



**UNIVERSIDAD NACIONAL AUTÓNOMA
DE MÉXICO**

FACULTAD DE CIENCIAS

Muerte celular programada de las células granulosas de
folículos antrales en la rata adulta

T E S I S

QUE PARA OBTENER EL TÍTULO DE:

BIÓLOGA

P R E S E N T A :

ANA SOFÍA CASASA VÉLEZ



FACULTAD DE CIENCIAS UNAM

**DIRECTOR DE TESIS:
DRA. OLGA MARGARITA ECHEVERRÍA
MARTÍNEZ**

2013



Universidad Nacional
Autónoma de México



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.

ÍNDICE

RESUMEN.....	1
ABSTRACT.....	2
I. INTRODUCCIÓN.....	3
I.1. Ovario.....	3
I.2. Atresia y selección folicular.....	9
I.3. Muerte celular programada.....	13
I.3.I Apoptosis.....	13
I.3.II Autofagia.....	19
I.3.III Necrosis.....	25
I.4. Muerte celular programada en ovario de rata.....	26
II. OBJETIVOS.....	28
II.1 Objetivo general.....	28
II.2 Objetivos particulares.....	28
III. HIPÓTESIS.....	29
IV. MÉTODOS.....	30
IV.1. Inmunolocalizaciones.....	30
IV.2. Microscopía electrónica de transmisión.....	34
V. RESULTADOS.....	36
V.1 Inmunolocalizaciones.....	36
V.2 Microscopía electrónica de transmisión.....	43
VI. DISCUSIÓN.....	52
VII. CONCLUSIONES.....	57

VIII. REFERENCIAS.....	58
IX. ANEXO.....	62

RESUMEN

La atresia folicular es un proceso presente en todos los mamíferos. Durante la atresia, hay muerte celular programada del ovocito y de las células somáticas. Estudios previos han demostrado que el proceso que elimina a los ovocitos es la combinación de la muerte apopótica y autofágica. Asimismo, se ha reportado que existe apoptosis y muerte por autofagia en la misma población de células de la granulosa; sin embargo, no se ha caracterizado el mecanismo por el cual mueren estas células de forma individual. El objetivo general es describir las alteraciones de las células de la granulosa *in situ* y de forma individual durante la atresia folicular en la rata adulta. Se realizaron inmunolocalizaciones de marcadores iniciales y tardíos de apoptosis y autofagia (caspasa-3 activa y TUNEL para apoptosis, y Beclina 1 y LC3 para autofagia). Asimismo, se realizó una cuantificación para reportar las proporciones de los distintos tipos de muerte presentados en la población de células de la granulosa. Igualmente, se realizó la cuantificación de la intensidad de la fluorescencia para marcadores autofágicos para asegurar que las células consideradas en proceso de muerte por autofagia, realmente se encontraban en proceso de muerte y no era únicamente autofagia fisiológica. Los resultados muestran principalmente que existe una fracción de células que mueren por apoptosis, otra fracción que mueren por autofagia y, en menor proporción, una fracción que muere por la combinación de apoptosis y muerte por autofagia. Los resultados a nivel de microscopía óptica fueron apoyados por imágenes de microscopía electrónica de transmisión en donde se observó el mismo comportamiento que el anterior evaluado por microscopía de epifluorescencia. Además se observaron células con una morfología que puede corresponder a cualquier tipo de muerte.

ABSTRACT

Follicular atresia is a process presented in all mammals. During atresia, oocytes and follicular cells undergo programmed cell death. Previous studies have shown that the process that eliminates oocytes is a combination between apoptotic and autophagic cell death. It is also reported that there is apoptotic and autophagic cell death in the population of granulosa cells, nevertheless, the precise mechanism by which these cells die has not been characterized for individual cells. The general objective is to describe the alterations presented in granulosa cells *in situ* and individually during follicle atresia in adult rat. To address this, immunofluorescence localizations for initial and late apoptotic and autophagic markers (active caspase-3 and TUNEL for apoptosis, and Beclin 1 and LC3 for autophagy) were made. Quantification was made in order to report the proportion of cell death types presented in granulosa cell population. In addition, fluorescence intensity quantification was made for the autophagic markers in order to certify that the cells counted were in the process of autophagic cell death and not physiological autophagy. The results of these assays mainly show that there is a fraction of cells that undergo apoptotic cell death, another fraction that undergoes autophagic cell death and, in a much lower proportion, a fraction that undergoes a combination of apoptotic and autophagic cell death. Complementary to the optic assays, transmission electron microscopy images support the assertion previously demonstrated by epifluorescence microscopy. Furthermore, cells that morphologically could correspond to any type of cell death were observed.

I. INTRODUCCIÓN

I.1 Ovario

El ovario es el órgano principal en la reproducción de las hembras de los mamíferos. Está formado por la corteza y la médula, rodeado por la túnica albugínea y por el epitelio germinal. El epitelio germinal es un epitelio simple con células cúbicas, que recubre todo el ovario. La túnica albugínea, que se encuentra por debajo del epitelio, está compuesta por tejido conectivo denso e irregular. La corteza está constituida por los folículos en distintos estadios de maduración y por un estroma (red de tejido conectivo con células estromáticas similares a fibroblastos). La médula es la región central del ovario, la cual está formada por tejido conectivo laxo y en ésta hay una alta vascularización proveniente de las arterias ováricas (Gartner & Hiatt, 2002; Cormack, 2003; revisado en Escobar *et al.*, 2011). (Fig.1)

El ovario tiene dos funciones principales: la ovulatoria y la esteroidogénica. La ovulatoria se refiere a la generación de un ovocito que pueda llegar a ser fertilizable y la esteroidogénica se refiere a la síntesis y secreción de hormonas esteroideas (estrógenos y progesterona) necesarias para el correcto funcionamiento del aparato reproductor. Ambos procesos requieren del desarrollo folicular para ser llevados a cabo. (Oktem & Oktay, 2008)

La unidad funcional del ovario son los folículos, los cuales están constituidos por un ovocito y las células de la granulosa (células somáticas) que los rodean (Fig.1).

Los ovocitos pueden estar rodeados por una o más capas de células de la granulosa dependiendo del estadio del desarrollo en el que se encuentren. Estas células derivan del epitelio mesotelial y están dispuestas esféricamente alrededor del ovocito en los folículos primarios y secundarios. Los folículos están rodeados por la lámina basal que los separa del tejido conectivo, el cual separa a los folículos uno del otro (Gartner y Hiatt, 2002; Oktem y Oktay, 2008).

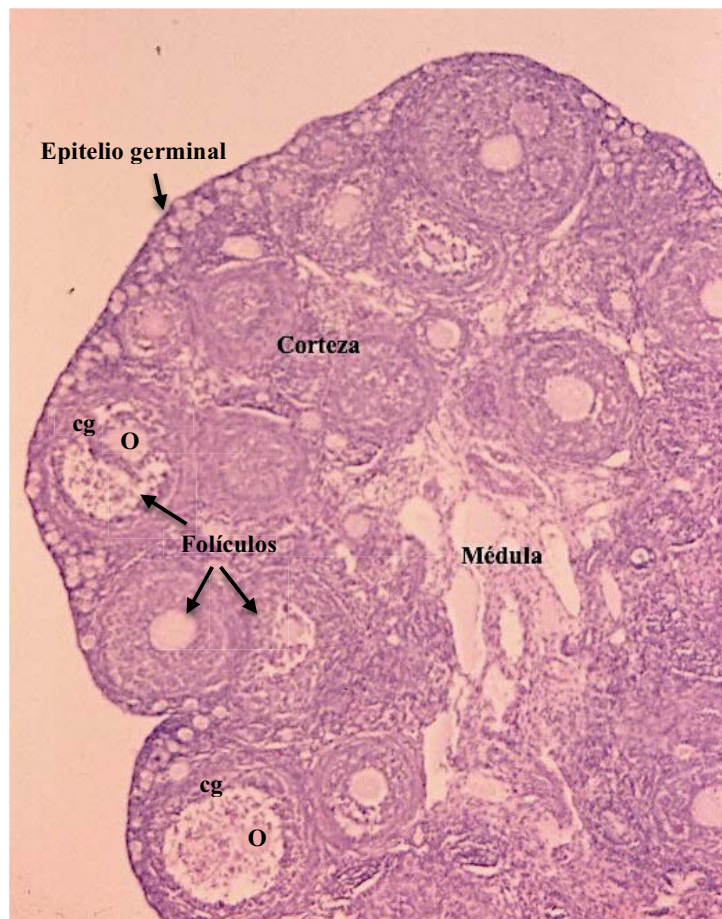


Figura 1. Ovario de ratón de los volcanes. Muestra la corteza y la médula, rodeadas por el epitelio germinal. La corteza está constituida por los folículos en distintos estadios del desarrollo, los cuales están formados por el ovocito (O) y las células de la granulosa (cg). Hematoxilina y eosina.

Los folículos se encuentran desprovistos de vascularización ya que ésta se encuentra en el tejido conectivo que los rodea, pero no atraviesa la lámina basal. Sin embargo, existen uniones comunicantes (*gap junctions*) entre las células de la granulosa, las cuales permiten la comunicación entre ellas y el ovocito. Estas uniones favorecen el flujo de nutrientes y moléculas de señalización, tal como aminoácidos, nucleótidos, hormonas, neurotropinas y factores de crecimiento. (Rankin, 1996; revisado en Escobar *et al.*, 2011)

El desarrollo folicular (foliculogénesis) ha sido clasificado de distintas formas por diferentes autores, todas tomando en cuenta el tamaño, morfología y fisiología. La clasificación de McGee y Hsueh (2000) describe el desarrollo folicular identificando folículos primordiales, primarios, secundarios, antrales tempranos, antrales y preovulatorios (Fig.2).

Los folículos primordiales están formados por el ovocito que se encuentra rodeado por una capa de células de la granulosa. El ovocito en los folículos primordiales se encuentra en estado latente mediante señales inhibitorias, tal como las moléculas PTEN, Foxo3a, p27 y Fox12. La activación de estos folículos está dada por varios factores que promueven el crecimiento folicular, el crecimiento del ovocito y la proliferación de las células de la granulosa y la teca, tal como el factor inhibitorio de leucemia (LIF), el ligando Kit (KitL) y la expresión del gen *nobox* (*newborn ovary homebox*). Después de activarse, los folículos primordiales pasan a ser folículos primarios. Los folículos primarios están formados por el ovocito y una capa de células de la granulosa que pasan de ser aplanadas a ser cúbicas. Asimismo, estos folículos tienen una lámina basal y zona pelúcida. (revisado en Escobar *et al.*, 2011)

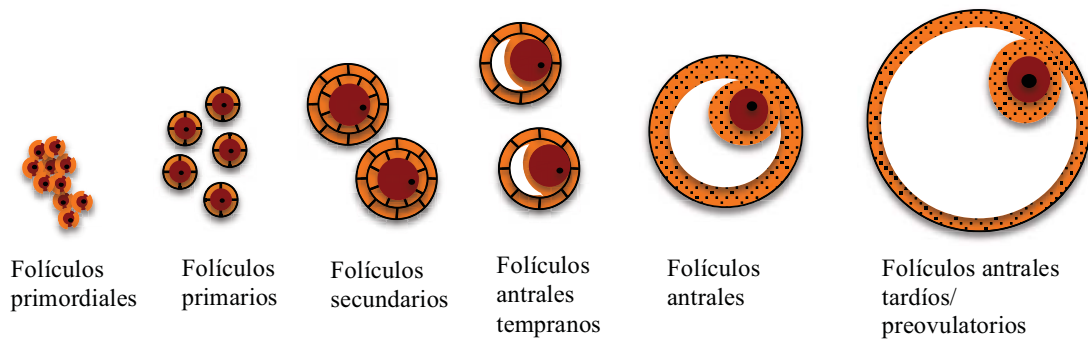


Figura 2. Desarrollo folicular según la clasificación de McGee y Hsueh (2000).

Los folículos secundarios están formados por el ovocito que continúa creciendo y varias capas de células de la granulosa. Al formarse la tercera capa de células de la granulosa, se diferencian las células de la teca a partir del tejido conectivo. Las células cercanas a la lámina basal se arreglan en paralelo a ésta y forman la teca interna, compuesta por células esteroideogénicas con una alta vascularización; mientras que las células lejanas forman la teca externa, compuesta por una banda de células no esteroideogénicas laxamente organizadas. En este periodo el ovocito secreta las glicoproteínas ZP1, ZP2 y ZP3, las cuales son esenciales en la zona pelúcida, la cual es atravesada por prolongaciones citoplasmáticas que comunican al ovocito y las células de la granulosa. El desarrollo de estos folículos hacia folículos antrales es dado principalmente por gonadotropinas. La hormona luteinizante (LH) estimula a las células tecales para que secreten andrógenos que a su vez estimulan la formación de receptores de FSH (*Follicular Stimulating Hormone*) en las células de la granulosa. Asimismo, el ovocito secreta factores que regulan algunas funciones de las células de la granulosa, tal como la división, la formación de receptores de LH y la esteroideogénesis, por lo cual la comunicación entre el ovocito y las células de la granulosa mediante las uniones

comunicantes, es sumamente importante. (revisado en McGee & Hsueh, 2000; Magoffin, 2005; revisado en Escobar *et al.*, 2011)

Los folículos antrales tempranos están caracterizados por la formación y crecimiento de un espacio antral, el cual surge por una acumulación del líquido folicular entre las células de la granulosa. Las células de la granulosa quedan divididas en las células del *cumulus oophorus* y de la *corona radiata*, que se encuentran rodeando al ovocito, y las células murales, las cuales quedan cerca de la lámina basal. El folículo incrementa en tamaño rápidamente (0.2-0.4 mm de diámetro en ratas (revisado en McGee & Hsueh, 2000)) debido a la acumulación del líquido en el espacio antral. Este líquido proviene de los capilares que rodean al folículo, de la vascularización de la teca interna y de las células foliculares; está formado principalmente por proteínas, lipoproteínas, factores de crecimiento, proteoglicanos, esteroides y gonadotropinas (revisado en Escobar *et al.*, 2011).

Durante la etapa antral y preovulatoria hay un control intrafolicular en donde factores de crecimiento y factores de supervivencia (gonadotropinas, interleucina-1 β , factor de crecimiento similar a la insulina tipo 1 (IGF-I), factor de crecimiento transformante alfa 1 (TGF α), factor de crecimiento epidérmico, factor de crecimiento de fibroblastos-2) juegan un papel muy importante al regular la selección y atresia folicular. Especialmente, los factores LH y FSH son esenciales en la proliferación y supervivencia de las células somáticas durante la selección de folículos en etapas tardías del desarrollo folicular. No obstante, la mayor parte de los folículos antrales son eliminados, mientras que únicamente algunos llegan a la etapa preovulatoria (revisado en McGee y Hsueh, 2000).

Los folículos preovulatorios o folículos de Graaf, en respuesta a la secreción cíclica de gonadotropinas, liberan al ovocito listo para ser fecundado junto con las células de la granulosa del *cumulus oophorus*. Las células somáticas restantes pasan por una transformación para formar el cuerpo lúteo en la que incrementan su tamaño y acumulan una sustancia llamada luteína (revisado en McGee y Hsueh, 2000; revisado en Escobar *et al.*, 2011).

El cuerpo lúteo es capaz de producir estrógenos y progesterona de acuerdo con el ciclo estral o menstrual. Cuando hay fertilización del ovocito, el cuerpo lúteo es mantenido por la gonadotropina coriónica humana (hCG) e incrementa la producción de progesterona, la cual inhibe el crecimiento de nuevos folículos. Esto sucede al inicio del embarazo, después la placenta es la que produce los estrógenos y progesterona. No obstante, si no hay fertilización del ovocito, el cuerpo lúteo degenera (luteólisis) y las células pierden la capacidad esteroidogénica. Esto resulta en una disminución en la producción de estrógenos y progesterona, lo cual permite el crecimiento de nuevos folículos que pueden llegar a ser seleccionados. Después de la luteolisis, las células granulosas y tecaes forman el *corpus albicans*, el cual es reabsorbido (Magoffin, 2005; revisado en Escobar *et al.*, 2011).

La producción de estrógenos y progesterona en los folículos se debe a la comunicación entre las células tecaes y las granulosas. Las células de la teca tienen la capacidad de producir andrógenos (principalmente androstenediona) a partir del colesterol, más no de convertirlos en estrógenos. Sin embargo, las células de la granulosa, a partir de la etapa folicular antral temprana, tienen la capacidad de convertir los andrógenos a estrógenos mediante el citocromo P450 (CYP19) y 17β-

hidroxiesteroide deshidrogenasa (17 β -HSD)). De esta forma, los andrógenos se difunden a través de la lámina basal y pasan a las células de la granulosa para ser convertidos en estradiol. Esta producción de hormonas esteroideas está regulada por LH (Magoffin, 2005).

I.2 Atresia y selección folicular

En los mamíferos, las hembras nacen con un número finito de ovocitos constituidos en folículos primordiales, los cuales son utilizados durante toda la vida reproductiva de la hembra. Sin embargo, el número de los folículos que son seleccionados para la ovulación es muy pequeño en comparación con el número de los que degeneran. La eliminación de estos folículos se da a través de la atresia folicular, la cual puede definirse como el proceso degenerativo mediante el cual los folículos pierden la integridad morfológica y fisiológica (Guraya, 2000). La atresia folicular se lleva a cabo mediante la muerte celular del ovocito y de las células somáticas, ya sea por apoptosis o por autofagia. Las características presentadas por los folículos atrésicos son: muerte celular programada (MCP) de las células de la granulosa y ovocito, separación de las células de la granulosa del resto, pérdida de células de la granulosa y, en casos de atresia muy avanzada, alteración en la forma del folículo. La figura 3 muestra las diferencias entre un folículo sano (a) y uno atrésico (b).

La atresia folicular, antes de la pubertad, es el proceso común por el cual pasan los folículos en crecimiento (McGee & Hsueh, 2000). Sin embargo, en adultos, las gonadotropinas juegan un papel importante en la selección de los folículos, en donde

uno o unos (dependiendo del organismo) llegarán a la etapa preovulatoria, mientras que otros serán conducidos a la atresia folicular. Este proceso es diferente para cada estadio del desarrollo folicular debido a que la susceptibilidad a la apoptosis y a los factores de supervivencia cambian en los diferentes estadios foliculares (Markstrom *et al.*, 2002). No obstante, en roedores, los folículos en etapas preantrales y antrales son más susceptibles a la atresia que los folículos en etapas tempranas del desarrollo folicular (revisado en McGee y Hsueh, 2000). Dependiendo de la fase del desarrollo folicular, la atresia puede iniciarse como una consecuencia de la muerte de células de la granulosa o como una consecuencia directa de la muerte del ovocito. Se ha demostrado que en folículos primordiales y primarios la apoptosis es un evento fisiológico autónomo del ovocito, independiente de los cambios hormonales en el ovario (Depalo *et al.*, 2003); mientras que en folículos maduros la atresia inicia con la apoptosis de las células somáticas (Tilly, 2001).

Se han propuesto dos formas de selección de folículos que continuarán el desarrollo. El reclutamiento inicial, en donde de forma continua se seleccionan ciertos folículos del acervo (*pool*) de folículos primordiales para continuar el crecimiento, y el reclutamiento cíclico, en donde algunos folículos antrales son seleccionados por un incremento de FSH de forma cíclica (McGee & Hsueh, 2000).

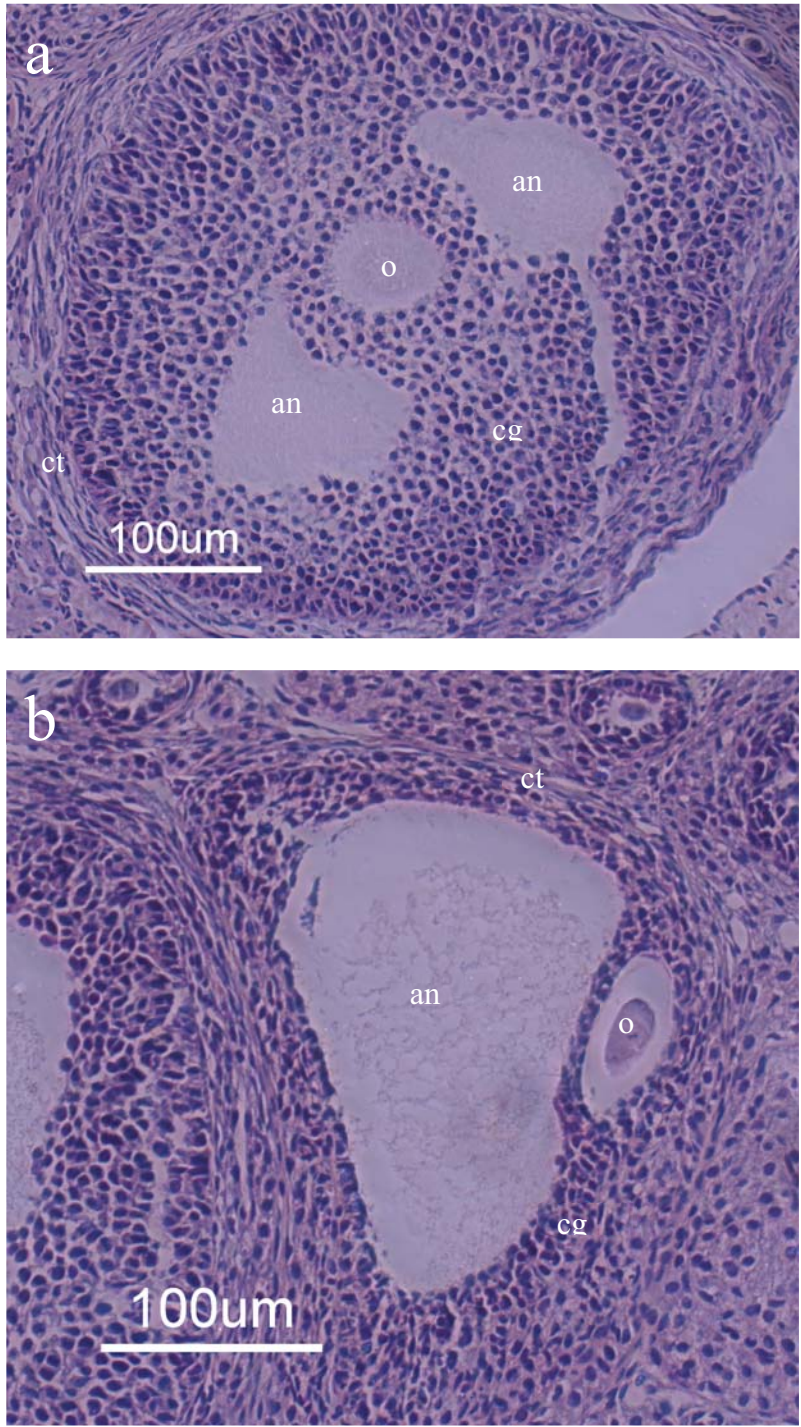


Figura 3. Muestra la diferencia entre un folículo antral sano (a) y uno atrésico (b). En a, las células de la granulosa (cg) mantienen una relación célula-célula. El ovocito (o) presenta una forma esférica. En b, el folículo ha perdido la forma esférica y ha adquirido una morfología irregular, lo mismo que el ovocito (o). Las células de la granulosa (cg) se encuentran alteradas y algunas totalmente separadas de sus vecinas. an- cavidad antral; ct- células de la teca. Hematoxilina y eosina.

Existen varias teorías acerca del proceso de selección de los folículos. Tilly (2001) describe tres teorías de este proceso de selección, en donde la primera se refiere a un proceso azaroso que es influenciado por limitaciones nutricionales. En esta teoría se propone la competencia de los ovocitos por factores de crecimiento durante la gametogénesis. Esto no sucede únicamente en ovocitos ya que durante el desarrollo ocurre en varios tipos de células, tal como en las neuronas. En la segunda teoría se propone una selección folicular por defectos en los ovocitos. Los ovocitos con anomalías cromosómicas o meiosis aberrantes son eliminados durante el desarrollo folicular como un control de calidad, de esta forma, únicamente los ovocitos competentes son los que sobreviven y continúan el desarrollo. En la tercera teoría, las células que mueren tienen una función de células nodrizas en donde unas “se sacrifican” para que otras sobrevivan. Esto sucede durante la ovogénesis, cuando las células germinales forman cistos (grupos de células germinales interconectadas y sincronizadas) en donde pocas células son las que sobreviven probablemente debido a que las demás células ayudan a controlar la meiosis y transfieren nutrientes a la célula germinal que se convertirá en un ovocito.

Dado que el 99% de los ovocitos son eliminados desde la etapa embrionaria, después del nacimiento y la etapa reproductiva, Tilly (2001) compara este proceso de selección de los ovocitos al proceso de Selección Natural de Darwin en donde hay una continua competencia por la supervivencia y únicamente el mejor adaptado es el que sobrevive. Esto puede ser particularmente cierto para especies que ovulan uno o pocos ovocitos en cada ciclo, ya que al eliminar a los ovocitos no competentes, se maximiza el éxito reproductivo.

I.3 Muerte celular programada

En 1964 Lockshin y Williams comenzaron a utilizar el concepto de muerte celular programada (MCP) para describir la muerte predecible de células durante el desarrollo ya que esto implicaba una programación en el desarrollo para que las células murieran en el tiempo y lugar exacto. Sin embargo, hoy en día el concepto de MCP es utilizado para describir el tipo de muerte celular que es mediada por una ruta de señalización que conlleva a la muerte de la célula (revisado en Jacobson *et al.* 1997). Schweichel y Merker en 1973 propusieron una clasificación de tipos de muerte celular: muerte celular tipo I (apoptosis), muerte celular tipo II (autofagia) y muerte celular tipo III (necrosis).

I.3.I Apoptosis

El término apoptosis fue propuesto por Kerr, Wyllie y Currie (1972) para describir un proceso activo de muerte celular programada con características específicas, tal como la condensación citoplasmática, la fragmentación de la célula en cuerpos apoptóticos rodeados por membrana y la fagocitosis de los restos celulares por otras células.

La apoptosis o muerte celular tipo I, es el proceso de muerte celular programada más conocido ya que está implicado en diversos procesos fisiológicos, tal como el desarrollo, en el cual hay una sobreproducción de células seguida por la muerte de una gran parte de ellas. Ejemplos de lo anterior se encuentran en el sistema nervioso o en la retracción de órganos vestigiales (ej. membrana interdigital). Asimismo, el papel que

juega la apoptosis en la homeostasis es de gran importancia al ser, junto con la mitosis, el proceso que mantiene la población de células en los tejidos en la etapa adulta. Sin embargo, la desregulación de la apoptosis puede dar lugar a diversas patologías, tal como cáncer, Parkinson, enfermedad de Huntington y Alzheimer; en algunos casos la enfermedad se debe a apoptosis excesiva y en otros es por apoptosis insuficiente. Según el Comité de Nomenclatura sobre Muerte Celular las características morfológicas que definen a la apoptosis son: la pérdida de la forma celular y nuclear, la reducción del volumen celular, la condensación de la cromatina, la fragmentación nuclear (cariorexix), la modificación ultraestructural de los organelos, y el engullimiento de la célula por fagocitosis (Elmore, 2007; Kroemer, 2009).

La característica bioquímica principal de la apoptosis es la fragmentación del DNA, la cual ocurre en dos pasos: el primero es por la acción de la topoisomerasa II y el segundo por la DNasa I/DNasa II. Esta característica de la apoptosis permite su detección mediante diversas técnicas que detectan el fraccionamiento del DNA, tal como la electroforesis en gel de agarosa con la formación de la escalera de DNA o la técnica de TUNEL (*Terminal deoxynucleotidyl transferase dUTP nick end labeling*) que marca los extremos 3'-OH de los fragmentos del DNA (Hussein, 2005; Kasagi *et. al* 1994).

La apoptosis es un mecanismo dependiente de caspasas. Las caspasas son un grupo de proteasas de cisteína que escinden específicamente después de un residuo de ácido aspártico; la especificidad de éstas es dada por el reconocimiento de los residuos de aminoácidos cercanos. Se han caracterizado 14 caspasas, las cuales han sido clasificadas en dos subfamilias: la subfamilia que participa en la apoptosis, constituida

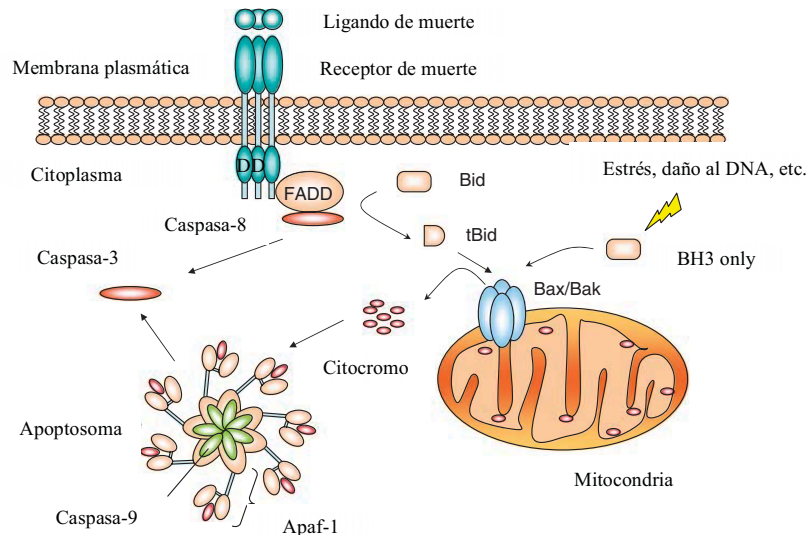
por las caspasas -2, -3, -6, -7, -8, -9 y-10; y la subfamilia de las caspasas proinflamatorias que consiste en las caspasas -1, -4, -5, -11, -12 y -13 (la caspasa 14 participa en la diferenciación de queratinocitos) (revisado en Escobar *et al.*, 2011).

Por otro lado, las caspasas que participan en la apoptosis pueden estar clasificadas dependiendo de la longitud de su prodominio, en caspasas iniciadoras y ejecutoras. Las caspasas iniciadoras son aquellas que desencadenan el proceso de apoptosis e incluyen a las caspasas -2, -8, -9, -10; mientras que las caspasas ejecutoras son las que llevan a cabo los procesos que caracterizan a la apoptosis al escindir varios substratos celulares, este grupo está formado por las caspasas -3, -6 y -7. (revisado en Degterev *et al.*, 2003; revisado en Rupinder *et al.*, 2007; revisado en Li & Yuan, 2008; revisado en Escobar *et al.*, 2011)

Las caspasas se encuentran en las células en forma de zimógenos (procaspasas) que pueden ser activados por dimerización (caspasas iniciadoras) o por escisión (caspasas efectoras). Una vez activas, las caspasas pueden activar a otras procaspasas de forma que la señal es amplificada. La estructura de las caspasas se encuentra muy conservada, teniendo un prodominio en la región N-terminal y un dominio catalítico en la región C-terminal. Las caspasas iniciadoras tienen un prodominio más largo que las ejecutoras, ya que las primeras tienen dominios de interacción de proteínas, tal como DED (*death effector domain*) o CARD (*caspase activation and recruitment domain*). (revisado en Degterev *et al.*, 2003; revisado en Rupinder *et al.*, 2007; revisado en Escobar *et al.*, 2011).

Existen dos mecanismos principales por los cuales puede ser llevada a cabo la apoptosis: la vía extrínseca y la intrínseca (Fig. 4). La vía extrínseca está mediada por receptores transmembranales, mientras que la intrínseca o mitocondrial está mediada por señales intracelulares. En la vía extrínseca, un ligando se une a un receptor transmembranal que posee un dominio de muerte (DD), el cual es citoplásmico y es el encargado de transmitir la señal extracelular al interior de la célula. Los ligandos más estudiados son FasL, TNF- α (*tumor necrosis factor α*), TWEAK (*TNF-like WEAK inducer of apoptosis*) y TRAIL (*TNF-related apoptosis-inducing ligand*). Los receptores más conocidos que pertenecen a la superfamilia de los receptores TNF, son Fas/CD95, TNF-R1, TRAMP/Apo-3/DR3/WSL-1/LARD, DR4/TRAIL-R1, DR5/TRAIL-R2/TRICK2/KILLER e interferon (IFN) (Ashkenazi & Dixit, 1998; Hussein, 2005; revisado en Escobar *et al.*, 2011). Los modelos más caracterizados son con FasL/FasR y TNF- α /TNFR1. Después de la unión del ligando al receptor, hay multimerización de los receptores que, a través de los DD, reclutan proteínas adaptadoras, las cuales se unen al dominio de muerte en los receptores. En el caso del modelo FasL/FasR, la proteína adaptadora es FADD; mientras que en el modelo TNF- α /TNFR1, la proteína adaptadora es TRADD, la cual a su vez recluta a FADD y RIP. Posteriormente, FADD se asocia con la procaspasa-8 mediante dimerización del dominio efector de muerte. La procaspasa-8 es activada de forma autocatalítica mediante la formación del complejo DISC (*death-inducing signaling complex*), esto induce la fase de ejecución de la apoptosis mediante la activación de la caspasa-3. En algunos casos en donde no hay suficiente caspasa-8 activa, la señal debe ser amplificada mediante la mitocondria. En estos casos, la caspasa-8 escinde a la proteína citosólica Bid, que es translocada a la mitocondria, en donde activa los componentes de la ruta mitocondrial. La ruta extrínseca puede ser bloqueada mediante inhibidores que regulan

la apoptosis tal como c-Flip (se une a FADD y a la caspasa-8) y Toso (inhibe el procesamiento de la caspasa-8) (revisado en Elmore, 2007; revisado en Li & Yuan, 2008).



Modificado de Li & Yuan (2008)

Figura 4. Ruta extrínseca e intrínseca de la apoptosis.

La vía intrínseca de la apoptosis es desencadenada por estímulos independientes de receptores que producen señales intracelulares que involucran a las mitocondrias. Un ejemplo de un estímulo negativo es la ausencia de factores de crecimiento u hormonas, lo cual puede dar lugar a la falla en la supresión de la apoptosis. Por otro lado, ejemplos de un estímulo positivo puede ser la radiación, toxinas, infecciones virales, hipoxia, hipertermia o radicales libres (aumentados y mantenidos). Estos estímulos activan proteínas de la subfamilia *BH3 only*, que pueden sobrepasar el efecto inhibitorio de las proteínas antiapoptóticas de la familia Bcl-2 y promover el ensamblaje de Bak/Bax en la membrana externa de la mitocondria. Como consecuencia, las proteínas citocromo c, Smac/DIABLO y la serín proteasa HtrA2/Omi, que normalmente se encuentran en el

espacio intermembranal, son liberadas al citosol. El citocromo c se une a Apaf-1 y a la procaspasa-9, activándolas y formando al apoptosoma. De esta forma, se activa la ruta dependiente de caspasas. Por otro lado, Smac/DIABLO y la serín proteasa inhiben la actividad de proteínas inhibidoras de la apoptosis. Una vez iniciado el proceso de apoptosis, otras proteínas son liberadas de la mitocondria. La proteína AIF (*apoptosis inducing factor*) y las endonucleasas G y CAD (*caspase-activated DNase*) se translocan al núcleo y fragmentan el DNA. Asimismo, la proteína AIF causa condensación periférica de la cromatina y la endonucleasa CAD promueve la condensación pronunciada de la cromatina. (revisado en Elmore, 2007; revisado en Li & Yuan, 2008)

Los reguladores de esta vía de la apoptosis son proteínas de la familia de Bcl-2, que regulan la permeabilidad de la mitocondria y por ende la liberación del citocromo c. Algunas de estas proteínas son antiapoptóticas, incluyendo Bcl-2, Bcl-c, Bcl-XL, Bcl-XS, Bcl-w y BAG. Mientras tanto, otras proteínas de esta familia son proapoptóticas, incluyendo a Bcl-10, Bax, Bak, Bid, Bad, Bim, Bik y Blk. Estas proteínas de la familia de Bcl-2 son, a su vez, reguladas por la proteína supresora de tumores p53 (revisado en Elmore, 2007).

Ambas rutas (extrínseca e intrínseca) siempre terminan en la fase de ejecución de la apoptosis. Las caspasas ejecutoras, tal como la caspasa-3, -6 o -7, activan a endonucleasas citoplasmáticas y proteasas que degradan material nuclear al igual que proteínas del citoesqueleto. La caspasa ejecutora más importante es la caspasa-3, la cual es activada por caspasas iniciadoras. Una vez activada la caspasa-3, es un punto de no retorno ya que ésta activa a la endonucleasa CAD, que degrada el DNA y condensa la cromatina. Igualmente, la caspasa-3 induce la reorganización del citoesqueleto y la

formación de los cuerpos apoptóticos. Uno de los mecanismos por el cual es llevado a cabo lo anterior, es la escisión de la gelsolina por la caspasa-3. La gelsolina a su vez escinde los filamentos de actina, resultando en la modificación del citoesqueleto que como consecuencia da lugar a una falla en el transporte intracelular, en la división celular y en transducción de señales (Elmore, 2007).

El último paso en la apoptosis es la fagocitosis de los restos celulares. En el caso de las células de la granulosa, esto sucede por células vecinas o por macrófagos. Este evento es inducido por la asimetría en los fosfolípidos de la membrana y la transposición de fosfatidilserina en la monocapa extracelular de las células apoptóticas. Esta marca es reconocida por las células fagocíticas, lo cual da la característica de ausencia de inflamación (revisado en Elmore, 2007).

I.3.II Autofagia

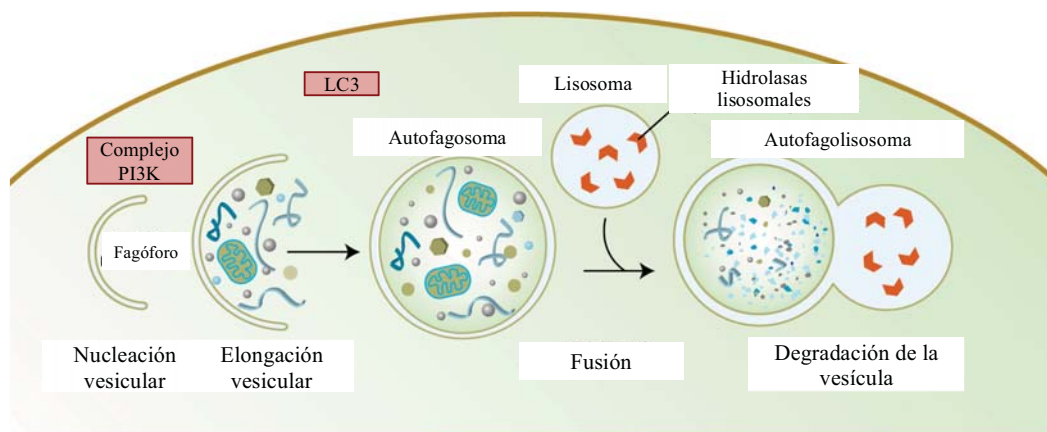
En 1963 Christian de Duve acuñó el término autofagia (comerse a si mismo) para describir el proceso en el cual la célula presentaba vesículas que contenían citoplasma y organelos al igual que enzimas lisosomales (Klionsky, 2007). La autofagia (macroautofagia) es un proceso celular muy conservado, desde levaduras hasta mamíferos, cuya función principal es la degradación de algunas proteínas mal plegadas y organelos defectuosos o cuya actividad funcional haya terminado. Este proceso también puede tener una función adaptativa que provee de nutrientes y energía a la célula en momentos de estrés al reutilizar los componentes del material degradado. En mamíferos, existe autofagia basal que puede ser estimulada en respuesta a señales de estrés intracelulares o extracelulares, tal como la falta de nutrientes o factores de

crecimiento, o a estrés en el retículo endoplásmico. La autofagia juega un papel importante en diversos procesos tanto fisiológicos, como patológicos. Ejemplos de los procesos fisiológicos son: remodelación de tejidos, procesos inmunológicos tal como la degradación de patógenos intracelulares, el envejecimiento y durante ciertos momentos del desarrollo. Por otro lado, la desregulación de la autofagia puede dar lugar a diversos procesos patológicos, tal como el cáncer y la neurodegeneración. Asimismo, bajo ciertas circunstancias puede dar lugar a la muerte celular, también llamada muerte celular programada tipo II (Deretic, 2007; He & Klionsky, 2009; Yang & Klionsky, 2010; Juenemann & Reits, 2012).

Existen tres tipos de autofagia diferenciados por la selectividad y el mecanismo mediante el cual llevan el material que será degradado hacia el lisosoma: la macroautofagia, la microautofagia y la autofagia mediada por chaperonas. La macroautofagia ha sido la más estudiada y generalmente es a la que se refiere cuando hablamos de autofagia. Ésta inicia con la formación de vesículas de doble membrana (autofagosomas) que secuestran citoplasma u organelos, que acarrear a lo largo de microtúbulos para después fusionarse con los lisosomas y dar lugar a los autofagolisosomas (autolisosomas), en donde la membrana interna del autofagosoma junto con el contenido son degradados por las hidrolasas lisosomales (Fig.5). La degradación resulta en aminoácidos y lípidos que pueden ser reutilizados en diversas rutas. El presente estudio está enfocado en la macroautofagia, aquí llamada autofagia.

En la microautofagia hay una invaginación de la membrana lisosomal, mediante la cual el citosol u organelos son engullidos por el lisosoma para ser degradados. Por último, en la autofagia mediada por chaperonas, que sólo se ha observado en

mamíferos, hay una transposición directa del material que será degradado a través de la membrana del lisosoma. Esto sucede al tener chaperonas que seleccionan proteínas que poseen la secuencia pentapeptídica KFERQ, la cual es reconocido por la proteína Hsc70 (*heat shock cognate protein 70*). Este complejo se une al receptor lisosomal Lamp-2a y la proteína es desplegada para pasar al lumen lisosomal (Kroemer *et al.*, 2009; Mizushima & Levine, 2010; Juenemann & Reits, 2012).



Modificado de Meléndez & Levine (2009)

Figura 5. Formación del autofagolisosoma.

A pesar de que las vesículas autofágicas fueron observadas en células de mamíferos desde los años 50 del siglo XX, la maquinaria molecular comenzó a describirse en levadura en los años 90 con el descubrimiento de los genes *ATG* (*autophagy related genes*) (Yorimitsu & Klionsky, 2005; Mizushima & Levine, 2010).

El proceso autofágico ocurre en cuatro pasos: la inducción, la formación del autofagosoma, la fusión con el lisosoma y la degradación del contenido. La inducción de la autofagia puede estar dada por diversos estímulos intracelulares o extracelulares. El estímulo clásico es la escasez de aminoácidos, que aumenta la fosforilación de

mTOR (*mammalian Target of Rapamycin*) y por ende la inhibición éste, el cual es a su vez un inhibidor de la autofagia que controla la transcripción y modificación de proteínas Atg. (revisado en Escobar *et al.*, 2011)

La formación del fagóforo (precursor del autofagosoma) o membrana de aislamiento requiere la formación del complejo PI3K Vps34 con la Beclina 1 (ortóloga de la proteína Atg6 de levadura) y obtiene la membrana precursora del retículo endoplásmico. La Beclina 1 es una proteína esencial en la formación temprana del autofagosoma al promover la nucleación. Ésta se encuentra en la red del trans Golgi y forma parte del complejo fosfatidilinositol 3-cinasa clase III, el cual es activado por UVRAG, Ambra1 y Bif-1. La Beclina 1 fue descubierta inicialmente como una proteína que interactúa con Bcl-2, inhibiéndola, al igual que Bcl-xL. (revisado en Escobar *et al.*, 2011)

La actividad de Vps34 permite la conjugación de Atg5 con Atg12, la cual requiere a la Atg7 y Atg10. Atg5-Atg12 forma un complejo con Atg16, que modula el proceso de conjugación de LC3. La proteína LC3 es activada por la proteína Atg4, dando como resultado la proteína citosólica LC3-I que posteriormente se conjuga con fosfatidiletanolamina (PE) para formar LC3-II, que se encuentra asociada a la membrana (Juenemann & Reits, 2012). Atg5-Atg12 se disocia al completar la formación del autofagosoma, no obstante, LC3-II permanece asociada al autofagosoma. La proteína LC3 es necesaria para la formación del autofagosoma y se encuentra en el fagóforo y en la membrana del autofagosoma, por lo cual ésta es una proteína marcadora de vesículas autofágicas. (revisado en Escobar *et al.*, 2011)

Hay inhibidores de Vps34, tal como la 3-metiladenina (3-MA), que impiden la nucleación del fagóforo. Una vez formado el autofagosoma, éste se fusiona con un lisosoma y el material secuestrado es degradado mediante las enzimas lisosomales, junto con la membrana interna del autofagosoma. Una vez formado el autofagolisosoma, éste adquiere proteínas lisosomales asociadas a la membrana (Lamp1 y Lamp2) (revisado en Escobar *et al.*, 2011).

La autofagia como proceso de muerte celular programada, ocurre principalmente durante el desarrollo o en procesos homeostáticos del adulto que requieren una gran eliminación de células o cuando los fagocitos no tienen un fácil acceso a la zona de eliminación de células. En situaciones como falta de nutrientes, la autofagia incrementa y funciona como mecanismo de supervivencia; sin embargo, si el daño a la célula es excesivo o si la apoptosis está comprometida, la autofagia es utilizada como proceso de muerte. (revisado en Escobar *et al.*, 2011)

La autofagia tiene un papel dual al tener la capacidad de estar involucrada tanto en la supervivencia de la célula, como en la muerte. Un ejemplo de esto es en el cáncer, en donde la autofagia puede tener un papel protector al optimizar los recursos en células cancerígenas, permitiendo un rápido crecimiento, o eliminando mitocondrias despolarizadas que podrían inducir la muerte por apoptosis. No obstante, la autofagia también juega un papel importante en el tratamiento contra el cáncer, al limitar el tamaño de las células hasta causar la muerte (Baehrecke, 2005; revisado en Escobar *et al.*, 2011). La característica morfológica de este proceso es una muy alta vacuolización en ausencia de la compactación de la cromatina (Kroemer, 2009). En algunos casos se

presenta una ligera compactación del citoplasma y una dilatación de las mitocondrias y retículo endoplásmico (revisado en Escobar *et al.*, 2011).

Young *et al.* (2013) mencionan los mecanismos mediante los cuales puede estar actuando la autofagia: el primero se refiere a la autofagia como un mecanismo de supervivencia para la célula, el segundo es un mecanismo de muerte independiente de caspasas y el tercero es un mecanismo de muerte dependiente de caspasas. Los autores proponen que el mecanismo que seguirá la autofagia depende del balance entre la formación del autofagosoma y la degradación. En esta propuesta, si los autofagosomas son degradados fácilmente, la autofagia funciona como un mecanismo de supervivencia; si hay un exceso de maduración y degradación de los autofagosomas, la autofagia funciona como un mecanismo de muerte independiente de caspasas; y si hay una acumulación de membranas autofagosomales o autofagosomas inmaduros, entonces la autofagia funcionará como un mecanismo de muerte dependiente de caspasas en donde la caspasa-8 es activada.

Como fue previamente mencionado, existe una ruta de autofagia dependiente de caspasas. Martin y Baehrecke (2004) demostraron que en células de las glándulas de saliva de *Drosophila* las caspasas son necesarias para activar la muerte celular autofágica y mencionan que en *Drosophila*, justo antes de que se induzca la muerte celular por autofagia, hay genes apoptóticos que son activados.

I.3.III Necrosis

Durante mucho tiempo la necrosis fue considerada como un tipo de muerte accidental y no programada de las células o tejido. Las características más distintivas de la necrosis son la lisis celular y nuclear que conllevan a la inflamación al haber liberación del contenido intracelular. Otras características importantes de la necrosis son: la dilatación de las cisternas del retículo endoplásmico rugoso (sin pérdida de los ribosomas), de la envoltura nuclear, aparato de Golgi y en algunos casos de las mitocondrias; puede o no haber condensación de la cromatina (Clarke, 1990; Escobar *et al.*, 2011).

Hoy en día hay suficiente información para decir que este proceso puede estar regulado, incluso se ha utilizado el término ‘necroptosis’ para referirse a la necrosis regulada. Este proceso puede ser desencadenado por varios estímulos, tal como daño al DNA, excitotoxinas o mediante receptores de muerte. Aún no se sabe la ruta de señalización exacta por la cual mueren las células durante la necrosis, pero se sabe que puede haber ciertas moléculas involucradas. Por ejemplo, al haber inhibición de las caspasas, RIP1 y RIP3 no son degradadas y pueden dar lugar a la muerte necrótica (Galluzzi *et al.*, 2012).

I.IV Muerte celular programada en ovario de rata

Estudios previos de nuestro grupo han demostrado *in vivo* que el proceso que elimina a los ovocitos durante la atresia folicular está dado por la muerte celular programada en donde hay una combinación de apoptosis y autofagia (Ortiz *et al.*, 2006; Escobar *et al.*, 2008). Esto fue corroborado por el trabajo de Escobar *et al.* (2010) en el cual se demostró *in vitro* que la muerte de los ovocitos se debía a apoptosis y autofagia. Estos trabajos emplean diversas técnicas, las cuales incluyen inmunolocalizaciones dirigidas a proteínas características de apoptosis o autofagia, junto con ensayos para la identificación de fragmentación del DNA (TUNEL). Asimismo, se empleó la técnica de microscopía electrónica de transmisión para observar la ultraestructura de los ovocitos e identificar estructuras apoptóticas y autofágicas.

Choi *et al.* (2010) demostraron que en cultivo de células de la granulosa de ratas inmaduras tratadas con PMSG (*pregnant mare serum gonadotropin*), hubo una correlación entre la muerte por apoptosis y la muerte por autofagia en los mismos folículos. Esto fue comprobado por medio de inmunofluorescencia, en donde utilizaron la proteína LC3 como marcador de autofagia y caspasa-3 activa como marcador de apoptosis. Demostraron que las células de la granulosa de folículos primarios, preantrales y antrales (antrales iniciales, medios y tardíos) presentaron una intensa inmunoreactividad de LC3. Igualmente analizaron la expresión de LC3 y de caspasa-3 activa, encontraron que había una correlación positiva entre la expresión de LC3 y la de caspasa-3 activa, y que al tratar a las ratas con PMSG la expresión de LC3 y de caspasa-3 activa disminuía en los primeros dos días, pero incrementaba al tercero. Asimismo, analizaron la colocalización de LC3 y caspasa-3 activa en células de la granulosa de

folículos de ratas que habían sido tratadas con PMSG. Encontraron que en células de la granulosa de folículos antrales sanos había una débil inmunoreactividad para LC3 y para caspasa-3 activa, mientras que en folículos atrésicos que presentaban una alta inmunoreactividad para caspasa-3 activa, también había una intensa inmunoreactividad para LC3. Sin embargo, esto no pudo ser confirmado para folículos primordiales, primarios y preantrales dado que, a pesar de que en los folículos primarios y preantrales sí hay autofagia, no observaron caspasa-3 activa en las células de la granulosa de folículos primordiales, primarios y preantrales. Al comprobar la correlación entre la apoptosis y la autofagia en células de la granulosa, los autores indicaron que la muerte por autofagia puede estar involucrada en la atresia folicular. No obstante, no se ha demostrado la coexistencia de ambos procesos de muerte en la misma célula de la granulosa. (Choi *et al.* 2010)

Posteriormente, el mismo grupo demostró que en células de la granulosa de ratas inmaduras en cultivo, la acumulación de autofagosomas induce la apoptosis a través de la disminución de la expresión de Bcl-2, lo cual da lugar a la activación de caspasas (Choi *et al.*, 2011).

II. OBJETIVOS

II.1 Objetivo general

El objetivo general es analizar las alteraciones *in situ* en las células de la granulosa de folículos antrales atrésicos de rata adulta.

II.2 Objetivos particulares

Los objetivos particulares derivados del objetivo general son: evaluar la presencia de marcadores iniciales y tardíos del proceso de apoptosis mediante inmunofluorescencia, y analizar la presencia de marcadores iniciales y tardíos del proceso de muerte celular por autofagia. A partir de estos objetivos se deriva el objetivo de ver las proporciones de células positivas a los diferentes marcadores para cada tipo de muerte celular. Complementario a lo anterior, describir los cambios ultraestructurales presentados durante la muerte de las células de la granulosa empleando microscopía electrónica de transmisión.

III. HIPÓTESIS

Teniendo en cuenta que previamente se ha comprobado una correlación positiva entre la apoptosis y la autofagia en una población de células de la granulosa derivadas de folículos de ratas inmaduras *in vitro*, así como que el proceso por el cual mueren los ovocitos durante la atresia folicular *in vivo* en ocasiones es una combinación de apoptosis y autofagia; es posible que las células de la granulosa *in vivo* también presenten más de un proceso de muerte celular para eliminar a las células de folículos antrales atrésicos.

IV. MÉTODOS

La manipulación de los animales se realizó siguiendo los lineamientos éticos recomendados en la Guía para el Cuidado y Manejo de los Animales de Laboratorio (*Guide Line for the Care and Use of Laboratory Animals*,1996). Para este estudio se utilizaron 20 ratas hembras de la cepa Wistar (*Rattus norvegicus*), todas adultas (de aproximadamente 2 meses) , jóvenes y vírgenes. Las ratas se anestesiaron usando una cámara con éter para después hacer la disección. Se realizó una incisión en la parte baja del abdomen de las ratas, se localizaron los ovarios y se extrajeron. Ovarios de 9 ratas se destinaron para las inmunolocalizaciones de marcadores de autofagia y de apoptosis, y los ovarios de 11 ratas se destinaron a microscopía electrónica de transmisión.

IV.1 Inmunolocalizaciones

El material se fijó con paraformaldehído (4%) durante 2 horas, lavado con PBS (5 veces, 10 minutos por cada lavado), deshidratado con alcoholes graduales (etanol 30%, etanol 50%, etanol 60%, etanol 70%, etanol 80%, etanol 90%, etanol 96%, etanol 100% y etanol 100%) y posteriormente sustituyendo el etanol por xilol (etanol-xilol, aceite de cedro-xilol, xilol). En seguida se sustituyó el xilol por parafina (parafina-xilol, parafina 1, parafina 2) y después se incluyó el material en bloques de parafina.

Posteriormente se realizaron cortes de aproximadamente 5µm. Los cortes se colocaron en portaobjetos previamente cubiertos con poli-l-lisina (Sigma) y se hicieron dos dobles inmunolocalizaciones. Los marcadores empleados fueron caspasa-3 activa (marcador de apoptosis) y Beclina 1 (marcador de autofagia) para una doble inmunolocalización, y LC3 (marcador de autofagia) y TUNEL (*Terminal deoxynucleotidyl transferase dUTP nick end labeling*) (marcador de apoptosis) para la otra.

Inmunolocalización de caspasa-3 activa y Beclina 1:

Se desparafinó e hidrató mediante alcoholes graduales (xilol, etanol 100%, etanol 90%, etanol 70%, etanol 50%, etanol 30%, agua destilada y PBS). Se realizó la recuperación antigénica con buffer de citratos (*Antigen Retrieval Solution*, BioGenex), 3 minutos en un horno de microondas a potencia 10 (1,300 W) y luego 6 minutos a potencia 3 (780 W), ambos en baño María. Una vez que llegó a temperatura ambiente se realizaron tres lavados con PBS de tres minutos cada uno. Posteriormente se trató con glicina 100 mM durante 1 hora a temperatura ambiente. Se incubó con los anticuerpos primarios (1 µl de anticaspasa-3 activa hecho en conejo (Abcam) en 50 µl de PBS y antibeclina 1 hecho en oveja (Abcam) en 100 µl de PBS) durante toda la noche a 4° C. Como control negativo, se realizaron pruebas sin anticuerpo primario. Al término de esta incubación, se realizaron tres lavados de PBS de 3 minutos cada uno y se incubó con los anticuerpos secundarios: anticonejo hecho en cabra (Alexa Fluor 488) para reaccionar con el anticuerpo primario contra caspasa-3 activa y antioveja hecho en burro (Alexa Fluor 594) 1/200 µl de PBS para reaccionar con el anticuerpo primario contra Beclina 1. Se hizo un lavado rápido con buffer TBST y en seguida tres lavados

de 3 minutos con PBS. Se incubó con DAPI (SIGMA) durante 1 minuto y se volvió a lavar tres veces con PBS por 3 minutos para después montar las preparaciones con el medio de montaje *Vectashield Mounting Medium*.

Inmunolocalización de LC3 y TUNEL:

Para la doble inmunolocalización contra LC3 y el desarrollo de la técnica de TUNEL se desparafinó e hidrató mediante alcoholes graduales (xilol, etanol 100%, etanol 90%, etanol 70%, etanol 50%, etanol 30%, agua destilada y PBS). Se realizó la recuperación antigénica con buffer de citratos (Antigen Retrieval Solution), 3 minutos en un horno de microondas a potencia 10 y luego 6 minutos a potencia 3, ambos en baño María. Una vez que llegó a temperatura ambiente se realizaron tres lavados con PBS, cada uno de tres minutos. Después se trató con glicina 100 mM durante 1 hora a temperatura ambiente. Se incubó con el anticuerpo primario (antiLC3 (ABR) hecho en conejo 1/200 μ l de PBS) durante toda la noche a 4° C. Como control negativo, se realizaron pruebas sin el anticuerpo primario. Se realizaron tres lavados de PBS, cada uno de tres minutos. Se incubó con el anticuerpo secundario (anticonejo hecho en cabra (Alexa Fluor 488) 1/100 μ l) durante 1 hora y se lavó con PBS por 3 minutos. Posteriormente se realizó la técnica de TUNEL usando el kit *Apoptag Red In situ Apoptosis Detection Kit (Millipore)*. El tejido se incubó con buffer de equilibrio 15 minutos a temperatura ambiente, posteriormente se agregó la solución enzimática 33 μ l TdT y 77 μ l de buffer de reacción a 37° C durante 1 hora. Se incubó con buffer de paro (1 ml de buffer de paro en 34 ml de agua) durante 10 minutos. Se realizó un lavado de PBS por un minuto y se incubó con anti DIG Rhodamina (68 μ l de solución de bloqueo y 62 μ l de anti DIG Rhodamina) durante 45 minutos. Se lavó con PBS durante 1 minuto

y se incubó con DAPI (SIGMA) durante 1 minuto. Después se hicieron dos lavados de 1 minuto cada uno y se montó usando medio de montaje.

Obtención de imágenes y cuantificación

Las preparaciones se observaron en el microscopio de epifluorescencia Nikon Eclipse E600 y se obtuvieron imágenes con una cámara digital Nikon DXM1200F. Las imágenes fueron procesadas con el programa ImageJ, mediante el cual se realizaron los empalmes para la cuantificación de células. Previo al conteo de células, se realizó la cuantificación de la intensidad de la fluorescencia para Beclina 1 y LC3 en 3 folículos de ratas diferentes para cada marcador, en 60 células por folículo. La cuantificación se realizó por célula, tomando la intensidad total de la célula entre el área de la misma. Se realizaron análisis de varianzas (ANOVA) unilaterales para la densidad de fluorescencia, en donde se tomaron 30 células que eran consideradas en proceso de muerte celular por autofagia (al tener marca exacerbada) y otras 30 células eran consideradas con autofagia basal o fisiológica. De esta forma, se comprobó que las células con marca exacerbada están en proceso de muerte celular y la marca de autofagia no se debe a autofagia fisiológica.

Consecutivamente, se realizó la cuantificación de células, la cual consistió en contar el número de células con distintos marcadores de muerte. Ésta consideró el número de células en: proceso de muerte únicamente por autofagia (marca de Beclina 1 o LC3), por apoptosis (marca de caspasa-3 activa o TUNEL) y células con marca tanto de apoptosis como de autofagia. El conteo de células se realizó por folículo para las dos dobles inmunolocalizaciones. En total se contaron 7,293 células de 20 folículos de 6

ratas para la prueba de caspasa-3 activa y Beclina 1, y 3,895 células de 18 folículos de 6 ratas para la prueba de TUNEL y LC3. Se calcularon los porcentajes de cada fracción de células contadas, en donde el total eran las células con marca de caspasa-3 y Beclina 1 o de LC3 y TUNEL. Posteriormente se realizaron pruebas Z para ver si las diferencias observadas entre los grupos eran o no significativas. Las pruebas de Z realizadas fueron: TUNEL contra LC3, LC3 contra TUNEL+LC3, TUNEL contra TUNEL+LC3, caspasa-3 contra Beclina 1, Beclina 1 contra caspasa-3+Beclina 1 y Beclina 1 contra caspasa-3+Beclina 1. Dado que al realizar varias pruebas independientes aumenta la probabilidad de falsos positivos, se realizó una corrección de Bonferroni (ver Anexo), que al ser conservadora nos indica que las diferencias observadas son reales.

IV.2 Microscopía electrónica de transmisión

El material fue fijado con glutaraldehído (2.5%) y paraformaldehído (4%) durante 2 horas, y tuvo una postfijación con osmio (1%) durante 1 hora. El material se deshidrató mediante alcoholes graduales (etanol 30%, etanol 50%, etanol 60%, etanol 70%, etanol 80%, etanol 90%, etanol 100% y etanol 100%). Posteriormente se incluyó en la resina hidrofóbica Epón, usando óxido de propileno como intermediario, en donde se realizaron dos cambios de óxido de propileno (20 minutos cada uno), uno de propileno-Epón en proporción 2:1 (12 horas), uno de propileno-Epón en proporción 1:1 (12 horas), otro de propileno-Epón en proporción 1:2 y finalmente Epón puro, con el cual fueron incluidos en moldes de plástico e incubados durante 2 días a 60° C.

Una vez incluido el material, se realizaron cortes semifinos que fueron teñidos con azul de toluidina para seleccionar los folículos antrales atrésicos. Posteriormente, se hicieron cortes ultrafinos que fueron recogidos con anillos de cobre cubiertos con Formvar y contrastados con acetato de uranilo (20 minutos) y citrato de plomo (10 minutos) para después observarlos en el microscopio electrónico de transmisión Jeol1010 operado a 100 KV. Con una cámara digital Hamamatsu se obtuvieron imágenes de la ultraestructura de las células de la granulosa y se analizaron.

V. RESULTADOS

V.1 Inmunolocalizaciones (Beclina 1 y caspasa-3 activa, LC3 y TUNEL)

La Beclina 1 es una proteína marcadora de autofagia temprana, al igual que la caspasa-3 activa es una marca definitiva de apoptosis inicial; mientras que LC3 es una proteína marcadora de autofagia tardía y la técnica de TUNEL identifica el proceso de apoptosis en una etapa avanzada. Las inmunolocalizaciones demostraron células tanto con marca para apoptosis, como con marca para autofagia. No obstante, las células positivas a Beclina 1 (marca de autofagia), también fueron positivas a caspasa-3 activa (marca de apoptosis); a comparación de las células positivas a caspasa-3 activa que presentaban esta marca con o sin la presencia de Beclina 1 (Fig. 6). Por otro lado, se encontraron células positivas únicamente a LC3, únicamente positivas a la técnica de TUNEL y células positivas a ambas marcas (Fig. 7).

Cuantificación de la intensidad de fluorescencia

Debido a que la autofagia es un proceso fisiológico que ocurre en todas las células, se realizó una cuantificación de la intensidad de fluorescencia para los marcadores de autofagia (Beclina 1 y LC3). En ésta, un grupo de células granulosas eran consideradas en proceso de muerte por autofagia al tener una marca exacerbada, mientras que el otro grupo eran consideradas en proceso de autofagia fisiológica. Las figuras 8 y 9 muestran los datos de dos de los seis folículos considerados para la cuantificación de la fluorescencia de Beclina 1 y LC3, respectivamente. En éstas se observa una intensidad de fluorescencia significativamente mayor en las células consideradas en proceso de muerte que en las células con autofagia fisiológica. Esto

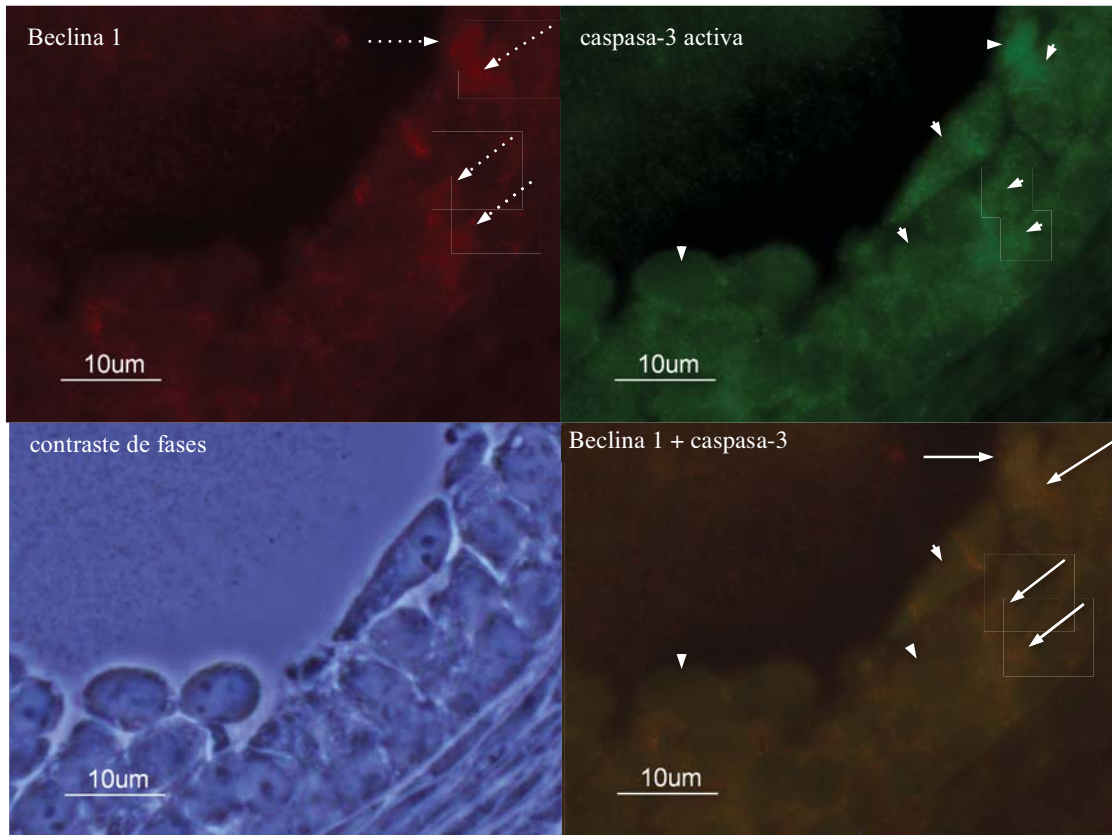


Figura 6. Células de la granulosa en folículo antral atrésico. Muestra células en proceso de muerte celular programada (apoptosis, autofagia y ambos procesos en la misma célula). Las flechas indican células marcadas tanto con Beclina 1, como con caspasa-3 activa; mientras que las cabezas de flechas indican células marcadas únicamente por caspasa-3 activa y las células señaladas con flechas punteadas son positivas a Beclina 1.

es respaldado por los análisis de varianza, en los cuales la probabilidad de error es menor a 0.05, indicando una diferencia significativa entre los grupos (muerte por autofagia y autofagia fisiológica). Por lo tanto, es válido decir que las células consideradas en proceso de muerte celular, efectivamente están en proceso de muerte por autofagia y no es únicamente autofagia fisiológica. La cuantificación de la intensidad de fluorescencia para las células marcadas con caspasa-3 activa no fue necesaria debido a que al haber presencia de esta proteína en forma activa, la célula está destinada a la apoptosis sin vuelta atrás.

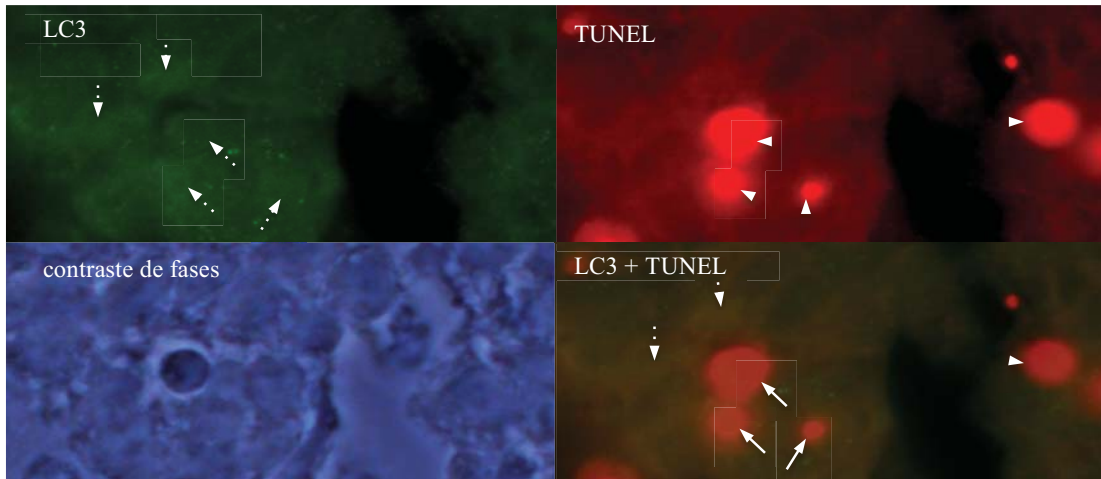


Figura 7. Células de la granulosa en folículo antral atrésico. Células en proceso de muerte celular programada. Las células positivas a LC3 indican las células en proceso de muerte por autofagia (flechas punteadas), la célula positiva únicamente a TUNEL muestra la célula en proceso de muerte por apoptosis (cabeza de flecha) y las células marcadas tanto por LC3 como por TUNEL muestran células en proceso de muerte por autofagia junto con apoptosis (flechas).

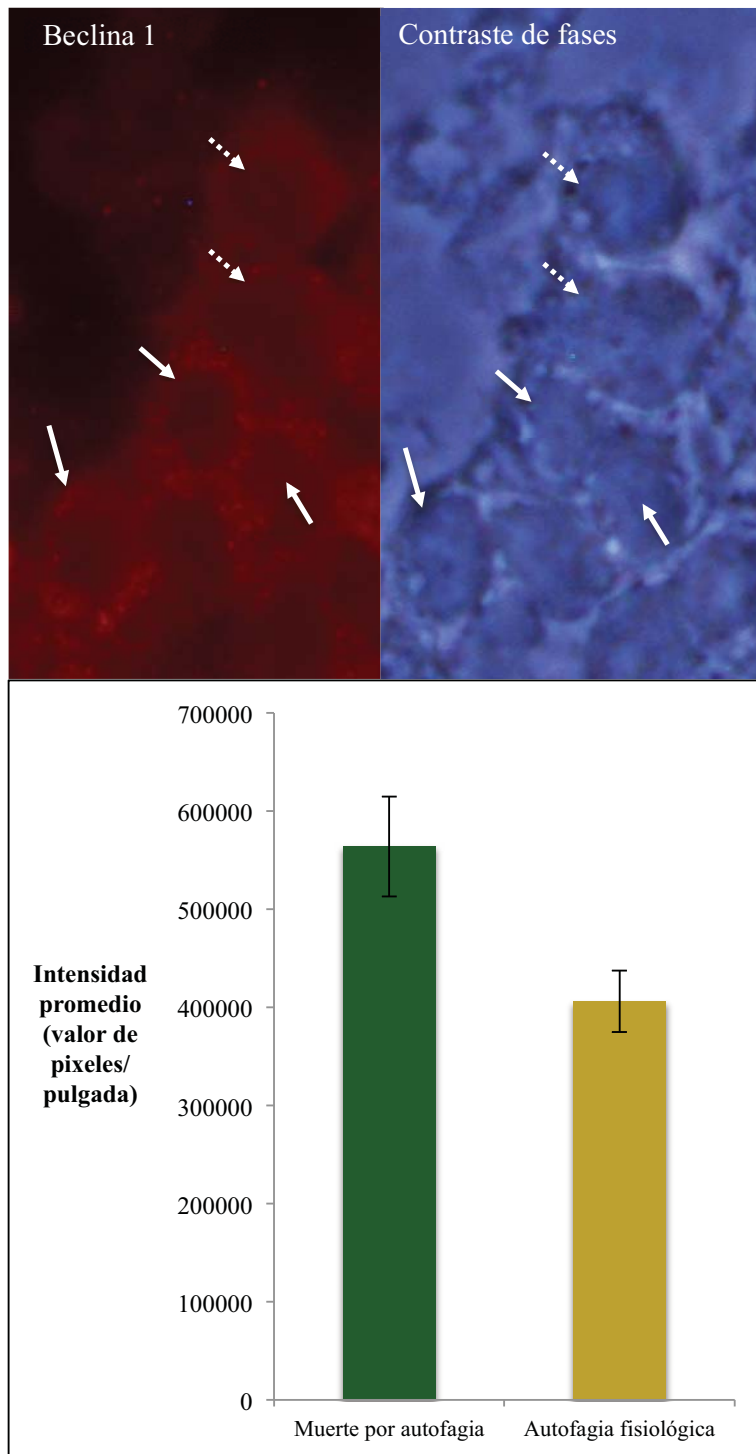


Figura 8. La gráfica muestra el promedio de la intensidad de fluorescencia de Beclina 1. Existe una diferencia significativa entre las dos poblaciones ($p < 0.05$). Se observan las diferencias entre los grupos de células con marca exacerbada de Beclina 1 (flechas) y los grupos de células con marca basal de Beclina 1 (flechas punteadas).

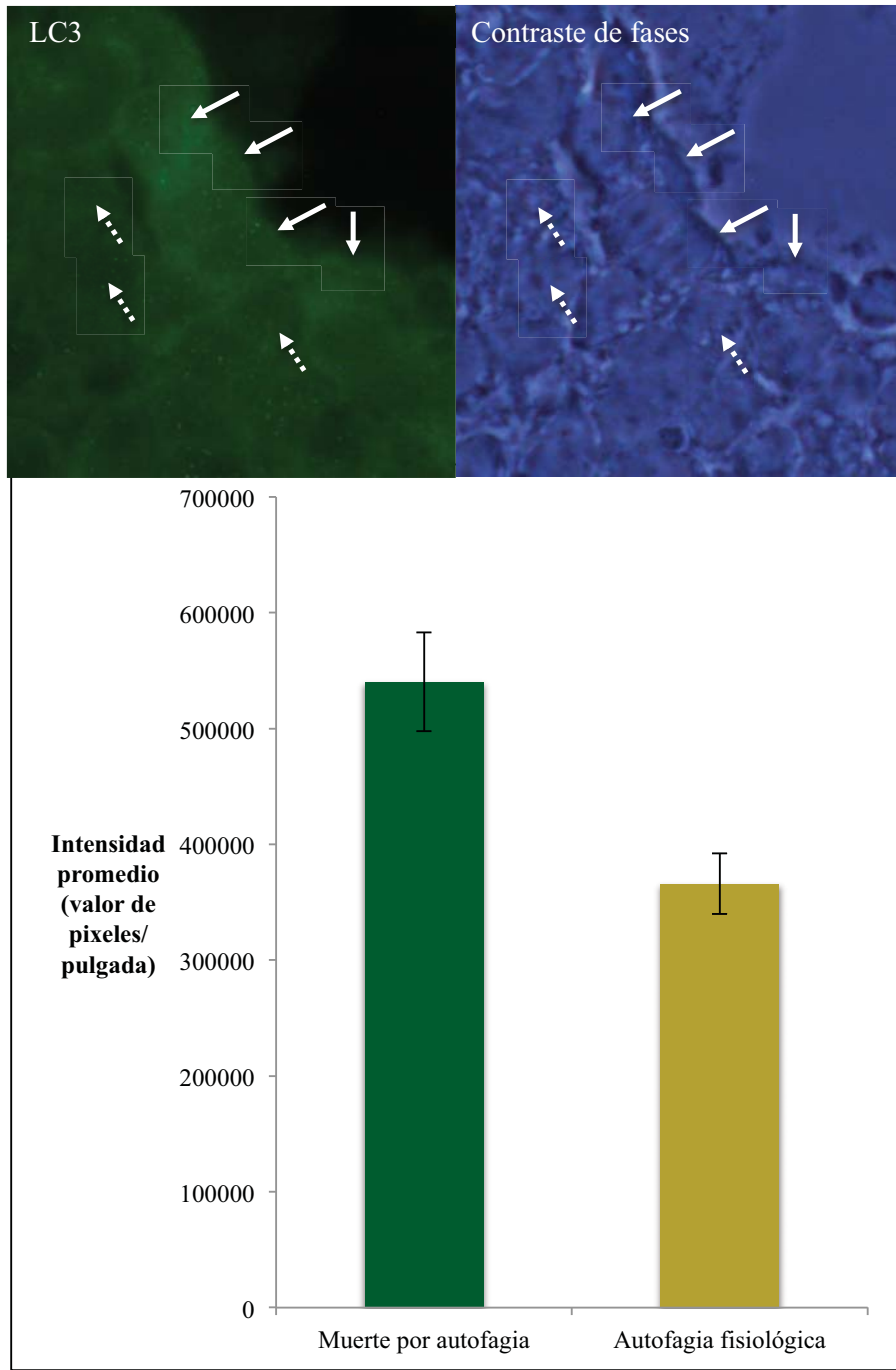


Figura 9. La gráfica muestra el promedio de la intensidad de fluorescencia para las células marcadas con LC3, tanto para el grupo considerado en proceso de muerte por autofagia (flechas), como para el grupo considerado con autofagia fisiológica (flechas punteadas). Existe una diferencia significativa entre las dos poblaciones ($p < 0.05$).

Cuantificación de células en proceso de muerte

El conteo de células en proceso de muerte celular programada que se realizó, consideró células en proceso de muerte por apoptosis únicamente (caspasa-3 activa o TUNEL), muerte por autofagia únicamente (células con marca exacerbada de Beclina 1 o LC3) y células con ambas marcas (caspasa-3 activa y Beclina 1 o TUNEL y LC3). Asimismo, se calculó el porcentaje de los tipos de muerte en la población de células de la granulosa, respecto al número total de células en proceso de muerte celular programada. Se realizaron pruebas Z para comparar las proporciones entre los diferentes grupos, en todos los casos hubo diferencias significativas. Dado que realizar múltiples pruebas independientes aumenta la probabilidad de falsos positivos, se realizó una corrección de Bonferroni que nos indica que las diferencias observadas son reales (ver Anexo).

La figura 10 muestra el porcentaje de células con marcadores iniciales de apoptosis (caspasa-3 activa) y de autofagia (Beclina 1), así como de marcadores de ambos tipos de muerte (caspasa-3 activa + Beclina 1). La proporción de células marcadas únicamente con caspasa-3 activa es muy alta (~67%) en comparación con las que presentan únicamente Beclina 1 (<1%). La Beclina 1 observada siempre se encontró en presencia de caspasa-3 activa, por lo cual en la gráfica se muestra en la fracción de caspasa-3 + Beclina 1 (~32%).

El porcentaje de células con marcadores de muerte tardíos (TUNEL y LC3) se presentan en la figura 11. El comportamiento de los marcadores de muerte avanzada es muy distinto a los marcadores de muerte inicial. En estos marcadores se observa una mayor proporción en el marcador de muerte por autofagia LC3 (~67%) que el marcador

de muerte por apoptosis TUNEL (~25%), mientras que la fracción de células con ambos marcadores es mucho menor a las otras dos fracciones (~8%).

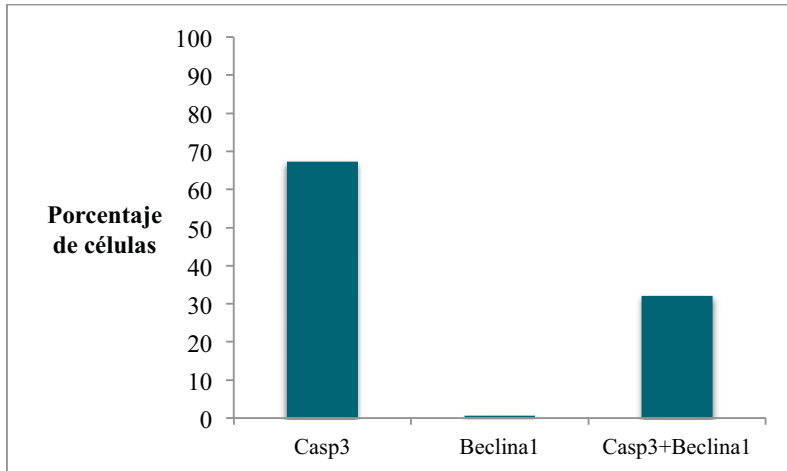


Figura 10. Porcentaje de células con marcadores de muerte inicial (caspasa-3 activa, Beclina y caspasa-3 + Beclina1). Estos datos corresponden a un total de 7,293 células.

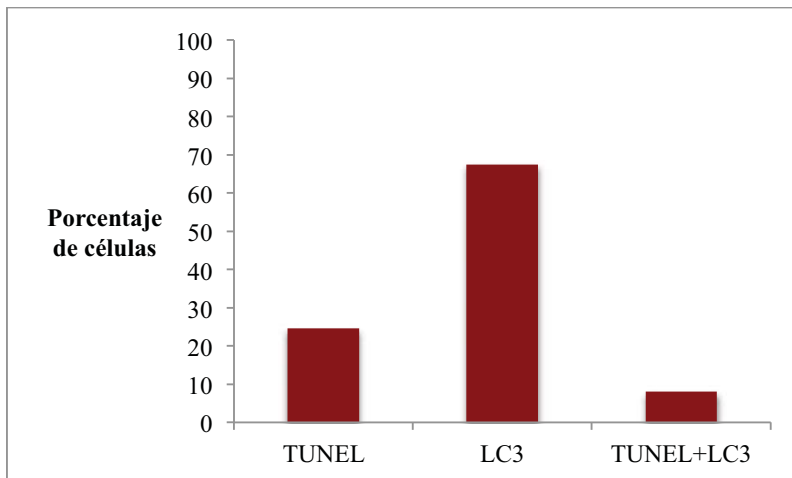


Figura 11. Porcentaje de células con marcadores de muerte tardíos (TUNEL y LC3). Estos datos corresponden a un total de 3,895 células.

V.2 Microscopía electrónica de transmisión

A pesar de que los análisis inmunohistoquímicos son una herramienta esencial en la detección de la MCP, ésta normalmente requiere otro análisis que apoye los resultados. En este estudio se empleó la microscopía electrónica de transmisión, que es especialmente útil en la detección de autofagia.

Los folículos antrales atrésicos encontrados durante la exploración del ovario en microscopía óptica presentaban separación de las células de la granulosa, deformación del folículo, varias células con núcleos picnóticos, células con alta vesiculización y células con ambas características (Fig.12).

Durante el análisis de la ultraestructura de las células de la granulosa empleando microscopía electrónica de transmisión, se pudieron observar características morfológicas tanto de apoptosis como de autofagia. Se observaron células con características correspondientes únicamente a apoptosis, características correspondientes únicamente a autofagia, características correspondientes a ambos tipos de muerte y alteraciones que no correspondían a los tipos de muerte previamente mencionados.

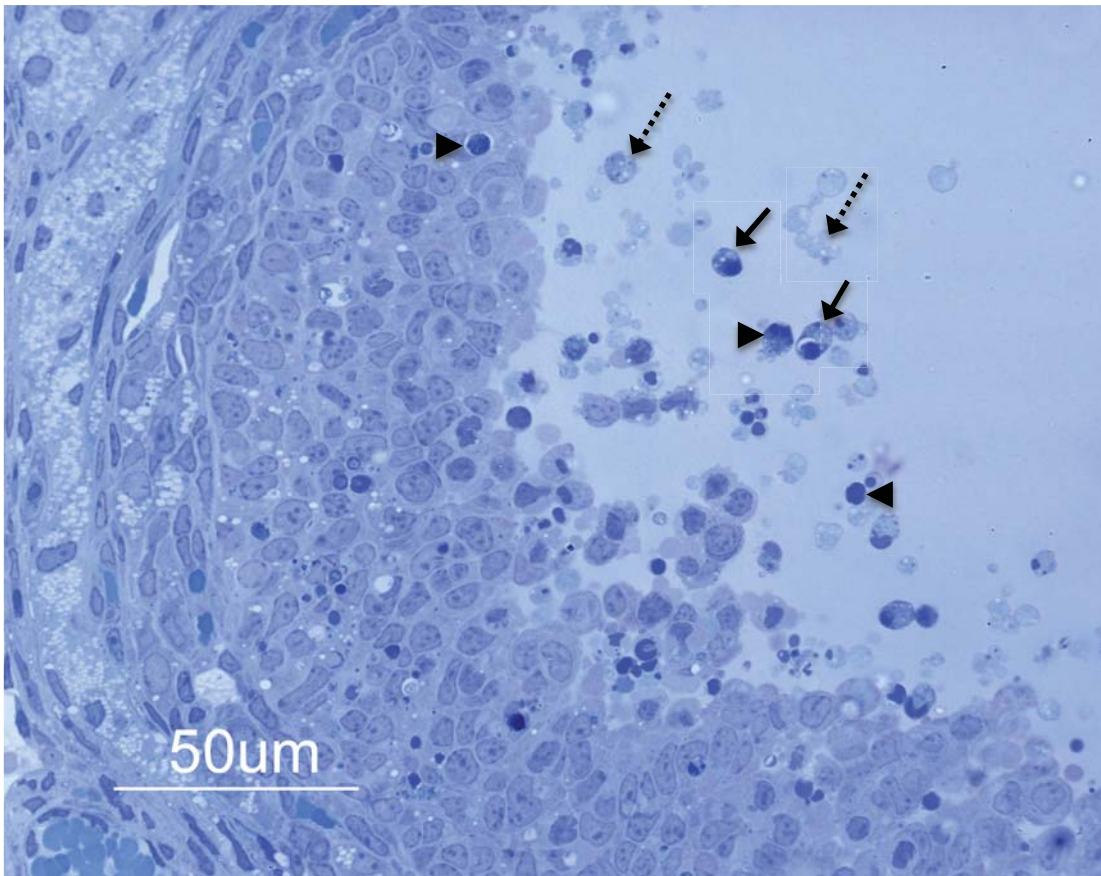


Figura 12. Imágen óptica de un folículo antral atrésico. Se observan células altamente alteradas, una gran parte de ellas se encuentran separadas del resto. Asimismo, se observan varios núcleos picnóticos (cabezas de flecha), células con alta vesiculización (flechas punteadas) y células con alta vesiculización al igual que núcleos picnóticos (flechas).

La figura 13 presenta una célula de la granulosa sin alteraciones morfológicas. En esta célula podemos observar el núcleo y el citoplasma que se encuentran sanos. A comparación de esta célula, en la figura 14 se observan células con características apoptóticas. La figura 14a, muestra una célula con la cromatina altamente compactada, denotando una muerte apoptótica. Asimismo, en la figura 14b, se puede observar una célula de la granulosa con núcleo altamente compactado cuya envoltura nuclear se encuentra igualmente alterada. La figura 14c, muestra una célula con un núcleo fragmentado y

altamente compactado, esta célula también se encuentra separada del resto de las células de la granulosa, por lo cual probablemente se encuentra desprovista de nutrientes y factores de crecimiento. Estas características indican una clara muerte por apoptosis.

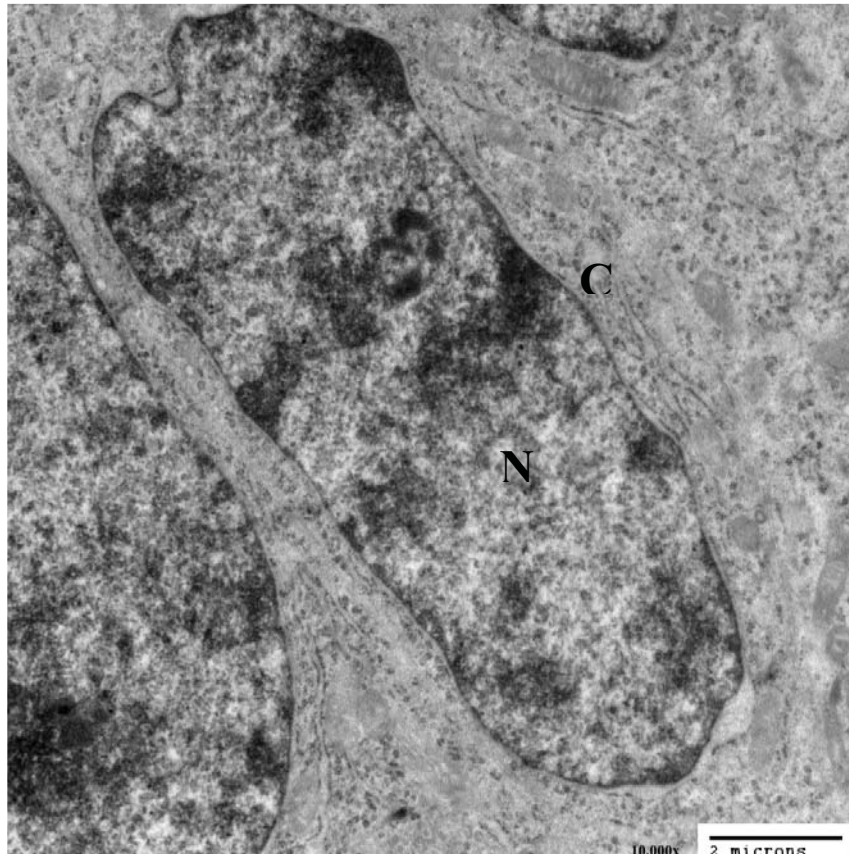
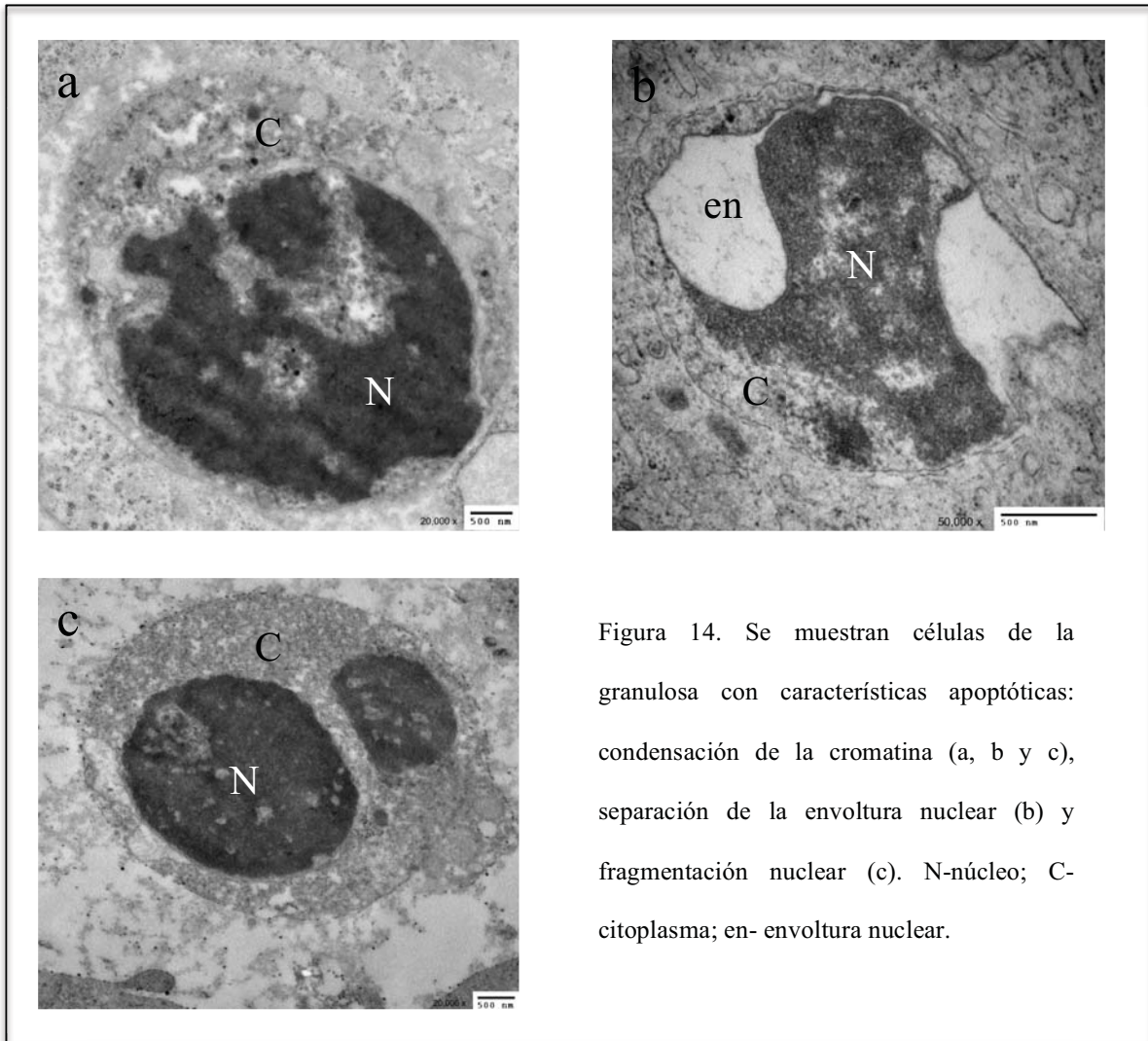


Figura 13. Célula de la granulosa sin alteraciones morfológicas. N= núcleo; C= citoplasma.

Por otro lado, se observaron células con características únicamente de muerte por autofagia, la cual se ilustra en la figura 15. Las figuras 15a y 15b, muestran células con una alta vesiculización, ésta es la característica principal de la muerte por autofagia. Asimismo, las células de la figura 15a, presentan retracción del citoplasma, lo cual es evidenciado por la alta electrodensidad presentada en el citoplasma a comparación de otras células. Es

posible asegurar que lo observado en las células a bajo aumento es autofagia dado que en la figura 15c, se observa un autofagosoma a gran aumento, en el cual se pueden ver las dos membranas.



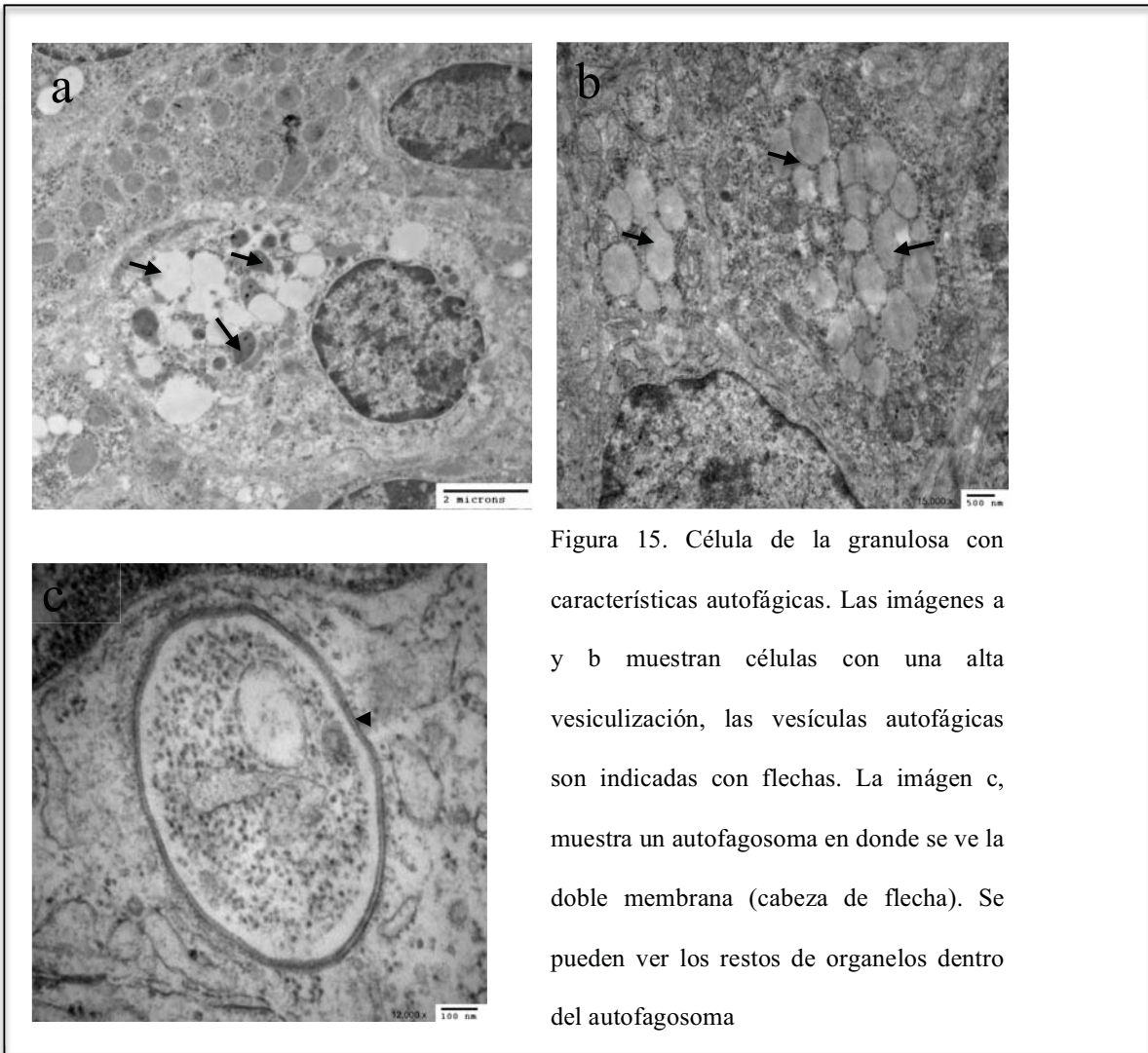


Figura 15. Célula de la granulosa con características autofágicas. Las imágenes a y b muestran células con una alta vesiculización, las vesículas autofágicas son indicadas con flechas. La imagen c, muestra un autofagosoma en donde se ve la doble membrana (cabeza de flecha). Se pueden ver los restos de organelos dentro del autofagosoma

Asimismo, se observaron células en las que se presentaban características tanto de apoptosis como de autofagia. Esto puede verse en la figura 16a, en la que hay dos células con claras alteraciones ya que ambas presentan una alta condensación de la cromatina y notable vesiculización. Adicionalmente, la célula superior muestra separación de la envoltura nuclear, la cual es característica de apoptosis. Asimismo, la figura 16b, muestra una célula con cromatina condensada y alta vesiculización. No obstante, en la parte superior de la imagen se presenta una célula con características únicamente apoptóticas: retracción citoplásmica y condensación de la cromatina. La imagen 16c, presenta una alta

vesiculización en el citoplasma, al igual que un núcleo ligeramente picnótico. Además, se observa una ligera alteración en la envoltura nuclear.

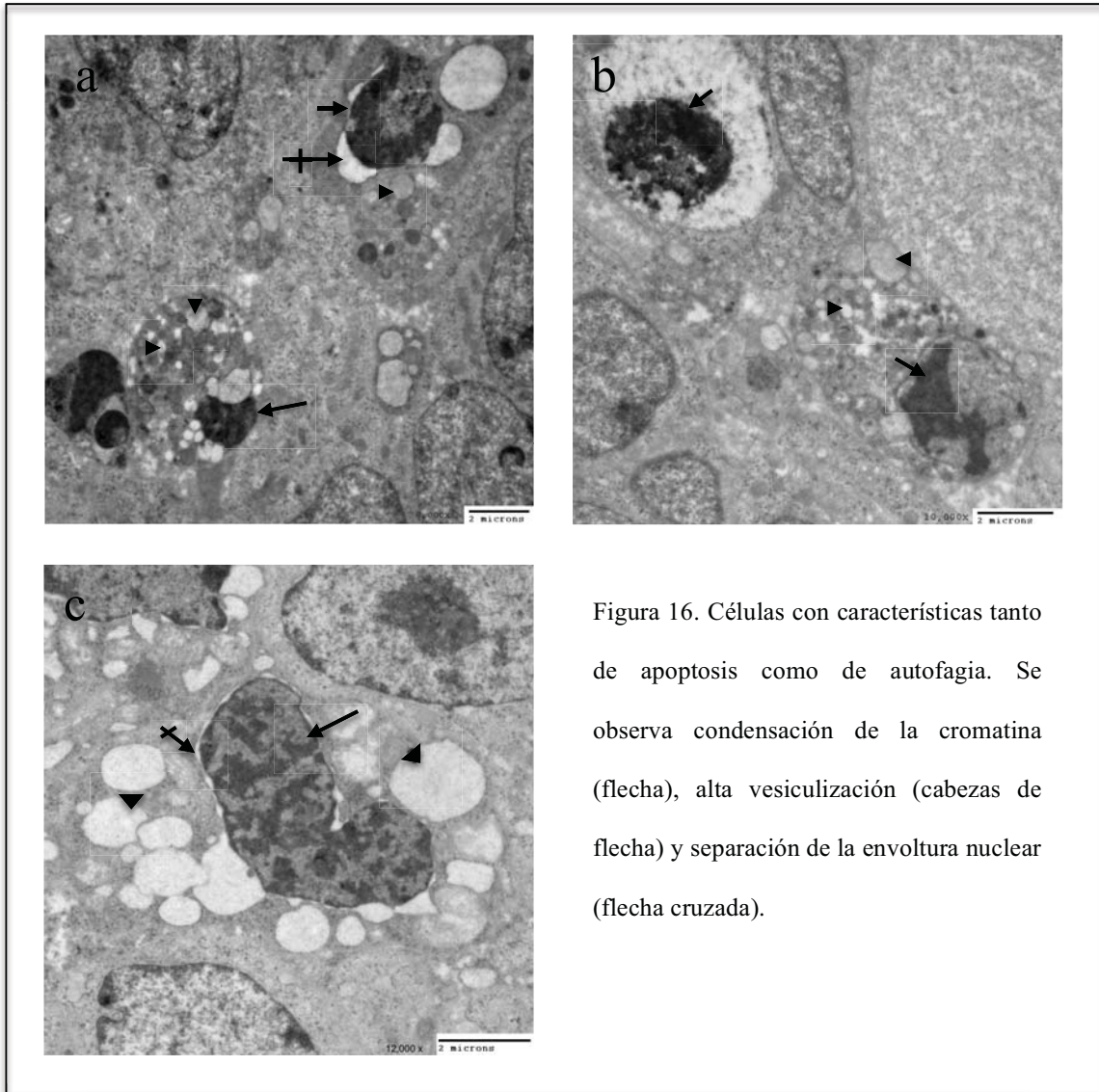


Figura 16. Células con características tanto de apoptosis como de autofagia. Se observa condensación de la cromatina (flecha), alta vesiculización (cabezas de flecha) y separación de la envoltura nuclear (flecha cruzada).

En los folículos antrales en atresia inicial se encontraron algunas células de la granulosa en proceso de muerte celular con características distintas a las previamente descritas (Fig. 17 y 18). Éstas presentan el retículo endoplásmico y la envoltura nuclear alterados, en algunos casos acompañado de condensación citoplásmica, una ligera

condensación de la cromatina o cambio en la forma celular. El retículo endoplásmico alterado al estar expandido, semejava una alta vesiculización. Las células en las cuales se presentaba esta alteración, frecuentemente estaban agrupadas, es decir, había una regionalización de la alteración. La figura 17 muestra imágenes panorámicas, en donde se pude ver las células de este tipo. Las imágenes de la figura 18a a la 18c, muestran células con cisternas del retículo endoplásmico alteradas así como algunas mitocondrias alteradas, las cuales pueden verse a detalle en la imagen 18d. En esta imagen se aprecian las cisternas del retículo con los ribosomas adheridos a la membrana, de forma que podemos asegurar que es el retículo endoplásmico rugoso el que se encuentra alterado.

Esta característica se observó en diferentes grados en varias células. Como vemos al comparar la imagen 18b y la imagen 18c, en donde la célula de la imagen 18b se observa mucho más alterada que la célula de la imagen 18c.

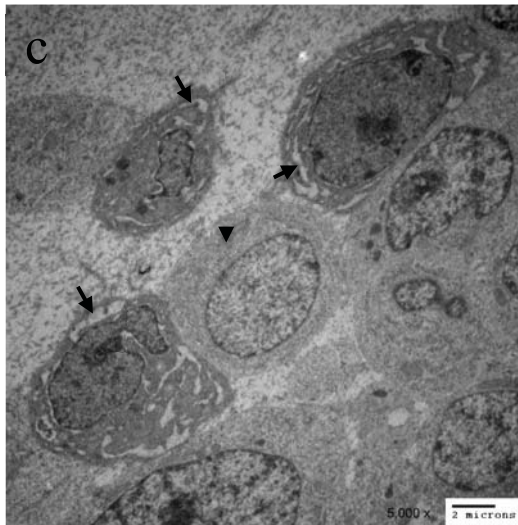
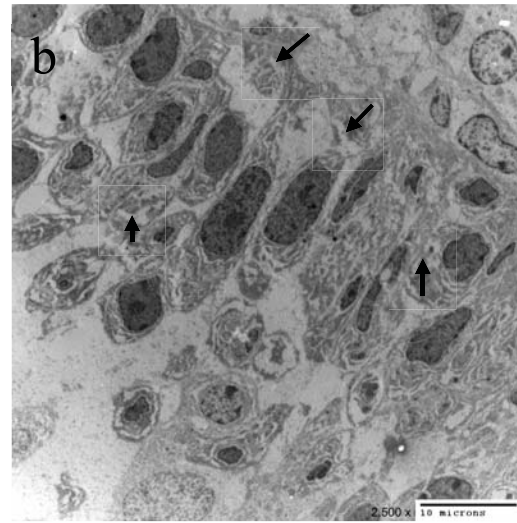
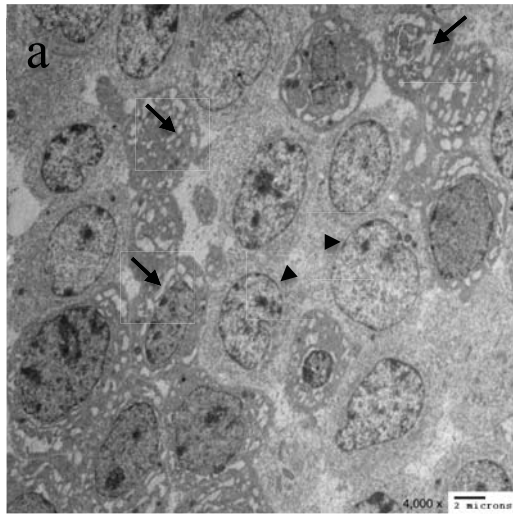


Figura 17. Muestra células que presentan alteraciones en el retículo endoplásmico (flechas). Algunas células vecinas presentan ultraestructura normal, lo cual indica que las modificaciones del retículo endoplásmico no son artefactos (cabezas de flecha).

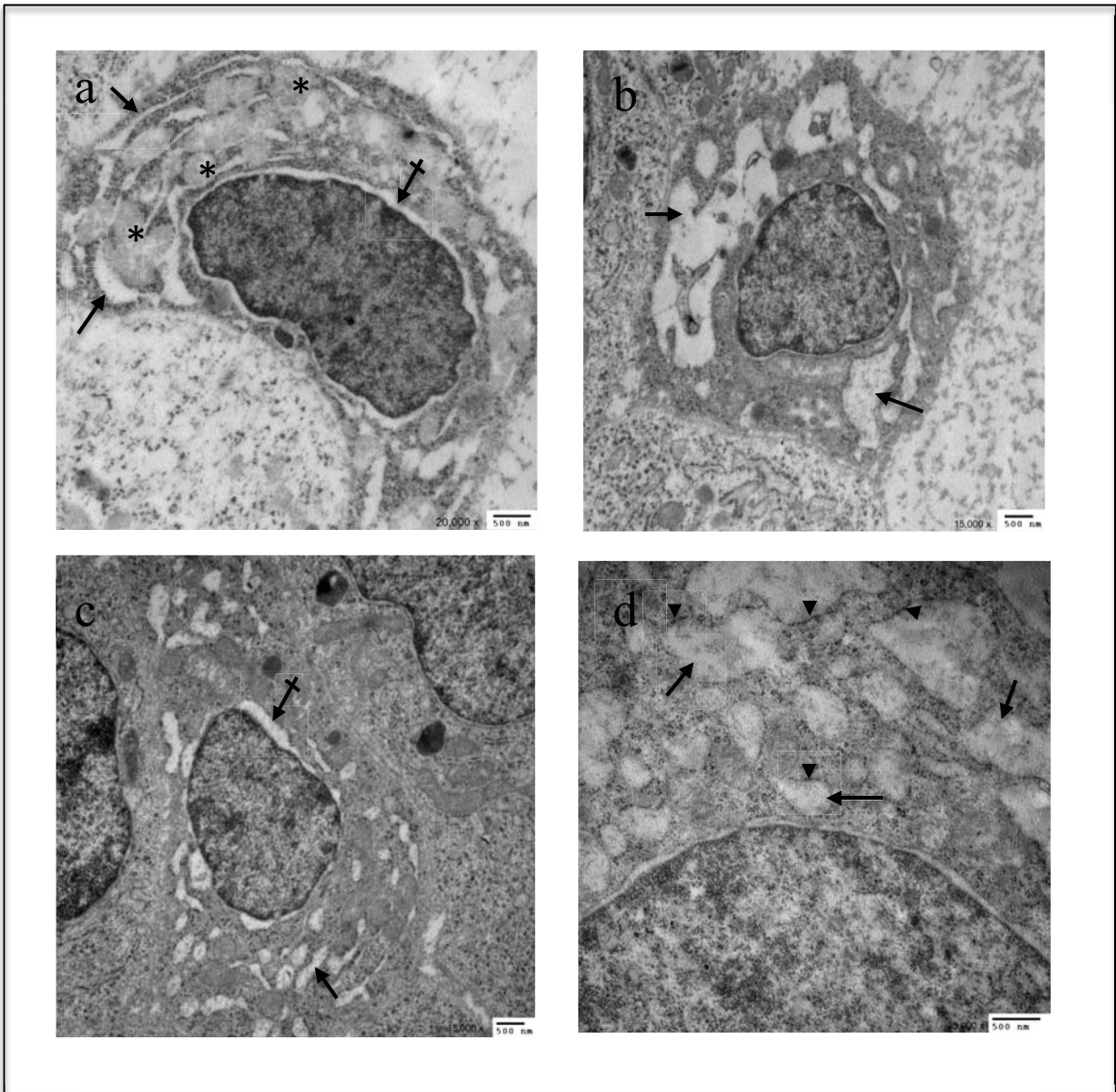


Figura 18. Células con alteraciones en el retículo endoplásmico (flechas), la envoltura nuclear (flechas con cruz) y mitocondrias alteradas (asteriscos). La imagen d, muestra a detalle las cisternas del retículo endoplásmico con ribosomas adheridos a la membrana (cabezas de flecha).

VI. DISCUSIÓN

En el ovario se han reportado distintos tipos de muerte celular. A pesar de que originalmente se pensaba que el proceso mediante el cual morían las células de la granulosa durante la atresia era la apoptosis, se ha probado que existe más de un tipo de muerte en el mismo tejido. D'Herde (1996) demostró la coexistencia de dos subpoblaciones de células de la granulosa en la codorniz, las que estaban muriendo por autofagia y las que morían por apoptosis, al inducir la atresia folicular. Asimismo, Choi *et al.* (2010) reportaron que en la población de células de la granulosa de rata inmadura estimuladas con PMSG *in vitro* puede haber apoptosis o muerte por autofagia. Sin embargo, estos grupos no han investigado los tipos de muerte que participan en la atresia folicular de forma individual, ni han abordado la coexistencia de marcadores de más de un tipo de muerte de forma simultánea en una sola célula, en un ambiente no modificado e *in situ*. El presente trabajo, al realizar pruebas con estas características, demuestra la existencia de más de dos tipos de muerte en las células de la granulosa de rata y presenta las proporciones en las que esto está sucediendo.

Escobar *et al.* (2008) demostraron la presencia tanto de marcadores apoptóticos, como de marcadores autofágicos en el mismo ovocito. No obstante, los autores reportan una frecuencia de 73% de ovocitos con varios marcadores iniciales de muerte (tanto apoptóticos como autofágicos) en la misma célula, con respecto al total de ovocitos en proceso de muerte. Esto contrasta con los resultados obtenidos en el presente trabajo dado que en este caso el porcentaje de células de la granulosa que presentaban ambos marcadores iniciales en la misma célula fue mucho menor (~32%). Esto indica que,

mientras que en las células germinales el proceso de muerte comienza teniendo características de muerte apoptótica y autofágica, en las células de la granulosa el proceso de muerte normalmente comienza teniendo características apoptóticas.

El hecho de que la marca de Beclina 1 únicamente esté presente junto con caspasa-3 activa puede deberse a: 1) la Beclina 1 está induciendo la formación de autofagosomas que a su vez inducen la apoptosis, como propone Choi. *et al* (2011); 2) hay un proceso que involucra tanto la muerte por apoptosis como la muerte por autofagia, tal como sucede en los ovocitos (Escobar *et al.*, 2008) ; 3) la muerte de estas células es mediante autofagia dependiente de caspasas, tal como demostraron Martin y Baehrecke (2004). Cabe destacar que en la propuesta 1, el trabajo realizado fue en un sistema modificado y en la propuesta 3, el trabajo realizado fue en células de la glándula de saliva de *Drosophila*, por lo cual la propuesta 2 es la más convincente al ser en un sistema *in vivo* y realizado ovocitos de rata. Sin embargo, aún queda esclarecer el papel que juega la Beclina 1 en ésta fracción de células.

Por otro lado, en un estadio avanzado de muerte se presenta mayor proporción de células con LC3 (~67%), a comparación de la fracción que presenta positividad a la técnica de TUNEL (~25%). En parte esto se debe a que la marca de TUNEL es de apoptosis muy tardía, es decir, la célula ya está altamente alterada cuando la técnica da positiva; mientras que la marca de LC3 detecta autofagia en plena actividad de degradación celular. La fracción de células que presentan ambas marcas es muy baja, lo cual sugiere que el proceso de muerte se da preferencialmente por apoptosis u autofagia, y en último de los casos por una combinación de ambos procesos.

Estudios recientes han demostrado que existe una asociación entre la muerte por apoptosis y la muerte por autofagia. Según Baehrecke (2005) la asociación entre la autofagia y la activación de caspasas depende del tipo celular, organismo y condiciones específicas. Esta conexión es extremadamente complicada dado que la autofagia puede funcionar como un mecanismo de supervivencia o como un mecanismo de muerte celular. Por ejemplo, algunas proteínas antiapoptóticas de la familia de Bcl-2 se han visto implicadas en la regulación de la autofagia al unirse a la Beclina 1, inhibiendo este proceso (Pattingre, 2005). Asimismo, los esfingolípidos pueden ser unos reguladores importantes en la relación entre la apoptosis y la autofagia, aunque aún no se saben los mecanismos exactos. Por ejemplo, las ceramidas son conocidas por ser inductoras de apoptosis mediante la ruta mitocondrial y recientemente se ha visto que inician la autofagia por la regulación de la Beclina 1. Asimismo, se ha visto que los esfingolípidos son importantes en la elongación, expansión y cierre de la membrana autofagosomal. (revisado en Young, 2013).

Nuestros resultados de microscopía electrónica de transmisión apoyan los datos antes discutidos ya que demuestran la presencia de una fracción de células con características meramente apoptóticas, otra fracción con características únicamente autofágicas y una tercera fracción que involucra características de ambos procesos de muerte. Otra aportación importante fue el hallazgo de células con características que podían corresponder a cualquier tipo de muerte (apoptosis, autofagia o necrosis): la dilatación de las cisternas del retículo endoplásmico, alteración de las mitocondrias y una ligera condensación del citoplasma y de la cromatina.

Leber y Andrews (2010) indican que la proteína Bcl-2 puede estar adherida a la membrana del retículo endoplásmico (no únicamente a la membrana de las mitocondrias). Esta proteína está involucrada en la regulación de la apoptosis y de la autofagia, por lo cual los resultados del presente estudio muestran una conexión entre ambas rutas y sugieren que las alteraciones observadas pueden ser características iniciales tanto de apoptosis como de autofagia o de la combinación de ambos. No obstante, aún queda pendiente realizar estudios que puedan esclarecer qué es lo que está pasando en células con esta morfología.

A pesar de que una de las características de la necrosis es la dilatación del retículo endoplásmico, envoltura nuclear y en algunos casos de las mitocondrias (Galluzzi *et al.* 2012), en las células de la granulosa estas características no corresponden a un tipo de muerte necrótico dado que no se observaron características de necrosis avanzada, donde esperaríamos ver una gran área afectada ya que en la necrosis hay liberación de enzimas y las células vecinas son severamente afectadas. En el ovario nunca se observa dicho caso, por lo cual descartamos que las características observadas correspondan a necrosis.

La atresia folicular es un proceso que ocurre en todas las etapas del desarrollo folicular y se reconoce por la muerte del ovocito y de las células de la granulosa. El ovocito ha sido ampliamente estudiado, no obstante, las células foliculares también juegan un papel importante en el destino del ovocito. El presente trabajo se realizó *in situ* en condiciones fisiológicas, no obstante aún quedan muchos estudios por realizar para poder elucidar el papel que están jugando los diferentes tipos de muerte de las células de la granulosa en la atresia folicular. Una posibilidad es que estos sean procesos

redundantes o de refuerzo, en donde si uno falla los demás aseguren que el folículo siga el proceso de atresia y las células destinadas a morir sean eliminadas efectivamente. Asimismo, es importante esclarecer cuales son los procesos de regulación que guían el proceso de muerte a una u otra vía de MCP.

VII. CONCLUSIONES

Las evaluaciones inmunohistoquímicas muestran que las células de la granulosa son positivas a marcadores de apoptosis, de autofagia o de ambos al mismo tiempo.

Los procesos de muerte predominantes en las células de la granulosa durante la atresia en ratas adultas son la apoptosis y la autofagia, en menor proporción los dos procesos en la misma célula.

Las características ultraestructurales evidencian células con una elevada vacuolización tipo autofágica, apoyando los resultados inmunohistoquímicos que evidencian muerte por esta vía.

Las células de la granulosa también presentaron características ultraestructurales correspondientes a la apoptosis clásica.

Las características de apoptosis y autofagia en una misma célula fueron claramente observadas en las células de la granulosa a nivel ultraestructural.

Las alteraciones del retículo endoplásmico rugoso observadas a nivel ultraestructural, pueden corresponder a estados iniciales de una muerte celular aún no definida, ya que es una característica que puede corresponder tanto a la apoptosis como a la autofagia.

El presente estudio muestra que durante la atresia folicular en ratas adultas, las células de la granulosa son eliminadas por tres diferentes rutas: apoptosis, autofagia y una mezcla de ambas.

VIII. REFERENCIAS

- Abdi, H. (2007) The Bonferonni and Šidák Corrections for Multiple Comparisons. Neil Salkind (Ed.). *Encyclopedia of Measurement and Statistics*. (pp. 103-107) Thousand Oaks (CA): Sage.
- Baehrecke, E. H. (2005). Autophagy: dual roles in life and death? *Nature reviews. Molecular cell biology*, 6 (6), 505–510. doi:10.1038/nrm1666
- Bland, M.J. & Altman, D.G. (1995) Multiple significance tests: the Bonferroni method. *BMJ*, 310, 170
- Choi JY, Jo MW, Lee EY, Yoon B, Choi DS. (2010). The role of autophagy in follicular development and atresia in rat granulosa cells. *Fertility and Sterility*, 93 (8), 2532-7.
- Choi, J., Jo, M., Lee, E., & Choi, D. (2011). Induction of apoptotic cell death via accumulation of autophagosomes in rat granulosa cells. *Fertility and Sterility*, 95(4), 1482–6. doi:10.1016/j.fertnstert.2010.06.006
- Clarke, P. G. H. (1990). Developmental cell death : morphological diversity and multiple mechanisms. *Anatomy and Embryology*, 181, 195–213.
- Cormack, D. H. (2003). Female Reproductive System. *PDQ Histology* (pp. 185–200). Ontario, Canada: BC Decker Inc.
- Degterev, A., Boyce, M., & Yuan, J. (2003). A decade of caspases. *Oncogene*, 22(53), 8543–67. doi:10.1038/sj.onc.1207107
- Depalo, R., Nappi, L., Loverro, G., Bettocchi, S., Caruso, M.L., Valentini, A.M., Selvaggi, L. (2003) Evidence of apoptosis in human primordial and primary follicles. *Human Reproduction*. 18 (12), 2678- 82.
- 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.
- Elmore, S. (2007). Apoptosis: a review of programmed cell death. *Toxicologic pathology*, 35(4), 495–516. doi:10.1080/01926230701320337
- Escobar M.L., Echeverría O.M., Ortiz R., Vázquez-Nin, G.H. (2008). Combined apoptosis and autophagy, the process that eliminates the oocytes of atretic follicles in immature rats. *Apoptosis*. 13, 1253–1266.

Escobar M.L., Echeverría O.M., Sánchez-Sánchez L., Méndez, C., Pedernera E., Vázquez-Nin, G.H. (2010). Analysis of different cell death processes of prepubertal rat oocytes in vitro. *Apoptosis*. 15, 511–526

Escobar, M. L., Vázquez-Nin, G. H., & Echeverría, O. M. (2011). Autophagy. En G. H. Vázquez-Nin, M. L. Escobar, M. De Felici, O. M. Echeverría, & F. G. Klinger (Eds.), *Cell Death in Mammalian Ovary* (pp. 81–102). Dordrecht: Springer Netherlands. doi:10.1007/978-94-007-1134-1

Escobar, M. L., Vázquez-Nin, G. H., & Echeverría, O. M. (2011). Apoptosis. En G. H. Vázquez-Nin, M. L. Escobar, M. De Felici, O. M. Echeverría, & F. G. Klinger (Eds.), *Cell Death in Mammalian Ovary* (pp. 63–80). doi:10.1007/978-94-007-1134-1

Escobar, M. L., Vázquez-Nin, G. H., & Echeverría, O. M. (2011). Brief Description of the Histological, Cytological and Functional Aspects of the Ovary. En G. H. Vázquez-Nin, M. L. Escobar, M. De Felici, O. M. Echeverría, & F. G. Klinger (Eds.), *Cell Death in Mammalian Ovary* (pp. 3–24). Springer.

Galluzzi, L., Vitale, I., Abrams, J. M., Alnemri, E. S., Baehrecke, E. H., Blagosklonny, M. V., Dawson, T. M., et al. (2012). Molecular definitions of cell death subroutines: recommendations of the Nomenclature Committee on Cell Death 2012. *Cell death and differentiation*, 19(1), 107–20. doi:10.1038/cdd.2011.96

Gartner, L.P. & Hiatt, J.L. (2003). *Texto Atlas de Histología*, (2ª ed., pp. 439-41) McGraw-Hill Interamericana.

Guide Line for the Care and Use of Laboratory Animals. (1996). (pp. 1–140) The National Academies Press.

Guraya, S. (2000). *Comparative Cellular and Molecular Biology of Ovary in Mammals*. (pp. 236) Science Publishers, Inc.

He, C., & Klionsky, D. J. (2009). Regulation mechanisms and signaling pathways of autophagy. *Annual review of genetics*, 43, 67–93. doi:10.1146/annurev-genet-102808-114910

Hussein, M. R., Haemel, A. K., & Wood, G. S. (2003). Apoptosis and melanoma: molecular mechanisms. *The Journal of pathology*, 199(3), 275–88. doi:10.1002/path.1300

Jacobson, M. D., Weil, M., & Raff, M. C. (1997). Programmed Cell Death in Animal Development. *Cell*, 88, 347–54.

Juenemann, K., & Reits, E. a. (2012). Alternative macroautophagic pathways. *International journal of cell biology*, 2012 (1), 1-8. doi:10.1155/2012/189794

Juhasz, G., & Neufeld, T. P. (2006). Autophagy: a forty-year search for a missing membrane source. *PLoS biology*, 4(2), 161-4. doi:10.1371/journal.pbio.0040036

- Kasagi N, Gomyo Y, Shirai H, Tsujitani S, Ito H. (1994). Apoptotic cell death in human gastric carcinoma: analysis by terminal deoxynucleotidyl transferase-mediated dUTP-biotin nick end labeling. *Jpn J Cancer Res.*, 85(9), 939-45.
- Kerr, J. F. R., Wyllie, A. H., & Currie, A. R. (1972). Apoptosis: A basic biological phenomenon with wide-ranging implications in tissue kinetics. *Br. J. Cancer*, 26, 239.
- Klionsky, D. J. (2007). Autophagy: from phenomenology to molecular understanding in less than a decade. *Nature Reviews Molecular Cell Biology*, 8, 931–937.
- Kovács J, Forgo V, Peczely P. (1992) The fine structure of the follicular cells in growing and atretic ovarian follicles of the domestic goose. *Cell Tissue Res*, 267, 561-569
- Kroemer, G., Galluzzi, L., Vandenabeele, P., Abrams, J., Alnemri, E. S., Baehrecke, E. H., Blagosklonny, M. V., et al. (2009). Classification of Cell Death. Recommendations of the Nomenclature Committee on Cell Death 2009. *Cell death and differentiation*, 16(1), 3–11. doi:10.1038/cdd.2008.150.Classification
- Leber, B., & Andrews, D. W. (2010). Closing in on the link between apoptosis and autophagy. *F1000 biology reports*, 2, 88. doi:10.3410/B2-88
- Levine, B. & Deretic, V. (2007). Unveiling the roles of autophagy in innate and adaptive immunity. *Nature Reviews Immunology*, 7, 767-777
- Li, J., & Yuan, J. (2008). Caspases in apoptosis and beyond. *Oncogene*, 27(48), 6194–206. doi:10.1038/onc.2008.297
- Magoffin, D. A. (2005). Ovarian theca cell. *The international journal of biochemistry & cell biology*, 37(7), 1344–9. doi:10.1016/j.biocel.2005.01.016
- Markström, E., Svensson, E. C., Shao, R., Svanberg, B., Billig, H. (2002). Survival factors regulating ovarian apoptosis – dependence on follicle differentiation. *Reproduction*. 123, 23–30.
- Martin, D. N., & Baehrecke, E. H. (2004). Caspases function in autophagic programmed cell death in *Drosophila*. *Development (Cambridge, England)*, 131(2), 275–84. doi:10.1242/dev.00933
- Mc Gee, E. A., & Hsueh, A. J. W. (2000). Initial and Cyclic Recruitment of Ovarian Follicles. *Endocrine Reviews*, 21(2), 200–214.
- Meléndez, A., & Levine, B. (2009). Autophagy in *C. elegans*. *WormBook : the online review of C. elegans biology*, 1–26. doi:10.1895/wormbook.1.147.1
- Mizushima, N., & Levine, B. (2010). Autophagy in mammalian development and differentiation. *Nature cell biology*, 12(9), 823–30. doi:10.1038/ncb0910-823

Nature Cell Biology Editorial. (2010). Focusing on Autophagy. *Nature Cell Biology*, 12(9), 813.

Oktem, O., & Oktay, K. (2008). The ovary: anatomy and function throughout human life. *Annals of the New York Academy of Sciences*, 1127, 1–9. doi:10.1196/annals.1434.009

Ortíz R., Echeverría O.M., Salgado R., Escobar M.L., Vázquez-Nin, G.H (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

Pattingre, S., Tassa, A., Qu, X., Garuti, R., Liang, X. H., Mizushima, N., Packer, M., et al. (2005). Bcl-2 antiapoptotic proteins inhibit Beclin 1-dependent autophagy. *Cell*, 122(6), 927–39. doi:10.1016/j.cell.2005.07.002

Rankin, T., Familari, M., Lee, E., Ginsberg, A., Dwyer, N., Blanchette-mackie, J., Drago, J., et al. (1996). Mice homozygous for an insertional mutation in the Zp3 gene lack a zona pellucida and are infertile. *Development*, 122, 2903–10.

Rupinder, S. K., Gurpreet, A. K., & Manjeet, S. (2007). Cell suicide and caspases. *Vascular pharmacology*, 46(6), 383–93. doi:10.1016/j.vph.2007.01.006

Tilly, J. L. (2001). Commuting the death sentence: How oocytes strive to survive. *Nature Reviews Molecular Cell Biology*, 2, 838–48.

Tilly, J.L. (2001). Emerging technologies to control oocyte apoptosis are finally treading on fertile ground. *Scientific World Journal*, 1, 181-3.

Yang, Z., & Klionsky, D. J. (2010). Eaten alive: a history of macroautophagy. *Nature cell biology*, 12(9), 814–22. doi:10.1038/ncb0910-814

Yorimitsu, T., & Klionsky, D. J. (2005). Autophagy: molecular machinery for self-eating. *Cell death and differentiation*, 12 Suppl 2, 1542–52. doi:10.1038/sj.cdd.4401765

Young, M. M., Kester, M., & Wang, H.-G. (2013). Sphingolipids: regulators of crosstalk between apoptosis and autophagy. *Journal of lipid research*, 54(1), 5–19. doi:10.1194/jlr.R031278

IX. ANEXO

Error Tipo I y corrección de Bonferroni

Al realizar varias pruebas en los mismos datos, se corre el riesgo de rechazar la hipótesis nula, cuando ésta debería ser aceptada. Éste es el error Tipo I, en el cual puede parecer que hay un evento *raro* cuando en realidad no lo hay. Ésto se debe a la *inflación* del nivel alfa. La probabilidad de caer en el error Tipo I en cada prueba es igual a α , la cual normalmente es 0.05. El evento de cometer el error Tipo I y el evento de no cometer el error Tipo I, no pueden ocurrir simultáneamente, por lo cual son complementarios. Por lo tanto, la probabilidad de no cometer el error Tipo I es 0.95 (Abdi, 2007).

Teniendo en cuenta que la probabilidad de observar dos eventos independientes al mismo tiempo es el producto de las probabilidades de cada evento, la probabilidad de no caer en el error Tipo I en la primer prueba y en la segunda prueba es:

$$0.95 \times 0.95 = (1 - 0.05)^2 = (1 - \alpha)^2$$

Por lo tanto, al aumentar el número de pruebas, el exponente incrementará (en C pruebas: $(1 - \alpha)^C$). Por ejemplo, si tenemos 10 pruebas: $0.95^{10} = 0.599$. Esto significa que la probabilidad de no cometer el error Tipo I disminuye y por lo tanto la probabilidad del error Tipo I aumenta, con lo cual podríamos rechazar la hipótesis nula cuando ésta debe ser aceptada. Es decir, podríamos observar diferencias significativas cuando no existen (Bland & Altman, 1995; Abdi, 2007).

Debido a lo explicado anteriormente, se puede realizar la prueba de Bonferroni, también llamada Boole o aproximación de Dunn. Esta prueba corrige la probabilidad de caer en el error Tipo I al adaptar el valor de α de cada prueba de la siguiente forma:

$$\frac{\alpha}{C}$$

En el ejemplo:

$$\frac{0.05}{10} = 0.005$$

Por lo cual los valores críticos de tablas aumentan y la probabilidad de cometer el error Tipo I disminuye (Bland & Altman, 1995).