



**UNIVERSIDAD NACIONAL AUTÓNOMA  
DE MÉXICO**

---

---

**FACULTAD DE CIENCIAS**

**ANÁLISIS BIOQUÍMICO DE LA MUERTE CELULAR EN  
OVARIOS DE RATA ADULTA.**

**T E S I S**

**QUE PARA OBTENER EL TÍTULO DE:**

**BIÓLOGO**

**P R E S E N T A :**

**GETHSEMANY GARCÍA GUERRERO**

**DIRECTOR DE TESIS:**

**DRA. OLGA MARGARITA ECHEVERRÍA MARTÍNEZ**

**2015**

**CIUDAD UNIVERSITARIA, D.F.**





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.

## **Hoja de datos del Jurado**

### **1. Datos del alumno**

García  
Guerrero  
Gethsemany  
Tel. 54855656  
Universidad Nacional Autónoma de México  
Facultad de Ciencias  
Biología  
30615944-2

### **2. Datos del tutor**

Dra.  
Olga Margarita  
Echeverría  
Martínez

### **3. Datos del sinodal 1**

Dra.  
Maricela  
Villagrán  
Santa Cruz

### **4. Datos del sinodal 2**

Dra.  
María del Carmen  
Méndez  
Herrera

### **5. Datos del sinodal 3**

Dra.  
Tatiana  
Fiordelisio  
Coll

### **6. Datos del sinodal 4**

Dra.  
María Luisa  
Escobar  
Sánchez

### **7. Datos del trabajo escrito**

Análisis bioquímico de la muerte celular en ovarios de rata adulta  
53 p  
2015

# Índice

---

<b>RESUMEN</b> .....	<b>1</b>
<b>ABSTRACT</b> .....	<b>2</b>
<b>INTRODUCCIÓN</b> .....	<b>4</b>
OVARIO .....	4
<i>Foliculogénesis</i> .....	6
<i>Luteinización</i> .....	9
<i>Meiosis</i> .....	10
ATRESIA FOLICULAR .....	11
CONCEPTO DE MUERTE CELULAR .....	12
<i>Apoptosis</i> .....	13
<i>Caspasas</i> .....	13
<i>Bcl-2</i> .....	15
<i>Rutas de activación de la apoptosis</i> .....	16
<i>Externalización de la Fosfatidilserina (PS)</i> .....	18
<i>Autofagia</i> .....	19
<i>Tipos de autofagia</i> .....	20
<i>LC3 (Microtubule-associated protein 1 light chain 3)</i> .....	22
<i>Monodansilcaverina (MDC)</i> .....	22
<b>JUSTIFICACIÓN</b> .....	<b>24</b>
<b>HIPÓTESIS</b> .....	<b>25</b>
<b>OBJETIVOS</b> .....	<b>25</b>
OBJETIVO GENERAL .....	25
OBJETIVOS PARTICULARES.....	25
<b>MATERIAL Y MÉTODOS</b> .....	<b>26</b>
MICROSCOPIA ÓPTICA .....	26
<i>Tinción con Hematoxilina-Eosina</i> .....	26
MICROSCOPIA ELECTRÓNICA.....	27
ENSAYO DE MONODANSILCAVERINA (MDC) Y ANEXINA-V .....	28
1) <i>MDC</i> .....	28
2) <i>Anexina-V</i> .....	28
3) <i>MDC y Anexina-V</i> .....	29
WESTERN BLOT .....	30
<b>RESULTADOS</b> .....	<b>31</b>

# Índice

---

MICROSCOPIA ÓPTICA .....	31
MICROSCOPIA ELECTRÓNICA .....	33
ENSAYO DE MONODANSILCADAVERINA (MDC) Y ANEXINA-V .....	35
<i>Ensayo de MDC</i> .....	35
<i>Ensayo de Anexina-V</i> .....	38
<i>Ensayo de MDC + Anexina-V</i> .....	40
WESTERN BLOT .....	42
<b>DISCUSIÓN .....</b>	<b>43</b>
<b>CONCLUSIONES.....</b>	<b>48</b>
<b>REFERENCIAS .....</b>	<b>49</b>

## Resumen

---

### Resumen

La atresia folicular es el mecanismo mediante el cual se eliminan los folículos que no cumplen con los requisitos para realizar la ovulación. Durante este proceso ocurren diferentes tipos de muerte celular programada como la apoptosis, la cual se lleva a cabo por un grupo de proteasas llamadas caspasas, cuya actividad provoca cambios en la morfología de las células. La autofagia como muerte celular programada, se caracteriza por la presencia de un gran número de autofagosomas, lo que conduce a una falla celular y posteriormente a la muerte. En el presente trabajo, hemos evaluado aspectos bioquímicos de la eliminación celular de las granulosas durante el proceso de atresia folicular en ratas adultas.

Se utilizaron poblaciones aisladas de células de la granulosa obtenidas por tripsinización de ovarios de rata adulta. Se realizó la identificación de la apoptosis y de la muerte celular autofágica, en células enteras y en lisados celulares. Se identificó a la apoptosis por medio de la técnica de incorporación de la Anexina-V y la expresión de caspasa-3 en su forma activa. La autofagia como muerte celular se evaluó analizando los niveles de incorporación de la Monodansilcadaverina (MDC) al espacio citoplasmático de las granulosas, así como por medio de la expresión de la lipidación de la proteína LC3.

Los resultados evidencian que las células de la granulosa de ovarios de rata, presentan características bioquímicas que indican la presencia de diferentes rutas de muerte; ya que dentro de las poblaciones evaluadas un porcentaje de las mismas es positivo a marcadores de apoptosis y otro grupo ha sido positivo a indicadores de autofagia. Es importante mencionar que se identificó una pequeña población que simultáneamente presenta marcadores de apoptosis y de autofagia incrementada, lo cual indica que estas células están siendo eliminadas por dos tipos de muerte al mismo tiempo.

La evaluación bioquímica de la muerte celular de las granulosas de ovarios de ratas adultas, indica que la atresia folicular se puede llevar a cabo por tres diferentes mecanismos, apoptosis, autofagia y en menor medida por una combinación de ambos.

## Abstract

---

### Abstract

Follicular atresia is the mechanism by which are eliminated the follicles that are not destined to the ovulation. The atresia process is conducted by programmed cell death as the apoptosis, which is carried out by a group of proteases called caspases, whose activity causes changes in cell morphology. Another type of programmed cell death is the autophagy which is characterized by the presence of a large number of autophagosomes, leading to the cells toward a failure and a subsequent cell death. In this work, we have evaluated biochemical aspects of the granulosa cell removal during follicular atresia in adult rats.

Isolated populations of granulosa cells were obtained by means of trypsinization of adult rat ovaries. We identified the apoptosis and autophagic cell death processes using whole and lysate cells. Apoptosis was identified using the techniques of: Annexin-V incorporation and active caspase-3 expression. Autophagy as cell death was evaluated by analyzing the incorporation of monodansylcadaverine (MDC) levels into the cytoplasmic space and the LC3 protein lipidation.

Our results evidenced that the granulosa cells of rat ovaries have biochemical characteristics indicating the presence of different routes of cell death. It was evidenced the presence of three different cellular groups according the presence of apoptotic or autophagic markers. A cellular percentage was positive to markers indicating apoptosis, another group was positive to indicators of autophagy, and finally a small third group evidenced the presence of apoptosis markers as well as an increased autophagy, indicating that these cells were eliminated by two routes of cell death at the same time.

The biochemical assessment of granulosa cell death of adult rat ovaries indicates that there are three different mechanisms by which the follicular atresia is carried out, the apoptosis, the autophagy and lesser extent the combination of both process in the same cell.

## Abreviaturas

---

Abreviatura	Nombre
ADN	Ácido desoxirribonucleico
Apaf-1	Factor activador de la proteasa apoptótica 1
ARN	Ácido ribonucleico
Atg	Genes relacionados a autofagia
Bcl-2	Células de linfoma tipo B-2
CAD	DNAsa activada por caspasa
CARD	Dominio reclutador de caspasas
DED	Dominio efector de muerte
DISC	Complejo de señalización de inducción de muerte
EGF	Factor de crecimiento epidérmico
FADD	Fas asociado con dominio de muerte
FSH	Hormona folículo estimulante
IAP	Inhibidor de proteínas apoptóticas
IP	Ioduro de propidio
Lamp	Proteína de membrana asociada a lisosoma
LC3	Cadena ligera 3 de la proteína 1 asociada a microtúbulos
LH	Hormona luteinizante
LIF	Factor inhibidor de la leucemia
MCP	Muerte celular programada
MDC	Monodansilcadaverina
mTOR	Diana de rapamicina en células de mamífero
PS	Fosfatidilserina
TNRF	Receptor del factor de necrosis tumoral



# Introducción

---

## Introducción

### Ovario

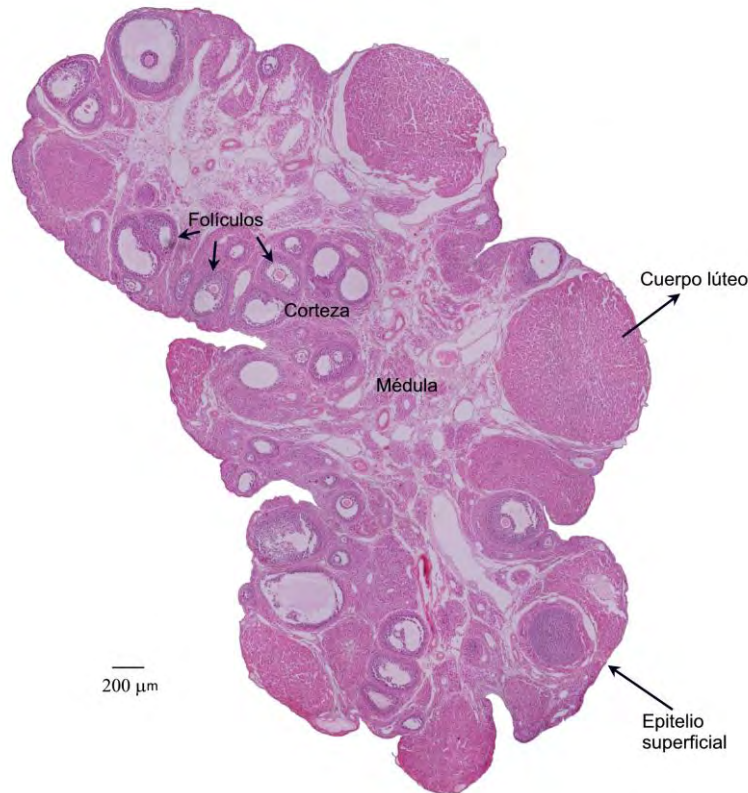
El ovario o gónada femenina, es el órgano principal en la reproducción de las hembras. En los mamíferos es una estructura par de color blanco o amarillento, de forma ovalada. Se localiza uno en cada lado de la cavidad pélvica superior, contra la parte posterior de la pared de la pelvis y cerca del útero, presentan una superficie irregular durante la etapa reproductiva. El ovario está compuesto por tres regiones: la médula, la corteza y el epitelio superficial. La región medular se encuentra en el centro del ovario, está compuesta por fibroblastos embebidos en fibras de colágena y fibras elásticas. La médula contiene también grandes vasos sanguíneos, que derivan de las arterias ováricas, vasos linfáticos y fibras nerviosas. La corteza ovárica contiene los folículos (unidad funcional y estructural del ovario), en distintos niveles de desarrollo, rodeados por tejido conjuntivo con gran cantidad de células tipo fibroblasto y una densa red de fibras de colágena, dispuestas en distintas direcciones. En el estroma se encuentran incluidas otras estructuras, que son: el cuerpo lúteo y el cuerpo *albicans*. El epitelio superficial o germinativo está constituido por una capa de células cúbicas, que rodea al ovario, por debajo de esto se encuentra una capa de tejido conjuntivo que constituye la túnica albugínea. El epitelio germinativo transporta moléculas a la cavidad abdominal, participando en la ruptura y separación cíclica de la superficie ovárica durante la ovulación; éste epitelio tiene la capacidad de reparar la lesión provocada durante la ovulación. Descansa sobre una membrana basal, seguida de una capa de tejido conjuntivo denso con fibras paralelas a la superficie, la túnica albugínea ovárica es responsable del color blanquecino del ovario ([Eynard et al. 2008](#); [Gartner and Hyatt 2002](#); [Jones and Lopez 2006](#); [Ross and Pawlina 2007](#)). (Fig. 1)

El ovario tiene dos funciones esenciales en la reproducción: la producción de gametos y la síntesis de hormonas esteroides. La generación de gametos, consta de la producción y mantenimiento de ovocitos que cumplan con las características de competencia para ser fertilizables y poder desarrollarse. La función hormonal está regulada dentro de un eje hipotálamo-hipófisis-ovario y las hormonas ováricas son absolutamente necesarias para el funcionamiento del órgano y mantenimiento de la gestación. Regula el crecimiento postnatal de los órganos reproductores y el desarrollo de los caracteres sexuales secundarios. También participa en los cambios cíclicos que tienen el oviducto, el útero, la vagina e incluso glándulas mamarias, estos cambios se dan como preparación al

## Introducción

---

embarazo. Estas funciones se encuentran ampliamente relacionadas y los eventos que los componen dan lugar al desarrollo folicular, luteogénesis y luteólisis (Oktem and Oktay 2008; White and Porterfield 2013).



**Figura 1. Ovario de rata adulta. Se observa el epitelio superficial rodeando el ovario, cerca de la periferia se encuentra la corteza, compuesta por los folículos en diferentes etapas del desarrollo y cuerpos lúteos. En el centro se localiza la médula.**

En los ovarios de mamífero, los folículos se componen de un ovocito que es rodeado de células de la granulosa y células de la teca (ambas células somáticas). Las células de la granulosa proporcionan soporte físico y el microambiente necesario para el desarrollo de los ovocitos, este tipo celular se encuentra diferenciándose continuamente. Se ha demostrado que las células de la granulosa presentan receptores específicos para gonadotropinas FSH (Hormona Folículo Estimulante) y LH (Hormona Luteinizante), además de factores tales como EGF, IGF-1y el anti-Mülleriano. La acción de estas hormonas y factores de crecimiento cambia dependiendo de la etapa de diferenciación de los folículos y de la etapa del ciclo reproductivo. Otra de las funciones que cumplen las

## Introducción

---

células de la granulosa, es la síntesis de esteroides ováricos, como el estradiol. Las células de la teca, se organizan formando la teca interna y la teca externa, estas células están separadas de las células de la granulosa por una membrana basal. Una de las principales funciones de las células de la teca, es la secreción de andrógenos que son utilizados por las granulosa para producir estrógenos. Las células de la teca responden a LH mediante un aumento en la producción de andrógenos a partir del colesterol. La biosíntesis de los estrógenos es controlada por la enzima aromatasa, que requiere de andrógenos producidos por las células de la teca como sustrato. Conforme se desarrolla el folículo, las células de la granulosa se diferencian y aumentan la síntesis de estrógenos. La proporción y distribución de las células, se encuentra relacionado a la etapa de desarrollo en el que se encuentre el folículo. El destino final de los folículos está regulado por factores endocrinos y parácrinos. (McGee and Hsueh 2000; Skinner et al. 2003).

El desarrollo de los folículos se da a través de diferentes etapas: primordial, primaria, secundaria, antral y preovulatoria. Los folículos primordiales que se encuentran en reposo pueden comenzar su crecimiento o no desarrollarse, el crecimiento folicular consta de dos pasos: un reclutamiento inicial de folículos primordiales y posteriormente un reclutamiento cíclico de folículos en desarrollo que competirá para ser seleccionados, madurar y ser ovulado. El reclutamiento inicial comienza poco después de la formación del folículo primordial, cuando los animales están en etapa juvenil o incluso antes del nacimiento, dependiendo de la especie. Antes de la pubertad los folículos se desarrollan de forma lenta, llegando a la etapa de folículo primario. El reclutamiento cíclico comienza en la pubertad en respuesta a la maduración del eje hipotálamo-hipófisis-gónada, es en este momento donde se seleccionará un folículo para su maduración, este proceso se lleva de manera cíclica a lo largo de la vida reproductiva adulta de la hembra (McGee and Hsueh 2000; Norris and Carr 2013).

### *Foliculogénesis*

En la etapa embrionaria, los ovocitos se encuentran en agrupaciones de células germinales, llamadas nichos de células germinales. La foliculogénesis tiene lugar cuando los ovocitos que sobrevivieron a un primer proceso de selección, son rodeados de células de la pre-granulosa. Se presenta un sistema de comunicación entre el ovocito y las

## Introducción

---

células de la granulosa, lo cual es importante para el desarrollo folicular inicial. Algunos estudios en mamíferos demuestran que los folículos primordiales pueden expresar el factor inhibidor de la leucemia (LIF), el cual promueve el crecimiento folicular y estimula el crecimiento de los ovocitos, además de participar en la proliferación de las células de la teca. LIF es producido principalmente por células somáticas, en especial por las células de la granulosa. Otros factores involucrados en el desarrollo folicular son la expresión de gen *nobox* (*new born ovary*) que participa en la transición a la etapa primaria del folículo y el Kit ligando (KitL) implicado en la proliferación de las células de la granulosa y en el crecimiento de los ovocitos ([Edson et al. 2009](#)).

La transición de un folículo primordial a un folículo primario es evidenciada por el cambio morfológico en las células de la granulosa que pasan de ser aplanadas a cúbicas, lo cual se puede apreciar claramente a nivel histológico. En esta etapa se comienza a diferenciar la lámina basal, asimismo el ovocito incrementa su tamaño. Los vasos sanguíneos se encuentran sólo en el tejido conectivo ([Edson et al. 2009](#); [McGee and Hsueh 2000](#)).

Los folículos secundarios se caracterizan por un ovocito en crecimiento, por la proliferación de las células de la granulosa que dan origen a varias capas celulares que promueven el incremento del tamaño folicular y la diferenciación de las células de la teca. Las células del tejido conectivo más cercanas a la lámina basal se reorganizan y dan lugar a la teca interna, mientras que las más lejanas conforman la teca externa. Estas células tienen como función la síntesis de andrógenos. La aparición de la estratificación tecal promueve el establecimiento de la vascularización alrededor del folículo, compuesta de arteriolas que terminan en una red de capilares cercanos a la membrana basal. Mientras se forma el folículo secundario, las células de la granulosa expresan receptores para la FSH, estrógenos y andrógenos. En esta fase, el ovocito sintetiza y secreta glucoproteínas, lo que origina un halo translúcido que lo rodea, conocido como zona pelúcida. Los componentes principales son las proteínas ZP1, ZP2 y ZP3. En esta fase las células de la granulosa empiezan a formar uniones tipo gap, sus prolongaciones citoplasmáticas atraviesan la zona pelúcida para mantener contacto con la membrana plasmática del ovocito. Estas uniones permiten la transferencia de nutrientes, aminoácidos, hormonas, factores de crecimiento y señales de regulación de la meiosis, en

## Introducción

---

dichas uniones intervienen diferentes proteínas como las conexinas: -32 y -37 (Edson et al. 2009; Norris and Carr 2013).

Una vez conformada la teca interna, los folículos son nombrados pre-antrales. En dicha fase el ovocito incrementa su tamaño, la cantidad de ARN, la síntesis de proteínas, el número de ribosomas, mitocondrias y otros organelos. Las células de la granulosa que lo rodean incrementan su tamaño y proliferan. El folículo alcanza la fase antral inicial cuando se forman pequeñas cavidades entre las células de la granulosa, que son ocupados con fluido denominado licor folicular. Cuando el folículo comienza a mostrar estas características, se ha iniciado el reclutamiento cíclico. El licor folicular, está compuesto de diferentes sustancias que son secretadas por las células foliculares como: proteínas reguladoras, esteroides, factores de crecimiento, proteoglicanos y lipoproteínas, que participan en el desarrollo folicular. El folículo incrementa su tamaño y volumen debido a las altas cantidades de fluido antral y a la proliferación de las células de la granulosa. En esta etapa se forman tres tipos de células de la granulosa, las que rodean al ovocito, llamadas de la corona *radiata* y las del *cumulus oophorus*; y las que se ubican en la pared del folículo, denominadas granulosa *murales*. El ovocito continúa creciendo, las células de la granulosa proliferan y se reacomodan dependiendo de la cantidad de fluido folicular, hasta consolidarse el antro. Cuando el espacio antral se ha formado, se observa una figura en media luna dentro del folículo, lleno del licor folicular y las células de la granulosa alrededor. Las células de la teca incrementan la expresión de enzimas para la síntesis de esteroides, se lleva a cabo una selección de folículos para continuar su desarrollo, donde existe una dependencia a los niveles de secreción de FSH y LH. En tanto que los folículos no seleccionados pasan por un proceso de atresia folicular (McGee and Hsueh 2000; Vázquez-Nin et al. 2011).

Los folículos en etapa antral o preovulatoria tienen como función principal concluir el desarrollo del ovocito, esto se lleva a cabo, a través de los factores de crecimiento y de supervivencia que regulan la selección y atresia folicular. Existe un crecimiento folicular activo donde se desarrolla la capacidad de respuesta a los estímulos de las hormonas FSH y LH, que son secretadas de forma cíclica. Estos folículos debido a su tamaño producen un relieve en la superficie ovárica, en el momento de la ovulación la pared del folículo se rompe provocando la expulsión del ovocito, el cual es liberado rodeado por las

## Introducción

células de la granulosa; el líquido folicular ayuda a impulsar al ovocito. El ovocito expulsado entra al infundíbulo de la trompa uterina y se introduce en su interior, donde será capacitado y facultado para una posterior fertilización. Un par de horas antes de la ovulación las células de la granulosa y de la teca interna comienzan su transformación a cuerpo lúteo (Edson et al. 2009; McGee and Hsueh 2000; Norris and Carr 2013; Vázquez-Nin et al. 2011). (Fig 2.)

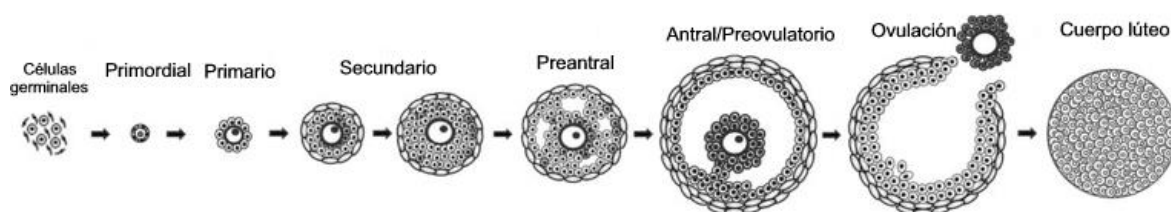


Figura 2. Clasificación de foliculogénesis en mamíferos. Modificado de Edson et al., 2009.

### *Luteinización*

Después de la ovulación y la cicatrización, las células de la granulosa y de la teca se modifican para formar una estructura que funciona como una glándula endocrina después de la ovulación, el cuerpo lúteo. En esta transformación se da un rearrreglo de la vascularización el cual da inicio a la fase lútea o luteinización. Las células de la granulosa incrementan su tamaño, adquieren capacidad esteroidogénica y acumulan un pigmento amarillo, de nombre luteína. Las células de la teca interna son nombradas células de la teca luteinizadas, sintetizan androstenodiona y progesterona en respuesta a los estímulos de LH. El cuerpo lúteo continúa aumentando su tamaño y entra en una fase de involución aproximadamente 14 días después de la ovulación, salvo que ocurra fecundación. Si esto pasa el cuerpo lúteo seguirá aumentando de tamaño y producirá progesterona y estrógenos bajo la estimulación de la gonadotropina coriónica humana (hCG) producida por el trofoblasto del embrión implantado (Jones 2012; Norris and Carr 2013; Tresguerres and Castillo 2005).

## Introducción

---

La regresión que ocurre en el cuerpo lúteo, también conocida como luteólisis, genera la formación del cuerpo *albicans*, cuando esto sucede el tejido conjuntivo del estroma sustituye al conjunto de células luteínicas en degeneración del cuerpo lúteo. Posteriormente el cuerpo *albicans* disminuye su tamaño y desaparece progresivamente (Kierszenbaum 2008).

### *Meiosis*

En los folículos en crecimiento, los ovocitos se mantienen detenidos en el estadio de diploteno de la profase meiótica I. Los procesos de transformación y cambio tanto en el núcleo como en el citoplasma se conocen como maduración del ovocito. El ovocito atraviesa por tres etapas que son: maduración nuclear, maduración epigenética y maduración citoplasmática. *La maduración nuclear* abarca la continuación y término de la primera división meiótica con la detención estable en una metafase II. Los ovocitos que llegan al máximo crecimiento folicular reinician la meiosis en respuesta al pico pre-ovulatorio de la LH. Durante la primera división meiótica, los cromosomas homólogos se segregan en grupos, uno dentro del primer cuerpo polar y otro dentro del ovocito de mayor volumen citoplasmático, generando un genoma haploide. Posteriormente se genera un segundo huso meiótico y es cuando el ovocito entra en metafase II, en la que se estaciona hasta ser activado por el espermatozoide. La meiosis es regulada por oscilaciones de la actividad de la cinasa p34cdc2, que es un componente de la ciclina B y participa en la actividad de factor promotor de maduración. Otro factor regulador del reinicio de la meiosis es la adenosina monofosfato cíclico (AMPc), el cambio en los niveles dentro del ovocito, facilita la permeabilidad de la membrana y mantienen el arresto meiótico; *Maduración epigenética*. Se realiza cuando el ovocito se encuentra en crecimiento, se generan modificaciones de la cromatina que regulan la expresión genética, dichas modificaciones son estables y heredables, estos cambios se presentan sin cambiar la secuencia de ADN; *Maduración citoplasmática*. Se lleva a cabo en el citoplasma de los ovocitos en maduración. Los ovocitos acumulan ARN materno inactivo y proteínas llamadas factores efecto-materno. Estos factores son esenciales para la transición huevo-embrión y para la embriogénesis temprana, son codificados por efecto de genes maternos y pueden ser sintetizados durante el crecimiento, maduración o después de la fertilización del ovocito (Escobar et al. 2008).

## Introducción

---

Existen pocos animales que viven más allá de su actividad reproductiva en la naturaleza debido a la depredación, enfermedad u otro fenómeno relacionado con el medio ambiente. Sin embargo las hembras humanas, viven períodos largos después de la edad reproductiva, donde el suministro de folículos está agotado y el ovario deja de ser funcional para la reproducción, esta condición es llamada menopausia. Una vez iniciado este proceso, va desapareciendo tanto la ovulación como la menstruación, acompañado de un declive en los niveles circulantes de estrógenos y andrógenos. A la menopausia se le asocian efectos como atrofia vaginal, cambios en el libido y deficiencia ósea (Norris and Carr 2013).

### **Atresia Folicular**

Cuando nacen las hembras de mamífero, presentan un número finito de folículos primordiales que son la población total de células germinales para toda la vida reproductiva. Pocos folículos ováricos diferenciados llegan a completar su maduración, ya que la mayor parte de estos folículos degeneran y son eliminados por el proceso de atresia folicular (Kezele et al. 2002).

En muchas especies, los ovocitos mueren durante el desarrollo temprano, incluso antes de que se formen los folículos en organismos neonatos, así como en organismos prepúberes. Varios autores lo consideran un proceso azaroso, que se ve incrementado por limitaciones de tipo nutricional y ambientales, muchos de estos autores consideran que la sobreproducción de células germinales y su eliminación, se da para obtener un soporte óptimo, aunque ésta exacerbada eliminación puede estar dirigida a células germinales con anomalías cromosómicas o genes defectuosos, asegurando un control de calidad en los ovocitos. Una de las hipótesis más aceptadas para explicar la gran cantidad de células germinales que son eliminadas, indica que cumplen la función de nodrizas, sacrificándose para que sobrevivan las más aptas, donando nutrientes y compuestos (Escobar et al. 2008; Vázquez-Nin et al. 2011).

Los folículos en atresia inicial se caracterizan por presentar células de la granulosa con condensación de la cromatina, una coloración oscura y mostrar encogimiento que se evidencia por su separación de las células vecinas. Al mismo tiempo el ovocito modifica y



## Introducción

---

altera su forma. Las cualidades bioquímicas de estos cambios en las células de la granulosa durante la atresia incluyen a la fragmentación de ADN, condición asociada a la muerte por apoptosis. En etapas avanzadas se puede identificar la atresia por la desintegración de la membrana basal y la presencia de leucocitos infiltrados en las capas de células de la granulosa. Estudios recientes indican que en el proceso de atresia folicular participan más de un tipo de muerte celular, apoptosis, autofagia o la combinación de éstas ([Kezele et al. 2002](#); [Vázquez-Nin et al. 2011](#)).

### Concepto de muerte celular

La muerte celular programada (MCP) es un mecanismo que implica una programación para que la muerte se dé en un lugar y tiempo exacto mediante una ruta de señalización que conlleva a la eliminación de las células. El concepto fue utilizado por Lockshin y Williams (1964) para describir la muerte de células durante el desarrollo.

La muerte celular se puede clasificar en relación a la apariencia morfológica de la célula, así como a criterios enzimáticos. Por sus aspectos funcionales se definen de tipo programado o de características accidentales, fisiológicas o patológicas. Se considera como una célula muerta cuando cumple cualquiera de los siguientes criterios ya sea morfológico o bioquímico: 1) Que la célula no tenga integridad en su membrana plasmática; 2) El citoplasma y el núcleo celular hayan sufrido fragmentación completa; 3) Los fragmentos y restos celulares sean engullidos por células adyacentes ([Kroemer et al. 2009](#)). En los organismos existe un equilibrio entre la supervivencia de las células normales y MCP. La apoptosis (muerte celular programada tipo I), la autofagia (muerte celular programada tipo II) y la necrosis son las tres formas más observadas de muerte celular, sus características morfológicas y bioquímicas particulares permiten identificarlas ([Ouyang et al. 2012](#)). (Fig 3.)

# Introducción

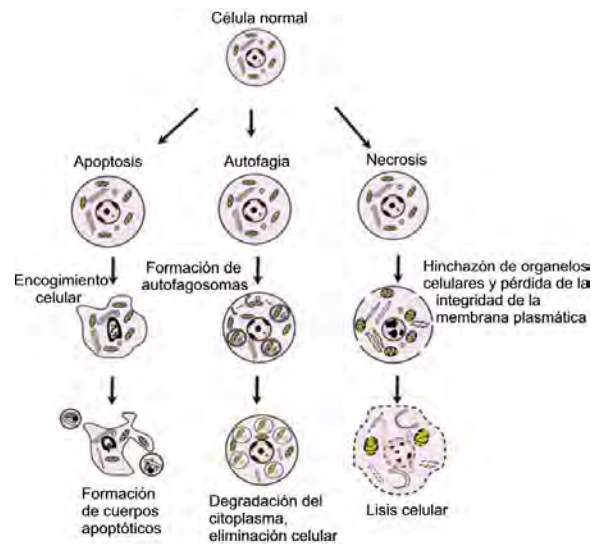


Figura 3. Tipos de muerte celular programada. Modificado de Vázquez-Nin, 2011.

## Apoptosis

El término apoptosis (“*apo*”= separa y “*ptosis*”= caer) también conocida como muerte celular programada tipo I, fue descrita por Kerr y colaboradores (1972). Ellos propusieron un patrón diferente de muerte celular con características diferentes a la necrosis, como contracción citoplasmática, condensación de la cromatina (*picnosis*), fragmentación nuclear (*cariorrexis*), formación de cuerpos apoptóticos y fagocitosis de los restos celulares por células vecinas. Los cambios bioquímicos incluyen escisión del ADN en fragmentos de 180-200 pb, externalización de la fosfatidilserina, participación activa de proteasas y miembros de las proteínas Bcl-2. El estudio de la apoptosis se considera esencial en numerosas patologías, ya que la desregulación o incremento de actividad produce enfermedades degenerativas (Kerr et al. 1972; de la Rosa 2000; Ouyang et al. 2012).

### Caspasas

La muerte celular programada tipo I es activada por una familia específica de proteasas de cisteína que escinde sus sustratos después de un residuo de ácido aspártico. Estas proteasas reciben el nombre de caspasas, fueron identificadas por medio de estudios en

## Introducción

*Caenorhabditis elegans* (*C. elegans*). Las caspasas pueden diferir en su secuencia primaria y en su especificidad por el sustrato; sin embargo, tienen en común que se sintetizan como zimógenos inactivos que contienen un predominio N-terminal, una sub-unidad grande (p20) y una sub-unidad pequeña (p10). Cada caspasa activa, forma un tetrámero que consiste en dos sub-unidades grandes y dos sub-unidades pequeñas idénticas (Oliver and Vallette 2005).

Los miembros de las caspasas comparten algunas características, tales como la secuencia de aminoácidos y estructura molecular. Se han identificado 14 caspasas, en humanos se expresan 11 (caspasa-1 a -10, y caspasa-14). El grupo de caspasas involucradas en la muerte celular, se subdivide en dos grupos: las caspasas ejecutoras (caspasa-7, caspasa-3 y caspasa-6) y las caspasas iniciadoras (caspasa-2, caspasa-8, caspasa-9 y caspasa-10). Las caspasas iniciadoras tienen pro-dominios largos (más de 100 aminoácidos) con motivos de reconocimiento proteína-proteína, como el dominio efector de muerte (DED) y el CARD (*caspase recruitment domain*), ambos dominios contribuyen a la transducción de señales en la activación de la actividad proteolítica de las caspasas. Las caspasas ejecutoras tienen predominios cortos (menos de 30 aminoácidos) y carecen de actividad enzimática intrínseca. Las caspasas iniciadoras son activadas por dimerización y las ejecutoras por escisión, las iniciadoras son responsables de la activación de las caspasas ejecutoras (Oliver and Vallette 2005; Vázquez-Nin et al. 2011). (Fig. 4)

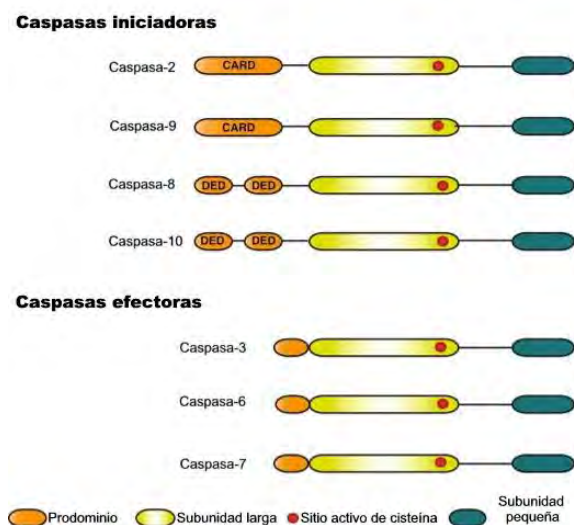


Figura 4. Clasificación de caspasas. Modificado de Vázquez-Nin, 2011.

## Introducción

---

Las caspasas se encuentran conservadas a través de la evolución, tiene un grado de heterogeneidad bioquímica y funcional, se han logrado identificar en los seres humanos y en grupos alejados como los nematodos. Puede ser activado a través de diferentes rutas bioquímicas; vía intrínseca y vía extrínseca, con o sin la dependencia de los factores mitocondriales como; citocromo C y las proteínas de la familia Bcl-2 ([Hengartner 2000](#); [Kroemer et al. 2009](#)).

### *Bcl-2*

El nombre de las proteínas Bcl-2 deriva del linfoma de células tipo B-2, fueron descritas a finales de 1980 en traslocaciones cromosómicas, características del linfoma folicular. Las proteínas Bcl-2 juegan un papel muy importante en la apoptosis, su principal lugar de acción es en la membrana mitocondrial externa, funcionan a través de interacciones proteína-proteína, con un control alostérico de sus conformaciones y dinámica dentro de la célula. Los miembros de esta familia, se dividen en tres categorías, basadas en su función intracelular y la homología en las secuencias de sus dominios BH ([Lindsay et al. 2011](#); [Moldoveanu et al. 2014](#)).

Todos los miembros comparten al menos uno de los cuatro dominios BH, se clasifican en pro-apoptóticos, anti-apoptóticos y un grupo denominado *BH3-only*. La categoría pro-apoptótica se caracteriza por compartir tres dominios (BH1, BH2 y BH3), lo integran las proteínas Bax, Bak y Bok, que participan en la formación de poros en la membrana mitocondrial externa, favoreciendo la liberación de factores como el citocromo C ([Akl et al. 2014](#)).

Los miembros anti-apoptóticos presentan cuatro dominios BH (BH1, BH2, BH3 y BH4), algunos se localizan en las membranas intracelulares y son los encargados de promover la supervivencia celular, ya que previenen la liberación de factores pro-apoptóticos uniéndose al dominio BH3 de las proteínas pro-apoptóticas, las proteínas que componen este grupo son Bcl-2, Bcl-XL, Bcl-W, Mcl1 y Bcl-2A1 ([Borner 2003](#)).

El grupo *BH3-only* contiene un solo dominio (BH3), promueve la activación de los efectores pro-apoptóticos, para llevar a cabo la muerte de la célula, es el principal

## Introducción

antagonista de Bcl-2. Las proteínas de este grupo forman complejos que favorecen la participación de proteínas pro-apoptóticas, sus integrantes son Bad, Bik, Bim, Bid, PUMA, Noxa, Hrk, BMF, Bcl-xs, Nbk y BNIP3 (Akl et al. 2014; Borner 2003). (Fig. 5)



Figura 5. Clasificación de las proteínas Bcl-2. Modificado de Hengartner, 2000.

### *Rutas de activación de la apoptosis*

Actualmente se han descrito con detalle las dos vías de activación de la apoptosis: La vía extrínseca y la vía intrínseca. La vía extrínseca, está regulada por receptores de la membrana citoplasmática. La vía intrínseca, que está relacionada con la liberación de citocromo C de la mitocondria y por la acción de proteínas de la familia Bcl-2.

La vía extrínseca se activa cuando el ligando se une al receptor transmembranal de muerte en la superficie celular, tales receptores son FasL, CD95, Apo 1, DR4/TRAIL-R1 y uno de los más estudiados TNFR (*tumor necrosis factor receptor*), se caracterizan por tener un complejo adaptador de señalización de muerte DISC (*death-inducing signaling complex*), dicho complejo contiene moléculas de anclaje y adaptadoras como el FADD (*Fas-Associated protein with Death Domain*). La formación del complejo conduce al reclutamiento de FADD, este acoplamiento permite la interacción con el DED de la pro-caspasa-8, produciendo el reclutamiento, oligomerización y forma activa de la caspasa. Cuando la caspasa-8 se encuentra en forma activa, promueve la participación y actividad de caspasas efectoras como a la caspasa-3 (Franklin 2011; Fulda and Debatin 2006).

## Introducción

---

La vía intrínseca, implica una cascada de eventos en respuesta a señales dentro de la célula, los estímulos pueden ser radiación ultravioleta, estrés celular y daño al ADN. Estos estímulos provocan la activación de diversas proteínas Bcl-2 pro-apoptóticas, como Bax, Bak y Bok, que conducen a la pérdida de la permeabilidad de la membrana externa de las mitocondrias, lo que a su vez permite la salida de proteínas que promueven la apoptosis, como citocromo C, Smac/Diablo y Apaf-1 (*Apoptotic protease activating factor 1*). Por lo que dentro de la vía intrínseca las mitocondrias son fundamentales. La liberación al citosol de citocromo C permite que se generen asociaciones dependientes de ATP con Apaf-1 y se forme el apoptosoma. Apaf-1 tiene tres dominios funcionales: un CARD presente en la región amino terminal, un dominio central de unión a nucleótidos y doce o trece repeticiones WD-40 en la región carboxilo terminal. Apaf-1 recluta y activa a las pro-caspasas-9 a través de interacciones de sus dominios CARD, la región de repeticiones WD-40 se extiende para formar la parte exterior del heptámero. Se requiere de ATP para que Apaf-1 active por cambio alostérico y dimerización a la caspasa-9. De esta forma el apoptosoma queda conformado por siete moléculas de Apaf-1, cada una unida a una molécula de citocromo C y el dominio N-terminal de la pro-caspasa-9. Cuando el apoptosoma se activa, la caspasa-9 escinde y activa a la caspasa-3. Mientras que Smac/Diablo se une y antagoniza a las IAP (*inhibitors of apoptosis proteins*) (Franklin 2011; Wesche-Soldato et al. 2007; Yuan and Akey 2013). (Fig. 6)

La vía intrínseca y la vía extrínseca se encuentran vinculadas, la caspasa-8 tiene la capacidad de escindir a Bid, generando a Bid truncado (tBid). tBid migra a la mitocondria donde provoca cambios en la membrana externa y favorece la salida de citocromo C. Además la caspasa-8 participa en la activación de la caspasa-3, considerada la de mayor importancia entre las caspasas ejecutoras, ya que activa específicamente a la CAD (*caspasa-activated DNase*), que degrada el ADN en forma activa y provoca la condensación de la cromatina. También, la caspasa-3 induce la reorganización del citoesqueleto y la formación de cuerpos apoptóticos. Una vez activada esta caspasa, es irreversible el mecanismo y la célula tiene como destino la muerte (Elmore 2007).

## Introducción

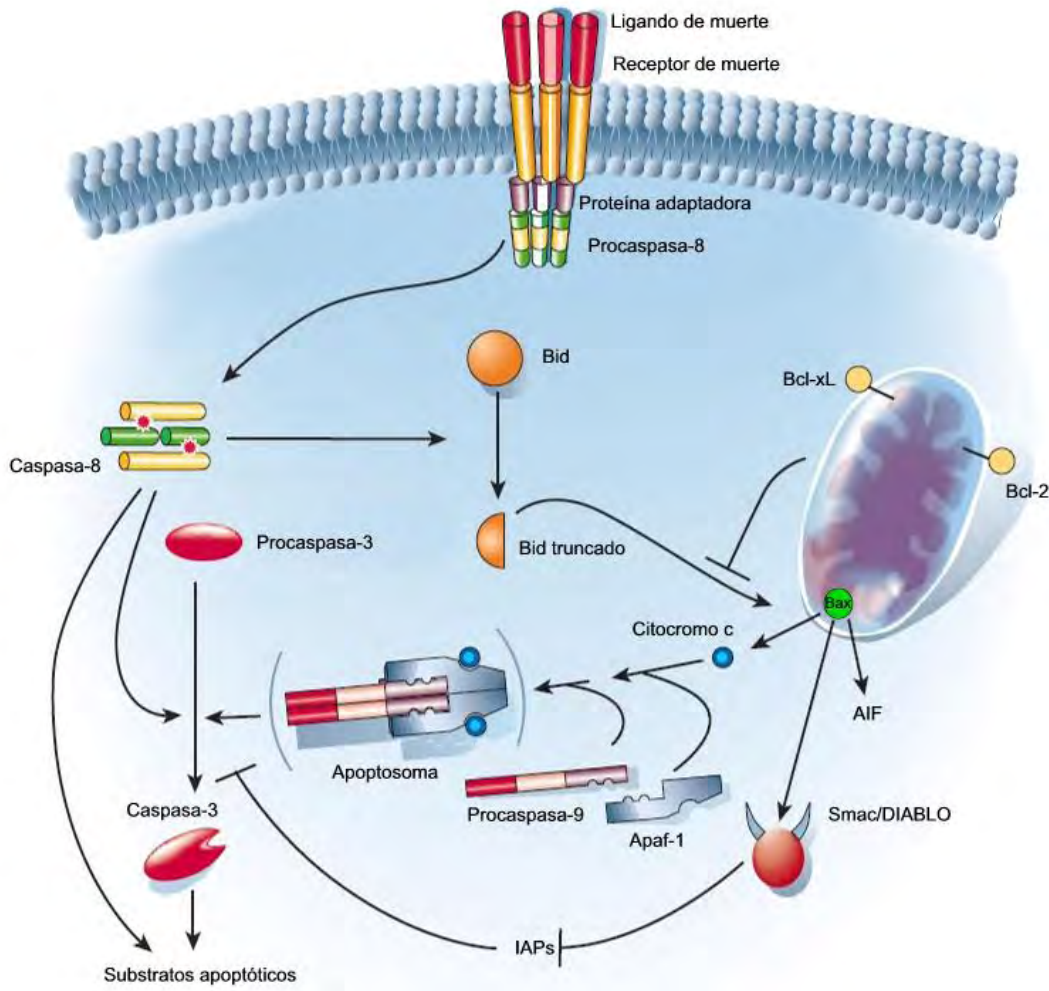


Figura 6. Ruta de activación de la apoptosis, vía extrínseca y vía intrínseca. Modificado de Hengartner, 2000.

### *Externalización de la Fosfatidilserina (PS)*

Una característica bioquímica de la apoptosis es la expresión de marcadores de superficie celular, este evento es considerado como uno de los primeros en llevarse a cabo tras el estímulo apoptótico. Se lleva a cabo la redistribución y exposición en la superficie celular de la PS, que es un fosfolípido que se encuentra en una célula normal en la cara interna de la bicapa lipídica de la membrana celular, es decir, dentro de la célula. Cuando una célula es inducida a morir, una enzima llamada traslocasa, que es dependiente de ATP, mueve de posición a la PS y la expone a la cara externa de la célula; ahí actúa como señal de reconocimiento para los fagocitos (Blankenberg 2008; Chaurio et al. 2009).

## Introducción

Después de iniciada la apoptosis la PS se externaliza, la membrana celular se mantiene íntegra y conserva su capacidad de excluir colorantes catiónicos como el IP (Ioduro de Propidio). El IP es impermeable a membranas plasmáticas intactas, penetra fácilmente la membrana de células muertas o necróticas, se intercala con el ADN formando un complejo fluorescente de color rojo brillante. La proteína anexina-V, muestra alta afinidad de unión a PS, de tal forma que en las etapas tempranas de muerte se pueden identificar células unidas a anexina-V pero que no permiten la entrada del IP. Esta alta afinidad entre el IP y la anexina-V ha permitido diseñar una estrategia para identificar la apoptosis, la cual consiste en marcar a la proteína anexina-V con fluorocromos y de esta manera identificar a las células apoptóticas en células vivas por medio de técnicas *in vitro* (Wlodkovic et al., 2012). (Fig. 7)

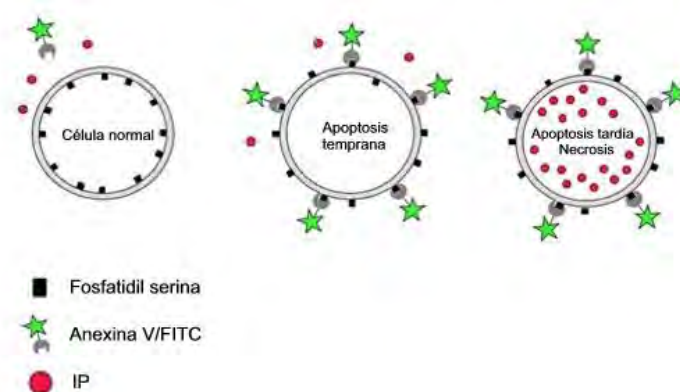


Figura 7. Proceso de externalización de la fosfatidilserina y su marcado con Anexina-V.

## Autofagia

El término autofagia (“*auto*”= uno mismo y “*phagy*”= comer) hace referencia a todo tipo de degradación celular que consista en la eliminación de componentes citoplasmáticos dañados o no deseados por vacuolas autofágicas. (Levine and Kroemer 2008).

La autofagia es el principal mecanismo regulado para degradar proteínas y organelos celulares de larga vida. Favorece la homeostasis requerida en procesos de inanición o estrés debido a la privación de factores de crecimiento. Además participa controlando un gran número de procesos fisiológicos que incluyen la falta de alimento, la diferenciación celular y la muerte. La autofagia ocurre a niveles basales en todas las células para



## Introducción

---

realizar la degradación de macromoléculas y el reciclamiento de organelos. El estado nutricional, la regulación hormonal y algunas señales físicas como la temperatura, la concentración de oxígeno y la densidad de las células, son importantes en el control de activación de la autofagia (Levine and Kroemer 2008; Ouyang et al. 2012).

### *Tipos de autofagia*

Han sido descritas por lo menos tres tipos de autofagia: autofagia mediada por chaperonas, micro-autofagia y macro-autofagia mejor conocida como autofagia, difieren en cuanto a sus funciones fisiológicas y el modo de eliminación del material. En la autofagia mediada por chaperonas, el material que va a ser degradado atraviesa directamente la membrana lisosomal. Esto ocurre debido a que las chaperonas seleccionan proteínas con el motivo KFERQ, que es reconocido por la proteína Hsc70 (*heat shock cognate protein 70*). El receptor lisosomal Lamp-2a reconoce el complejo y permite el paso por el lumen lisosomal, este tipo de autofagia solo se ha reportado en mamíferos. En la microautofagia, hay una invaginación de la membrana lisosomal, el material atrapado es engullido por el lisosoma para su degradación. La macroautofagia, se caracteriza por la formación de una vesícula de doble membrana que encierra porciones de citosol y organelos, se lleva a cabo una fusión con lisosomas y se forman los autolisosomas, donde el material contenido es degradado por hidrolasas lisosomales, los aminoácidos y lípidos obtenidos pueden reutilizarse o eliminarse (Escobar et al. 2013; Levine and Kroemer 2008). (Fig. 8)

## Introducción

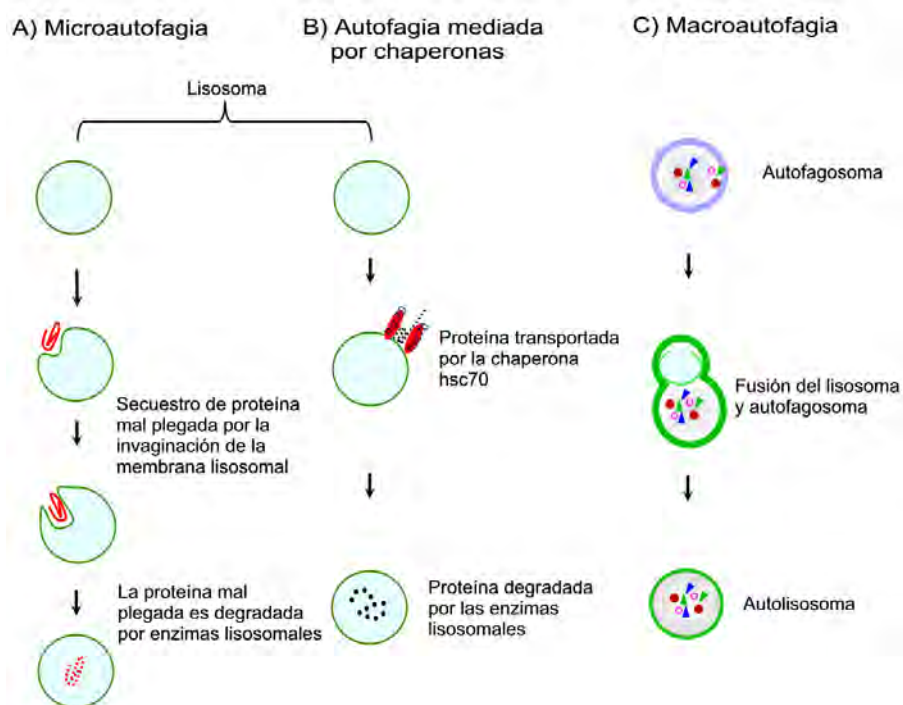


Figura 8. Clasificación de los 3 tipos de autofagia. Modificado de Escobar, 2013.

La evidencia morfológica de la autofagia es la presencia de vesículas autofágicas de doble membrana. La autofagia en los mamíferos se inicia con la formación de la membrana de aislamiento, que presentará una elongación, a esta membrana alargada se le llama fagóforo, el cual continúa elongándose hasta conformar la vesícula. Una vez formadas las vesículas de doble membrana con contenido citoplasmático, se fusionan con los lisosomas para formar los autolisosomas, en donde se llevará a cabo la degradación de los materiales secuestrados. Para evitar una autodegradación, la membrana lisosomal se enriquece con proteínas específicas llamadas Lamp1 y Lamp 2 (*Lysosome-associated membrane protein*) (Escobar et al. 2013; Jenkins et al. 2013).

Las características moleculares de la autofagia fueron descubiertas en levaduras, se identificó la participación de los genes *Atg* (*autophagy related genes*). Esto permitió el estudio de sus homólogos en mamíferos, determinando los mecanismos implicados en la formación y maduración de los autofagosomas. El estímulo para el inicio de la autofagia puede estar dado por diversos factores intracelulares o extracelulares, entre estos estímulos está la escasez de aminoácidos, que favorece la fosforilación y tiene como resultado la inhibición de mTOR (*mammalian Target of Rapamycin*), que controla la

## Introducción

---

transcripción y modificación de *Atg* (Bakula 2013). Cuando mTOR se inhibe Atg13 se desfosforila y provoca una mayor afinidad por Atg1 y Atg17, resultando en un aumento de actividad de la proteína quinasa Atg1. La quinasa Atg1 tiene un papel fundamental en el proceso de autofagia, su actividad sobre el citoplasma controla la formación de las vacuolas y la aparición de los autofagosomas.

### *LC3 (Microtubule-associated protein 1 light chain 3)*

En mamíferos LC3 (*Microtubule-associated protein 1 light chain 3*) es el homólogo de Atg8, que es una proteína importante que participa en el proceso de autofagia. LC3 está presente en autofagosomas y se sintetiza en una forma inactiva llamada LC3-I, que más tarde se convierte en una forma activa de membrana conocida como LC3-II, con afinidad que le permite adherirse a la fosfatidiletanolamina, convirtiéndose en una forma lipídada mediante un sistema de ubiquitinización. Durante la inducción de la autofagia, LC3-I se convierte a LC3-II, algunos autores consideran que la cantidad de LC3-II se correlaciona con el número de autofagosomas presentes (Escobar et al. 2013).

La autofagia es importante para respuestas adaptativas al estrés, pero también para el mantenimiento de la homeostasis, participando en la eliminación de proteínas y mitocondrias disfuncionales. Los defectos en la maquinaria autofagica se asocian a diversas enfermedades, incluyendo el envejecimiento asociado a patologías neurodegenerativas, cáncer, trastornos vasculares, así como a problemas metabólicos (Galluzzi et al. 2014).

### *Monodansilcadaverina (MDC)*

Se han desarrollado varios métodos para el estudio de la autofagia y la maduración de los autofagosomas a autolisosomas. La monodansilcadaverina (MDC) es un marcador utilizado para la identificación y visualización del proceso de autofagia con microscopía de fluorescencia. La MDC es un compuesto lisosomotrófico, inicialmente fue considerado como marcador selectivo de autolisosomas. La MDC es un compuesto con propiedades fluorescentes a una longitud de onda de 365 nm, debido a un grupo dansilo conjugado con una cadaverina. Se acumula en compartimentos membranosos ricos en lípidos. La MDC es usada como marcador selectivo para vacuolas autofágicas mediante la

## Introducción

---

interacción con los lípidos de membrana que están altamente concentrados en los compartimentos autofágicos. Cuando la MDC se incorpora en las células, la acumulación del compuesto se observa en zonas con puntos esféricos distribuidos por todo el citoplasma y en la región perinuclear ([Vázquez and Colombo 2009](#)).

## Justificación

---

### **Justificación**

Nuestro grupo de investigación ha hecho observaciones de algunos procesos de eliminación celular durante la atresia folicular, describiendo las vías y características morfológicas de la muerte celular apoptótica y autofágica Ortiz et al. (2006), Escobar et al. (2008). Mediante las técnicas de microscopía electrónica de transmisión y microscopía óptica se han observado las características ultraestructurales y modificaciones que sufren durante la atresia las células foliculares y los ovocitos. Específicamente, en las células de la granulosa, se han descrito las características morfológicas durante el proceso de muerte, así como la presencia de caspasa-3 activa y ADN fragmentado, ambos indicadores del proceso de apoptosis. De igual forma se evidencio la participación de la autofagia como muerte celular durante la atresia inmunolocalizando a las proteínas LC3, Lamp1 y Beclina1 (Casasa 2013). Los antecedentes mencionados apuntan a que las células de la granulosa podrían ser eliminadas por diversas rutas de muerte. Por lo que el presente trabajo pretende aportar nuevas evidencias a nivel bioquímico con respecto a la eliminación de las células de la granulosa en folículos atrésicos de ratas adultas.

## Hipótesis y Objetivos

---

### Hipótesis

Antecedentes estructurales y ultraestructurales muestran que las células de la granulosa de folículos atrésicos en ovarios de ratas adultas poseen características no sólo de apoptosis, por lo que el análisis bioquímico de la muerte de estas células, brindará nuevas evidencias de los posibles tipos de eliminación que se están llevando a cabo en las poblaciones celulares.

### Objetivos

#### Objetivo general

Evaluar las rutas de muerte autofágica y apoptótica de las células ováricas durante la atresia folicular de ratas adultas, utilizando métodos bioquímicos.

#### Objetivos particulares

- Evaluar las características estructurales y ultraestructurales de las células de la granulosa de folículos atrésicos.
- Evaluar la presencia de autofagia por medio de la incorporación de Monodansilcadaverina (MDC) a los lisosomas.
- Evaluar la externalización de la fosfatidilserina mediante la incorporación de Anexina V acoplada a FITC (Isotiocianato de fluoresceína).
- Analizar la participación de la apoptosis y la autofagia al mismo tiempo en una misma célula con la incorporación de MDC y Anexina V.
- Analizar la expresión de Caspasa- 3 activa (apoptosis) y LC3 (autofagia) en ovarios de rata por medio de la técnica de *Western blot*.

## Material y Métodos

---

### Material y Métodos

Utilicé 15 ratas hembras adultas de la cepa Wistar (*Rattus norvegicus*), siguiendo los lineamientos de bioética marcados en la norma oficial mexicana (NOM 062-ZOO-1999).

Para la obtención de los ovarios, anestesié las ratas en una cámara saturada con gases de éter, una vez anestesiado el espécimen, lo coloqué sobre una bandeja de disección, sujetando sus cuatro extremidades exponiendo el abdomen. Realicé una incisión en la parte baja del abdomen y extraje los ovarios.

Procesé el material para los diferentes ensayos realizados de acuerdo a los protocolos correspondientes.

### Microscopía Óptica

Fijé el material con paraformaldehído al 4% en PBS (*phosphate buffered saline*) pH 7.4 durante 2 horas a temperatura ambiente, realicé 5 lavados de 10 minutos en PBS. Deshidraté con alcoholes graduales: etanol 30%, 40%, 50%, 60%, 70%, 80% y 90% durante 1 hora y dos cambios de alcohol absoluto durante 20 minutos cada uno. Posteriormente sustituí el etanol por las siguientes mezclas: etanol-xilol 1:1 durante 30 minutos, aceite de cedro-xilol 1:1 durante 1 hora. Cambié la mezcla por xilol puro durante 10 minutos. Pre-incluí con parafina-xilol 1:1 durante 1 hora y dos cambios de parafina pura durante 1 hora. Finalmente incluí en parafina pura y dejé polimerizar a temperatura ambiente.

### Tinción con Hematoxilina-Eosina

Corté los bloques con el tejido incluido en parafina, en el microtomo, obteniendo cortes seriados de aproximadamente 10 micras. Coloque los cortes en portaobjetos cubiertos con Poli-L-lisina. Una vez adheridos los cortes se desparafinaron y se les realizó la técnica histológica de Hematoxilina y Eosina regresiva.

Desparafiné los cortes con xilol durante 10 minutos, deshidraté con alcoholes graduales: Etanol absoluto, etanol 90%, 70%, 50%, 30% y agua destilada durante 10 minutos. Teñí los cortes con hematoxilina durante 5 minutos y los lavé con agua de la llave durante 10 minutos. Realicé enjuagues consecutivos de etanol ácido (Etanol 70% + HCl 1%) y agua amoniacal (NH<sub>4</sub>OH 1%). Teñí con eosina durante 5 minutos. Después deshidraté con

## Material y Métodos

---

enjuagues en etanol al 50%, 80%, 90%; etanol absoluto durante 10 minutos, etanol absoluto-xilol 1:1 durante 10 minutos y xilol durante 10 minutos. Para finalizar monté los cortes con resina sintética y un cubreobjetos.

Observé las preparaciones en el microscopio óptico Nikon Eclipse E600 y fotografié con la cámara digital Nikon DXM 1200F.

### **Microscopía electrónica**

Fijé el material biológico con una mezcla de glutaraldehído (2.5%) y paraformaldehído (4%) en PBS pH 7.4 durante 2 horas. Postfijé con tetraóxido de osmio (1%) durante 1 hora, lavé 3 durante 10 minutos en PBS; deshidraté en alcoholes graduales: etanol 30%, 40%, 50%, 60%, 70%, 80%, 90% durante 10 minutos y dos cambios de alcohol absoluto durante 20 minutos. Utilicé óxido de propileno como agente intermediario para la pre-inclusión: realicé tres cambios de óxido de propileno en proporción óxido de propileno-epón 2:1 durante 12 horas, óxido de propileno-epón 1:1 durante 12 horas y óxido de propileno-epón 1:2 durante 12 horas. Finalmente incluí el material biológico en epón puro, lo coloqué en moldes de plástico y polimericé a 60°C durante 2 días.

Obtuve cortes semifinos a los que les realicé una tinción con azul de toluidina para hacer observaciones del tejido y seleccionar la zona de interés. Una vez definida la zona, realicé cortes ultrafinos que fueron colocados en rejillas de cobre cubiertas con Formvar. Los cortes se contrastaron con acetato de uranilo (4%) durante 20 minutos y citrato de plomo (0.3%) durante 10 minutos. Finalmente los observé en el microscopio electrónico de transmisión JEOL 1010 (100 KV), obtuve las imágenes con la cámara digital Hamamatsu. Este procedimiento permitió observar las características ultraestructurales de las células de la granulosa.



## Material y Métodos

---

### Ensayo de Monodansilcadaverina (MDC) y Anexina-V

Para definir a las células de la granulosa que estaban en procesos de muerte, ya sea por apoptosis o autofagia, utilicé las técnicas de identificación de la fosfatidilserina externalizada (apoptosis) y la abundancia de lisosomas (autofagia). Para la apoptosis utilicé la incorporación de anexina-V marcada con FITC (isotiocinato de fluoresceína) a la fosfatidilserina. Para identificar a las células en autofagia, utilicé la incorporación de la monodansilcadaverina (MDC) a los espacios lisosomales. Obtuve fracciones de células somáticas del ovario utilizando disgregación celular. Aislé las células de la granulosa a partir de ovarios de rata adulta, obtuve fracciones celulares enriquecidas con granulosa por medio de la técnica de cultivo celular. Realicé la extracción de gónadas, lavé en PBS pH 7.4 a 37°C. Disgregué los ovarios en trozos pequeños y los lavé por segunda vez en PBS, coloqué el tejido en un matraz que contenía 10 ml de SSB (Solución libre de Calcio<sup>++</sup> y Mg<sup>++</sup>) con tripsina 0.1% (GIBCO) a 37°C durante 10 minutos; evitando el empleo de colagenasa para no disgregar tejido conjuntivo y fibroblastos. Disgregué el tejido por pipeteo y detuve la reacción enzimática con inhibidores de tripsina (0.2% por cada 10 ml de SSB), centrifugué a 21,885 g durante 10 minutos, decanté el sobrenadante y resuspendí las células en 100 ml de PBS a 37°C.

Realicé 3 procedimientos diferentes para el análisis del marcado de las células de la granulosa.

#### 1) MDC

Tomé una alícuota de suspensión celular y agregué 50 µl de Monodansilcadaverina 10mM + 1µl de Ioduro de propidio (10 mM). Incubé durante 15 minutos a 37°C en oscuridad, posteriormente centrifugué brevemente. Lavé el botón celular en PBS y lo disgregué en 20µl de PBS. Coloqué una alícuota celular de la mezcla en un portaobjetos, lo cubrí con un cubreobjetos y lo observé en el microscopio de fluorescencia.

#### 2) Anexina-V

Tomé una alícuota de suspensión celular y agregue 100 µl de buffer de unión + 1 µl de Anexina-V + 1µl de Ioduro de propidio. Incubé durante 15 minutos a 37°C en oscuridad, posteriormente centrifugué brevemente. Lavé el botón celular en PBS y lo disgregué en

## Material y Métodos

---

20µl de PBS. Coloqué una alícuota celular de la mezcla en un portaobjetos, lo cubrí con un cubreobjetos y lo observé en el microscopio de fluorescencia.

### 3) MDC y Anexina-V

Tome una alícuota de suspensión celular y agregué 100 µl de buffer de unión + 1 µl de Anexina-V + 1µl de Ioduro de propidio (10 mM). A la mezcla ya preparada agregué 50 µl de Monodansilcadaverina 10mM, incubé durante 15 minutos a 37°C en oscuridad, posteriormente centrifugué brevemente. Lavé el botón celular en PBS y lo disgregué en 20µl de PBS. Coloqué una alícuota celular de la mezcla en un portaobjetos, lo cubrí con un cubreobjetos y lo observé en el microscopio de fluorescencia.

Las preparaciones fueron observadas en el microscopio Nikon Eclipse E600, donde obtuve imágenes con la cámara digital Nikon DXM1200F. Las imágenes fueron procesadas con el programa ImageJ donde realicé los empalmes y cuantifiqué las células.

Realicé la comparación de la intensidad de la fluorescencia para MDC en las células de la granulosa, considerando la intensidad total de fluorescencia en cada célula entre el área que ocupaba la misma. Para comprobar que las células con marca exacerbada están en procesos de muerte celular y la marca autofágica no se debe a autofagia basal.

La cuantificación de número de células, consistió en contar el número de células con diferentes marcadores de muerte: número de células en proceso de muerte por apoptosis (marca de Anexina-V), muerte por autofagia (Monodansilcadaverina) y células que presentan marca para apoptosis y autofagia. Realicé el conteo a nivel poblacional de las fracciones obtenidas de las células de la granulosa. En total conté 1309 células.

Los resultados que obtuve son la muestra representativa de 5 repeticiones de cada ensayo.

## Material y Métodos

---

### Western Blot

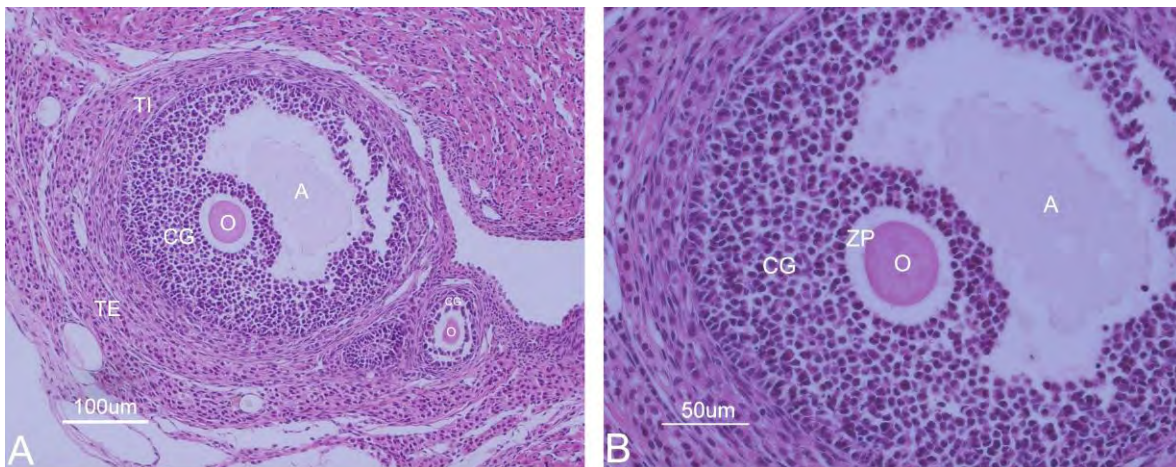
Evalué la expresión de las proteínas involucradas en los procesos de muerte celular en las células de la granulosa con el ensayo de *Western Blot*. Aislé células de la granulosa a partir de ovarios de rata adulta, obtuve fracciones celulares enriquecidas con granulosa por medio de la técnica de cultivo celular. Realicé la extracción de gónadas, lavé en PBS pH 7.4 a 37°C. Disgregué los ovarios en trozos pequeños y lavé por segunda vez en PBS, coloqué el tejido en un matraz que contenía 10 ml de SSB con tripsina 0.1% (GIBCO) a 37°C durante 10 minutos; evitando el empleo de colagenasa para no disgregar tejido conjuntivo y fibroblastos. Disgregué el tejido por pipeteo y detuve la reacción enzimática con inhibidores de tripsina (0.2% por cada 10 ml de SSB), centrifugué a 21,885 g durante 10 minutos, decanté el sobrenadante y resuspendí las células en 100 ml de PBS a 37°C. Coloqué el disgregado celular en cajas de *Petri* de 2.5 mm. Incubé las células durante 24 h a 37 °C en una atmósfera que contenía 5 % de CO<sub>2</sub> durante 24 h con DMEM GlutaMAX (GIBCO) suplementado con albúmina 0.1% (Sigma) y suero fetal bovino 4% (GIBCO). Después de 24 horas retiré el medio de cultivo para descartar todos los detritos celulares así como las células germinales, realicé 3 lavados con PBS. Las células fueron lisadas con un buffer de lisis RIPA (Tris-Cl 50 mM, pH 7,5; NaCl 150 mM, SDS 0.1%, PMSF 1 mM, desoxicolato de sodio 0.5%, y Nonidet P- 40 1%), suplementado con un cóctel completo de inhibidores de proteasa (Roche). Medí las proteínas totales mediante el ensayo de Bradford; cargué 50 mg de proteínas totales en un gel de SDS-poliacrilamida 12%, posteriormente transferí a una membrana de PVDF (difluoruro de polivinilo). La transferencia correcta fue verificada con rojo ponceau. Después de la transferencia bloqueé la membrana 1 h en buffer de bloqueo conformado por leche 5% (Svelty) + 1% BSA + TBS-T y la incubé toda la noche a 4°C con el anticuerpo contra caspasa-3 (Abcam) y contra LC3 (Abcam), diluidos 1:5000 en buffer de bloqueo. Posteriormente, incubé las proteínas con un anticuerpo secundario acoplado a peroxidasa (Jackson) en una dilución 1:10000 en buffer de bloqueo durante 1 h a temperatura ambiente. Detecté el etiquetado específico mediante un kit de quimioluminiscencia (Immobilon Western, Millipore Co). Finalmente expuse las membranas a placas de alta sensibilidad (Amersham Biosciences), las cuales revelé posteriormente.

## Resultados

### Resultados

#### Microscopía óptica

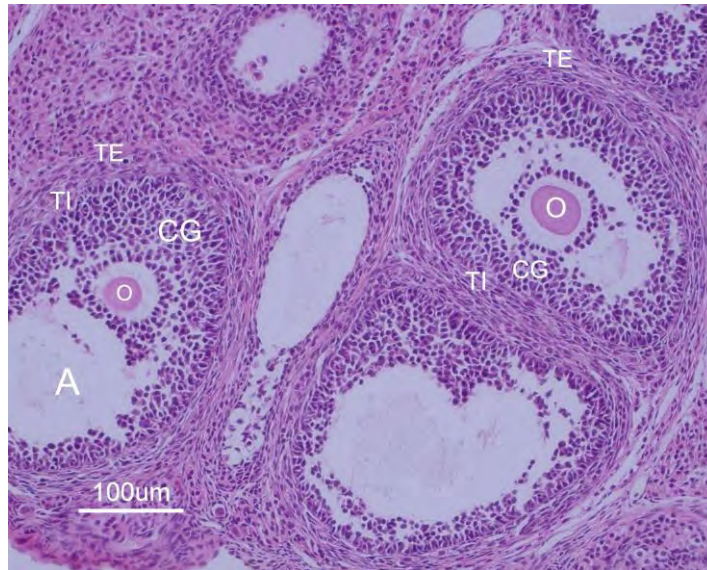
Las preparaciones con hematoxilina-eosina, nos permitieron evaluar las características estructurales de los folículos presentes en los ovarios de ratas adultas en las diferentes fases del ciclo estral. Se lograron observar folículos en diversas fases de desarrollo. En la figura 9 se muestran cortes de ovario de rata adulta, en la imagen 9A se observa un folículo antral, el ovocito en este folículo se encuentra rodeado por varias capas de células granulosas que forman el cumulus oophorus, en forma de media luna se ubica una cavidad con líquido folicular denominada antro, las células somáticas adyacentes a las granulosas forman dos capas distintas, llamadas teca interna y teca externa. En la misma imagen, justo por debajo del folículo antral se observa un folículo secundario, en el cual el ovocito se encuentra en el centro y es rodeado por dos capas de células de la granulosa. En la imagen 9B observamos un aumento del folículo antral, se puede identificar la zona pelúcida rodeando el ovocito. Ambos folículos presentan una morfología alterada, ya que las células de la granulosa se encuentran separadas entre sí y fuertemente compactadas, así mismo los ovocitos han perdido la forma circular.



**Figura 9. Folículo antral de ovario de rata adulta. A) Folículo antral, ovocito (O) rodeado por células de granulosa (CG), a la periferia del folículo se observan las células de la teca interna (TI) y la teca externa (TE) en la parte inferior se ubica un folículo secundario. B) Aumento del folículo antral se pueden distinguir la zona pelúcida (ZP) rodeando al ovocito (O) y las capas de células de la granulosa (CG). Tinción Hematoxilina-Eosina.**

## Resultados

Se observaron folículos con un mayor avance de atresia que los previamente descritos, en los cuales las células de la granulosa perdieron por completo la relación entre ellas. La figura 10 muestra dos folículos en etapa antral, se observan las capas de células de la granulosa rodeando el ovocito, así como la cavidad antral, ambos rodeados de las tecas que se localizan a la periferia del folículo.



**Figura 10.** Folículos atrésicos de rata adulta, en fase antral. Las células de la granulosa (CG) rodean al ovocito (O). Las células de la teca interna (TI) y de la teca externa (TE) rodean y limitan a los folículos con cavidad antral (A). Las células de la granulosa y el ovocito se encuentran alterados. Tinción Hematoxilina-Eosina.

## Resultados

---

### Microscopia Electrónica

En este trabajo utilicé la microscopía electrónica de transmisión para describir algunas características ultraestructurales de los procesos de muerte celular apoptótica y autofágica como: la separación de las células granulosas, presencia de núcleos picnóticos, la alta vesiculización y alteración de organelos.

La figura 11 muestra algunas células con características morfológicas de los procesos de muerte. La imagen 11A muestra una célula granulosa normal, el núcleo presenta una forma regular, tanto el citoplasma como los organelos se encuentran sin alteraciones, una de las características de las células normales que podemos observar es que mantienen la unión con células vecinas. La imagen 11B muestra una célula con la cromatina altamente compactada, la envoltura nuclear se encuentra alterada, ya que se observa fuertemente dilatada. Tanto el núcleo como el citoplasma tienen una forma irregular y compactada, esta célula perdió comunicación y contacto con células vecinas, características que indican una muerte tipo apoptótica.

Por otra parte, en la imagen 11C se observa una célula con alta vesiculización, característica principal de la autofagia, dentro de las vesículas se encuentra el material que será degradado. Cercano al núcleo existe una separación de la envoltura nuclear y el citoplasma se encuentra sin retracción. Además de estas observaciones de muerte tipo apoptótica y autofágica, encontré células con ambas características. La imagen 11D muestra una célula con cromatina altamente condensada, separación total de la envoltura nuclear y una considerable vesiculización del citoplasma, las vesículas presentan una gran cantidad de contenido citoplasmático en degradación.

## Resultados

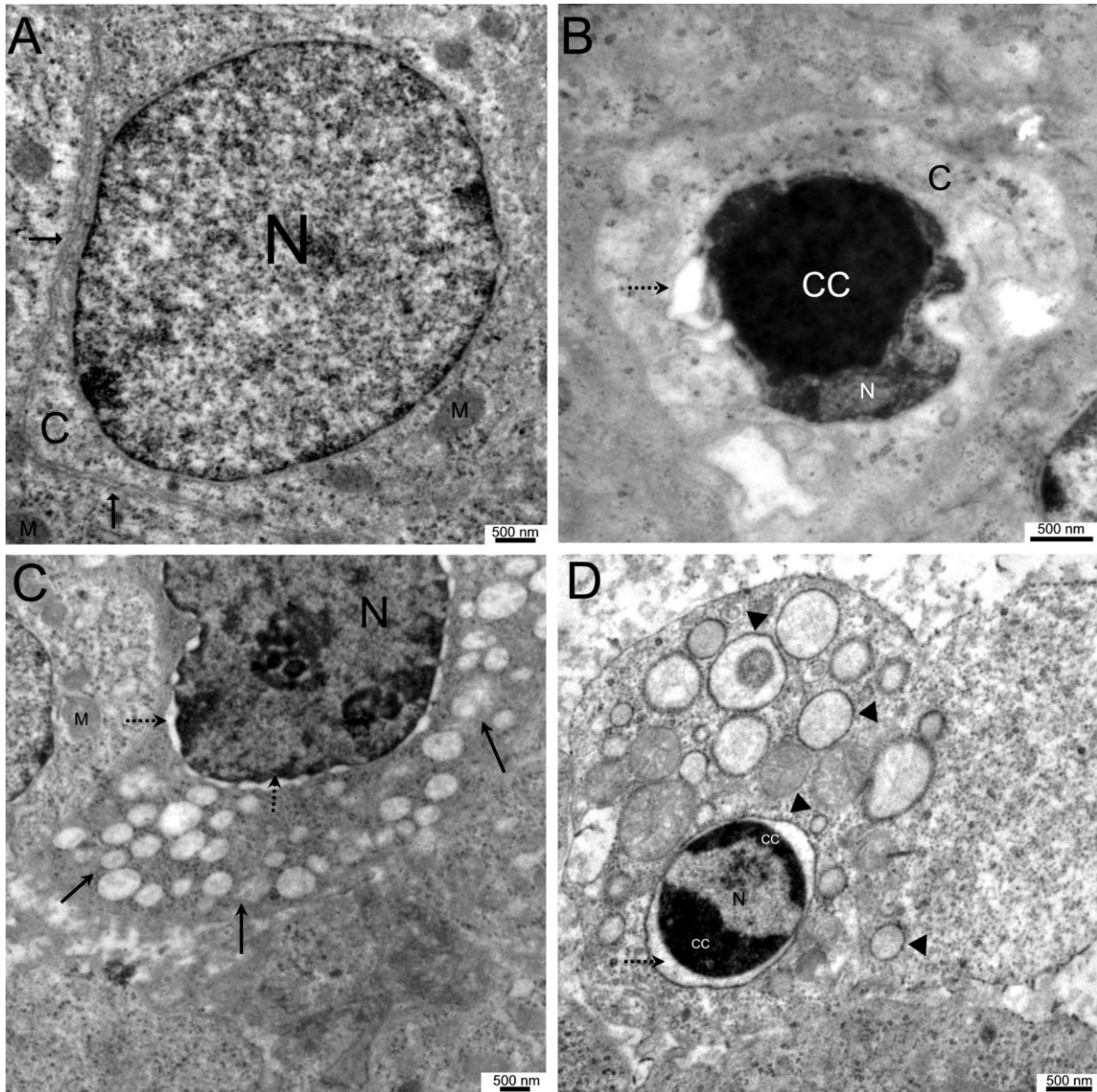


Figura 11. Micrografías electrónicas de células de la granulosa en diferentes procesos de muerte celular. A) Célula normal, el núcleo de la célula (N) presenta un tamaño y forma característica de este tipo celular, dentro del citoplasma (C) se observan mitocondrias (M) sin ninguna alteración, además de que mantiene una estrecha relación con las células vecinas (*flecha*). B) Célula de la granulosa con características apoptóticas, condensación de núcleo y citoplasma (C), separación de la envoltura nuclear (*flecha punteada*). C) Célula de la granulosa con características autofágicas, alta vesiculización en el citoplasma (*Flechas*) y separación de envoltura nuclear (*flecha punteada*). D) Célula con características apoptóticas y autofágicas, condensación de la cromatina (CC), separación de la envoltura nuclear (*flecha punteada*) y alta vesiculización (*cabezas de flecha*).

## Resultados

### Ensayo de Monodansilcadaverina (MDC) y Anexina-V

La evaluación de los procesos de autofagia y apoptosis en poblaciones celulares enriquecidas, la realicé con las técnicas de incorporación de MDC y de Anexina-V, respectivamente.

### Ensayo de MDC

La incorporación de MDC en células de la granulosa nos permitió identificar los lisosomas presentes en los espacios citoplasmáticos, evidenciando diferentes niveles de cantidad de marcado, algunas de las células observadas presentaban una elevada cantidad de marcado, lo que indica una alta actividad lisosomal y por lo tanto una gran cantidad de autofagia. La figura 12 muestra un conjunto de células de la granulosa, se identificaron células con una cantidad incrementada de marca positiva para MDC (autofágicas), estas células muestran acumulaciones del compuesto, se considera que en estas zonas se encuentran los autofagosomas. Se utilizó yoduro de propidio para marcar células con la membrana celular dañada (necróticas). Las células negativas a yoduro de propidio y con marca basal para monodansilcadaverina, fueron consideradas sanas.

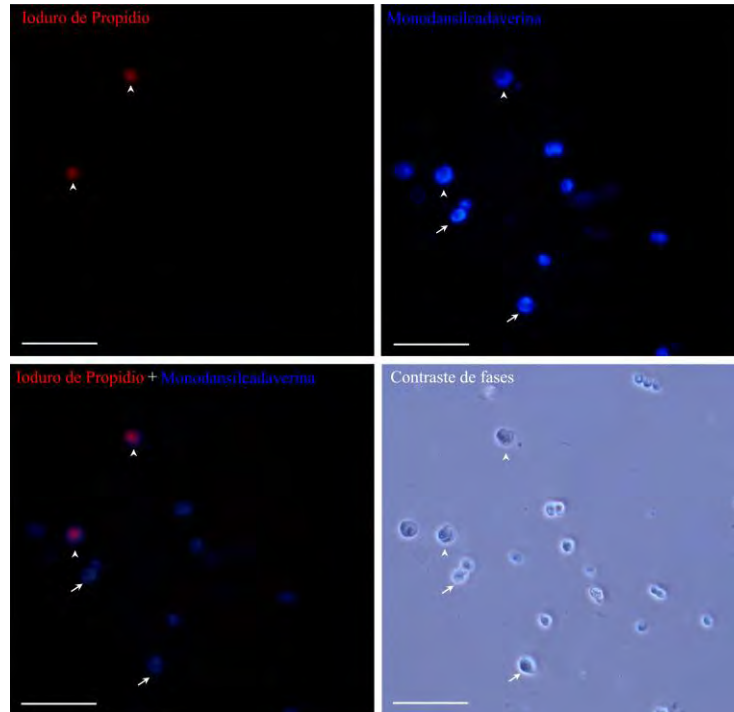


Figura 12. Ensayo de incorporación de Monodansilcadaverina (MDC). Las flechas indican células con elevada marca de MDC (autofágicas) y las cabezas de flecha señalan células positivas a yoduro de propidio (necróticas). Barra 50  $\mu\text{m}$ .



## Resultados

La autofagia es un proceso fisiológico que se presenta en todas las células, para descartar a las células que se encuentran con mayor incorporación del marcador, se realizó una cuantificación de la intensidad de fluorescencia para el marcador de autofagia (MDC). La figura 13 muestra el promedio de intensidad de fluorescencia de las células positivas a MDC. Se observa una diferencia entre las dos poblaciones. Siendo las células con autofagia incrementada las que tienen una intensidad promedio mayor, las células con autofagia basal presentan una intensidad promedio de pixeles/cm<sup>2</sup> cercano a 30. Con estos valores podemos asegurar que las células con autofagia incrementada están en proceso de muerte celular por autofagia.

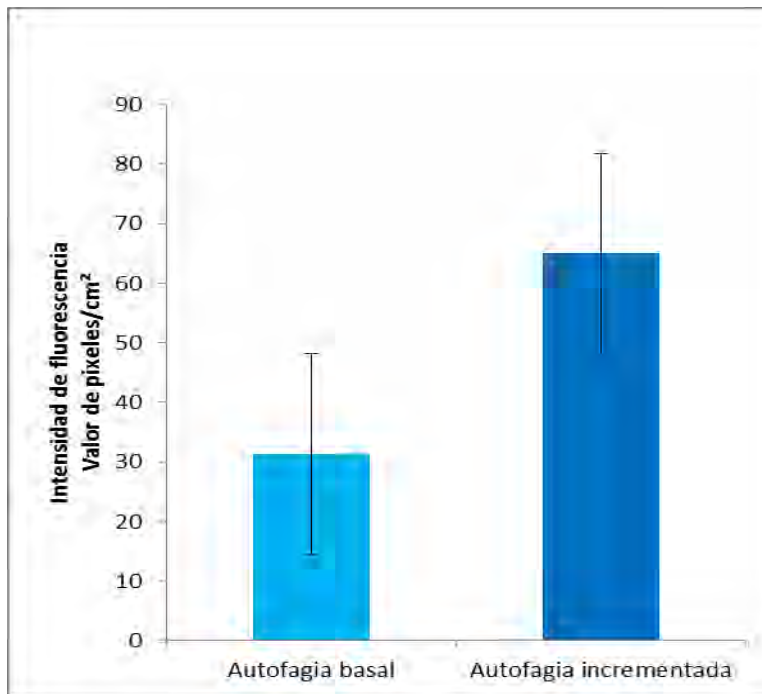


Figura 13. Promedio de la intensidad de fluorescencia de las células positivas a MDC.

## Resultados

Se realizó un conteo de células con marca positiva a MDC, la figura 14 muestra los porcentajes de células con marca, la primer barra corresponde a células consideradas con autofagia basal siendo (~30%). La segunda barra pertenece a células con autofagia incrementada (en proceso de muerte celular por autofagia) con un porcentaje de (~25%). La última barra hace referencia a células positivas a MDC y yoduro de propidio por lo que estas células son consideradas como necróticas, tienen un porcentaje de (~4%).

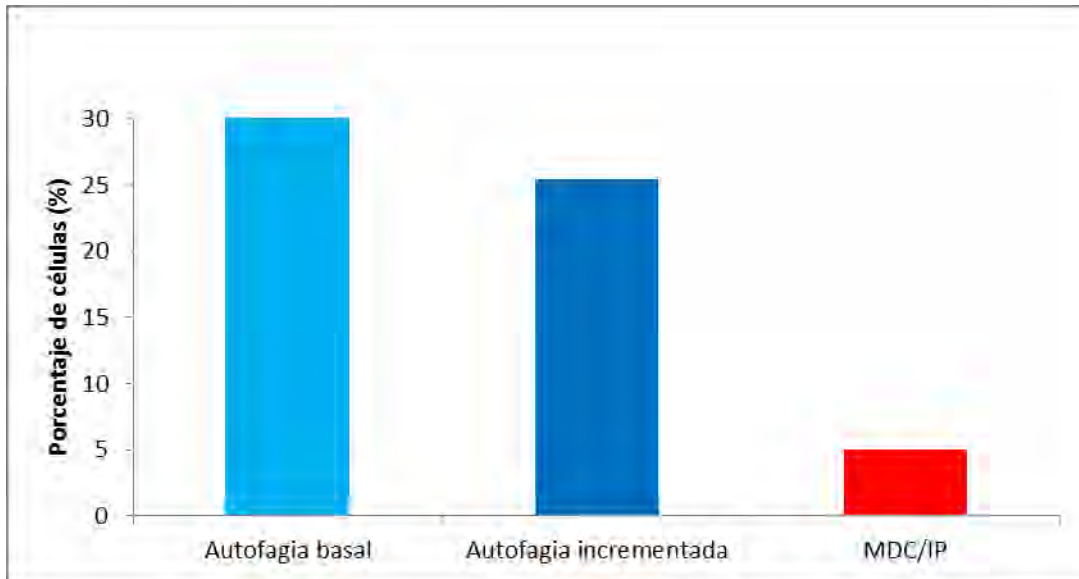


Figura 14. Porcentaje de células con marca positiva a autofagia basal, incrementada y con presencia de yoduro de propidio.

## Resultados

### Ensayo de Anexina-V

La muerte celular apoptótica fue evaluada en las células de la granulosa por medio de la incorporación de anexina-V acoplada a FITC, que se une a la fosfatidilserina situada en el lado externo de la membrana celular, en un proceso temprano de apoptosis. En la figura 15 se muestran las células positivas a anexina-V; también podemos observar en la imagen de contraste de fases la morfología característica de las células de la granulosa. Las células necróticas son positivas a ioduro de propidio y a anexina-V. Las células negativas a ambos marcadores fueron consideradas sanas.

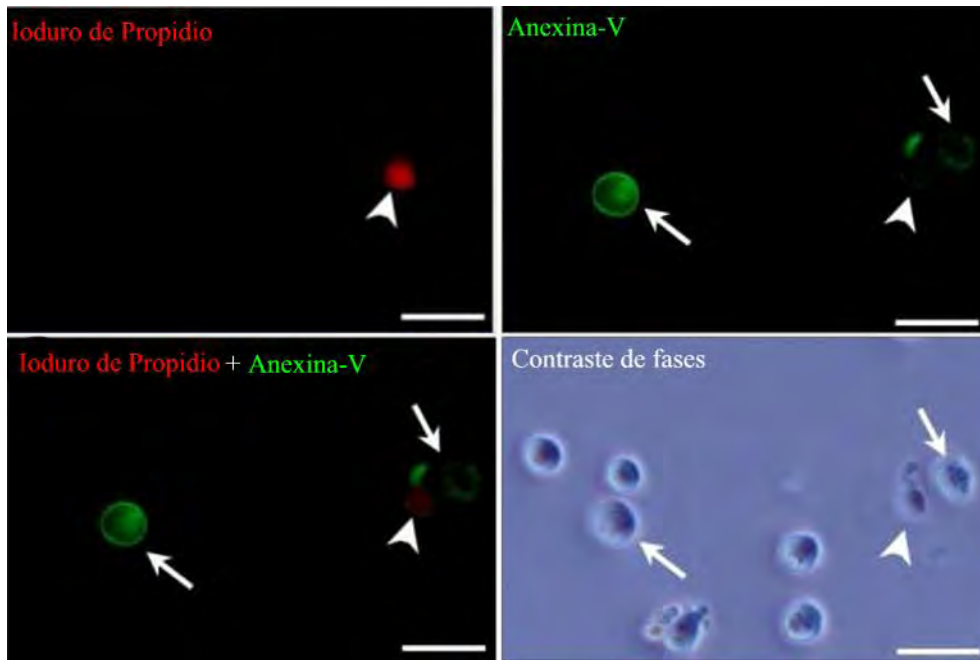


Figura 15. Ensayo de incorporación de Anexina-V. Las flechas indican células positivas a anexina-V (apoptóticas) y las cabezas de flecha señalan células positivas a ioduro de propidio (necróticas). Barra 20  $\mu\text{m}$ .

## Resultados

El conteo de células con marca positiva para apoptosis (Anexina-V) se presenta en la figura 16. La proporción de células marcadas con anexina-V es alta (~22%) en comparación de las células con anexina-V + ioduro de propidio (~1%). La fracción de células positivas a anexina-V corresponde a las células que presentan una apoptosis temprana.

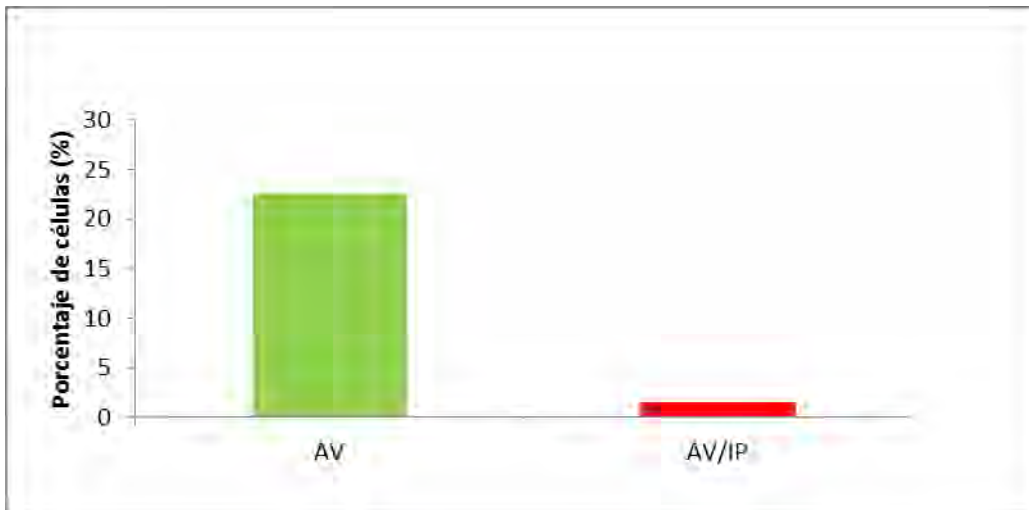


Figura 16. Porcentaje de Células con marca positiva a Anexina-V y Anexina-V + ioduro de propidio.

## Resultados

### Ensayo de MDC + Anexina-V

En este trabajo realizamos la incorporación simultánea de un marcador para muerte tipo autofágica (Monodansilcadaverina) y un marcador para muerte tipo apoptótica (Anexina-V) en una población aislada de células de la granulosa *in vivo*, con este procedimiento queremos observar si una célula granulosa presenta marcadores bioquímicos para ambos tipos de muerte. La figura 17 muestra dos células granulosas, la célula en la parte superior presenta solo marca positiva a MDC (autofágica), en la parte inferior podemos observar que la célula es positiva al marcador autofágico y al apoptótico, se puede ver la acumulación de puntos sobre la periferia de la célula marcado la externalización de la fosfatidilserina, así como la acumulación del marcador autofágico en zonas con presencia de autofagosomas. Esta participación simultánea muestra que la célula se elimina con la participación de los dos procesos de muerte estudiados. Ninguna de las células es positiva al marcador de yoduro de propidio, con esto aseguramos que son células vivas con procesos de muerte y no se trata de células necróticas.

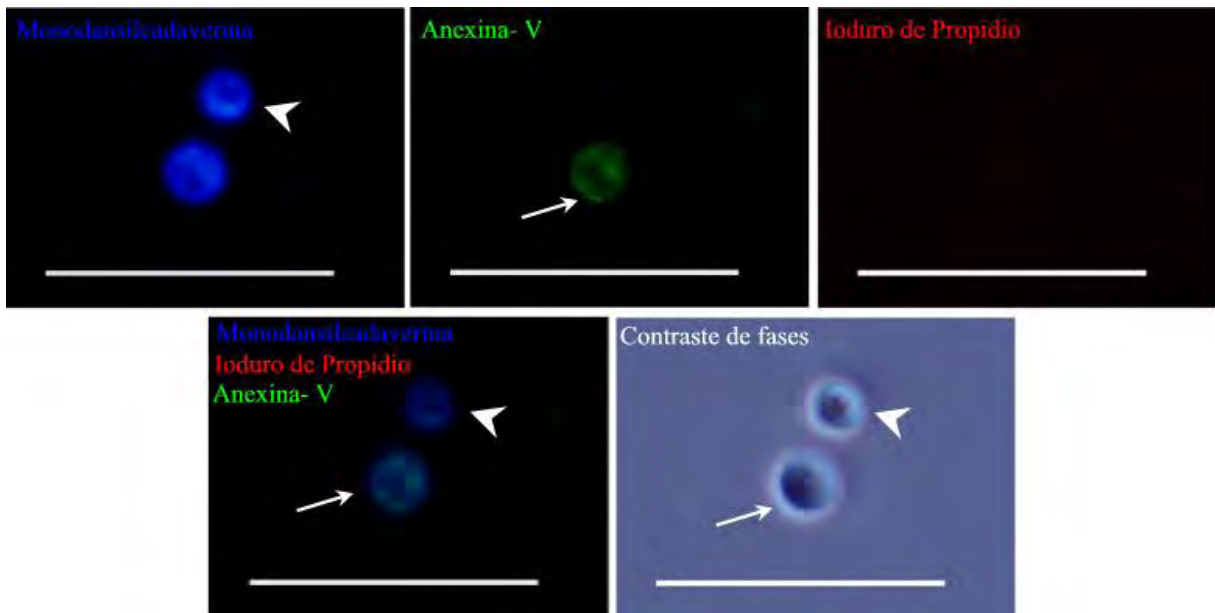
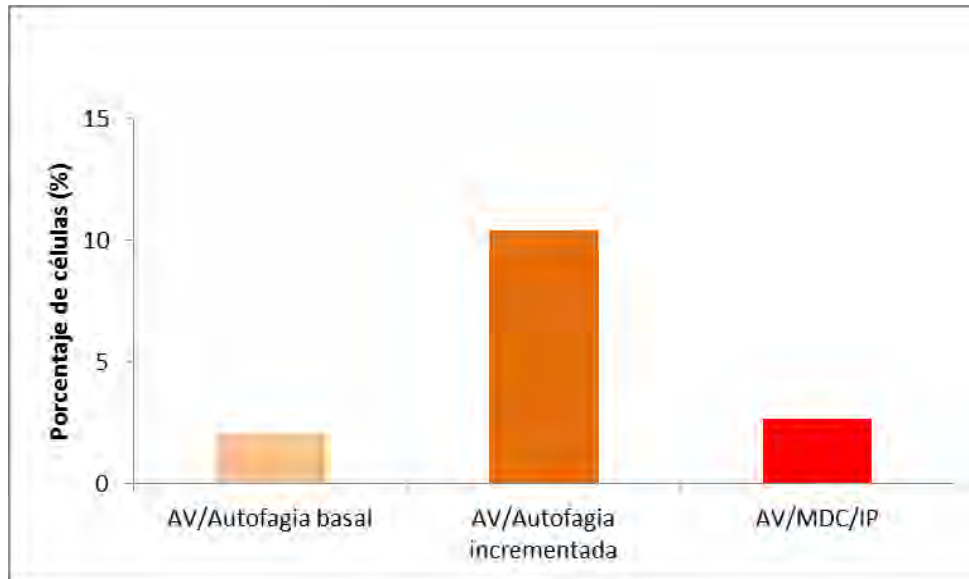


Figura 17. Incorporación simultánea de Monodansilcadaverina (MDC) y Anexina-V. Célula positiva a MDC (cabeza de flecha) y célula positiva a anexina-V y MDC (Flecha), ambas células son negativas a la marca de yoduro de propidio, indicando que ninguna de las dos es necrótica. Barra 50 $\mu$ m.

## Resultados

El porcentaje de células positivas para ambos marcadores de muerte (Anexina-V y MDC), muestra que el comportamiento de los marcadores con anexina-V + autofagia incrementada tiene una proporción mayor de células con marca (~10%), con respecto a las células con marca de anexina-V + autofagia basal (~2%), mientras que la fracción de células con ambos marcadores + yoduro de propidio, células necróticas, es similar a la fracción de células con marca de autofagia basal (~2%).



**Figura 18.** Porcentaje de células con marca a Anexina-V + autofagia basal, Anexina-V + autofagia incrementada y ambos marcadores con la presencia de yoduro de propidio.

## Resultados

### Western Blot

La proteína pro-apoptótica caspasa-3 activa, así como la lipidación de la proteína pro-autofágica LC3, fueron evaluadas en fracciones celulares mediante el análisis por *Western Blot*. Para definir si ambos procesos de muerte se llevan de manera simultánea se identificaron los marcadores de ambos tipos de muerte en la misma membrana. Sin embargo debido a que el peso de caspasa-3 activa, LC3-I y LC3-II son similares (17, 18 y 16 kDa, respectivamente) fue necesario marcar primero una proteína, posteriormente desnudar la membrana y finalmente marcar la segunda proteína. En la figura 19 se observa que existe presencia de la caspasa-3 activa y de LC3-II (forma activa), lo que indica activación de la ruta apoptótica y autofágica, señalando que ambas coexisten en un mismo tipo celular. La proteína Gliceraldehído-3-fosfato deshidrogenasa (GAPDH) fue empleada como marcador de carga.

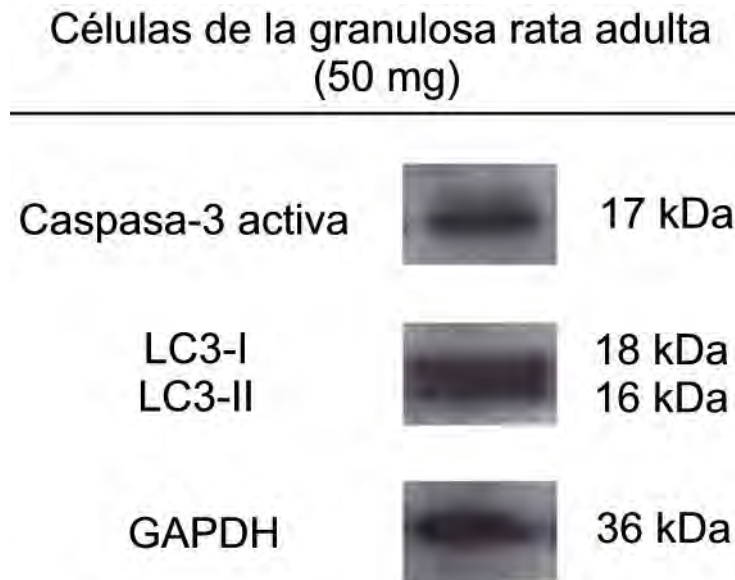


Figura 19. Expresión de las proteínas Caspasa-3 activa, LC3-I y LC-3 II (forma lipídada). GAPDH utilizado como control.

## Discusión

---

### Discusión

Existen reportes de diferentes tipos de muerte celular en el ovario, la apoptosis es la más estudiada durante la atresia folicular. Pruebas recientes muestran la participación de más de un tipo de muerte en células de ovario. En ovocitos de rata pre-púber, Escobar et al. (2008) demostraron que participan tres vías de eliminación celular: apoptosis, autofagia y la combinación de ambas rutas en una misma célula. En células de la granulosa se han observado características morfológicas donde se identifica más de un tipo de muerte. Choi et al. (2010) utilizando un modelo experimental, describieron cambios ultraestructurales típicos de la autofagia, como múltiples vacuolas, además sugieren que la autofagia inducida en células granulosas, está estrechamente relacionada con la inducción de apoptosis. Por otro lado, observaciones en ratas sin tratamientos experimentales, indican que las granulosas poseen características ultraestructurales que corresponden a la apoptosis y que un pequeño grupo de células presenta un proceso de muerte celular tipo autofágica (Casasa, 2013).

En el presente trabajo, evaluamos aspectos no sólo morfológicos y ultraestructurales de la muerte de las células somáticas de los folículos, también incluyó la evaluación de aspectos bioquímicos del evento, algunos de los cuales no pueden ser revisados en tejido fijado, cortado e incluido. Las características encontradas indican la participación simultánea de dos tipos de muerte en células de la granulosa.

Nuestras observaciones realizadas a nivel de microscopia óptica, evidencian algunas alteraciones morfológicas que sufren las células granulosas durante la atresia folicular como la separación y pérdida de unión, generando espacios y formas irregulares en las capas de células, como ya lo reportaron Escobar et al. (2012).

A nivel ultraestructural Devine et al. (2000) reportaron folículos atrésicos de rata con pérdida de células de la granulosa, formación de cuerpos apoptóticos, así como vacuolización del citoplasma, también observaron rasgos de otros tipos de muerte que no implica la apoptosis clásica. Nosotros logramos observar características iniciales del proceso de eliminación como la separación de la membrana externa de la envoltura nuclear, fases muy avanzadas del evento y una intensa condensación de la cromatina.



## Discusión

---

Nuestros resultados muestran células con una alta cantidad de autofagosomas, lo que sugiere un proceso de eliminación tipo autofágico. Inoue et al. (2000) realizaron un análisis estructural en folículos atrésicos de ratón, hallaron células de la granulosa con características apoptóticas, con una cantidad considerable de vacuolas, sin considerarlas como parte de un proceso de eliminación propia de la célula. Sin embargo, estudios en rata adulta han mostrado la participación de apoptosis y autofagia para su eliminación, Escobar et al. (2012) encontraron por microscopía electrónica características apoptóticas y un gran número de autofagosomas con material en degradación. Nuestros resultados indican que algunas células están siendo eliminadas por un proceso que implica la participación de ambos tipos de muerte de forma simultánea, confirmando lo reportado por Casasa (2013), quien muestra evidencias que manifiestan la presencia tanto de apoptosis como de autofagia, las cuales incluyen células con un núcleo fuertemente compactado, sin contracción celular y con una gran cantidad de vesículas autofágicas

El presente trabajo incluyó la técnica de incorporación de anexina-V acoplada a FITC en la fosfatidilserina a nivel de microscopía óptica de fluorescencia. Lobascio et al. (2007) realizaron el marcado de ovocitos de ratón en cultivo con anexina-V, encontraron células positivas para apoptosis y consideraron que esta técnica es muy útil para el análisis de procesos bioquímicos en células de ovario. Nuestros resultados evidencian que las células de la granulosa de rata adulta son positivas a la marca, indicando una apoptosis inicial. Para discriminar células en otro proceso de muerte, utilizamos yoduro de propidio, lo que nos permitió evaluar células apoptóticas y necróticas. Por su parte Valdez et al. (2005) utilizaron la anexina-V con yoduro de propidio para discriminar células de la granulosa durante el proceso de atresia en ovarios de vaca, gracias a esta técnica pudieron encontrar que la cantidad de células no viables era mucho mayor a lo esperado. Existen reportes de ovarios con tratamientos hormonales en los que se identificaron células apoptóticas con anexina, Maillet et al. (2003) trabajaron con ovarios de conejas tratadas con FSH, sus ensayos demostraron que no existe un incremento significativo de apoptosis tras el tratamiento.

Para evaluar la autofagia se realizó el ensayo de incorporación de Monodansilcadaverina en poblaciones de células de la granulosa, las cuales presentaron diferentes niveles de unión al compuesto fluorescente. Cuando la autofagia incrementa su nivel, las células entran en un proceso irreversible de muerte por autofagia. Existen diferentes estrategias

## Discusión

---

para discriminar los niveles basales de autofagia con respecto a células en proceso de muerte por autofagia (Klionsky et al. 2012); nosotros realizamos una cuantificación de la marca fluorescente presentada por cada célula, obtuvimos una cantidad de pixeles que corresponden a células con autofagia basal, cuando la marca en las células era numéricamente superior o exacerbada las clasificamos dentro de las células en proceso de muerte por autofagia. Los datos cuantitativos demuestran que las células con autofagia basal presentaron una fluorescencia menor en relación a las células en proceso de muerte por autofagia. Xu et al. (2015) utilizaron monodansilcadaverina como marcador de autofagia en células HeLa de cáncer de cuello uterino, encontraron marca positiva y aumentada para muerte tipo autofágica mediante MDC; mostraron que este colorante es útil en la identificación de células con autofagia.

Otro aspecto importante evaluado en el trabajo, fue la identificación de ambos procesos al mismo tiempo en la misma célula, por lo que realizamos un ensayo que incluyó la incorporación de la anexina-V y de la monodansilcadaverina en la misma población celular. Nuestros resultados indican que en células de la granulosa *in vivo* existe una proporción mayor de células de la granulosa positivas a monodansilcadaverina (~25%), en comparación con las células positivas a anexina-V (~22%), la presencia de ambos marcadores se presenta en (~10%). Estos resultados indican que existe una población celular que presenta procesos de apoptosis y autofagia en una misma célula.

Estas proporciones, podrían deberse a que la incorporación de anexina-V es específico para la etapa inicial del proceso de apoptosis, por lo que sólo tenemos cuantificadas células que comienzan a morir por vía apoptótica, sin contar a las células con muerte apoptótica tardía o muy avanzada. En tanto que, la marca de monodansilcadaverina detecta autofagia a través de la incorporación del agente a los lisosomas con actividad de degradación, estos resultados nos sugieren que la eliminación de las granulosa puede ser por autofagia o apoptosis, teniendo una combinación de procesos para eliminar de forma sincrónica las células. Velentzas et al. (2007), realizaron experimentos durante la ovogénesis de la mosca *Drosophila virilis*, en los que observaron características morfológicas de apoptosis y autofagia durante la eliminación de células en dicho evento; los autores realizaron ensayos para caspasas en su forma activa, tinción con monodansilcadaverina así como un análisis estructural del órgano, llegaron a la propuesta de que en las últimas etapas de ovogénesis de *D. virilis* la apoptosis y la autofagia operan

## Discusión

---

sinérgicamente para eliminar células degeneradas producto de la ovogénesis. Mientras tanto Hulas-Stasiak et al. (2011) obtuvieron resultados que mostraban la participación de la autofagia y la apoptosis en la atresia folicular del ratón espinoso (*Acomys cahirinus*), su estudio proporciona evidencias de que las células de la granulosa se someten a diferentes formas de muerte celular programada.

En los ensayos realizados en el presente trabajo, se observó una proporción baja de células positivas a yoduro de propidio (MDC/IP ~4%; AV/IP ~1%; MDC/AV/IP ~2%) lo que indica que la necrosis no participa en la eliminación de células granulosas durante la atresia folicular.

La expresión de proteínas evaluadas por *Western blot* en este trabajo, muestra que las células de la granulosa son positivas a caspasa-3 activa y de igual forma está presente la proteína LC3 en su forma lipídada, esto indica que los procesos de autofagia y apoptosis son simultáneos durante la eliminación de las células granulosas. Existe una gran cantidad de evidencias de que la caspasa-3 es el ejecutor principal de la muerte celular programada en el ovario, Feranil et al. (2005), observaron en folículos antrales de búfalo, la participación de la caspasa-3 en la eliminación de células atrésicas, encontraron una mayor frecuencia de marca positiva en folículos atrésicos en etapas avanzadas. Hurst et al. (2006) han realizado estudios con muestras de humano, localizaron la presencia de la procaspasa-3 en todas las etapas de los folículos, pero sólo encontraron marca positiva a la forma activa de caspasa-3 en células granulosas de folículos antrales en atresia. Por otro lado Boone et al. (1998) reportaron la presencia de caspasa-3 en células de la granulosa de rata, considerándola un elemento importante en el proceso de apoptosis de las granulosas.

Con respecto al proceso autofágico, Kabeya et al. (2000) mencionan que la participación de LC3-II puede definir el número de autofagosomas en la célula, es decir, su tasa de aumento y unión a las membranas representa directamente el nivel de autofagia que presenta la célula. Los resultados obtenidos en el presente estudio también mostraron la conversión de LC3 a su forma lipídada (LC3-II) evidenciando la presencia de la autofagia en las células de la granulosa.

Los resultados del presente estudio, indican la presencia de características bioquímicas de los procesos de muerte celular tipo apoptótica y autofágica, en condiciones fisiológicas

## Discusión

---

*in vivo*, considerando que los dos procesos estudiados de muerte pueden participar simultáneamente para la eliminación de las células de la granulosa durante la atresia folicular. Es necesario un estudio que evalúe una posible secuencia de las etapas de los procesos de muerte, para definir las condiciones propicias que la originen. Consideramos que la participación de los dos tipos de muerte identificados en el presente trabajo, se podrían presentar para hacer más eficiente la eliminación celular durante la atresia.

## Conclusiones

---

### Conclusiones

- Durante la atresia folicular de ratas adultas, las células de la granulosa presentan alteraciones estructurales y ultraestructurales que corresponden a más de un proceso de muerte celular.
- Las células de la granulosa son positivas a la incorporación de anexina-V, evidenciando el proceso de apoptosis.
- La presencia de un incremento en la incorporación de monodansilcadaverina en las células de la granulosa evidencia a la autofagia como un mecanismo de eliminación.
- La doble incorporación anexina-V y de monodansilcadaverina en las células de la granulosa, indica la muerte de las mismas por los procesos de apoptosis y autofagia al mismo tiempo.
- La expresión de caspasa-3 activa, así como de la proteína LC3-II (lipidada) exponen que la eliminación celular de las granulosas, se lleva a cabo por medio de los mecanismos de apoptosis y de autofagia.

## Referencias

---

### Referencias

- Akl, Haidar et al. 2014. "A Dual Role for the Anti-Apoptotic Bcl-2 Protein in Cancer: Mitochondria versus Endoplasmic Reticulum." *Biochimica et biophysica acta*.
- Bakula, Tassula Proikas-Cezanne and Daniela. 2013. *Autophagy - A Double-Edged Sword - Cell Survival or Death?* edited by Yannick Bailly. InTech.
- Blankenberg, Francis G. 2008. "In Vivo Detection of Apoptosis." *Journal of nuclear medicine : official publication, Society of Nuclear Medicine* 49 Suppl 2(Suppl\_2):81S – 95S.
- Boone, D. L., and B. K. Tsang. 1998. "Caspase-3 in the Rat Ovary: Localization and Possible Role in Follicular Atresia and Luteal Regression." *Biology of reproduction* 58(6):1533–39.
- Borner, Christoph. 2003. "The Bcl-2 Protein Family: Sensors and Checkpoints for Life-or-Death Decisions." *Molecular Immunology* 39(11):615–47.
- Casasa Vélez, Ana S. 2013. "Muerte Celular Programada de Las Células Granulosas de Folículos Antrales En La Rata Adulta." Universidad Nacional Autónoma de México.
- Chaurio, Ricardo A. et al. 2009. "Phospholipids: Key Players in Apoptosis and Immune Regulation." *Molecules (Basel, Switzerland)* 14(12):4892–4914.
- Choi, Jong Yeob, Min Wha Jo, Eun Young Lee, Byung-Koo Yoon, and Doo Seok Choi. 2010. "The Role of Autophagy in Follicular Development and Atresia in Rat Granulosa Cells." *Fertility and Sterility* 93(8):2532–37.
- Devine, P. J., C. M. Payne, M. K. McCuskey, and P. B. Hoyer. 2000. "Ultrastructural Evaluation of Oocytes during Atresia in Rat Ovarian Follicles." *Biology of reproduction* 63(5):1245–52.
- Edson, Mark A., Nagaraja Ankur K., and Matzuk Martin M. 2009. "The Mammalian Ovary from Genesis to Revelation." *Endocrine Reviews*, 624–712.
- Elmore, Susan. 2007. "Apoptosis: A Review of Programmed Cell Death." *Toxicologic pathology* 35(4):495–516.
- Escobar, M. L., O. M. Echeverría, R. Ortiz, and G. H. Vázquez-Nin. 2008. "Combined Apoptosis and Autophagy, the Process That Eliminates the Oocytes of Atretic Follicles in Immature Rats." *Apoptosis : an international journal on programmed cell death* 13(10):1253–66.
- Escobar, M. L., O. M. Echeverría, and G. H. V. zquez-Nin. 2013. *Autophagy - A Double-Edged Sword - Cell Survival or Death?* edited by Yannick Bailly. InTech.
- Escobar Sánchez, M. L., O. M. Echeverría Martínez, and G. H. Vázquez-Nin. 2012. "Immunohistochemical and Ultrastructural Visualization of Different Routes of Oocyte

## Referencias

---

- Elimination in Adult Rats.” *European journal of histochemistry* : EJV 56(2):e17.
- Eynard, Aldo R., Mirta Valentich, and Roberto Rovasio. 2008. “Sistema Reprodutor Femenino.” Pp. 517–40 in *Histologia y embriologa del ser humano: Bases celulares y moleculares*, edited by Aldo R. Eynard, Mirta Valentich, and Roberto Rovasio. Buenos Aires: Ed. Médica Panamericana.
- Feranil, Jb, N. Isobe, and T. Nakao. 2005. “Apoptosis in the Antral Follicles of Swamp Buffalo and Cattle Ovary: TUNEL and Caspase-3 Histochemistry.” *Reproduction in domestic animals = Zuchthygiene* 40(2):111–16.
- Franklin, James L. 2011. “Redox Regulation of the Intrinsic Pathway in Neuronal Apoptosis.” *Antioxidants & redox signaling* 14(8):1437–48.
- Fulda, S., and K. M. Debatin. 2006. “Extrinsic versus Intrinsic Apoptosis Pathways in Anticancer Chemotherapy.” *Oncogene* 25(34):4798–4811.
- Galluzzi, Lorenzo, Federico Pietrocola, Beth Levine, and Guido Kroemer. 2014. “Metabolic Control of Autophagy.” *Cell* 159(6):1263–76.
- Gartner, L., and J. Hyatt. 2002. “Sistema Reprodutor Femenino.” Pp. 539–63 in *Histología, Texto y Atlas*, edited by L.P Gartner and J.L Hyatt. México: Interamericana-Mc. Graw- Hill.
- Hengartner, M. O. 2000. “The Biochemistry of Apoptosis.” *Nature* 407(6805):770–76.
- Hułas-Stasiak, Monika, and Antoni Gawron. 2011. “Follicular Atresia in the Prepubertal Spiny Mouse (*Acomys Cahirinus*) Ovary.” *Apoptosis : an international journal on programmed cell death* 16(10):967–75.
- Hurst, Peter R., Jocelyn M. Mora, and Mark A. Fenwick. 2006. “Caspase-3, TUNEL and Ultrastructural Studies of Small Follicles in Adult Human Ovarian Biopsies.” *Human reproduction (Oxford, England)* 21(8):1974–80.
- Inoue, S., H. Watanabe, H. Saito, M. Hiroi, and A. Tonosaki. 2000. “Elimination of Atretic Follicles from the Mouse Ovary: A TEM and Immunohistochemical Study in Mice.” *Journal of anatomy* 196 ( Pt 1):103–10.
- Jenkins, Victoria K., Allison K. Timmons, and Kimberly McCall. 2013. “Diversity of Cell Death Pathways: Insight from the Fly Ovary.” *Trends in cell biology* 23(11):567–74.
- Jones, Ervin E. 2012. “The Female Reproductive System.” P. 1350 in *Medical physiology*, edited by Walter F. Boron and Emile L. Boulpaep. Philadelphia, PA: Elsevier Saunders.
- Jones, Richard E., and Kristin H. Lopez. 2006. “The Female Reproductive System.” Pp. 31–45 in *Human Reproductive Biology*, edited by Richard E. Jones and Kristin H. Lopez. United States: Academic Press.

## Referencias

---

- Kabeya, Y. et al. 2000. "LC3, a Mammalian Homologue of Yeast Apg8p, Is Localized in Autophagosome Membranes after Processing." *The EMBO journal* 19(21):5720–28.
- Kerr, J. F., A. H. Wyllie, and A. R. Currie. 1972. "Apoptosis: A Basic Biological Phenomenon with Wide-Ranging Implications in Tissue Kinetics." *British journal of cancer* 26(4):239–57.
- Kezele, Phillip, Eric Nilsson, and Michael K. Skinner. 2002. "Cell-Cell Interactions in Primordial Follicle Assembly and Development." *Frontiers in bioscience : a journal and virtual library* 7:d1990–96.
- Kierszenbaum, Abraham L. 2008. "Desarrollo Del Folículo Y Ciclo Menstrual." P. 688 in *Histología y Biología Celular*, edited by Abraham L. Kierszenbaum. España: Elsevier.
- Klionsky, Daniel J. et al. 2012. "Guidelines for the Use and Interpretation of Assays for Monitoring Autophagy." *Autophagy* 8(4):445–544.
- Kroemer, G. et al. 2009. "Classification of Cell Death: Recommendations of the Nomenclature Committee on Cell Death 2009." *Cell death and differentiation* 16(1):3–11.
- de la Rosa, E. 2000. "Muerte Celular Programada: Un Proceso Clave En Fisiología Y Patología." *Ciencia al día (internacional)* 3:1–13.
- Levine, Beth, and Guido Kroemer. 2008. "Autophagy in the Pathogenesis of Disease." *Cell* 132(1):27–42.
- Lindsay, Jennefer, Mauro Degli Esposti, and Andrew P. Gilmore. 2011. "Bcl-2 Proteins and Mitochondria--Specificity in Membrane Targeting for Death." *Biochimica et biophysica acta* 1813(4):532–39.
- Lobascio, A. M., F. G. Klinger, M. L. Scaldaferrri, D. Farini, and M. De Felici. 2007. "Analysis of Programmed Cell Death in Mouse Fetal Oocytes." *Reproduction (Cambridge, England)* 134(2):241–52.
- Maillet, G., A. Benhaïm, H. Mittre, and C. Féral. 2003. "Involvement of Theca Cells and Steroids in the Regulation of Granulosa Cell Apoptosis in Rabbit Preovulatory Follicles." *Reproduction (Cambridge, England)* 125(5):709–16.
- McGee, E. A., and A. J. Hsueh. 2000. "Initial and Cyclic Recruitment of Ovarian Follicles." *Endocrine reviews* 21(2):200–214.
- Moldoveanu, Tudor, Ariele Viacava Follis, Richard W. Kriwacki, and Douglas R. Green. 2014. "Many Players in BCL-2 Family Affairs." *Trends in biochemical sciences* 39(3):101–11.
- Norris, David O., and James A. Carr. 2013. "The Endocrinology of the Mammalian Ovary." Pp. 317–74 in *Vertebrate Endocrinology*. San Diego, CA: Elsevier.



## Referencias

---

- Oktem, Ozgur, and Kutluk Oktay. 2008. "The Ovary: Anatomy and Function throughout Human Life." *Annals of the New York Academy of Sciences* 1127:1–9.
- Oliver, Lisa, and François M. Vallette. 2005. "The Role of Caspases in Cell Death and Differentiation." *Drug resistance updates : reviews and commentaries in antimicrobial and anticancer chemotherapy* 8(3):163–70.
- Ortiz, R., O. M. Echeverría, R. Salgado, M. L. Escobar, and 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 : an international journal on programmed cell death* 11(1):25–37.
- Ouyang, L. et al. 2012. "Programmed Cell Death Pathways in Cancer: A Review of Apoptosis, Autophagy and Programmed Necrosis." *Cell proliferation* 45(6):487–98.
- Ross, Michael H., and Wojciech Pawlina. 2007. "Aparato Genital Femenino." Pp. 828–48 in *Histología. Texto y Atlas color con Biología Celular y Molecular*, edited by Michael H. Ross and Wojciech Pawlina. Buenos Aires: Ed. Médica Panamericana.
- Skinner, Michael K., Eric E. Nilsson, and Ramji K. Bhandari. 2003. "Cell-Cell Signaling in the Testis and Ovary." Pp. 2663–78 in *Handbook of Cell Signaling*, edited by Dennis Edward A. Washington: Elsevier.
- Tresguerres, Jesús A. F., and Carmen Castillo. 2005. "Fisiología Del Eje Hipotálamo-Hipófiso-Ovárico." P. 1178 in *Fisiología humana*, edited by Jesús A. Tresguerres, C. Ariznavarreta, D. Cardinali, and V. Cachofeiro. México: Mc Graw Hill.
- Valdez, Kelli E., S. Peder Cuneo, and Adele M. Turzillo. 2005. "Regulation of Apoptosis in the Atresia of Dominant Bovine Follicles of the First Follicular Wave Following Ovulation." *Reproduction (Cambridge, England)* 130(1):71–81.
- Vázquez, Cristina Lourdes, and María Isabel Colombo. 2009. "Assays to Assess Autophagy Induction and Fusion of Autophagic Vacuoles with a Degradative Compartment, Using Monodansylcadaverine (MDC) and DQ-BSA." *Methods in enzymology* 452:85–95.
- Vázquez-Nin, Gerardo H., María L. Escobar, Massimo De Felici, Olga M. Echeverría, and Francesca G. Klinger. 2011. *Cell Death in Mammalian Ovary*. New York: Springer.
- Velentzas, Athanassios D., Ioannis P. Nezis, Dimitrios J. Stravopodis, Issidora S. Papassideri, and Lukas H. Margaritis. "Apoptosis and Autophagy Function Cooperatively for the Efficacious Execution of Programmed Nurse Cell Death during *Drosophila* Virilis Oogenesis." *Autophagy* 3(2):130–32.
- Wesche-Soldato, Doreen E., Ryan Z. Swan, Chun-Shiang Chung, and Alfred Ayala. 2007. "The Apoptotic Pathway as a Therapeutic Target in Sepsis." *Current drug targets* 8(4):493–500.

## Referencias

---

- White Bruce A., and Porterfield Susan P. 2013. "Endocrine and Reproductive Physiology." Pp. 215–e3 in *The Female Reproductive System*, edited by White Bruce A. and Porterfield Susan P. Philadelphia, PA: Elsevier.
- Wlodkowic, D., J. Skommer, and Z. Darzynkiewicz. 2012. "Cytometry of Apoptosis. Historical Perspective and New Advances." *Experimental oncology* 34(3):255–62.
- Xu, Li, Jing-Hua Liu, Jing Zhang, Na Zhang, and Zan-Hong Wang. 2015. "Blockade of Autophagy Aggravates Endoplasmic Reticulum Stress and Improves Paclitaxel Cytotoxicity in Human Cervical Cancer Cells." *Cancer research and treatment : official journal of Korean Cancer Association* 47(2):313–21.
- Yuan, Shujun, and Christopher W. Akey. 2013. "Apoptosome Structure, Assembly, and Procaspase Activation." *Structure (London, England : 1993)* 21(4):501–15.