pathways has been shown in double knock out mice fibroblasts for apoptotic genes *bax* and *bak* [38] and also in cancer cells [39]. These conditions favor the autophagic cell death pathway. Recent evidences show that  $\text{H}_2\text{O}_2$  and 2-methoxyestradiol (which is an inhibitor of manganese-superoxide dismutase) induce both apoptotic and autophagic cell death [40]. Studies on steroid-triggered salivary gland cell death during *Drosophila* development show that some caspases are active in a process exhibiting an autophagic morphology. Caspase 3 activation and *Atg* gene transcription immediately precede autophagic cell death in salivary glands [36, 41]. Several signal transduction pathways that are triggered by common cellular stress, as well as more specific signaling pathways, can elicit both autophagy and apoptosis [42]. Reactive Oxygen Species (ROS) can favor pro-apoptotic membrane permeabilization and also stimulate the proteolytic activity of *Atg4* and thereby induce autophagy [43].

It has been recently reported that some members of the antiapoptotic Bcl-2 family can regulate autophagy [44–46], possibly by interacting with Beclin 1 [44, 45]. Beclin 1 is

**Fig. 7** Nucleolar alterations. (a–f) Sections of the same nucleolus. (a–b) Active caspase 3 immunolocalization and DAPI staining of the same section. (c–d) lamp1 immunolocalization and DAPI staining of the same section. (e–f) TUNEL procedure and DAPI staining of the same section. (g–i) Adjacent sections of the same nucleolus. (g) Ag-NOR protein specific of the nucleolus. (h) Active caspase 3. (i) lamp1 immunolocalization. Bars 10  $\mu$ m

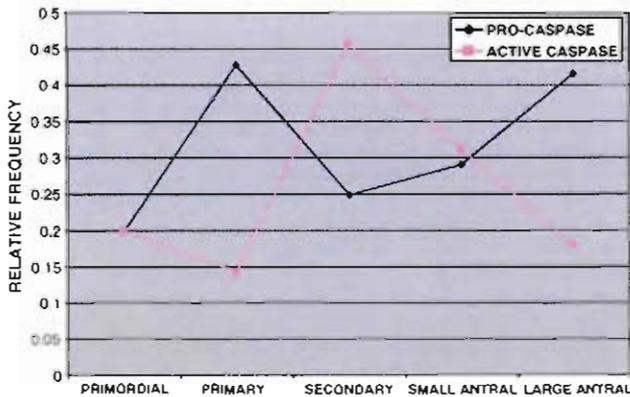
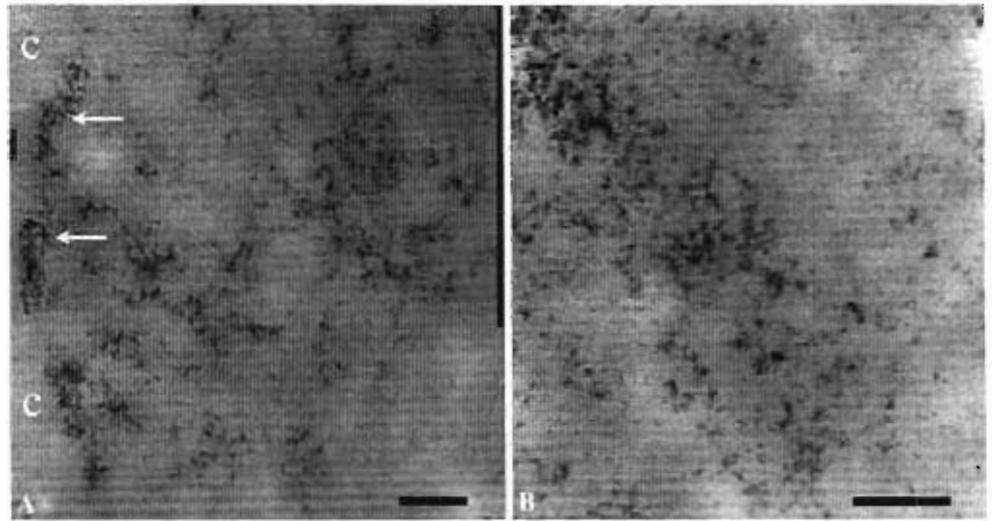


essential for autophagy induction [47, 48], and was found to interact with Bcl-2 via the BH1 and BH2 domains of the latter [45]. Autophagy helps apoptosis-deficient cells to adapt to the stress; however, prolonged autophagy results in cell death. In this case its absence imparts protection.

A previous immunocytochemical and ultrastructural study demonstrated the presence of active caspase 3, lamp1 and TUNEL signal in the population of dying mammalian oocytes [23]. In the present work we observed the simultaneous presence of markers of autophagy and apoptosis in the same oocyte in process of cell death. Main autophagic features found in these oocytes were structural changes as clear vesicles, lysosomes, autophagosomes accompanied by increased activity of acid phosphatase and lamp1

immunolocalization. Lamp1 is a protein of the membrane of lysosomes. This increase of the number of lysosomes is a typical feature of autophagic cell death. In this process lysosomal activity increases because autophagic vesicles are directed to the lysosomes [49]. Furthermore, autophagosomes in maturation process are positive to lysosomal markers [50]. Active caspase 3 is an apoptotic marker frequently present in dying oocyte. It coexists in the same oocyte more often with autophagic markers than with positive TUNEL reaction, which is a final expression of apoptotic cell death. These observations allow us to propose that in early stages of the process of oocyte death, apoptotic and of autophagic features are present simultaneously in the same oocyte. It is interesting to note that most oocytes dye their

**Fig. 8** High power views of nuclei of decaying oocytes stained with osmium ammine procedure specific for DNA. (a) DNA is fragmented. Remains of peripheral chromatin are pointed by arrows. The DNA of the extended internal chromatin is extensively fragmented. (c) Cytoplasm. (b) Higher magnification of a region of extended chromatin. The DNA is cut in small fragments which remain dispersed in nucleoplasm. Bars 100 nm



**Graph 3** The changes of the frequency of pro-caspase 3 and that of the active enzyme show an inverse relation in different types of oocytes

**Table 1** Relative frequency of the four markers of cell death in the general population of altered oocytes

	Relative frequency
Active acid phosphatase	0.298
Lamp1	0.281
Active Caspase 3	0.236
TUNEL	0.185

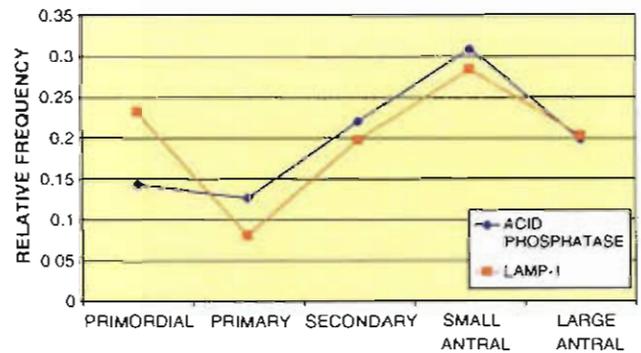
**Table 2** Relative frequency of more than one cell death marker in the total population of dying oocytes

	Relative frequency
Double associations	0.22
Triple associations	0.47
Quadruple associations	0.31

cytoplasm destroyed by autophagolysosomes and their chromatin fragmented but never compacted, except in those oocytes that dye in pachytene stage of meiotic prophase I.

**Table 3** Relative frequency of the associations of two markers in the population of double-positive oocytes

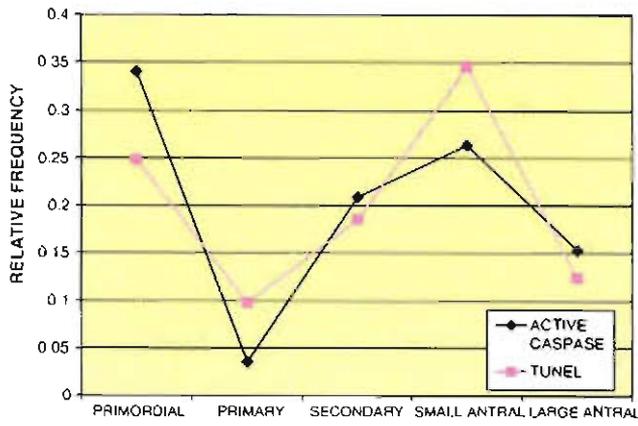
	Relative frequency
Lamp1–active caspase	0.119
Lamp1–acid phosphatase	0.595
Lamp1–TUNEL	0.095
Active caspase–acid phosphatase	0.095
Active caspase–TUNEL	0.024
Acid Phosphatase–TUNEL	0.071



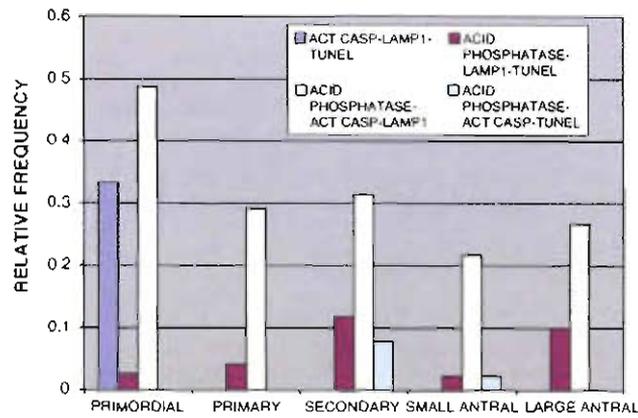
**Graph 4** Relative frequency of acid phosphatase and lamp1, changes in parallel in different types of oocytes

Nucleolar alterations include the presence of proteins normally located in the cytoplasm as lamp1 and active caspase 3. The presence of these proteins in the nucleolus of oocytes in the process of cell death must involve alterations in at least two steps regulating the distribution of macromolecules in cell compartments. One is the transport of the protein through nuclear pore and the other is the capture of the protein by the nucleolus.

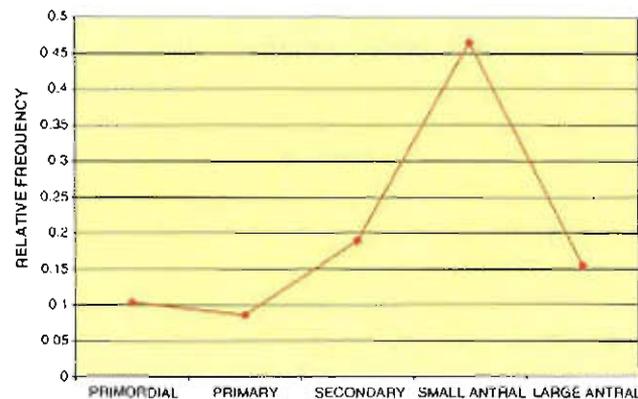
The transport of molecules larger than 40 kD requires a nuclear import signal, which is a specific sequence of



**Graph 5** The frequencies of both markers of apoptosis are similar in each group of oocytes

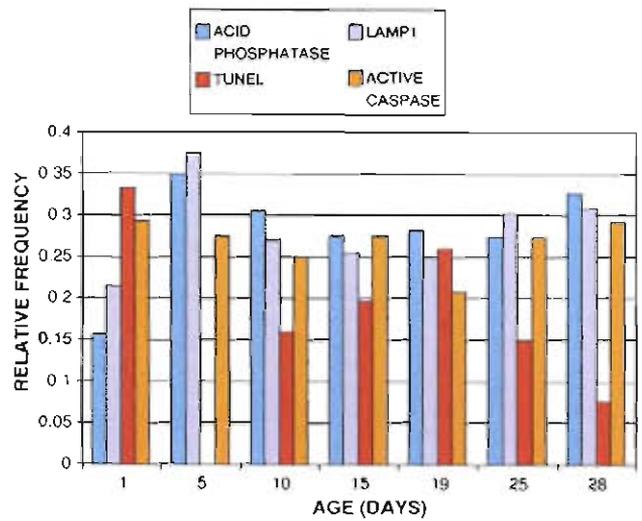


**Graph 6** Changes in the frequency of the simultaneous presence of three cell death markers in different type of oocytes



**Graph 7** Changes in the frequency of TUNEL, active caspase 3, lamp1 and acid phosphatase in the same oocyte, in different types of follicles

amino acids, and a transport receptor. The transport receptor must engage with nucleoporins with domains with multiple phenylalanine–glycine repeats. This type of transport employs energy from GTP hydrolysis. Our immunolocalizations



**Graph 8** Relative frequency of lamp1, acid phosphatase, TUNEL and active caspase 3 in oocytes of different ages

demonstrate that the importation of caspase 3, lamp1 to the nucleus do not take place in normal oocytes and granulosa cells, thus importation of these enzymes to the nucleus must involve an important alteration of these transport mechanisms.

Classically the nucleolus was considered to be the place where ribosomes are built. Recently several evidences indicate that it is related with the biogenesis of small RNAs transcribed by RNA polymerase III and encoded by genes located outside the nucleolus as 5S rRNA, tRNA, RNase P, SRP RNA and U6 snRNA [51]. Recently close to 700 human proteins were identified in purified nucleoli [51], many of these proteins are related to processes other than ribosome production as cell cycle regulation, DNA repair, pre-mRNA processing, RNA editing, telomere metabolism, tRNA processing and regulation of protein stability [52]. The nucleolus was proposed to be a domain of the sequestration of molecules that normally operate outside this organelle (mainly in nucleoplasm) [53]. These sequestrations may be involved in normal cell cycle regulation and other normal cell functions by preventing proteins from reaching their targets [54]. So the sequestration of caspase 3 and lamp1 in the nucleolus may be related to some specific but still unknown steps of the complex process of oocyte death.

All these results allow us to propose that the process of death of the oocyte probably begins with the autophagic degradation of cytoplasmic components including mitochondria. This initial phase promotes the activation of caspases which trigger a non-typical apoptotic route of cell death. Our data indicates that oocytes may use different combinations of a proteolytic mechanism mediated by caspases leading to DNA fragmentation without compaction of the chromatin and an autophagic processes mediated by autophagolysosomes to destroy the cytoplasm of the cell.

**Acknowledgments** PAPIIT IN211905-3, PAPIIT IN203308-3, CONACYT 36450-N. We thank Silvia Juárez and Ernestina Ubaldo for their technical assistance.

## References

- Hirshfield AN (1991) Development of follicles in the mammalian ovary. *Int Rev Cytol* 124:43–101. doi:10.1016/S0074-7696(08)61524-7
- Morita Y, Tilly JL (1999) Oocyte apoptosis: like sand through an hourglass. *Dev Biol* 213:1–17. doi:10.1006/dbio.1999.9344
- Tilly JL, Robles R (1999) Apoptosis and its impact in clinical reproductive medicine. In: *Molecular biology in reproductive medicine*. Parthenon, New York, pp 79–101
- Murdoch WJ (2000) Proteolytic and cellular death mechanisms in ovulatory ovarian rupture. *Biol Sings Recept* 9:102–114
- Rueda BR, Hoyer PB, Hamemilk DL, Tilly JL (1997) Potential regulators of physiological cell death in the corpus luteum. In: *Cell death in reproductive physiology*. Springer-Verlag, New York, pp 161–181
- Garrett WM, Guthrie HD (1999) Expression of Bcl-2 and 3-hydroxysteroid dehydrogenase protein during oocyte and follicle development in foetal and post-natal pig ovaries. *Reprod Fertil Dev* 11:463–470. doi:10.1071/RD00003
- Kerr JFR, Willie AH, Currie AR (1972) Apoptosis: a basic biological phenomenon with wide-ranging implications in tissue kinetics. *B. J Cancer* 26:239–257
- Baehrecke EH (2005) Autophagy: dual roles in life and death? *Nat Rev Mol Cell Biol* 6:505–510. doi:10.1038/nrm1666
- Aki T, Yamaguchi K, Fujimiyama T, Mizukami Y (2003) Phosphoinositide 3-kinase accelerates autophagic cell death during glucose deprivation in the rat cardiomyocyte-derived cell line H9c2. *Oncogene* 22:8529–8535
- Bursch W, Ellinger A, Kienzl H, Torok L, Pandey S, Sikorska M, Walker R, Hermann RS (1996) Active cell death induced by the antiestrogens tamoxifen and ICI 164 384 in human mammary carcinoma cells (MCF-7) in culture: the role of autophagy. *Carcinogenesis* 17:1595–1607. doi:10.1093/carcin/17.8.1595
- Schweichel JU, Merker HJ (1973) The morphology of various types of cell death in prenatal tissues. *Teratology* 7:253–266. doi:10.1002/tera.1420070306
- Clarke PGH (1990) Development cell death: morphological diversity and multiple mechanisms. *Anat Embryol (Berl)* 181:195–213. doi:10.1007/BF00174615
- Gozuacik D, Kimchi A (2004) Autophagy as a cell death and tumor suppressor mechanism. *Oncogene* 23:2891–2906. doi:10.1038/sj.onc.1207521
- Levine B, Klionsky DJ (2004) Development by self-digestion: molecular mechanisms and biological functions of autophagy. *Dev Cell* 6:463–477. doi:10.1016/S1534-5807(04)00099-1
- Shintani T, Klionsky DJ (2004) Autophagy in health and disease: a double-edged sword. *Science* 306:990–995. doi:10.1126/science.1099993
- Klionsky DJ, Emr SD (2000) Autophagy as a regulated pathway of cellular degradation. *Science* 290:1717–1721. doi:10.1126/science.290.5497.1717
- Lu Y, Lenardo MJ, Baehrecke EH (2004) Autophagy and caspases: a new cell death program. *Cell Cycle* 3:1124–1126
- Bursch W (2001) The autophagosomal-lysosomal compartment in programmed cell death. *Cell Death Differ* 8:569–581. doi:10.1038/sj.cdd.4400852
- Fukuda M (1991) Lysosomal membrane glycoproteins. Structure, biosynthesis and intracellular trafficking. *J Biol Chem* 266:21327
- Sawada R, Jardine KA, Fukuda M (1993) The genes of major lysosomal membrane glycoproteins lamp1 and lamp2. The 5'-flanking sequence of lamp2 gene and comparison of exon organization in two genes. *J Biol Chem* 268:13010
- Perez GI, Tao XJ, Tilly JL (1999) Fragmentation and death (a. k. a. apoptosis) of ovulated oocytes. *Mol Hum Reprod* 5:414–420. doi:10.1093/molehr/5.5.414
- Perez GI, Jurisicova A, Matikainen T, Moriyama T, Kim MR, Takai Y et al (2005) A central role for ceramide in the age-related acceleration of apoptosis in the female germline. *FASEB J* 19:860–862
- Ortiz R, Echeverría OM, Salgado R, Escobar ML, Vázquez-Nin GH (2006) Fine structural and cytochemical analysis of the processes of cell death of oocytes in atretic follicles in new born and prepubertal rats. *Apoptosis* 11:25–37. doi:10.1007/s10495-005-3347-0
- Guide Line for the Care and Use of Laboratory Animals (1996) The National Academies Press, Washington, DC, pp 1–140
- Gomori G (1950) An improved histochemical technique for acid phosphatase. *Stain Technol* 25:81
- Chen P, Abrams JM (2000) Drosophila apoptosis and Bcl-2 genes: outliers fly in. *J Cell Biol* 148:625–627
- Jolly PD, Smith PR, Heath DA, Hudson NL, Lun S, Still LA et al (1997) Morphological evidence of apoptosis and prevalence of apoptotic versus mitotic cells in the membrane granulosa of ovarian follicles during spontaneous and induced atresia in ewes. *Biol Reprod* 56:837–846. doi:10.1095/biolreprod56.4.837
- Hughes FM Jr, Gecospe WC (1991) Biochemical identification of apoptosis (programmed cell death) in granulosa cells. Evidence for a potential mechanism underlying follicular atresia. *Endocrinology* 129:2415–2422
- Tilly JL (1997) Apoptosis and the ovary: a fashionable trend of food for thought? *Fertil Steril* 67:226–228. doi:10.1016/S0015-0282(97)81901-2
- Fenwick MA, Hulse PR (2002) Immunohistochemical localization of active caspase 3 in the mouse ovary. Growth and atresia of small follicles. *Reproduction* 124:659–663. doi:10.1530/rep.0.1240659
- Matikainen T, Perez GI, Zheng TS, Kluzak TR, Rueda BR, Flavell RA et al (2001) Caspase-3 gene knockout defines cell lineage specificity for programmed cell death signaling in the ovary. *Endocrinology* 142:2468–2480. doi:10.1210/en.142.6.2468
- Quirk SM, Cowan RG, Harman RM (2005) Progesterone receptor and the cell cycle modulate apoptosis in granulosa cells. *Endocrinology* 145:5033–5043. doi:10.1210/en.2004-0140
- D'Herde K, De Prest B, Roels F (1996) Subtypes of active cell death in the granulosa of ovarian atretic follicles in the quail (*Coturnix coturnix japonica*). *Reprod Nutr Dev* 36:175–189. doi:10.1051/rnd:19960203
- Kovacs J, Forgo V, Peczely P (1992) The fine structure of the follicular cells of the domestic goose. *Cell Tissue Res* 267:561–569. doi:10.1007/BF00319379
- Takeda M, Shirato I, Kobayashi M, Endou H (1999) Hydrogen peroxide induces necrosis, apoptosis, oncosis and apoptotic oncosis of mouse terminal proximal straight tubule cells. *Nephron* 81:234–238. doi:10.1159/000045282
- Martin DH, Baehrecke AH (2004) Caspase function in autophagic cell death in *Drosophila*. *Development* 131:275–284
- Boya P, González-Polo RA, Casares N, Perfettini JL, Dessan P, Larochette N et al (2005) Inhibition of macroautophagy triggers apoptosis. *Mol Cell Biol* 25:1025–1040. doi:10.1128/MCB.25.3.1025-1040.2005
- Fleury C, Mignotte B, Vayssière JL (2002) Mitochondrial reactive oxygen species in cell death signaling. *Biochimie* 84:131–141. doi:10.1016/S0300-9084(02)01369-X

39. Hara T, Nakamura K, Matsui M, Yamamoto A, Nakahara Y, Suzuki-Migishima R et al (2006) Suppression of basal autophagy in neural cells causes neurodegenerative disease in mice. *Nature* 441:885–889. doi:10.1038/nature04724
40. Chen Y, McMillan-Ward E, Kong J, Israels SJ, Gibson SB (2008) Oxidative stress induces autophagic cell death independent of apoptosis in transformed and cancer cells. *Cell Death Differ* 15:171–182. doi:10.1038/sj.cdd.4402233
41. Lee CY, Clough EA, Yellon P, Teslovich TM, Stephan DA, Bachrecke EHN (2003) Genomic-wide analysis of steroid an irradiation-triggered programmed cell death in *Drosophila*. *Curr Biol* 13:350–357
42. Maiuri MC, Zalckvar E, Kimchi A, Kroemer G (2007) Self-eating and self-killing: crosstalk between autophagy and apoptosis. *Nat Rev Mol Cell Biol* 8(9):741–752. doi:10.1038/nrm2239
43. Scherz-Shouval R, Shvets E, Fass E, Shorer H, Gil L et al (2007) Reactive oxygen species are essential for autophagy and specifically regulate the activity of atg4. *EMBO J* 26:1749–1760. doi:10.1038/sj.emboj.7601623
44. Shimizu S, Kanaseki T, Mizushima N, Mizuta T, Arakawa-Kobayashi S, Thompson CB et al (2004) Role of Bcl-2 family proteins in a non-apoptotic programmed cell death dependent on autophagy genes. *Nat Cell Biol* 6:1221–1228. doi:10.1038/ncl1192
45. Pattingre S, Tassa A, Qu X, Garuti R, Liang XH, Mizushima N et al (2005) Bcl-2 antiapoptotic proteins inhibit Beclin 1-dependent autophagy. *Cell* 122(6):927–939. doi:10.1016/j.cell.2005.07.002

40

4

4

4

4

5

5

5

5

5

10.1016/S0955-0674(00)00102-2

044 55 1\*

Jose Maria Die

goes?

HS

PR

/

10.1016/S0955-0674(00)00102-2

ZW

www.digitalprintshop.com.mx printshop@cablavisio

10.1038/35014078

10.1242/jcs.01736

10.1007/s00418-007-0359-6