



UNIVERSIDAD NACIONAL AUTÓNOMA
DE MÉXICO

FACULTAD DE CIENCIAS

MECANISMOS DE ELIMINACIÓN DE CÉLULAS
GERMINALES EN OVARIOS DE RATAS JUVENILES
(40 DÍAS DE EDAD)

T E S I S

QUE PARA OBTENER EL TÍTULO
DE
BIÓLOGO

P R E S E N T A

SEBASTIÁN PALACIOS MARTÍNEZ



DIRECTORA DE TESIS:
DRA. MARÍA LUISA ESCOBAR SÁNCHEZ

Ciudad Universitaria, Cd. Mx., 2019



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.

1. Datos del alumno

Apellido paterno Palacios
Apellido materno Martínez
Nombre(s) Sebastián
Teléfono 55 2342 5290
Universidad Nacional Autónoma de México
Facultad de Ciencias Facultad de Ciencias
Carrera Biología
Número de cuenta 312603050

2. Datos del tutor

Grado Dra.
Nombre(s) María Luisa
Apellido Paterno Escobar
Apellido Materno Sánchez

3. Datos del sinodal 1

Grado Dra.
Nombre(s) Lourdes Teresa
Apellido Paterno Agredano
Apellido Materno Moreno

4. Datos del sinodal 2

Grado Dra.
Nombre(s) Olga Margarita
Apellido Paterno Echeverría
Apellido Materno Martínez

5. Datos del sinodal 3

Grado Dr.
Nombre(s) Carlos Leonardo
Apellido Paterno Peraza
Apellido Materno Reyes

6. Datos del sinodal 4

Grado M. en C.
Nombre(s) Luis
Apellido Paterno Sánchez
Apellido Materno Sánchez

7. Datos del trabajo escrito

Título Mecanismos de eliminación de células germinales en ovarios de ratas juveniles (40 días de edad)
Número de páginas 67 pp
Año 2019

Índice

Lista de abreviaturas	1
Índice de Figuras	2
Resumen	4
Abstract	6
Introducción	8
<i>Ovario</i>	8
<i>Desarrollo folicular</i>	9
<i>Atresia folicular</i>	12
<i>Muerte Celular</i>	14
<i>Muerte Celular Programada Tipo I: Apoptosis</i>	15
<i>Muerte Celular Programada Tipo II: Autofagia</i>	21
<i>Interacción entre autofagia y apoptosis</i>	26
Antecedentes	28
Objetivos	29
Hipótesis	29
Material y métodos	30
<i>Obtención y procesamiento del material biológico</i>	30
<i>Tinción general hematoxilina-eosina</i>	30
<i>Inmunohistoquímica</i>	30
Anticuerpos.....	30
Inmunodetecciones.....	31
<i>Observación y fotografía de las muestras</i>	32
<i>Cuantificación de fluorescencia y edición de imágenes</i>	32
Resultados	33
I. <i>Morfología general del ovario (Hematoxilina y eosina)</i>	33
II. <i>Detección de proteínas apoptóticas en ovocitos</i>	36
III. <i>Detección de proteínas autofágicas en ovocitos</i>	40
IV. <i>Inmunodetección simultánea de proteínas apoptóticas y autofágicas en ovocitos</i>	44
V. <i>Análisis de la frecuencia de tipo de muerte por etapa folicular</i>	49

Discusión	51
Conclusiones	56
Referencias	57

Lista de abreviaturas

Abreviatura	Nombre
AMPK	Proteína Cinasa activada por AMP
ATG	Genes Relacionados con Autofagia
BAK	Antagonista de Homólogos BCL-2
BARA	Dominio Repetido β/α de Unión a Membrana
BAX	Proteína X Asociada a BCL-2
BCL-2	Linfoma de Células-B 2
BH	Homología BCL-2
BIR	Repeticiones Baculovíricas Inhibidoras de la Apoptosis
CAD	Desoxirribonucleasa Activada por Caspasas
cAMP	Adenosín Monofosfato cíclico
CC	<i>Coiled-Coil</i>
CG	Gonadotropína Coriónica
cGMP	Guanosín Monofosfato cíclico
DAPI	4',6-diamino-2-fenilindol
DD	Dominio de Muerte
DED	Dominio Efector de Muerte
DISC	Complejo de Señalización Inductor de Muerte
DNA	Ácido Desoxirribonucleico
FADD	Proteína de DD Asociada a FAS
FAK	Cinasa de Adhesión Focal
FAS	Primer receptor de Señal Apoptótica
FSH	Hormona Foliculoestimulante
GDF-9	Factor de Diferenciación del Crecimiento 9
IAP	Proteína Inhibidora de Apoptosis
ICAD	Desoxirribonucleasa Activada por Caspasas Inactiva
IDR	Región Intrínsecamente Desordenada
IGF-I	Factor de Crecimiento similar a Insulina I
IGF-II	Factor de Crecimiento similar a Insulina II
IL-1 β	Interleucina 1 β
IL-6	Interleucina 6
KL	Kit Ligando
LC3	Proteína de Cadena Ligera 3a Asociada a Microtúbulos
LH	Hormona Luteinizante
MCP	Muerte Celular Programada
miRNA	Micro RNA

mTOR	Blanco de Rapamicina de mamíferos
PAK	Cinasa 2 Activada por p21
PBS	Solución Salina amortiguada con Fosfatos
PGC	Célula Germinal Primordial
PI3CKC3	Complejo Clase III Fosfatidilinositol 3-cinasa
PKA	Proteína Cinasa A
RNA	Ácido Ribonucleico
Smac/DIABLO	Segundo Activador de Caspasas Derivado de Mitocondria
TNF	Factor de Necrosis Tumoral
TNF- α	Factor de Necrosis Tumoral- α
TRADD	Proteína de DD Asociada a Receptor TNF tipo 1
TRAIL-R	Receptor de Ligando Inductor de Apoptosis relacionado a TNF
ULK1	Cinasa activadora de autofagia Similar a Unc-51
XIAP	X-linked IAP

Índice de Figuras

N.º de Figura	Título
Figura 1	Etapas del desarrollo folicular.
Figura 2	Folículo atrésico.
Figura 3	Progresión de la apoptosis.
Figura 4	Rutas de activación de la apoptosis.
Figura 5	Tipos de autofagia.
Figura 6	Formación de autofagosomas por distintos complejos moleculares.
Figura 7	Esquema de las inmunolocalizaciones dobles realizadas en cortes seriados para las proteínas apoptóticas y Beclina 1.
Figura 8	Corte histológico de ovario de rata de 40 días teñido con hematoxilina y eosina.
Figura 9	Folículo sanos.
Figura 10	Folículo antral sano.
Figura 11	Folículos atrésicos.
Figura 12	Cuantificación de la intensidad de la fluorescencia asociada a las proteínas BAX, BAK Y BCL-2xl mediante inmunodetección.
Figura 13	Detección de las proteínas apoptóticas BAX, BAK y caspasa-

	3 activa en ovarios de ratas de 40 días de edad.
Figura 14	Detección de la caspasa-3 activa en un folículo en estado avanzado de apoptosis.
Figura 15	BCL-2xl en ovocitos.
Figura 16	Cuantificación de la intensidad de la fluorescencia asociada a las proteínas Beclina 1 y LC3 mediante inmunodetección.
Figura 17	Inmunodetección de Beclina 1 y LC3.
Figura 18	Ovocito con marca positiva a las proteínas autofágicas Beclina 1 y LC3.
Figura 19	Sobreposición de las inmunodetecciones de Beclina 1 y LC3.
Figura 20	Ovocito con marca positiva a las proteínas pro-apoptóticas BAX, BAK y caspasa-3 activa.
Figura 21	Sobreposición de las inmunodetecciones de Beclina 1 y BAX.
Figura 22	Ovocito con marca positiva a Beclina 1 y a las proteínas pro-apoptóticas BAX, BAK y caspasa-3 activa.
Figura 23	Sobreposición de las inmunodetecciones para BAX, BAK y caspasa-3 activa con Beclina 1.
Figura 24	Magnificación de las sobreposiciones de BAX y LC3 con Beclina 1 en el mismo ovocito.
Figura 25	Promedio de fluorescencia de Beclina 1, BAX, BAK y caspasa-3 activa en dos ovocitos representativos.
Figura 26	Porcentaje de ovocitos con muerte apoptótica o combinada según su etapa folicular.

Resumen

La atresia folicular es el mecanismo por el que se eliminan hasta el 99% de las células germinales femeninas durante la vida de un individuo. La apoptosis juega un papel importante durante este proceso, participando en la eliminación de las células de la granulosa y el ovocito. Sin embargo, en diferentes modelos de animales vertebrados se ha identificado un proceso de eliminación celular de ovocitos en el que no sólo participa la apoptosis, sino que también participa la autofagia. En nuestro grupo de trabajo, se ha demostrado la presencia de ambas rutas de muerte en células germinales de ratas pre-púberes de 1 hasta 28 días de edad, así como en ratas adultas.

La madurez gonadal y la primera ovulación en ratas ocurren a los 35 días de edad, lo que implica cambios drásticos en la dinámica del ovario. Debido a lo anterior, el objetivo de este trabajo fue el de identificar la presencia de ambas rutas de eliminación y la posibilidad de que exista interacción entre ellas en ratas juveniles de 40 días de edad, además de la descripción general morfológica del ovario en este periodo transitorio. Para cumplir los objetivos se realizó una tinción general hematoxilina-eosina en cortes de ovario de ratas juveniles incluidos en parafina. Por otro lado, se analizó con inmunodetecciones dobles en cortes seriados la presencia de los marcadores autofágicos Beclina 1 y LC3, así como a los marcadores apoptóticos BAX, BAK y caspasa-3 activa. También se evaluó la presencia de la proteína anti-apoptótica BCL-2xl. Se tomó en cuenta la etapa de desarrollo folicular de los ovocitos estudiados con el fin de comparar la incidencia de los diferentes tipos de muerte celular en esta edad con la de ratas pre-púberes y adultas.

Los resultados obtenidos durante este trabajo demuestran la presencia de apoptosis y autofagia simultánea en ovocitos atrésicos a los 40 días de edad. Se identificó a una población de ovocitos atrésicos en la que la vía autofágica se encuentra incrementada. Este tipo de ovocitos también son positivos a los marcadores pro-apoptóticos estudiados. En cambio, la presencia de BCL-2xl en ovocitos a los 40 días de edad es mínima. Se identificó co-localización entre las señales de BAX y BAK con Beclina 1, lo que sugiere que estas proteínas están siendo eliminadas vía autofagia, por lo que se le podría atribuir un papel de

supervivencia celular en este contexto. Sin embargo, en ovocitos con autofagia incrementada la proteína ejecutora de apoptosis caspasa-3 activa también se incrementa. La incidencia de muerte celular debida a ambos procesos parece ser menor a la que existe en ratas prebúberes, y se asemeja mayormente a ratas adultas que se encuentran en la etapa de estro del ciclo estral.

Abstract

Follicular atresia is the mechanism through which up to 99% of female germ cells are eliminated during the life of an individual. Apoptosis plays a key role during this process, participating in the elimination of granulosa cells and the oocyte. Still, in various animal models, the apoptosis process doesn't act alone, but has been identified to act together with autophagy. Our work group has demonstrated using *in vivo* studies the participation of both cell death mechanisms in atretic germ cells in pre-pubertal rats from 1 to 28 days of age, as well as in adult rats.

In rats, gonadal maturity together with the first ovulation happen at 35 days of age, which implies drastic changes in the ovary dynamics. Therefore, we sought to analyze with detail the ovary morphology in 40 day old juvenile rats, and to investigate the participation of both cell elimination pathways, as well as their possible interaction at this developmental stage.. In order to accomplish these objectives a hematoxylin and eosin staining method was utilized on paraffin-embedded ovary sections. In addition, autophagic proteins Beclin 1 and LC3, together with pro-apoptotic BAX, BAK and active caspase-3 were simultaneously immunodetected on serial ovary sections. The presence of anti-apoptotic BCL-2xl was also evaluated. The follicular development stage at which the atretic oocytes were found was taken into consideration in order to compare the incidence of the different types of cell death mechanisms at this age with those of pre-pubertal and adult rats.

The results obtained during this project confirm the simultaneous presence of apoptosis and autophagy in atretic oocytes in 40 day old rats. An oocyte population in which autophagy is incremented was identified. These autophagy-positive oocytes were also positive to the analyzed pro-apoptotic proteins. In contrast, BCL-2xl was practically absent in the studied oocytes. Discrete points of coincidence in the signals of BAX and BAK with those of Beclin 1 were identified, suggesting that these pro-apoptotic proteins are degraded through autophagy. This would mean autophagy is playing a pro-survival role in this cellular context. Regardless, oocytes with increased autophagy also showed an increase in active caspase-3, an apoptosis-executing protein. The incidence of this kind of combined cellular death

mechanism appears to be smaller to that of pre-pubertal rats, and shows similarities to that of adult rats in the estrus phase of the estral cycle.

Introducción

Ovario

El ovario es el órgano encargado de la producción de gametos en hembras, además de tener un papel importante en la regulación hormonal. Se encuentra recubierto de peritoneo modificado denominado epitelio germinal, debajo del cual se localiza la túnica albugínea, que es una cápsula de tejido conectivo denso irregular y poco vascularizado (**Gartner et al., 2015**). A nivel histológico se pueden distinguir dos regiones diferentes: la medular y la cortical. La primera se encuentra en el centro del órgano y está formada por tejido conectivo laxo altamente vascularizado, además de contener vasos linfáticos y nervios. Adicional al tejido conectivo compuesto por fibroblastos, dentro de la médula se pueden encontrar otros dos tipos de células encargadas de secretar hormonas: las células intersticiales, que secretan estrógeno, y las células hiliares productoras de andrógeno (**Ross et al., 2012**). La corteza ovárica rodea a la médula y está formada por tejido conectivo denominado estroma, el cual contiene células estromales similares a fibroblastos (**Gartner et al., 2015**). Otros componentes de la corteza ovárica son los folículos, los cuales son la unidad funcional del ovario donde ocurre la formación de gametos, el cuerpo lúteo y el cuerpo *albicans*. Cada folículo está compuesto por células somáticas denominadas células de la granulosa y de la teca que rodean a un ovocito, el cual se encuentra detenido en la primera profase de la meiosis y al atravesar todas las etapas de este tipo de división terminará madurando en un óvulo. Las células de la granulosa proveen al ovocito las condiciones necesarias para su manutención y desarrollo, mientras que las de la teca desempeñan un papel de regulación hormonal. El desarrollo folicular inicia desde la etapa de gestación y se mantiene durante la vida postnatal. Aun así, no es sino hasta que ocurren los cambios hormonales (que inducen la madurez sexual), que los ovocitos pueden continuar con la meiosis y el folículo puede desarrollarse más allá de la etapa antral (**Dissen et al., 2003**).

La función secretora hormonal del ovario depende en parte de la formación de una glándula endocrina temporal denominada cuerpo lúteo, que se forma a partir de un folículo maduro después de que se libera el óvulo. Al liberarse el óvulo el folículo colapsa lo que es seguido por una remodelación drástica del tejido la cual incluye la invasión de vasos sanguíneos y de

células de la teca hacia el interior del folículo y la proliferación masiva de células de la granulosa **(Norris & Lopez, 2011)**. Estas últimas también aumentan considerablemente de tamaño, incrementan sus reservas lipídicas y se pigmentan de un color amarillo debido a la producción de luteína **(Murphy, 2004)**. La formación y función del cuerpo lúteo dependen de secreciones parácrinas y endócrinas que incluyen estrógenos, IGF-I (Factor de Crecimiento similar a Insulina I), IGF-II (Factor de Crecimiento similar a Insulina II), CG (Gonadotropina Coriónica) y LH (Hormona Luteinizante). En el cuerpo lúteo los niveles de colesterol aumentan, lo que permite que se produzcan cantidades altas de progesterona. Si el óvulo liberado es fecundado, el cuerpo lúteo se mantiene y juega un papel importante durante la gestación. En caso de no ocurrir fecundación, éste degenera y forma al cuerpo *albicans*, donde las células de la granulosa luteinizadas son remplazadas por tejido estromal **(Ross et al., 2012)**

Desarrollo folicular

Durante su desarrollo los folículos atraviesan una serie de etapas de maduración que tienen como consecuencia cambios en la morfología y dinámica celular. Según la etapa de maduración en la que se encuentren los folículos se les denomina primordiales, primarios, secundarios, antrales y preovulatorios (o de Graff) (Figura 1). El tiempo que tardan los folículos en madurar varía según la especie: en ratas toma alrededor de 60 días para que un folículo primordial llegue a la etapa de preovulatorio, aunque en el primer ciclo estral que tiene como resultado el alcance de la madurez sexual, el tiempo se reduce a unos 35 días **(McGee & Hsueh, 2000)**.

El desarrollo folicular comienza con la formación de folículos primordiales durante la diferenciación gonadal en el embrión. Después de migrar hacia el interior de la gónada bipotencial las células germinales primordiales (PGCs) entran en una etapa proliferativa que resulta en un incremento en la mitosis y, por ende, en la producción de un elevado número de células germinales, a partir de ahora denominadas ovogonias **(Rojas et al., 2015)**.

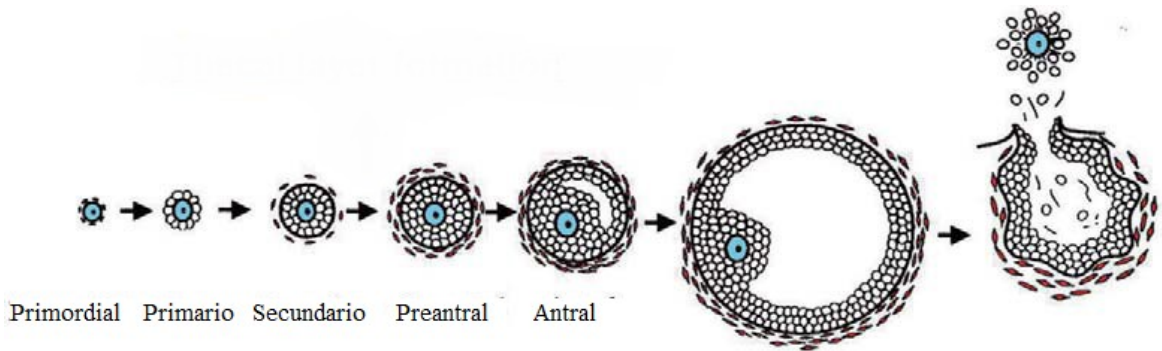


Figura 1. Etapas del desarrollo folicular. En azul se muestra el ovocito, rodeado por células de la granulosa (cúbicas) y de la teca (aplanadas, en rojo). (Modificado de Orisaka et al., 2011).

Un proceso fundamental durante la ovogénesis es la meiosis, proceso por el cual se da la recombinación genética y la reducción cromosomal. Ésta es inducida en hembras por el ácido retinoico y consta de dos fases principales denominadas meiosis I y meiosis II, siendo la primera la de mayor duración. La profase I se subdivide a la vez en leptoteno, cigoteno, paquiteno y diploteno. Durante estas fases se lleva a cabo la sinapsis cromosómica que resulta en la recombinación genética (Keeney, 2009). Las ovogonias comienzan el proceso meiótico (por lo que ahora reciben el nombre de ovocitos) durante el desarrollo embrionario, pero no lo completan, sino que se mantienen en diploteno durante toda la vida del organismo hasta recibir señales gonadotrópicas que induzcan la maduración del folículo. Durante el inicio de la meiosis los ovocitos se encuentran unidos entre sí formando cistos al interior del ovario fetal, estos cistos germinales comienzan a separarse al morir algunos de los ovocitos por apoptosis. Los ovocitos que aún son viables son rodeados por células somáticas (o foliculares) para formar a los folículos primordiales (Rojas et al., 2015).

Durante cada ciclo reproductivo un número de folículos son reclutados para continuar con su desarrollo y formar gametos maduros. El reclutamiento inicial de folículos primordiales provoca la proliferación de las células de la granulosa hasta formar una capa sencilla de células cúbicas que rodean al ovocito. El aumento en el número de células de la granulosa se ve acompañado por el incremento de tamaño del ovocito, el cual seguirá creciendo hasta que el folículo alcance la etapa antral y el ovocito desarrolle una zona pelúcida (McGee & Hsueh, 2000). El folículo se considera como secundario cuando cuenta con dos o más capas

de células de la granulosa. Durante esta etapa también comienza a diferenciarse la teca folicular a partir del tejido conectivo en el ovario **(Revisado en Vázquez-Nin et al., 2011)**. La comunicación entre el ovocito y las células foliculares durante las primeras fases de desarrollo es esencial para que la maduración del folículo continúe. Se sabe que esta comunicación se da a través de moléculas expresadas por el ovocito como el factor de diferenciación del crecimiento-9 (GDF-9) y expresadas por las células foliculares como Kit Ligando (KL) **(McGee & Hsueh, 2000)**.

La división mitótica de las células de la granulosa y el crecimiento del ovocito se mantienen durante la etapa preantral, asimismo, se completa la adquisición de la teca. La formación de la teca es un proceso independiente de gonadotropinas, ya que las células precursoras de la teca no tienen receptores para hormona LH y la teca se desarrolla de manera normal en organismos sin FSH (Hormona Folículoestimulante). Al desarrollarse la teca se crea un asa de regulación ovocito-granulosa-teca en la que la producción de GDF-9 por el ovocito actúa sobre las células de la teca indirectamente al inducir en células de la granulosa la producción de KL e IGF-I. En respuesta a dichas señales las células de la teca comienzan a producir factores androgénicos que estimulan la proliferación de las células de la granulosa **(Orisaka et al., 2011)**. La transición de la etapa preantral a la antral es el momento más susceptible a la inducción de atresia folicular, por lo que la mayoría de los folículos no llegarán a ser antrales **(McGee & Hsueh, 2000)**.

La etapa antral se caracteriza por la formación y crecimiento de una cavidad denominada antro folicular. Este antro contiene líquido secretado por las células de la granulosa y contiene gonadotropinas y lípidos, entre otras cosas **(Revisado en Vázquez-Nin et al., 2011)**. Durante esta etapa la cavidad antral separa a un estrato de células de la granulosa que rodean al ovocito del resto de las granulosa, a este estrato se le denomina *corona radiata*. El desarrollo durante la etapa antral se vuelve completamente dependiente de gonadotropinas al expresar las células de la granulosa receptores a FSH. Por último, antes de la ovulación el ovocito reanuda la meiosis y produce el primer cuerpo polar, convirtiéndose ahora en un ovocito secundario listo para la fertilización **(Kaipia & Hsueh, 1997; Manabe et al., 2003; Rojas et al., 2015)**.

En todas las especies de mamíferos se libera un número limitado de ovocitos en cada ciclo reproductivo. Debido a que el número de folículos que se encuentran en proceso de maduración en cada ciclo es mayor al de ovocitos que se liberarán, los folículos entran en un proceso de selección y dominancia mediado por la secreción de estrógenos. Las células de la granulosa adquieren la capacidad de transformar los andrógenos secretados por la teca en estrógenos durante la etapa antral. Los folículos que han adquirido la capacidad de secreción de estrógenos ganan dominancia debido a que la secreción de estrógenos forma parte de un asa de retroalimentación negativa que disminuye la secreción de FSH, por lo que los folículos que aún son dependientes de esta hormona no pueden continuar con su desarrollo y entran en un proceso de atresia folicular. Se ha comprobado experimentalmente que mientras más avanzado está el folículo en su maduración su dependencia de FSH disminuye, de esta forma el folículo dominante escapa del efecto inhibitorio que genera sobre los demás **(Zelevnik, 2003)**.

Atresia folicular

La atresia folicular es un evento a través del cual se eliminan los folículos que no son seleccionados durante el proceso de maduración. Hasta 99% de los ovocitos (y por ende de los folículos) en un organismo serán eliminados por mecanismos de muerte celular programada durante la vida de un individuo **(Tilly, 2001)**. La atresia folicular puede suceder durante cualquier etapa del desarrollo folicular, pero la mayoría de los folículos que se vuelven atrésicos lo hacen durante la etapa antral y el periodo de formación del antro **(Chun et al., 1996)**.

Morfológicamente, la atresia folicular se caracteriza por núcleos picnóticos y cuerpos apoptóticos en células de la granulosa, presencia de macrófagos en el antro folicular, separación de las células de la granulosa de la membrana basal del folículo y fragmentación de la misma (Figura 2). El ovocito sufre fragmentación y se pierde su conexión con las células de la *corona* **(Manabe et al., 2003)**. En etapas tempranas del desarrollo folicular la atresia es iniciada por la muerte del ovocito seguida de apoptosis en células de la granulosa,

en cambio, en etapas antrales de maduración la atresia comienza con la apoptosis de las células de la granulosa (**Matikainen et al., 2001**). A pesar de que la principal vía de eliminación de células de la granulosa y células de la teca es por apoptosis, los ovocitos pueden sufrir también un proceso de muerte por autofagia o una combinación de ambas vías (**Escobar et al., 2008; Ortiz et al., 2006**).

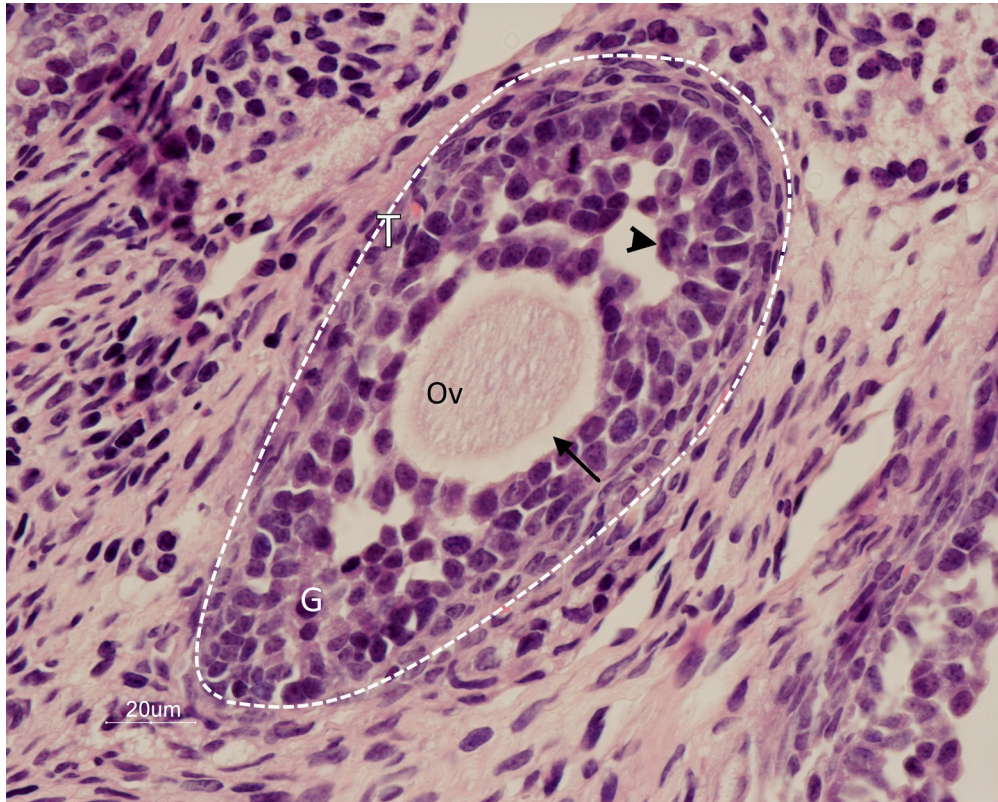


Figura 2. Folículo atrésico: *Se puede ver que el folículo (línea punteada) y el ovocito (Ov) han perdido su forma esférica. Flecha: Se observa la separación entre el ovocito y las células de la granulosa (CG). Cabeza de flecha: células de la granulosa apoptóticas. T: Células de la teca. Tinción: Hematoxilina-eosina.*

Durante su desarrollo los folículos están sujetos a un delicado equilibrio hormonal del cual dependerá si los folículos se tornan atrésicos o no. Existen varios factores de supervivencia folicular que a través de diferentes vías evitan que el folículo entre en atresia. Entre estos factores se encuentran gonadotropinas endócrinas como FSH y LH que generan acumulación de cAMP (Adenosín Monofosfato cíclico) y la subsecuente activación de la vía de señalización de PKA (Proteína Cinasa A). Otros factores de crecimiento producidos

localmente como IGF-I e IL-1 β (Interleucina-1 β) sinergizan con los factores endocrinos al suprimir a la apoptosis. IGF-I actúa al activar la vía de fosforilación de la tirosina, mientras que IL-1 β lo hace al incrementar óxido nítrico y activar la vía dependiente de cGMP (Guanosín Monofosfato cíclico) (**Kaipia & Hsueh, 1997; Chun, 1995**).

Los factores intra-ováricos que inducen atresia folicular incluyen a TNF- α (Factor de Necrosis Tumoral- α), actuando a través del receptor con dominio de muerte TNF-RI, el receptor FAS (Primer receptor de Señal Apoptótica) y FAS ligando y a IL-6, otra citocina producida por las células de la granulosa, la cual induce fragmentación del DNA en las mismas (**Kaipia & Hsueh, 1997**). Recientemente también se ha comenzado a discernir el papel que juegan los miRNAs en la regulación de la atresia folicular, algunos funcionando como factores de supervivencia y otros como factores que inducen atresia (**Worku et al., 2017**). Se ha documentado ampliamente que la atresia folicular puede estar mediada por algunas rutas de muerte celular programada como la apoptosis y la autofagia (**Tilly, 2001**).

Muerte Celular

Para que el crecimiento, desarrollo y mantenimiento de la homeostasis se den de manera adecuada en un organismo, las células no sólo deben proliferar, sino que también se deben eliminar. Ejemplos en los que ocurre la eliminación sistemática de células son la formación de tejidos y extremidades durante el desarrollo embrionario, así como a la eliminación de células dañadas o infectadas para evitar la afectación de otras células. Este tipo de muerte celular sigue vías de señalización específicas y reguladas, por lo que se le denomina Muerte Celular Programada (MCP). La MCP es diferente a la muerte celular no controlada como la necrosis, la que además implica la ruptura de la membrana celular y un consecuente proceso de inflamación (**Alberts et al., 2015; Kerr, 1972**).

La MCP se puede distinguir en diferentes tipos según los mecanismos que actúan y las características observables en la célula que estos generan. El primer tipo de MCP descrito en 1972 por Kerr y colaboradores fue denominado apoptosis, que además fue considerada

como el único tipo de muerte celular programada durante unos veinte años. No fue sino hasta la última década del siglo XX e inicios del XXI que mecanismos alternativos de MCP comenzaron a ser discutidos, como son la muerte celular autofágica (o muerte celular programada tipo II) y la paraptosis (MCP tipo III) (Clarke, 1990; Sperandio et al., 2000). En ovario se ha observado y descrito a la MCP tipo I y tipo II, funcionando ambas de manera individual y en ocasiones en conjunto (Escobar et al., 2013; Escobar et al., 2008).

Muerte Celular Programada Tipo I: Apoptosis

La apoptosis es un proceso de muerte celular programada evolutivamente conservado en organismos multicelulares que sucede de manera regular durante la vida embrionaria y adulta de los organismos, cuya función es eliminar células defectuosas, que han llegado al final de su vida útil o que simplemente ya no son requeridas. Morfológicamente, la ejecución de la apoptosis tiene como resultado la condensación del citoplasma y de la cromatina en la periferia nuclear, el aparente “burbujeo” o *blebbing* de la membrana plasmática y la formación de cuerpos apoptóticos (Kerr, 1972). El rompimiento del DNA en fragmentos de aproximadamente 180-200 pares de bases y sus múltiplos, es también uno de los resultados de la apoptosis. Los contenidos de la célula siempre se mantienen rodeados por la membrana celular por lo que no hay respuesta inflamatoria (Bose, 2015). Finalmente, los cuerpos apoptóticos en los que degenera la célula son fagocitados por células aledañas y por macrófagos (Figura 3) (Kasuya, 1997).

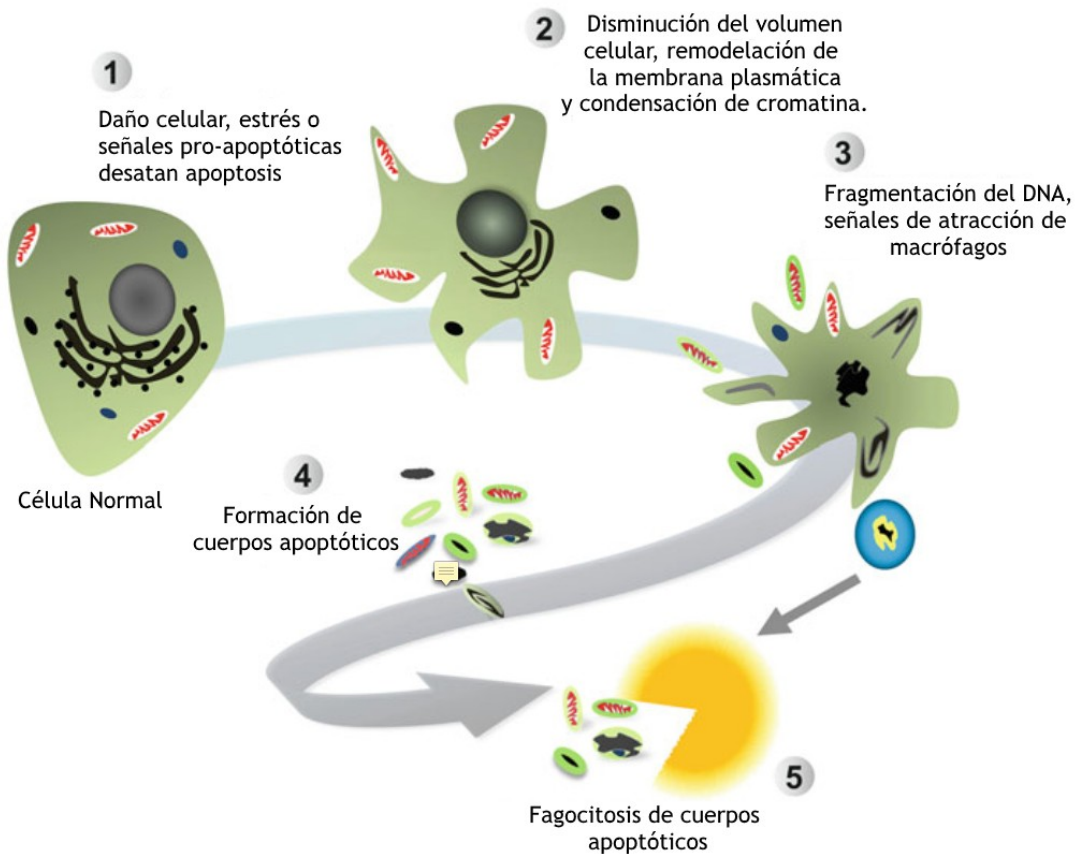


Figura 3. Progresión de la apoptosis (Modificado de Singh & Bose, 2015).

La naturaleza altamente regulada de la apoptosis requiere de una compleja maquinaria de control y ejecución, cuyo componente central son un grupo de enzimas cisteín-proteasas denominadas caspasas. Las caspasas utilizan un residuo catalítico de cisteína para cortar a sus substratos en residuos específicos de ácido aspártico (Singh & Bose, 2015). Las caspasas comparten características con otras proteasas, tal como su producción en forma de moléculas precursoras (zimógenos o procaspasas) sin actividad catalítica. El precursor es activado por un procesamiento proteolítico que puede ser inducido ya sea por una proteasa distinta o por la forma activa del mismo precursor, un fenómeno conocido como autocatálisis. Esto significa que las caspasas pueden crear asas de retroalimentación positiva, en las que grandes cantidades de procaspasas pasan a su forma activa de manera exponencial al iniciar la cascada de señalización (Thornberry & Lazebnik, 1998). La estructura

molecular de las procaspasas es conservada, se caracteriza por un prodominio N-terminal, una subunidad grande y una subunidad pequeña. Para pasar a su forma activa las procaspasas requieren de una serie de cortes que resultan en la remoción del prodominio y de la región *linker* entre la subunidad grande y la pequeña, a continuación la molécula se homodimeriza. Como resultado la caspasa activa es un heterotetrámero de dos unidades, cada una de las cuales consiste de una subunidad grande y una pequeña **(Revisado en Vázquez-Nin 2011; Cade, 2015)**.

Las caspasas se clasifican de acuerdo con su función en tres categorías: caspasas pro-inflamatorias, caspasas iniciadoras de la apoptosis y caspasas ejecutoras de la misma. Las caspasas iniciadoras, tal como su nombre lo indica, son necesarias para el inicio de la apoptosis por diferentes vías y su papel es la activación de las caspasas ejecutoras. Las caspasas 2, 9, 8 y 10 son caspasas iniciadoras. Las caspasas ejecutoras incluyen a caspasa-3, 6 y 7, éstas son las encargadas de hidrolizar diferentes sustratos celulares como laminas y otras proteínas encargadas de mantener la integridad estructural de la célula. El corte de estos sustratos tiene como resultado las características morfológicas de la apoptosis **(Philchenkov, 2003; Revisado en Vázquez-Nin, 2011)**.

Las caspasas son reguladas directamente por un grupo de proteínas que reciben el nombre de proteínas inhibidoras de apoptosis (IAPs), definidas por contener por lo menos un dominio conservado BIR (Repeticiones Baculovíricas Inhibidoras de la Apoptosis). Muchas de las proteínas pertenecientes a este grupo tienen funciones independientes de la apoptosis, pero su capacidad de secuestrar caspasas las vuelve de especial importancia para la regulación de ésta. XIAP (*X-linked, IAP*), por ejemplo, puede unirse e inactivar a las caspasas 3 y 7 en la fase de ejecución y a la caspasa-9 durante el inicio de la vía intrínseca. Las IAPs son a la vez reguladas por un grupo adicional de proteínas pro-apotóticas mitocondriales que incluye a Smac/DIABLO **(Garrison et. al., 2011; Maycotte et. al., 2008)**.

Existen dos vías de activación principales para la apoptosis (Figura 4). La vía extrínseca es iniciada por señales tipo receptor-ligando, en las que participan receptores de muerte pertenecientes a la superfamilia de receptores de factor de necrosis tumoral (TNF).

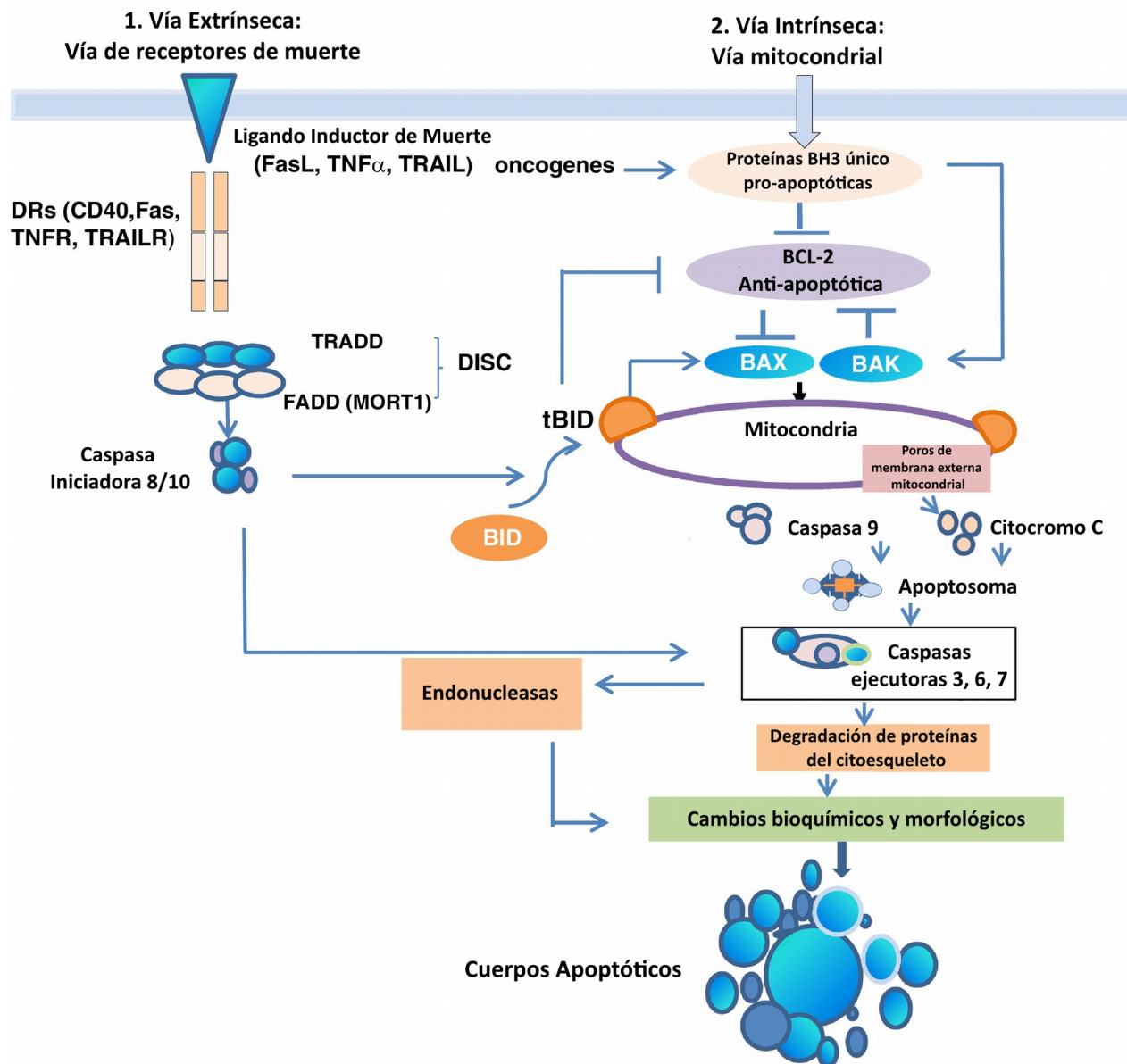


Figura 4. Rutas de activación de la apoptosis (Modificado de Wu et al., 2017).

Los receptores de esta familia contienen un dominio de muerte (DD) intracelular, el cual al darse la unión entre el receptor y el ligando permite que el receptor interactúe con otras proteínas señalizadoras intermediarias que también tienen un DD. Entre estos receptores de muerte se incluyen TNF-R1, FAS y TRAIL-R (Receptor de Ligando Inductor de Apoptosis relacionado a TNF), cuyas respectivas proteínas señalizadoras intermediarias son TRADD (Proteína de DD Asociada a Receptor TNF tipo 1) para el primero y FADD (Proteína de DD

Asociada a FAS) para los últimos dos (**Walczak & Kantari, 2011**). Las proteínas señalizadoras intermediarias funcionan como andamiaje para la formación del complejo DISC (Complejo de Señalización Inductor de Muerte), desde donde el dominio efector de muerte (DED) libre de los intermediarios recluta y activa a las caspasas iniciadoras de la vía extrínseca caspasa-8 y caspasa-10, las cuales a su vez cortan y activan a las caspasas ejecutoras de la apoptosis (**Singh & Bose, 2015**).

La vía intrínseca, también conocida como vía mitocondrial, puede ser inducida por una variedad de señales que incluyen daño al DNA, radiación UV, potencial redox alterado, cambios en el metabolismo y daño intracelular. Esta vía involucra a la familia de proteínas BCL-2, caracterizadas por contener uno o más dominios de homología BCL-2 (BH). Las distintas proteínas de la familia se categorizan en anti-apoptóticas (BCL-2, BCL-2xl, BCL-W), pro-apoptóticas (BAX, BAK, BOK) y pro-apoptóticas de un sólo dominio BH3 (BID, HRK, BIM, PUMA y Noxa entre otras) (**Singh & Bose, 2015; Vázquez-Nin 2011**). El evento principal que induce a la muerte celular en esta vía es la permeabilización de la membrana externa mitocondrial y la liberación de distintas proteínas para formar al apoptosoma, lo que lleva a la activación de las caspasas ejecutoras. En condiciones no apoptóticas la proteína BAX se encuentra en una conformación monomérica en el citosol. Al recibir señales de muerte celular se da un incremento en su nivel citosólico, así como su translocación hacia la mitocondria, seguida de un cambio conformacional que permite a la proteína insertarse en la membrana externa de la mitocondria y oligomerizarse para formar poros. BAK, en cambio, se encuentra ya en la mitocondria por lo que sólo el cambio conformacional y la oligomerización son necesarios para la formación de poros. La oligomerización de estas proteínas requiere a otras proteínas pro-apoptóticas de dominio BH3, específicamente a BID, BIM y PUMA (**Letai, 2011**). Al permeabilizarse la membrana se libera al citocromo-c, componente central del apoptosoma. El citocromo-c entonces se une a los dominios repetidos WD-40 de la proteína citoplasmática Apaf-1, lo que produce cambios conformacionales en ésta e induce la formación del complejo heptamérico que es el apoptosoma. La formación del apoptosoma tiene como consecuencia más cambios en la estructura de Apaf-1 que posibilitan la interacción del complejo con procaspasa-9, su

activación y por lo tanto la inducción de la cascada de caspasas que culminan en muerte celular (**McStay & Green, 2011**).

Los pasos requeridos para la formación del apoptosoma son regulados negativamente por las proteínas anti-apoptóticas BCL-2. Estas proteínas funcionan al secuestrar a los factores pro-apoptóticos e inhibir su función. Todas las proteínas anti-apoptóticas pueden secuestrar a BID, BIM y a PUMA para evitar la activación de BAX y BAK. Adicionalmente, también pueden unirse a las formas oligomerizadas de BAX y BAK para evitar la formación de poros en la membrana mitocondrial (**Letai, 2011**).

Existe aún otro tipo de proteínas pertenecientes al grupo de un sólo dominio BH3 cuya función es inhibir a las proteínas anti-apoptóticas y por lo tanto inducir muerte celular. Dentro de este grupo están, por ejemplo, BAD y Noxa que pueden secuestrar a BCL-2 (**Rubinstein & Kimchi, 2012; Singh & Bose, 2015**).

Ambas vías están vinculadas en diferentes puntos dentro de las cascadas de señalización antes de culminar en la activación de caspasas ejecutoras. La caspasa-8, perteneciente a la vía extrínseca, tiene la capacidad de activar a BID y consecuentemente inducir apoptosis mitocondrial, asimismo, caspasa-3 puede activar a caspasa-8 creando un asa de retroalimentación positiva (**Harrington et al., 2008**). Smac/DIABLO también tiene un papel importante al promover la actividad de caspasas pertenecientes a la vía extrínseca y a la vía intrínseca. Durante la ejecución de la apoptosis las caspasas 3, 6 y 7 cortan diferentes sustratos como Desoxirribonucleasa Activada por Caspasas (CAD), la cual pasa de su forma inactiva (ICAD) a la forma catalíticamente activa que corta al DNA de la célula. Las caspasas ejecutoras también inactivan a proteínas anti-apoptóticas, como BCL-2, y a proteínas reguladoras del citoesqueleto, como gelsolina, Cinasa de Adhesión Focal (FAK) y Cinasa 2 Activada por p21 (PAK) (**Thornberry, 1998**).

Muerte Celular Programada Tipo II: Autofagia

La autofagia es una vía de degradación lisosomal evolutivamente conservada que se encuentra en todos los organismos eucariontes. Su función es la de mantener la homeostasis celular a través de la degradación y reciclaje de componentes celulares como organelos dañados y proteínas mal plegadas (**Meijer & Codogno, 2004**). La autofagia también es un mecanismo necesario para la supervivencia celular en ausencia de nutrientes y otras situaciones de estrés, como infecciones y estrés oxidante. A pesar de esto, la autofagia excesiva o desregulada puede llevar a muerte celular (**Mizushima et al., 2008**). Existen tres formas diferentes por las que se lleva a cabo la autofagia (Figura 5), reguladas por mecanismos independientes: macroautofagia, en la cual se degradan organelos y volúmenes enteros de citoplasma; microautofagia, en la que se degradan volúmenes menores a través de invaginación de la membrana lisosomal, y autofagia mediada por chaperonas, en la cual proteínas específicas son introducidas directamente al lumen lisosomal por medio de proteínas chaperonas para su degradación (Revisado en **Vázquez-Nin et al., 2011**). La macro y microautofagia pueden llevar a cabo degradación de manera selectiva y no selectiva.

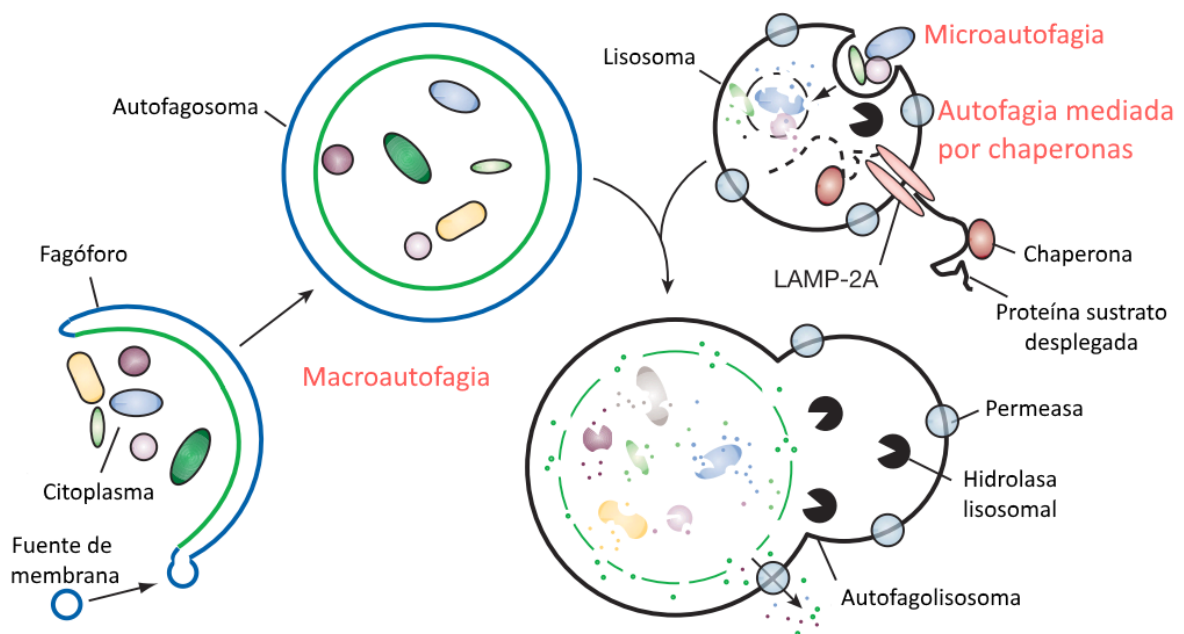


Figura 5. Tipos de autofagia. (Modificado de Mizushima et al., 2008).

El proceso de macroautofagia comienza con la formación de una doble membrana lipídica en forma de copa llamada fagóforo en la región del citoplasma a degradar (Figura 6). El fagóforo se expande hasta envolver la región o a los elementos blanco y forma una vesícula denominada autofagosoma. El autofagosoma después es transportado y se fusiona con un lisosoma, la vesícula de membrana simple resultante recibe el nombre de autofagolisosoma y es en donde los materiales secuestrados son degradados para poder reutilizar sus componentes (Meijer & Codogno, 2004).

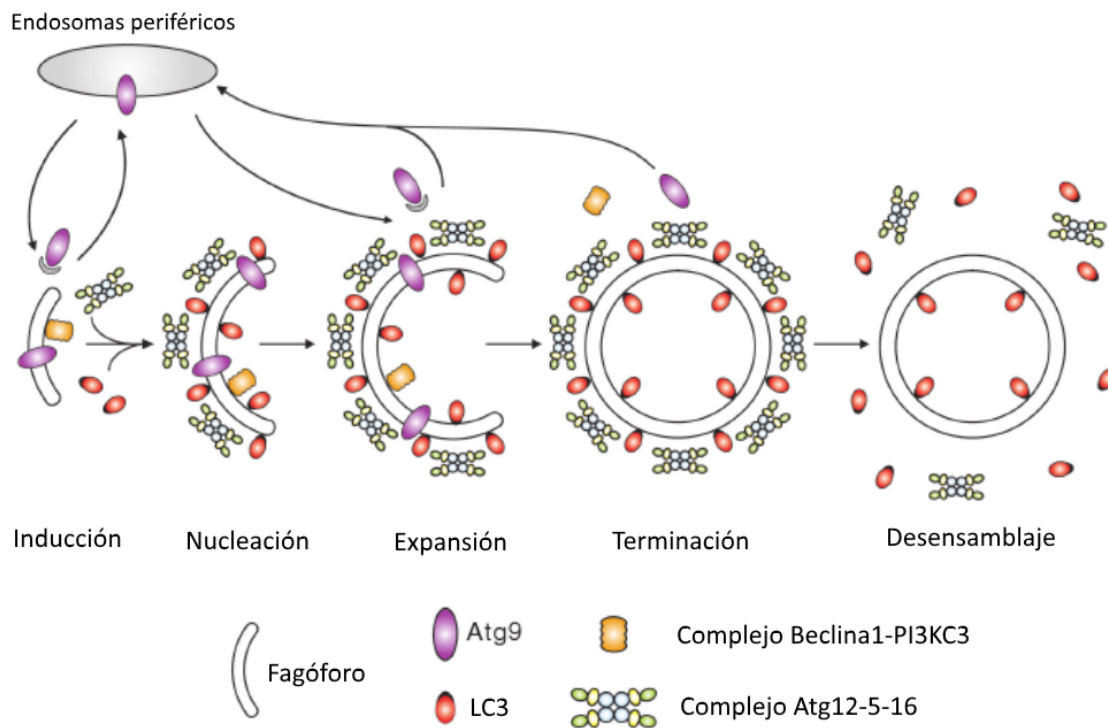


Figura 6. Formación del autofagosoma por distintos complejos moleculares
(Modificado de Yang & Klionsky, 2009).

La autofagia es regulada por un grupo de genes denominado ATG (Genes Relacionados con Autofagia) descritos originalmente en levaduras, pero con homologías en los mamíferos. Dentro de las proteínas Atg existe un conjunto necesario para la formación del autofagosoma al que se le ha denominado como el “núcleo” de la maquinaria molecular de la autofagia. El “núcleo” se subdivide a su vez en cuatro componentes: 1) El complejo ULK1 (Atg1 en levaduras), 2) El complejo clase III fosfatidilinositol 3-cinasa (PI3KC3), relacionado con

Beclina 1, 3) Dos sistemas de conjugación: Atg12-Atg5-Atg16 y LC3/Atg8, similares a ubiquitina y 4) Proteínas transmembranales Atg9 y VMP1 (**Wirth et al., 2013; Yang & Klionsky, 2010**).

En mamíferos, ULK1 (Cinasa activadora de autofagia Similar a Unc-51) es una molécula esencial para la formación del fagóforo en condiciones bajas en nutrientes. ULK1 forma un complejo con FIP200 y con Atg-13. mTOR (Blanco de Rapamicina), por otra parte, es una proteína importante en diversos procesos celulares (como el crecimiento y la traducción de proteínas) debido a su capacidad de censar los niveles energéticos en la célula (especialmente niveles de aminoácidos), factores de crecimiento y señales de nutrientes. mTOR se considera como un regulador maestro de la autofagia debido a que en mamíferos el complejo mTORC1 (que incluye a mTOR y a otras proteínas) interactúa directamente con el complejo ULK1 y lo regula. Cuando los niveles energéticos en la célula se encuentran elevados, mTOR en su forma no fosforilada, se une con el complejo ULK1 (fosforilado) e inhibe su actividad. Al bajar los niveles de energía, mTOR pasa a su forma fosforilada, liberando al complejo ULK1, el cual atraviesa varios eventos de fosforilación directa entre las proteínas que lo forman y termina por localizarse en las membranas pre-autofagosomales. (**Ganley et al., 2009; Mizushima et al., 2009; Wirth et al., 2013**). ULK1 regula la formación del fagóforo controlando el flujo de proteínas Atg, como Atg9 (**Young, Chan, Hu, & Köchl, 2006**), asimismo fosforila y activa al complejo Beclina1-PI3KC3 (**Park et al., 2018**). Otro sensor energético en la célula, AMPK (Proteína Cinasa activada por AMP), también está involucrado en la regulación tanto de mTOR como de ULK1. A diferencia de mTOR que principalmente puede censar los niveles de aminoácidos en la célula, AMPK es sensible a los niveles de ATP. Al disminuir la proporción ATP/AMP, AMPK puede arrestar el ciclo celular e inhibir mTOR induciendo autofagia a través de ULK1 (**Lee et al., 2010**).

El complejo de Beclina 1-PI3KC3, compuesto por Beclina 1, Vps34 y p150 es también crucial para la formación del autofosoma. Existen dos complejos Beclina 1-PI3KC3 que se forman por la interacción directa y mutuamente excluyente de Beclina 1 con Atg14L y con UVRAG, ambos complejos cumplen papeles distintos dentro de la autofagia (**Wirth et**

al., 2013; Yang & Klionsky, 2010). El primero, el complejo Atg14L-Beclina 1-PI3KC3, se ha relacionado con la síntesis temprana de los autofagosomas y la regulación positiva de la autofagia (**Funderburk et al., 2010**). Mientras tanto, el complejo UVRAG-Beclina 1-PI3KC3 regula la expansión y curvatura de la membrana autofagosomal a través de la interacción con Bif-1 (una proteína de la familia BCL-2 de dominio BH3) y del tráfico de Atg9 (**Takahashi et al., 2007, 2011**).

Beclina 1 es una proteína de 450 aminoácidos, ortóloga de la proteína Atg6 en levaduras, que en el citosol se encuentra en forma de homodímero. Además de ser crucial para la formación del autofagosoma Beclina 1 tiene la capacidad de unirse a la proteína anti-apoptótica BCL-2. Beclina 1 sufre de una delección monoalélica en ciertos tipos de cáncer y se expresa de manera reducida en tumores (**Yue et al., 2003**). Beclina 1 está compuesta por una región intrínsecamente desordenada (IDR) que contiene un motivo BH3 en los residuos 105-130, el cuál le permite interactuar con proteínas de la familia BCL-2; un dominio de hélice flexible; un dominio tipo *coiled-coil* (CC) y un dominio repetido β/α de unión a membrana (BARA) (**Ranaghan et al., 2017**).

Los sistemas de conjugación Atg12-Atg5-Atg16 y LC3 son necesarios para la expansión de la membrana autofagosomal. Ambos complejos se localizan en el fagóforo durante la formación del autofagosoma, manteniéndose en él durante la elongación de la membrana lipídica. El complejo Atg-12-5-16 se localiza principalmente al exterior de la membrana y es liberado al citosol cuando se completa el autofagosoma (**Yang & Klionsky, 2009**). Por otra parte, LC3 antes de localizarse en la membrana autofagosomal se encuentra en su forma soluble LC3-I en el citoplasma. Al haber escasez de nutrientes en la célula LC3 pasa a su forma lipidada LC3-II (LC3-fosfatiletanolamina) ligada a la membrana del autofagosoma (**Tanida, et al., 2004**). LC3 también funciona como una proteína adaptadora durante la autofagia selectiva y se ha relacionado con la formación del complejo ULK1 (**Lee & Lee, 2016**).

La proteína transmembranal Atg9 ha sido propuesta como la encargada de trasladar fragmentos de membrana lipídica hacia el autofagosoma en formación para la expansión del

mismo. En condiciones ricas en nutrientes Atg9 se localiza en el complejo *trans*-Golgi y en endosomas tardíos. Durante la inducción de autofagia Atg9 es redistribuida a membranas de endosomas periféricos y co-localiza con LC3 en autofagosomas (Yang & Klionsky, 2010; Young et al., 2006).

A pesar de que la autofagia funciona principalmente como mecanismo de preservación celular existe un proceso de muerte celular programada dependiente de la autofagia. Este tipo de muerte celular parece ser prevalente en células donde la apoptosis se encuentra inhibida. Además de esto se ha propuesto que la muerte celular autofágica podría suceder en situaciones donde se requiere eliminación masiva de células, por ejemplo, durante el desarrollo embrionario (Levine & Yuan, 2005; Tsujimoto & Shimizu, 2005).

Se debe distinguir entre la muerte celular *por* autofagia y la muerte celular *con* características autofágicas. La primera es dependiente de los mecanismos moleculares autofágicos y se evita al inhibir dichos mecanismos. Este tipo de muerte fue caracterizado primero en organismos modelo como *Drosophila melanogaster* y *Caenorhabditis elegans* (Revisado en Anding & Baehrecke, 2015; Berry & Baehrecke, 2007) mientras que la presencia de ésta en diferentes contextos en mamíferos ya había sido descrita, pero se mantuvo controversial hasta tiempos más recientes (Galluzzi et al., 2018; Shimizu et al., 2004). La muerte celular con características autofágicas no depende por completo de proteínas ATG, ya que es resultado de la compleja red de interacción que existe entre la autofagia y otros tipos de MCP, principalmente con la apoptosis.

Interacción entre autofagia y apoptosis

La comunicación que existe entre la vía autofágica y la vía apoptótica es extremadamente compleja y dependiente del contexto celular en el que suceda. Independientemente del contexto la relación parece estar regulada principalmente por la familia de proteínas BCL-2 de dominio BH3 único y la interacción de éstas con la proteína autofágica Beclina 1. Además, cuando la autofagia y la apoptosis suceden en una misma célula la autofagia suele suceder antes de que inicie el proceso apoptótico, ya que los estímulos de estrés que llegan a inducir apoptosis al superar un umbral crítico inducen primero autofagia como una respuesta de supervivencia en la célula (**Mariño et al., 2014**). Beclina 1 contiene un dominio BH3 que le permite interactuar con otras proteínas de la misma familia. La interacción más característica de este tipo se da con la proteína anti-apoptótica BCL-2, que inhibe a Beclina 1 consecuentemente inhibiendo autofagia (**Pattingre et al., 2005**). De manera similar a lo que sucede en la apoptosis, las proteínas de dominio único BH3 (como BAD) interfieren con esta interacción e inducen autofagia (**Salminen et al., 2013**).

Sin embargo, la comunicación entre las dos vías no se limita a interacciones proteína-proteína ni a situaciones que son inhibitorias o inductoras de las dos vías simultáneamente. La inducción de la autofagia en la célula puede tanto inhibir como inducir apoptosis. La inhibición puede ocurrir de diferentes maneras, tales como la eliminación selectiva de mitocondrias dañadas para evitar la liberación del citocromo C, y la degradación de proteínas específicas pro-apoptóticas como caspasas-8 (**Hou et al., 2010; Suzukiet et al., 2011**). Por el contrario, la eliminación autofágica de proteínas anti-apoptóticas como la misma BCL-2 y proteínas IAP funciona como un mecanismo inductor de apoptosis. Aunado a esto, se ha reportado que el sitio de formación de autofagosomas sirve como una plataforma de activación para caspasas (particularmente caspasa-8), entonces de igual manera la inducción de autofagia ayuda a la inducción de apoptosis (**Huang et al., 2013**).

Cuando la inducción de apoptosis regula a la vía autofágica lo hace generalmente de una manera inhibitoria. Esto se debe a que algunos de los sustratos de las caspasas ejecutoras son proteínas fundamentales para la formación de autofagosomas, como Beclina 1 y las

proteínas ATG. Se ha observado que fragmentos de estas proteínas autofágicas degradadas tienen funciones pro-apoptóticas, por lo que su degradación no sólo evita autofagia, sino que también crea un asa de retroalimentación positiva para la apoptosis (**Rubinstein & Kimchi, 2012; Shalini et. al., 2015**).

Antecedentes

La presencia de apoptosis durante la atresia folicular en mamíferos se conoce desde hace tiempo. Estudios como el de Tilly (1991), demostraron que el principal mecanismo de eliminación de ovocitos en este grupo de animales es la apoptosis. El papel de diferentes proteínas apoptóticas durante la atresia folicular ha sido demostrado también, entre ellas BAX y BCL-2 (De Felici et al., 1999) así como caspasa-3 (Matikainen et al., 2001). Sin embargo, la mayoría de estos estudios en los que la apoptosis se define como el proceso definitivo en la eliminación de ovocitos atrésicos se realizaron en condiciones *in vitro*. En estudios *in vivo* en peces se demostró la implicación de la ruta autofágica durante la atresia folicular (Morais et al., 2016; Santos et al., 2008). En la actualidad, se han diseñado modelos experimentales que han permitido proponer la existencia de una posible interacción entre la vía autofágica y la apoptótica (Hou et al., 2010; Pattingre et al., 2005).

En nuestro grupo de trabajo, se ha demostrado la presencia de ambas rutas de muerte en células germinales de ratas pre-púberes (hasta 28 días de edad) (Escobar et al., 2008; Ortiz et al., 2006) y en ratas adultas (hasta 90 días de edad) (Escobar et al., 2012). La muerte autofágica parece ser más prevalente en la etapa pre-púber, antes de que ocurra la primera ovulación, a diferencia de la etapa adulta, en donde los marcadores predominantes en los ovocitos son los apoptóticos, lo que establece un cambio en las vías de eliminación dependiente de la edad del individuo. Lo anterior, permite proponer que, en la etapa intermedia, es decir en organismos juveniles en los que apenas ha ocurrido un periodo de ovulación, el proceso de eliminación de las células germinales puede ser diferente a las etapas ya conocidas.

Objetivos

Objetivo General

Estudiar el tipo de muerte celular presente durante la eliminación de ovocitos atrésicos en ovarios de ratas juveniles de 40 días de edad.

Objetivos Particulares

- Caracterizar la morfología general de ovarios de rata de 40 días de edad.
- Estudiar la presencia del proceso apoptótico en ovocitos de rata de 40 días de edad.
- Identificar la posible participación de la vía de eliminación autofágica en ovocitos de la misma edad.
- Analizar la presencia simultánea de las dos vías, detectando a la proteína autofágica Beclina 1 y a las proteínas apoptóticas caspasa-3 activa, BAX y BAK.

Hipótesis

La muerte de ovocitos de organismos pre-púberes y adultos es conducida por apoptosis y autofagia, siendo la autofagia predominante en la etapa pre-púber y la apoptosis en la etapa adulta. Por lo que se espera que en organismos juveniles de 40 días de edad pueda llevarse una eliminación de las células germinales que implique ambas rutas, de manera simultánea o por separado, y se presente una tendencia diferente a las etapas pre-púber y adulta.

Material y métodos

1. Obtención y procesamiento del material biológico

Se utilizaron ambos ovarios de 18 ratas Wistar de 40 días de edad. Se siguieron los lineamientos de ética de la Norma Oficial Mexicana (NOM 062-ZOO-1999).

El material fue extraído y fijado en paraformaldehído al 4% en PBS durante 24 horas, con un posterior lavado en agua por 24 horas. El material fijado se deshidrató en una serie de alcoholes en concentraciones graduales, desde etanol al 30% en agua hasta etanol 100%, con un posterior aclarado en xilol (10 minutos), finalmente se incluyó en parafina.

A partir del material incluido se obtuvieron varios conjuntos de cortes seriados en un microtomo Leica modelo RM3125 con un espesor de 5 μ m. Los cortes se colocaron en portaobjetos recubiertos de poli-L-lisina de la marca Sigma.

2. Tinción general hematoxilina-eosina

El material se desparafinó y rehidrató para ser teñido. Una vez rehidratado, el material se trató con hematoxilina de Harris durante diez minutos, se hizo el viraje del colorante con etanol ácido (etanol 70% en HCL 1%) y agua amoniacal (NH_3OH 1%); posteriormente se deshidrató hasta etanol 50%, después de lo cual se teñó con eosina alcohólica durante tres minutos y se continuó con la deshidratación hasta xilol. Por último, las preparaciones teñidas se montaron utilizando resina sintética.

3. Inmunohistoquímica

3.1 Anticuerpos

Primarios: Anti-Beclina 1, desarrollado en oveja (Abcam) dilución 1:50 en PBS, anti-BAK, desarrollado en conejo (Abcam) dilución 1:50 en PBS, anti-BAX, desarrollado en conejo (Abcam) dilución 1:50 en PBS, anti-BCL-2xl, desarrollado en ratón (Abcam) dilución 1:50 en PBS, anti-caspasa-3 activa, policlonal desarrollado en conejo (Sigma Aldrich) dilución 1:50 en PBS, anti-LC3, desarrollado en conejo (Thermo Fisher) dilución 1:50 en PBS.

Secundarios: Anti-ratón desarrollado en cabra acoplado al fluorocromo verde Alexa Fluor 488 (Invitrogen), dilución 1:200 en PBS, anti-conejo desarrollado en cabra acoplado al fluorocromo verde Alexa Fluor 488 (Sigma Aldrich), dilución 1:200 en PBS, anti-oveja desarrollado en burro acoplado a fluorocromo rojo Alexa Fluor 594 (Jackson Immunoresearch), dilución 1:200 en PBS.

3.2 Inmunodetecciones

Se hicieron inmunolocalizaciones sencillas y dobles en cortes seriados, además de tinción de material genético con el colorante fluorescente DAPI (4',6-diamino-2-fenilindol). DAPI es un colorante fluorescente que se une fuertemente a las regiones ricas en timina y adenina en el DNA, por lo que permite una visualización clara del núcleo celular. Se inmunodetectó de forma individual a las proteínas pro-apoptóticas: caspasa-3 activa, BAX y BAK, así como a la proteína anti-apoptótica BCL-2xl. Por otra parte, se realizaron inmunodetecciones sencillas para las proteínas relacionadas con autofagia Beclina 1 y LC3. Una vez inmunodetectadas individualmente todas las proteínas, se detectó en inmunolocalizaciones dobles a Beclina 1 de forma simultánea con las proteínas apoptóticas caspasa-3 activa, BAX, BAK; asimismo, se identificó la presencia simultánea de Beclina 1 y BCL-2xl en la misma célula (Figura 7). Por último, se detectó simultáneamente a Beclina 1 con LC3.

Los cortes se desparafinaron y rehidrataron para su procesamiento. Se realizó la recuperación antigénica de las muestras con buffer de citratos 0.1M en un horno de microondas marca Panasonic a 1300W durante tres minutos y a 780W durante seis minutos. Se enfriaron las muestras, se lavaron tres veces con PBS y se colocaron en glicina 100 mM durante una hora. Posteriormente se colocó la mezcla de anticuerpos primarios en cada corte según lo indicado en la figura 7 y se incubó a 4 °C durante una noche. A continuación, se lavaron las muestras con PBS y se añadieron los anticuerpos secundarios, los cuales se incubaron durante dos horas a temperatura ambiente. Después de un lavado con PBS se agregó DAPI durante un minuto, se lavó de nuevo y se montaron las preparaciones utilizando el medio de montaje para microscopía de fluorescencia Vecta-Shield.

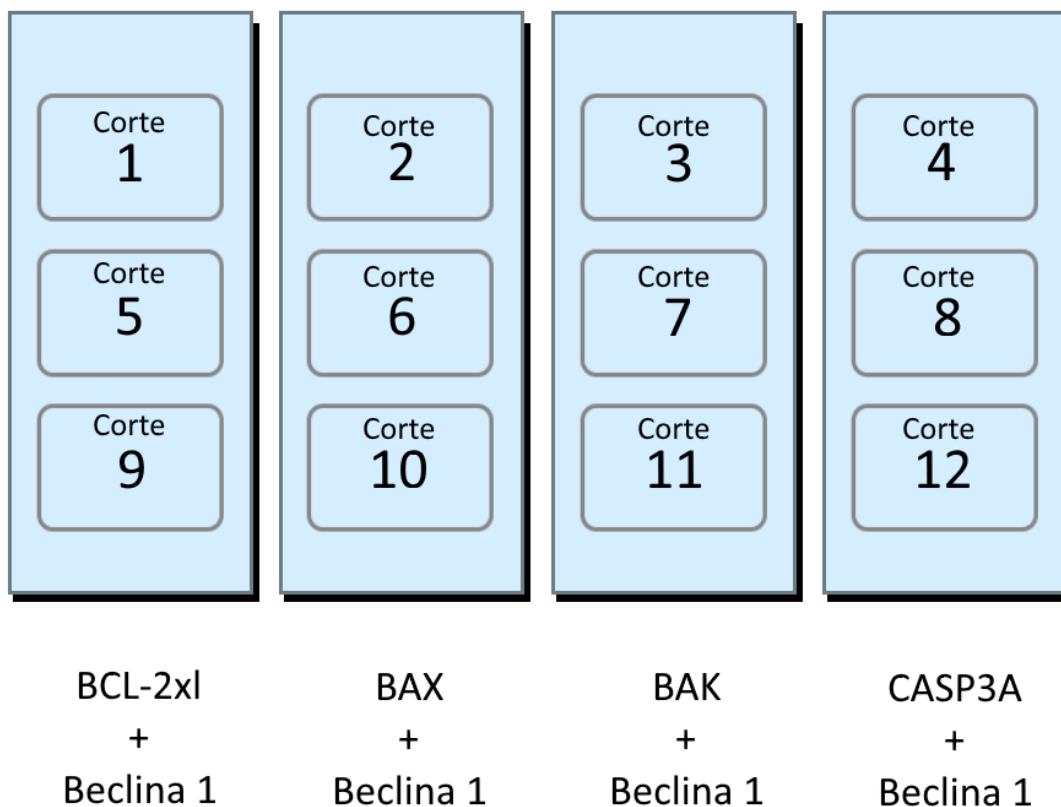


Figura 7. Esquema de las inmunolocalizaciones dobles realizadas en cortes seriados para las proteínas apoptóticas y Beclina 1.

4. Observación y fotografía de las muestras

Todas las muestras se observaron y fotografiaron en un microscopio de epifluorescencia Nikon Eclipse E600 utilizando una cámara Nikon modelo DXM1200F. Se fotografiaron todos los ovocitos dentro de cada corte en contraste de fases y con los filtros necesarios para la observación de los marcadores de fluorescencia.

5. Cuantificación de fluorescencia y edición de imágenes

Se cuantificó el promedio de fluorescencia en cada ovocito utilizando el software ImageJ v1.58J y los datos se procesaron utilizando Microsoft Excel 2013, Statistica v10 y GraphPad V5. Las imágenes se editaron utilizando Microsoft PhotoDraw2000 y el software libre paint.net v4.0.13.

Resultados

I. Morfología general del ovario (Hematoxilina y eosina).

La tinción con hematoxilina y eosina permitió visualizar de manera general la morfología del ovario de rata a los 40 días de edad. Se identificaron folículos en diversas etapas de crecimiento (Figura 8). También se observaron cuerpos lúteos, lo que indica que a esta edad ya ha sucedido por lo menos una ovulación (Figura 8) y el individuo ha alcanzado la madurez gonadal. Las características observadas permitieron definir a los folículos sanos en

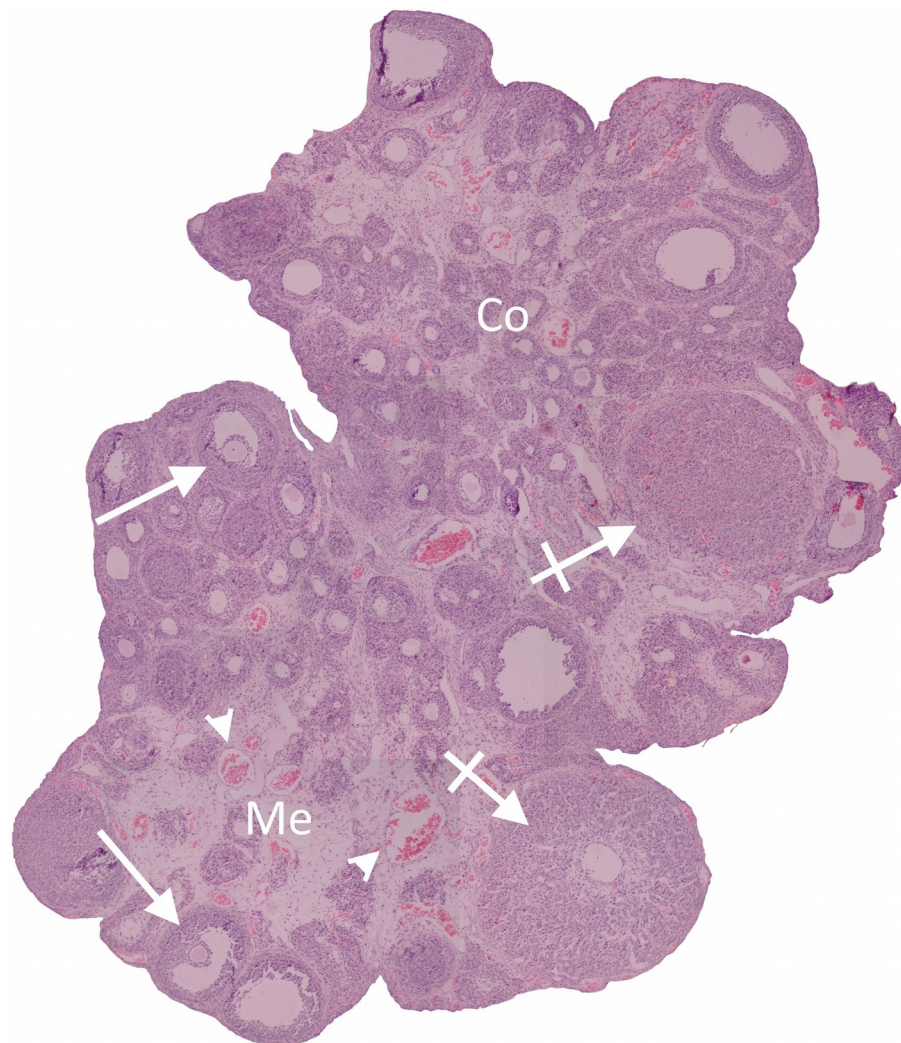


Figura 8. Corte histológico de ovario de rata de 40 días teñido con hematoxilina y eosina. En el corte se puede observar la corteza ovárica (Co) con varios folículos en diferentes etapas de desarrollo, la médula (Me) se observa vascularizada (cabezas de flecha). En esta imagen se pueden identificar algunos folículos antrales (flechas) y dos cuerpos lúteos (flechas cruzadas).

varios estados de desarrollo (Figuras 9 y 10), así como algunos con marcadas alteraciones indicando atresia avanzada (Figura 11). Los folículos sanos se identifican por poseer una forma redondeada, las células de la granulosa conservan su relación entre sí, el ovocito posee una estructura redondeada y homogénea (Figuras 9 y 10). Los folículos atrésicos muestran una deformación del ovocito y de las células somáticas que lo rodean (Figura 11).

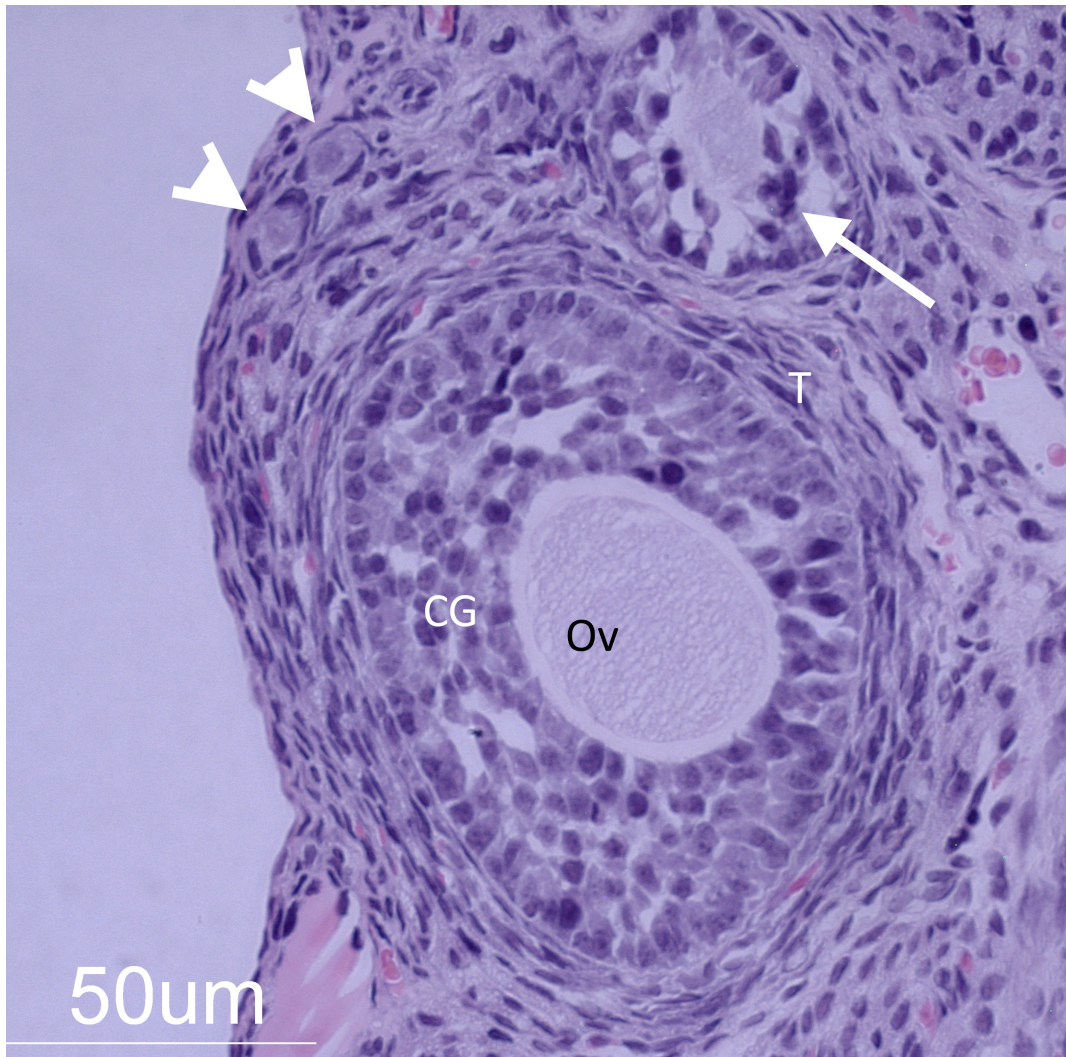


Figura 9. Folículos sanos. Se observa un folículo pre-antral, en el cual el ovocito (Ov) tiene una forma esférica, además la capa de células de la granulosa (CG) mantiene su estructura y su unión con el ovocito. Adicionalmente, se pueden ver dos folículos primordiales (cabezas de flecha) y un folículo secundario atrésico (flecha).

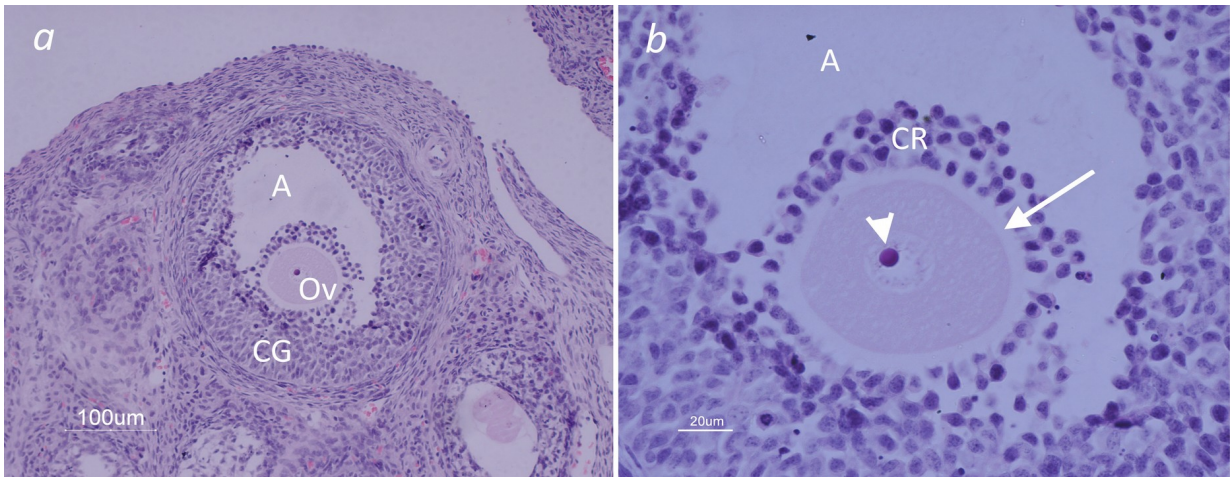


Figura 10. *a)* Folículo antral sano, el folículo conserva su estructura y el ovocito mantiene una forma esférica. Se observa el antro folicular (A) bien desarrollado *b)* Aumento del mismo folículo. Dentro del ovocito se aprecia claramente el nucléolo (cabeza de flecha), de mayor densidad que el núcleo. También se puede ver la zona pelúcida (flecha) entre el ovocito y las células de la *corona radiata* (CR).

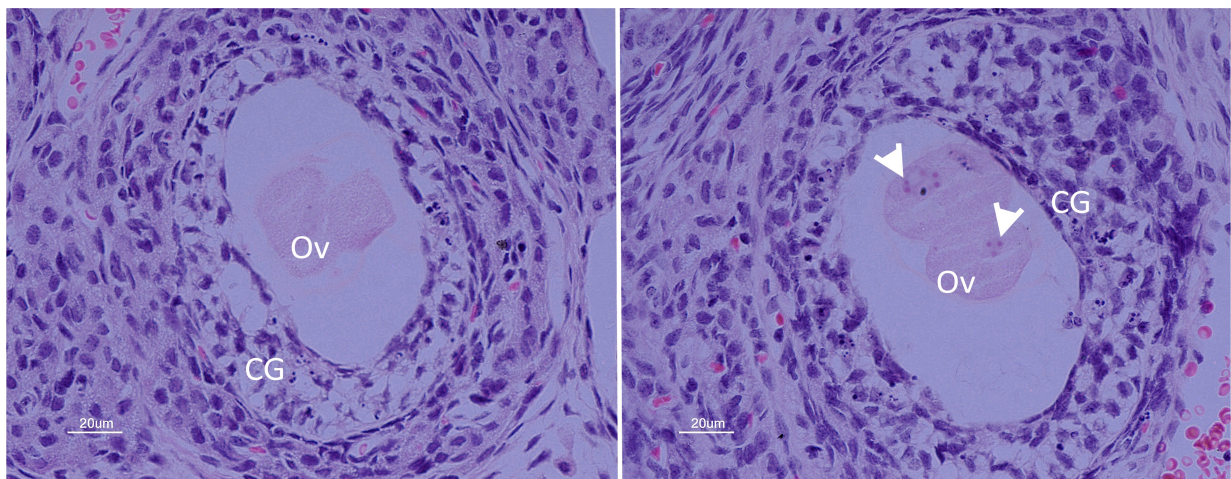


Figura 11. Folículos atrésicos. En ambos casos la forma esférica del folículo y del ovocito se ha perdido. Las células de la granulosa y el ovocito se encuentran apoptóticos, con una notable condensación del material nuclear (cabeza de flecha) y fragmentación celular.

II. Detección de proteínas apoptóticas en ovocitos.

Para identificar a los ovocitos apoptóticos se inmunodetectó a las proteínas BAX, BAK y a caspasa-3 en su forma activa. Para definir la presencia de BAX y BAK en los ovocitos se cuantificó la intensidad de la fluorescencia promedio asociada a ellas, considerando como negativos a los ovocitos que presentaron un nivel de fluorescencia basal. De la misma manera, se cuantificó la intensidad de la fluorescencia asociada a la proteína anti-apoptótica BCL-2xl para determinar su presencia en los ovocitos. Se graficó el promedio de fluorescencia de todos los ovocitos considerados como positivos y negativos (Figura 12), utilizando a los ovocitos totales sin considerar el ovario del que provenían. En el caso de caspasa-3 activa, la presencia de la proteína fue suficiente para considerar al ovocito como apoptótico, independientemente de la intensidad de la fluorescencia.

Los resultados mostraron que en el ovario de rata de 40 días existe un número de ovocitos en los que es posible detectar a las proteínas pro-apoptóticas BAX, BAK y a la capsasa-3 activa. Estas observaciones sugieren que estos ovocitos son eliminados por apoptosis (Figura 13).

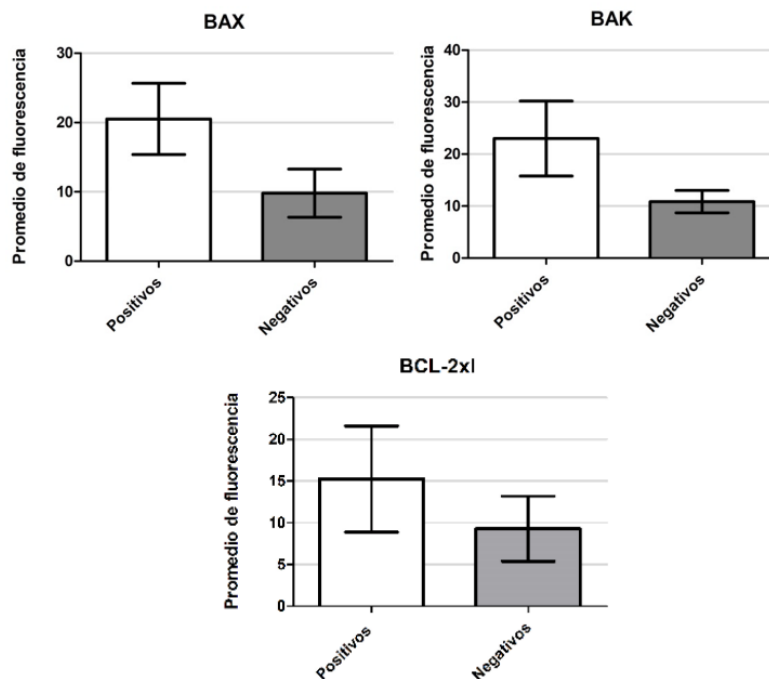


Figura 12. Cuantificación de la intensidad de la fluorescencia asociada a las proteínas BAX, BAK y BCL-2xl mediante inmunodetección. Se muestra la intensidad de fluorescencia promedio de los ovocitos considerados como positivos y de aquellos considerados como negativos (\pm desviación estándar).

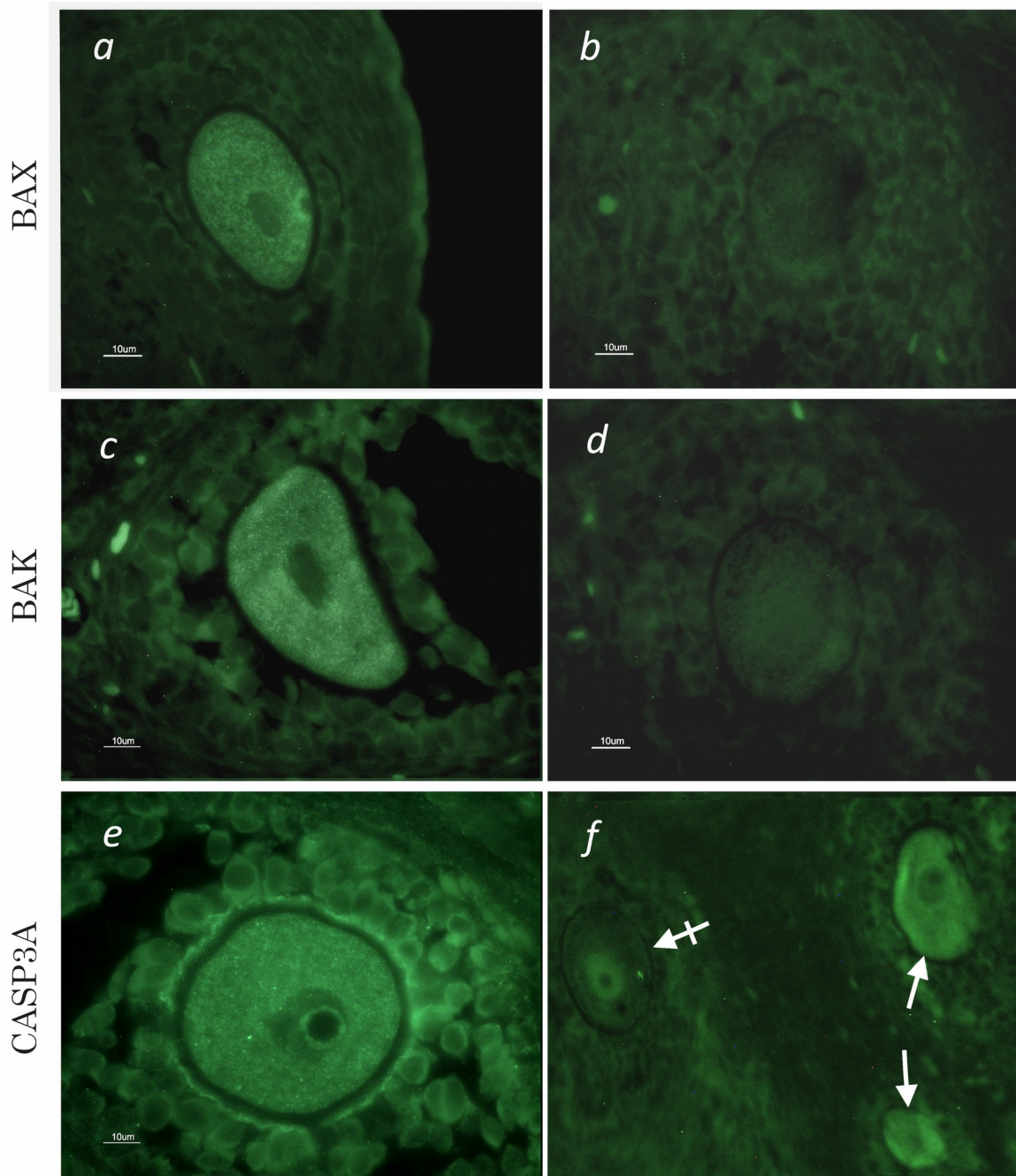


Figura 13. Detección de las proteínas apoptóticas BAX, BAK y caspasa-3 activa en ovarios de ratas de 40 días de edad. *a)* Ovocito con marca positiva a la proteína apoptótica BAX, perteneciente a un folículo atrésico pre-antral. El ovocito ha perdido su forma esférica, aunque mantiene el contacto con las células de la granulosa, que conservan su integridad y no presentan fluorescencia. Lo anterior indica un proceso de atresia relativamente temprano iniciado por el ovocito. *b)* Folículo antral con morfología sana. El ovocito y las células de la granulosa tienen un promedio de fluorescencia que se considera negativa. *c)* Ovocito positivo a la proteína apoptótica BAK. El folículo en etapa antral se encuentra en un estado de atresia más avanzado que el de la imagen *a*. Se ha perdido la integridad de la capa de

células de la granulosa, que también son positivas a BAK. *d)* Folículo antral, el ovocito no tiene marca positiva a BAK. *e)* Ovocito positivo a la caspasa ejecutora de apoptosis caspasa-3 en su forma activa. A pesar de que el ovocito no ha perdido del todo su forma la célula presenta una marca positiva evidente. El folículo se encuentra en etapa antral, las células de la granulosa también se encuentran apoptóticas y dispersas en el folículo. *f)* Ovocito negativo a caspasa-3 activa (flecha cruzada), se observan también dos ovocitos positivos a la misma proteína (flechas).

Se encontraron ovocitos con marca positiva a alguna de las tres proteínas pro-apoptóticas en folículos primarios, secundarios y antrales, estando la mayoría en ésta última. De igual manera los ovocitos con marca positiva para apoptosis se observaron en diferentes estados de progreso del proceso apoptótico. La figura 13 *e)* muestra un ovocito con una morfología que indica apoptosis temprana, la figura 13 *c)* presenta una morfología de apoptosis y atresia folicular intermedia. La figura 14 muestra una morfología de apoptosis en un estado avanzado.

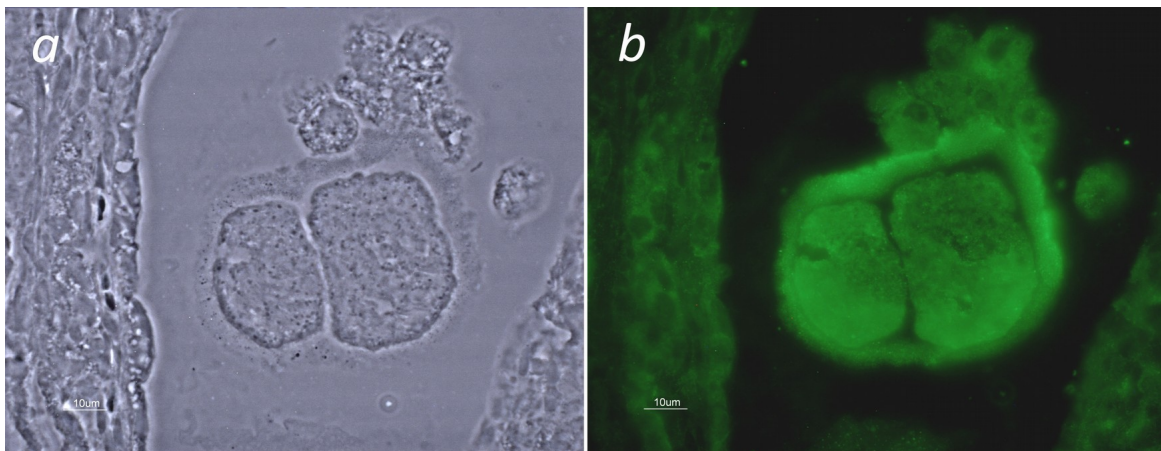


Figura 14. Detección de la caspasa-3 activa en un folículo en estado avanzado de apoptosis. El ovocito ha perdido por completo su integridad estructural y se encuentra dividido en dos cuerpos apoptóticos. No hay contacto con las células de la granulosa, también apoptóticas. *a)* Contraste de fases. *b)* Inmunodetección de la caspasa-3 activa.

Por otra parte, también realizamos experimentos de inmunolocalización para detectar a la proteína anti-apoptótica BCL-2xl (Figura 15). Se encontraron pocas células con marca positiva de esta proteína, en comparación con los ovocitos positivos a las proteínas pro-apoptóticas. Más aún, todos los ovocitos en los que fue posible detectar a BCL-2xl presentaron una morfología que indica apoptosis.

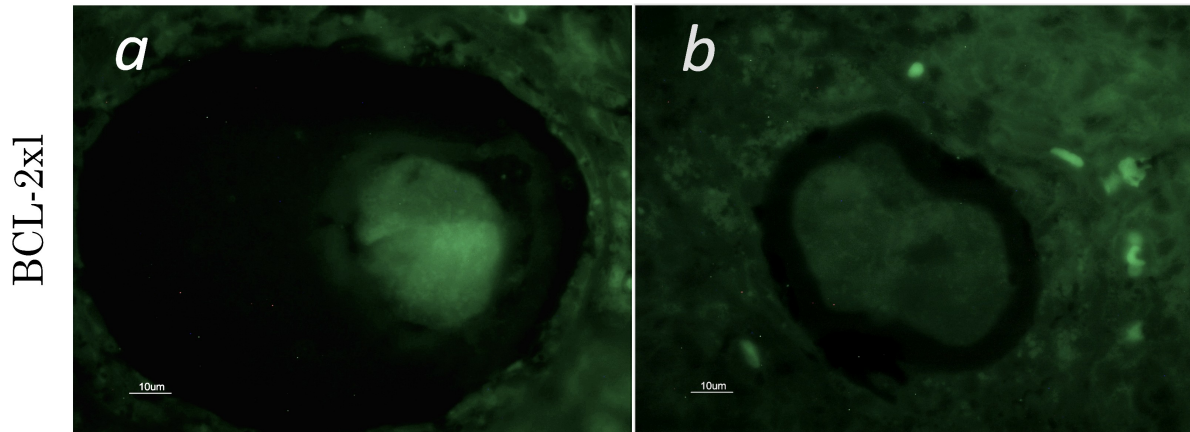


Figura 15. *a)* Ovocito con marca positiva a la proteína anti-apoptótica BCL-2xl en un folículo antral. A pesar de la marca de BCL-2xl la célula parece apoptótica, sugiriendo que la señal anti-apoptótica no fue suficiente para contrarrestar a la señal pro-apoptótica. *b)* Ovocito apoptótico negativo para BCL-2xl.

III. Detección de proteínas autofágicas en ovocitos.

De manera similar a lo que se hizo para las proteínas apoptóticas, se cuantificó la intensidad promedio de la fluorescencia asociada a las proteínas autofágicas Beclina 1 y LC3 en inmunodetecciones sencillas; los ovocitos se dividieron en dos grupos: positivos y negativos.

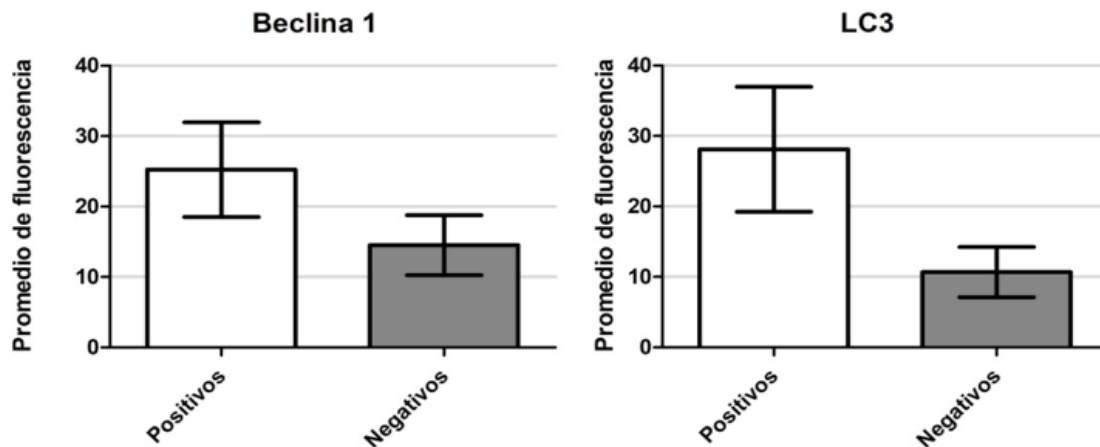


Figura 16. Cuantificación de la intensidad de la fluorescencia asociada a las proteínas Beclina 1 y LC3 mediante inmunodetección. Se muestra la intensidad de fluorescencia promedio de los ovocitos considerados como positivos y de aquellos considerados como negativos (\pm desviación estándar).

Se encontró una muy clara distinción entre células con marca basal de Beclina 1 (negativas), en las que la autofagia probablemente ocurre a un nivel fisiológico, y células con un nivel de fluorescencia asociado a las proteínas autofágicas elevado, en las que el incremento de estas proteínas podría estar asociado a un incremento en el nivel de autofagia (Figura 16). A diferencia de las inmunodetecciones para proteínas apoptóticas, los marcadores autofágicos se observaron con una distribución citoplasmática y en puntos discretos dentro de la célula. Los puntos discretos de LC3 pueden interpretarse como autofagosomas ya formados, debido a que LC3 forma parte del complejo proteico de la membrana de estos organelos. Beclina 1 forma parte del complejo de ensamblaje del fagóforo, así que señala la formación de los autofagosomas. Ovocitos con una intensidad fluorescente elevada asociada tanto a Beclina 1 o a LC3 presentaron morfologías tanto de ovocito sano como de ovocito apoptótico. Sin embargo, la mayoría de ellos carecieron de marcas claras de apoptosis (Figura 17).

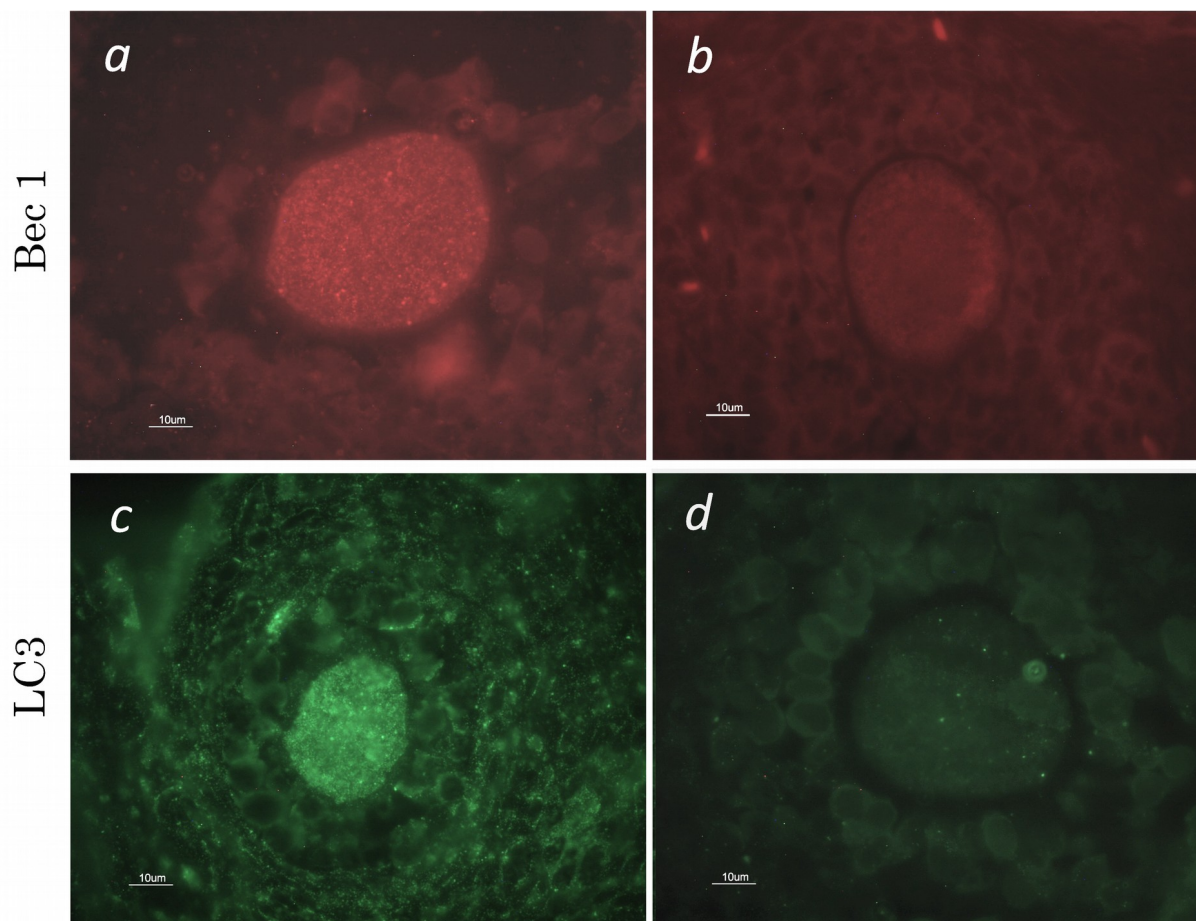


Figura 17. Inmunodetección de Beclina 1 y LC3. El ovocito en *a)* tiene una intensidad de fluorescencia elevada en comparación con la fluorescencia de fondo observada para ovocitos negativos *b)*, lo que es consistente con un acumulación de Beclina en estos ovocitos. *a)* Folículo antral. El ovocito tiene autofagia incrementada respecto al nivel basal. Nótese que la intensidad de la fluorescencia para Beclina 1 en el ovocito es también mayor que la de las células de la granulosa que lo rodean, y ésta también se observa en puntos discretos. En *b)* nótese que el folículo antral no se encuentra atrésico. *c)* Folículo secundario positivo para LC3, compárese la intensidad de su fluorescencia con la de un folículo negativo en *d)*. Se puede observar que el resto de las células del folículo también presenta una intensidad de fluorescencia superior a la observada en los folículos negativos. *d)* Folículo antral con marca basal de LC3.

Las inmunolocalizaciones simultáneas de Beclina 1 y LC3 cumplieron con dos funciones: por un lado, permitieron corroborar la diferencia entre un nivel de autofagia basal y uno incrementado y, por otro lado, permitieron confirmar la presencia de los autofagosomas. La figura 18 muestra un ovocito aparentemente sano, con una morfología no apoptótica en un

foliculo pre-antral no atrésico. Se puede ver una intensidad de fluorescencia de ambas proteínas elevada. De igual manera, se observan puntos discretos donde localizan las dos proteínas. Al sobreponer las imágenes (Figura 19), se evidencia la coincidencia casi total en los puntos discretos de ambas proteínas. Lo anterior nos indica que en estas células Beclina 1 no sólo sirve de marcador para fagóforos, si no que también permite identificar autofagosomas.

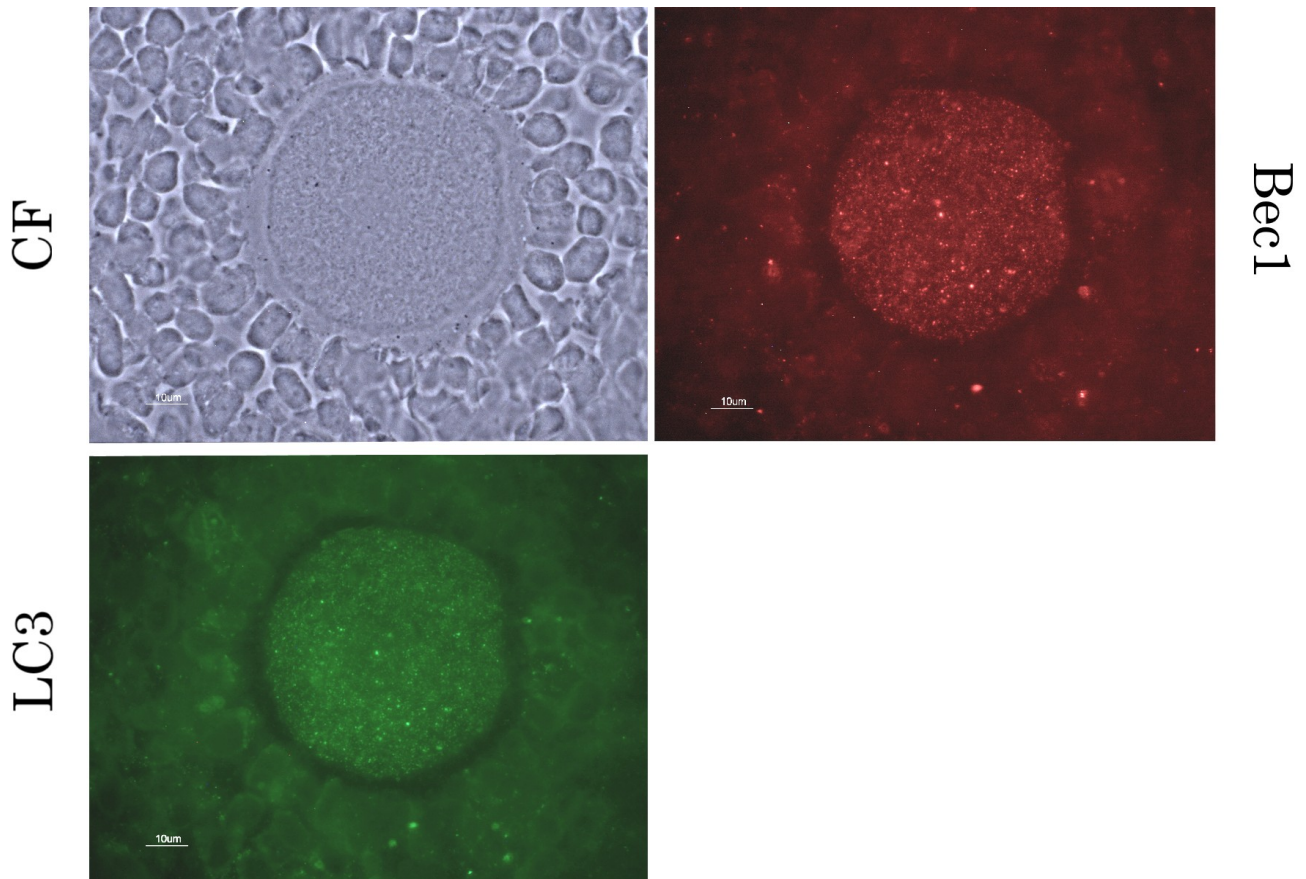


Figura 18. Ovocito con marca positiva a las proteínas autofágicas Beclina 1 y LC3. El foliculo se encuentra en etapa antral. El ovocito y las células de la granulosa presentan morfología no apoptótica. La presencia de ambas proteínas se evidencia en puntos discretos dentro de la célula.

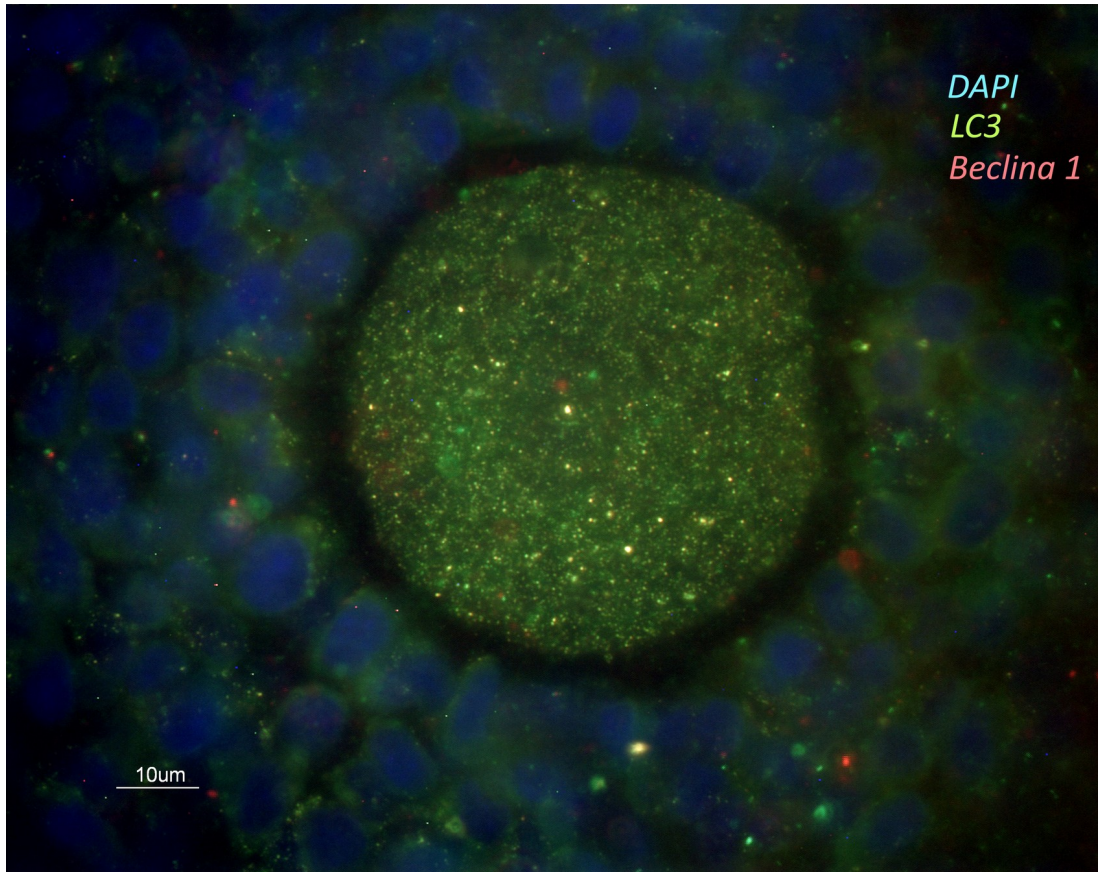


Figura 19. Sobreposición de las inmunodetecciones de Beclina 1 y LC3 del ovocito de la figura 18. Se observan algunos puntos amarillos que indican sitios de co-localización de ambas proteínas, lo que corrobora el proceso autofágico en esta célula.

IV. Inmunodetección simultánea de proteínas apoptóticas y autofágicas en ovocitos.

Para analizar la presencia simultánea de apoptosis y autofagia en una misma célula se realizaron inmunodetecciones dobles de Beclina 1 y alguna de las siguientes proteínas: BAX, BAK, caspasa-3 activa y BCL-2xl, en cortes seriados. Se encontraron ovocitos con diversas combinaciones de marcas positivas en casi todas las etapas de desarrollo folicular. La figura 20 muestra un folículo en etapa secundaria, el que presenta marca positiva sólo para las tres proteínas pro-apoptóticas y negativa para Beclina 1 y BCL-2xl. Esto indica un

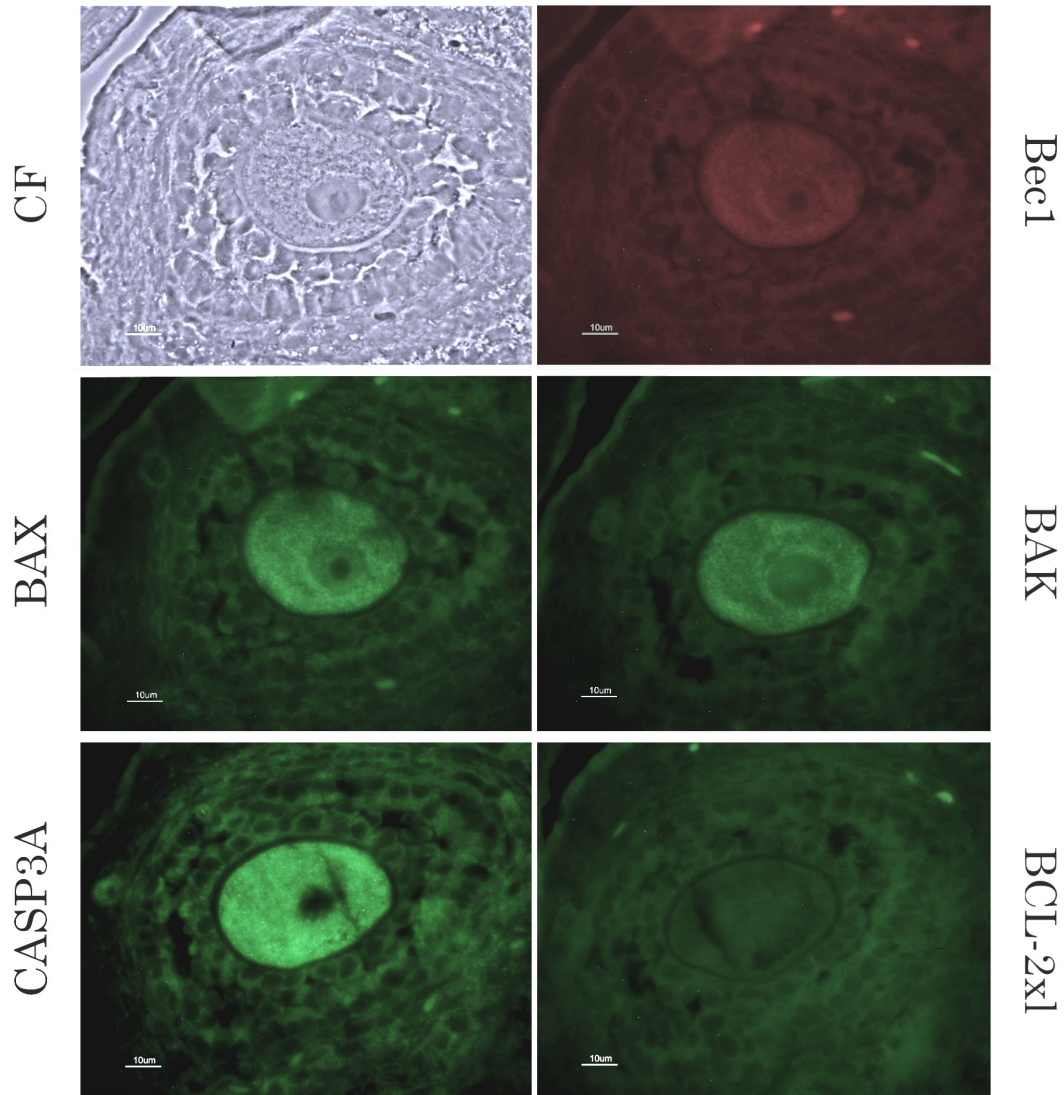


Figura 20. Ovocito con marca positiva a las proteínas pro-apoptóticas BAX, BAK y caspasa-3 activa, indicando un proceso de apoptosis simple. El ovocito comienza a perder su forma esférica y la capa de células de la granulosa pierde su integridad. CF: Contraste de fases.

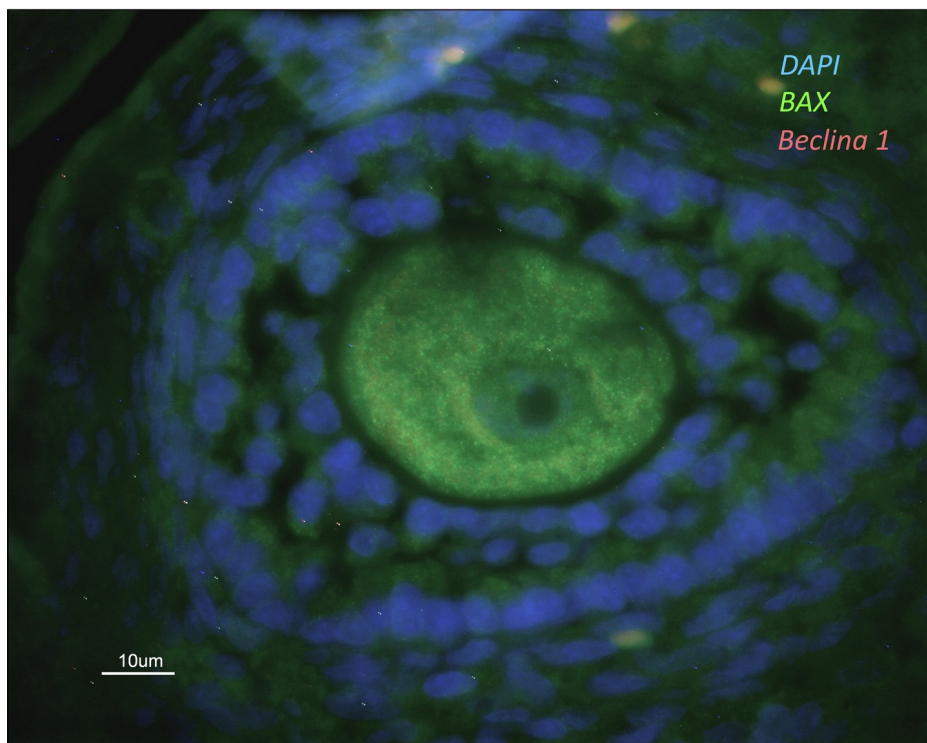


Figura 21. Sobreposición de las fotografías correspondientes a Beclina 1, BAX y DAPI del ovocito de la figura 20. La señal de fluorescencia se observa principalmente de un color verde, indicando presencia de BAX y ausencia de Beclina 1.

proceso de muerte únicamente por apoptosis. Al sobreponer las inmunolocalizaciones de Beclina 1 y BAX (Figura 21) se puede visualizar con mayor claridad una disminución en la relación Beclina 1/BAX al compararla, por ejemplo, con la figura 23. En las figuras 22 y 23 se muestra un ovocito que presentó marca positiva tanto a las proteínas pro-apoptóticas como a Beclina 1. La morfología del ovocito parece indicar un proceso de apoptosis temprana, a pesar de que la morfología de las células de la granulosa indican un proceso de atresia folicular ya avanzado. Al sobreponer las fotografías de cada proteína pro-apoptótica con las de Beclina 1 se pueden observar puntos discretos en donde coinciden BAX y BAK con Beclina 1 (Figura 23 *a* y *b*). La coincidencia observada es diferente a la de la figura 19, en donde la coincidencia entre LC3 y Beclina 1 es total y no parece que la distribución de alguna de las proteínas esté envolviendo a la otra. En los puntos de coincidencia de BAX y BAK con Beclina 1 se observa un mayor desfase y los puntos de coincidencia parecen estar rodeados por un halo correspondiente a Beclina 1, lo que podría sugerir que BAX y BAK se encuentran en el interior de los autofagosomas (Figura 24).

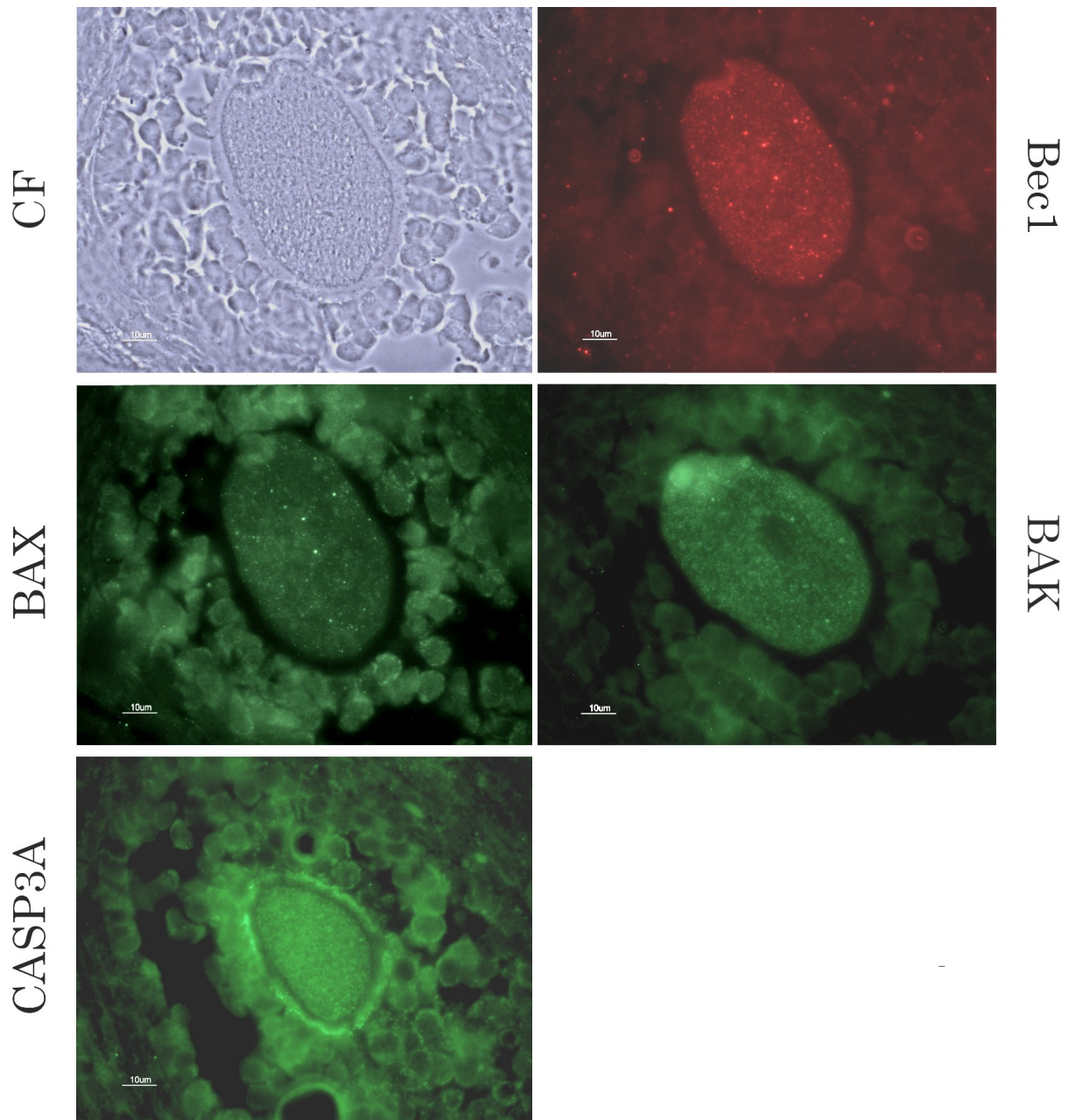


Figura 22. Ovocito con marca positiva a Beclina 1 y a las proteínas pro-apoptóticas BAX, BAK y caspasa-3 activa. El folículo en etapa antral se encuentra atrésico. El estado de apoptosis avanzada de las células de la granulosa respecto al del ovocito, aunado a la etapa folicular parece indicar que el proceso de atresia fue iniciado por las células de la granulosa y no por el ovocito.

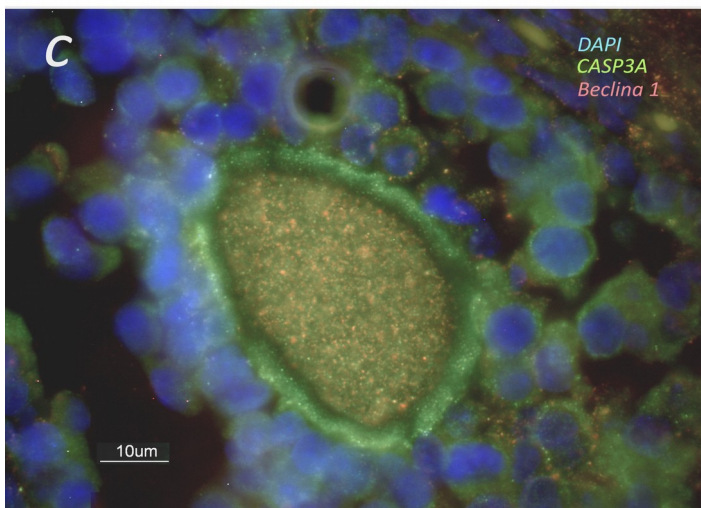
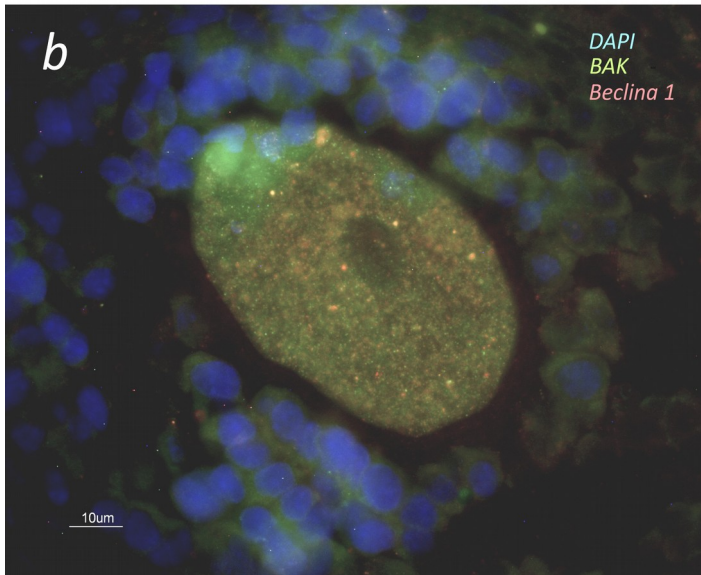
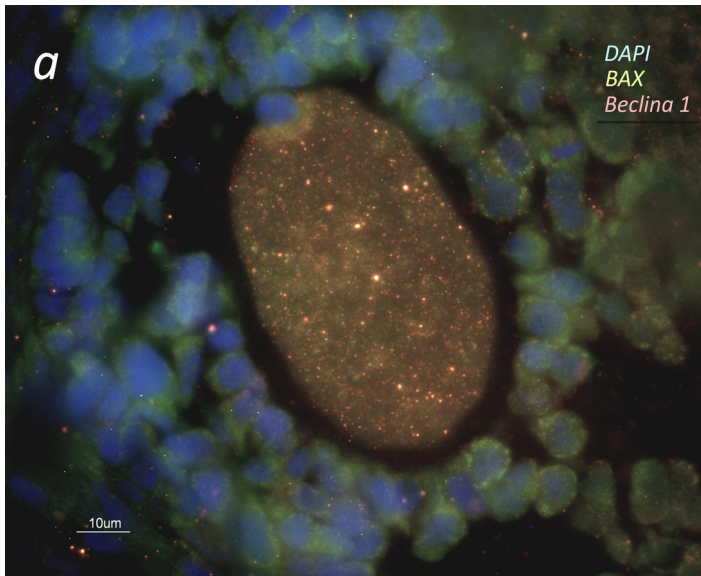


Figura 23. Sobreposición de las inmunodetecciones para BAX, BAK y caspasa-3 activa con Beclina 1 en el mismo ovocito.

a) Sobreposición de BAX, Beclina 1 y DAPI. La célula presenta puntos discretos donde coinciden las marcas de BAX y Beclina 1.

b) Sobreposición de BAK, Beclina 1 y DAPI. Al igual que en la figura *a)* se observan puntos discretos donde coincide la marca de las dos proteínas.

c) Sobreposición de caspasa-3 activa y Beclina 1. En este caso a pesar de que ambas marcas son positivas sólo se observan puntos discretos de Beclina 1, en los que no hay coincidencia en la señal de la misma manera que con BAX y BAK.

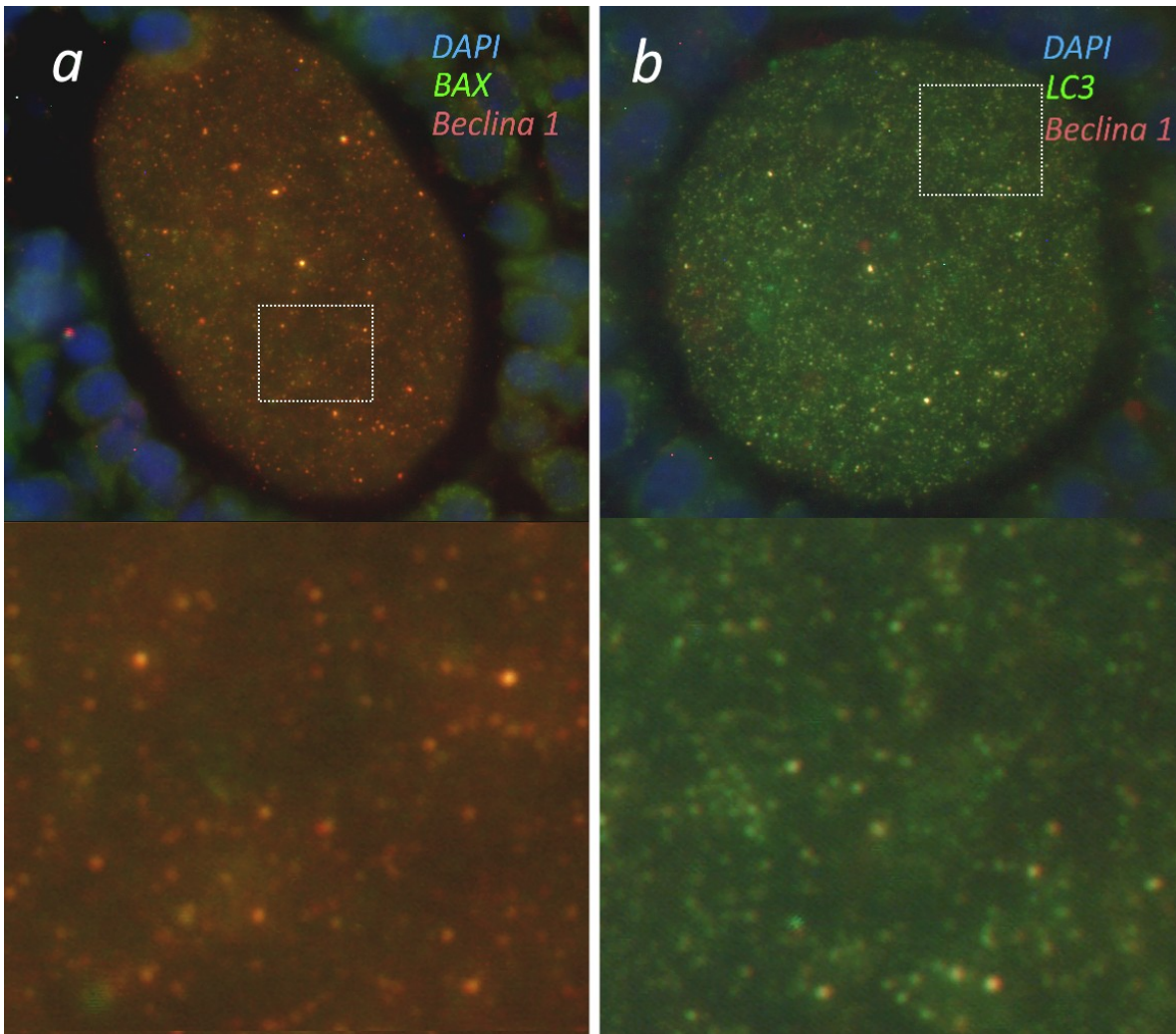


Figura 24. Magnificación de las sobreposiciones de a) BAX con Beclina 1 y b) LC3 con Beclina 1. La co-localización de fluorescencia de BAX y Beclina 1 presenta un mayor desfase que la de LC3 y Beclina 1.

Las inmunodetecciones en las que se identifica de forma simultánea a la proteína pro-autofágica Beclina 1 con BAX, BAK o la caspasa-3 activa, permitieron demostrar que existen ovocitos en los cuales están presentes simultáneamente Beclina 1 y la caspasa-3 activa de forma simultánea. La cuantificación de la fluorescencia promedio de Beclina 1, BAX, BAK y caspasa-3 activa en dos ovocitos representativos se muestra en la figura 25. El primero presentó un nivel basal de Beclina 1, mientras que, de acuerdo con los datos cuantitativos, en el segundo éste nivel fue elevado. La intensidad fluorescente de caspasa-3 activa fue elevada en el ovocito con altos niveles de Beclina 1 respecto al ovocito con un nivel basal. Este fenómeno fue consistente en la mayoría de los ovocitos en los que se

realizaron inmunodetecciones dobles; sólo un ovocito con autofagia incrementada presentó menor fluorescencia de caspasa-3 activa que los ovocitos con autofagia basal.

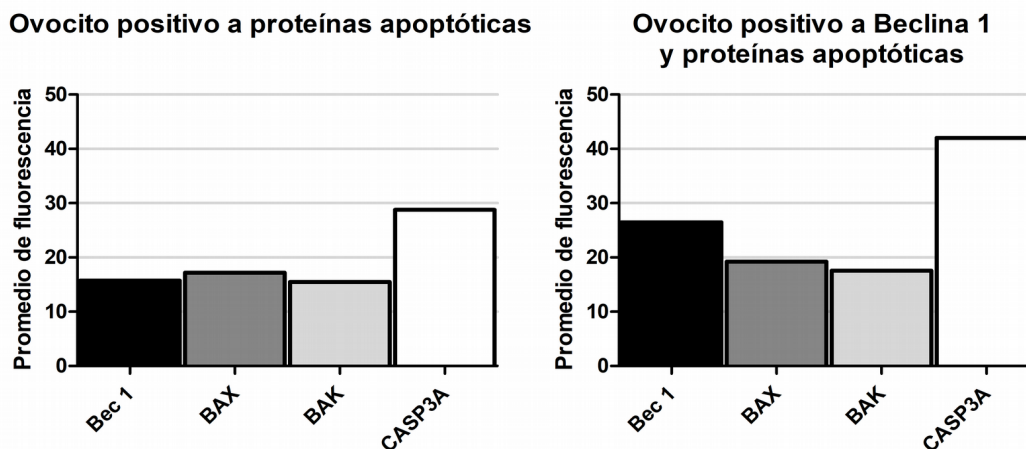


Figura 25. Promedio de fluorescencia de Beclina 1 y de las proteínas pro-apoptóticas en dos ovocitos representativos. El ovocito de la gráfica izquierda tiene un nivel de autofagia basal, mientras que el de la derecha presentó un nivel de autofagia incrementado. En ovocitos con autofagia incrementada el promedio de fluorescencia de caspasa-3 activa es mayor al de los ovocitos con autofagia basal.

V. Análisis de la frecuencia de tipo de muerte por etapa folicular.

Se determinó la etapa de desarrollo folicular en la que se encontraban los folículos con ovocitos positivos a marcadores de autofagia, apoptosis, a ambos o a ninguno (Figura 26). Los ovocitos con antro en formación y los antrales se consideraron como una misma categoría. Algunos folículos se encontraron en estados de atresia tan avanzados que no fue posible determinar la etapa de desarrollo en la que se encontraban, por lo que la etapa se denota como “indeterminada”. La mayor incidencia de muerte por apoptosis con autofagia incrementada simultánea se presentó en folículo antrales, lo que corresponde al 30% del total de ovocitos estudiados. Por otro lado, el 35% de los ovocitos mostraron marcadores apoptóticos y se encontraron en folículos antrales; indicando que a los 40 días de edad la muerte por apoptosis es más común que la muerte combinada. La mayoría de los ovocitos atresicos en folículos secundarios se encontraron en un proceso de apoptosis sin autofagia. Se identificó a un número similar de ovocitos apoptóticos y con muerte combinada en folículos primarios y folículos indeterminados.

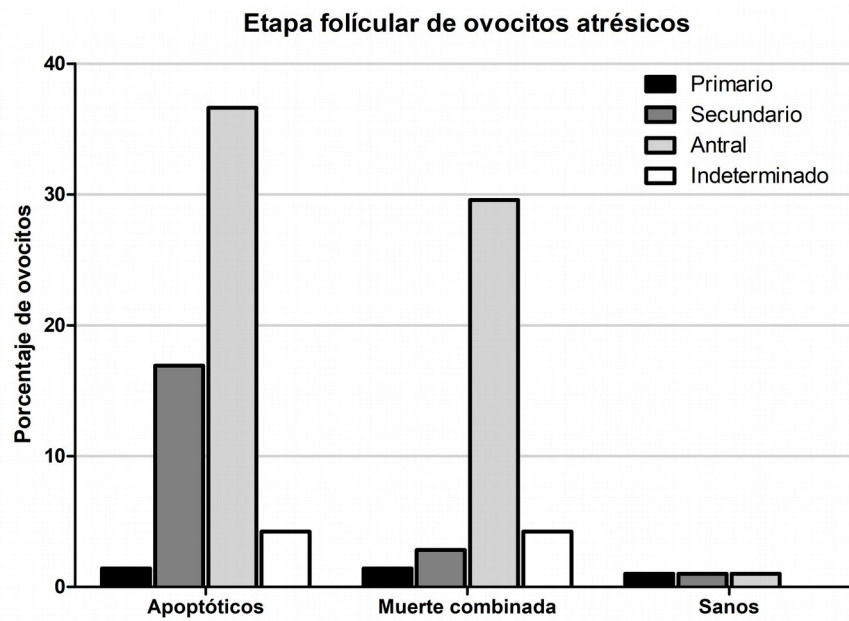


Figura 26. Porcentaje de ovocitos con muerte apoptótica o combinada según su etapa folicular.

Discusión

En el presente trabajo pudimos describir las características morfológicas y citológicas del proceso de eliminación de ovocitos en ratas juveniles. La apoptosis fue considerada durante un tiempo como el proceso principal por el que se eliminan los ovocitos durante la atresia folicular, sin embargo, estudios anteriores de nuestro equipo de trabajo han demostrado la presencia de apoptosis, autofagia y una combinación de ambas durante la eliminación de ovocitos atrésicos en ratas prepúberes y en ratas adultas (**Escobar et al., 2012; Escobar et al., 2010; Escobar et al., 2008; Ortiz et al., 2006**).

Entre las alteraciones morfológicas que observamos en este trabajo destacan principalmente la pérdida de la forma esférica de la célula y la separación entre el ovocito y las células de la *corona radiata*. Asimismo, se observaron folículos atrésicos en todas las etapas del desarrollo folicular excepto en la etapa primordial. Adicionalmente, se pudieron observar cuerpos lúteos que indican que a los 40 días ya ha ocurrido por lo menos un evento de ovulación. Lo anterior es consistente con la edad de la primera ovulación descrita por Mcgee y Hsueh (**2000**) de 34 días. El tamaño de los cuerpos lúteos parece ser menor a los descritos en ratas adultas (**Escobar et al., 2012**).

Es conocido que la apoptosis es regulada por los miembros de la familia BCL-2 y ejecutada por las proteínas denominadas caspasas (**Revisado en Galluzzi et al., 2018**). Durante el presente estudio, demostramos la presencia de las proteínas BAX y BAK, ambos miembros pro-apoptóticos de la familia BCL-2, en ovocitos de ratas juveniles. Asimismo, la caspasa-3 activa también fue inmunodetectada. Nuestros resultados mostraron la participación del proceso apoptótico durante la eliminación de ovocitos en folículos atrésicos en ratas de 40 días de edad. Estos ovocitos apoptóticos se encontraron en folículos primarios, secundarios y en etapa antral, la mayoría en ésta última. Para determinar el proceso apoptótico, fue necesario evaluar la intensidad de marcado para las proteínas BAX y BAK; ambas se encuentran en fase soluble, y bajo condiciones de inicio de apoptosis la presencia de estas proteínas se incrementa (**Letai, 2011**). La medición de la fluorescencia de dichas proteínas permitió distinguir cuantitativamente a los ovocitos positivos y negativos para cada proteína.

Con estos datos, identificamos ovocitos con diferentes combinaciones de marcadores fluorescentes, aunque en la mayoría de los casos se encontró marca positiva a las tres proteínas pro-apoptóticas de manera simultánea. Los marcadores apoptóticos se encontraron en ovocitos con morfologías indicativas de diferentes etapas de la apoptosis. En células en etapas más avanzadas del proceso fue más común encontrar señal positiva sólo de caspasa-3 activa, lo que podría deberse a que BAX y BAK son degradadas una vez que la apoptosis alcanza la fase de ejecución, similar a lo descrito por Kugu *et al.* en ovarios de primates (1998). En lo que respecta a la proteína anti-apoptótica BCL-2xl, de todos los ovocitos estudiados sólo una fracción mínima mostró marca positiva a la proteína, y en estos casos la morfología indicó que el ovocito se encontraba apoptótico. Los niveles de expresión de BCL-2 y de BCL-2xl se han relacionado de una manera directamente proporcional con los niveles de progesterona en el organismo (Liszewska *et al.*, 2005; Morrissy *et al.*, 2016), esta hormona es producida en el cuerpo lúteo (Revisado en Niswender *et al.*, 2000). Lo anterior podría señalar que los bajos niveles de BCL-2xl observados a los 40 días de edad se deben a una baja producción de progesterona consecuencia del número y tamaño disminuidos de los cuerpos lúteos, respecto a los de ratas adultas.

Las proteínas Beclina 1 y LC3 son parte fundamental del proceso de formación y maduración de los autofagosomas. Beclina 1 durante el ensamblaje del fagóforo y LC3 durante su posterior elongación (Yang & Klionsky, 2010). LC3-II, la forma lipídada asociada a membranas se mantiene asociada a la membrana hasta que sucede la fusión autofagosoma-lisosoma y la posterior degradación de los componentes del autofagosoma (Tanida *et al.*, 2004). Ambas proteínas se encuentran en niveles basales en células sanas, su aumento sirve como un indicador del incremento de autofagia en la célula, lo que puede derivar en muerte celular autofágica (Mizushima *et al.*, 2008). Al detectar a Beclina 1 y a LC3 identificamos células con niveles basales y elevados de estas proteína, sugiriendo un aumento en los procesos de autofagia de las segundas. Estas últimas generalmente presentaron morfologías sanas o de apoptosis temprana. En las inmunodetecciones se observaron puntos discretos de localización de ambas proteínas. Al inmunodetectar a Beclina 1 y a LC3 en una misma célula identificamos puntos de co-localización completa en la señal

de ambas proteínas, lo que nos sugiere que en ovocitos de 40 días Beclina 1 funciona como marcador de autofagosomas ya formados.

El proceso de eliminación celular combinado por apoptosis y muerte autofágica en ovocitos se ha descrito en diferentes modelos, tales como peces (**Morais et al., 2016**), ratas adultas y pre-púberes (**Escobar et al., 2008; Escobar et al., 2012**). En ratas juveniles de 40 días de edad identificamos, por medio de inmunodetecciones dobles, la presencia de un proceso en el que ocurren de manera simultánea la muerte celular apoptótica y un incremento en el proceso autofágico. Identificamos ovocitos con marca positiva a Beclina 1 y a BAX, BAK y caspasa-3 activa, así como ovocitos positivos a las proteínas pro-apoptóticas pero con autofagia basal.

Identificamos ovocitos en los que se encontró consistentemente a los tres marcadores pro-apoptóticos y un nivel elevado de Beclina 1. Los ovocitos con marca apoptótica y autofágica en su mayoría se encontraron en folículos antrales, sin morfología de apoptosis avanzada. Dentro de estas células se observaron puntos de localización para BAX y BAK, al sobreponer las detecciones con las de Beclina 1 existe co-localización entre la señal de las proteínas apoptóticas con la de Beclina 1. Sin embargo, la coincidencia de BAX/BAK con Beclina 1 parece ser diferente a la observada para LC3 y Beclina 1. En el primer caso se observa un desfase en la co-localización de las proteínas, en donde la señal de Beclina 1 parecería rodear a la señal de BAX/BAK, mientras que con LC3 y Beclina 1 la coincidencia en la señal es total. Lo anterior podría ser interpretado como una posible degradación de las proteínas pro-apoptóticas BAX y BAK en el interior de autofagosomas.

Las detecciones de caspasa-3 activa en ovocitos positivos a Beclina 1 no nos llevan a pensar que esta proteína sea degradada por autofagia. A pesar de esto, al estar siendo degradadas BAX y BAK se esperaría un decremento en la intensidad de la señal para todas las proteínas apoptóticas. Sin embargo, al comparar la intensidad de fluorescencia de las proteínas estudiadas en ovocitos con autofagia basal y con autofagia incrementada se observa una señal mayor de caspasa-3 activa en el ovocito con autofagia incrementada.

Las evidencias discutidas hasta el momento permiten proponer un mecanismo de eliminación de ovocitos en folículos antrales de ratas juveniles en el que participan la autofagia y la apoptosis en conjunto. En folículos antrales la atresia es iniciada por las células de la granulosa y, en respuesta a la muerte de estas células, la apoptosis inicia en el ovocito (**Matikainen et al., 2001**). A los 40 días de edad, la autofagia en ovocitos podría sufrir un incremento drástico como respuesta de supervivencia anti-apoptótica por parte de la célula; al incrementar la autofagia son degradadas proteínas, como BAX y BAK, que forman parte de las primeras etapas en la cascada de activación de la apoptosis. Esto retrasa la ejecución de la apoptosis en la célula, lo que se puede ver como una morfología poco apoptótica en comparación con la de las células de la granulosa, intensamente marcadas con BAX, BAK y caspasa-3 activa. A pesar de ello, debido a la relativa inmadurez de los cuerpos lúteos la señal anti-apoptótica al interior del ovocito, representada por BCL-2xl, no es suficiente para detener la activación de las caspasas ejecutoras, lo que aunado a posibles mecanismos de compensación activados por la vía apoptótica en respuesta a la degradación de BAX y BAK, tales como asas de retro-alimentación entre caspasas (**Thornberry & Lazebnik, 1998**), la activación de estas proteínas en sitios de formación de autofagosomas (**Huang et al., 2013**), o una posible interacción entre proteínas con dominio BH3, podrían dar como resultado una presencia aún mayor de caspasas ejecutoras en ovocitos con autofagia incrementada.

Al comparar los resultados obtenidos a esta edad con los observados en ratas prepúberes y ratas adultas, la incidencia de muerte celular combinada parece ser la mitad de la presente en ratas prepúberes (**Escobar et al., 2008**). En folículos secundarios el mecanismo prevalente de eliminación parece ser la apoptosis sin autofagia. Considerando la presencia de los marcadores autofágicos en etapas tempranas de apoptosis y el papel anti-apoptótico que parecen estar jugando, la disminución en la autofagia podría deberse al incremento en la presencia de proteínas BCL-2 anti-apoptóticas ligada a la madurez gonadal. Adicionalmente, en los estudios realizados en ratas prepúberes se menciona la ausencia completa de cuerpos apoptóticos, mientras que a los 40 días de edad los ovocitos atrésicos sí parecen formar estas estructuras. El proceso de eliminación de ovocitos atrésicos a los 40 días de edad asemeja lo descrito durante el estro en ratas adultas (**Escobar et al., 2012**), más que lo observado en las

otras etapas del ciclo estral. En ratas adultas, la incidencia de muerte por apoptosis se relacionó con los niveles de FSH; durante el estro disminuyen los niveles de FSH y como consecuencia aumenta la incidencia de apoptosis. La similitud entre lo observado en ratas juveniles y ratas en estro podría deberse a niveles similares de FSH en ambos, ligado a la relativa inmadurez hormonal de las ratas juveniles.

Los resultados obtenidos permitieron observar con mayor detalle el mecanismo por el que son eliminados los ovocitos atrésicos durante una edad transitoria entre la etapa juvenil y adulta, en el que participan la apoptosis y la autofagia. Aún así, se requieren más estudios para obtener un mejor entendimiento acerca de la manera en la que se relacionan ambos procesos de muerte durante esta edad. Inmunodetecciones ultraestructurales utilizando microscopía electrónica de transmisión podrían ayudar a confirmar la posible degradación de BAX y BAK por autofagia, mientras que co-inmunoprecipitaciones podrían destacar interacciones directas entre las proteínas estudiadas.

Conclusiones

- A los 40 días de edad existen poblaciones de ovocitos con autofagia basal y con autofagia incrementada.
- Durante esta edad los ovocitos pueden ser eliminados por apoptosis o por un proceso de autofagia y apoptosis simultáneas.
- Los niveles de BCL-2xl son prácticamente nulos probablemente debido a la relativa inmadurez gonadal de las ratas juveniles.
- Los ovocitos en folículos secundarios tienden a ser eliminados por apoptosis, mientras que en folículos antrales se encuentran ambos tipos de muerte.
- La autofagia podría incrementarse como una respuesta de supervivencia celular a las señales de muerte producidas en el folículo atrésico. Como consecuencia las proteínas pro-apoptóticas BAX y BAK podrían ser degradadas por autofagia.
- En ovocitos que presentan marcadores de apoptosis y de autofagia incrementada se observa un aumento en los niveles de caspasa-3 activa, lo que podría indicar un efecto sinérgico entre estos dos procesos.

Referencias

- Anding, A. L., & Baehrecke, E. H. (2015). *Autophagy in cell life and cell death. Current Topics in Developmental Biology* (1st ed., Vol. 114). Elsevier Inc. <https://doi.org/10.1016/bs.ctdb.2015.07.012>
- B Alberts, A Johnson, J Lewis, M. Raff, K. Roberts, and P. W. (2015). Molecular biology of the cell, 6th edition by B. Alberts, A. Johnson, J. Lewis, M. Raff, K. Roberts, and P. Walter. In *Biochemistry and Molecular Biology Education* (Vol. 36, p. 171). <https://doi.org/10.1002/bmb.20192>
- Berry, D. L., & Baehrecke, E. H. (2007). Growth Arrest and Autophagy Are Required for Salivary Gland Cell Degradation in *Drosophila*. *Cell*, 131(6), 1137–1148. <https://doi.org/10.1016/j.cell.2007.10.048>
- Bose, K. (2015). *Proteases in apoptosis: Pathways, protocols and translational advances. Proteases in Apoptosis: Pathways, Protocols and Translational Advances*. <https://doi.org/10.1007/978-3-319-19497-4>
- Cade, C. E., Clark, A.C (2015). Caspases- Key Players in Apoptosis. En *Proteases in Apoptosis: Pathways, Protocols and Translational Advances*. (pp. 31-51) <http://doi.org/10.1007/978-3-319-19497-4>
- Chun, S. Y., Eisenhauer, K. M., Minami, S., Billig, H., Perlas, E., & Hsueh, A. J. W. (1996). Hormonal Regulation of Apoptosis in Early Antral Follicles: Follicle-Stimulating Hormone as a Major Survival Factor. *Endocrinology*, 137(4), 1447–1456. <https://doi.org/10.1210/endo.137.4.8625923>
- Clarke, P. G. (1990). Developmental cell death: morphological diversity and multiple mechanisms. *Anatomy and Embryology*, 181(3), 195–213. <https://doi.org/10.1007/BF00174615>
- De Felici, M., Di Carlo, A., Pesce, M., Iona, S., Farrace, M. G., & Piacentini, M. (1999). Bcl-2 and Bax regulation of apoptosis in germ cells during prenatal oogenesis in the mouse embryo. *Cell Death and Differentiation*, 6(9), 908–915. <https://doi.org/10.1038/sj.cdd.4400561>
- Dissen, G. A., Paredes, A., Romero, C., Les Dees, W., & Ojeda, S. R. (2003). Neural and Neurotrophic Control of Ovarian Development. In *The Ovary: Second Edition* (Second Edi, pp. 3–23). Elsevier Inc. <https://doi.org/10.1016/B978-012444562-8/50002-1>
- Escobar, M. L., Echeverría, O. M., Ortíz, R., & Vázquez-Nin, G. H. (2008). Combined apoptosis and autophagy, the process that eliminates the oocytes of atretic follicles

in immature rats. *Apoptosis*, 13(10), 1253–1266. <https://doi.org/10.1007/s10495-008-0248-z>

- Escobar Sánchez, M. L. (2013). Involvement of Pro-Apoptotic and Pro-Autophagic Proteins in Granulosa Cell Death. *Cell Biology*, 1M. L., E.(1), 9. <https://doi.org/10.11648/j.cb.20130101.12>
- Escobar Sánchez, M. L., Echeverría Martínez, O. M., & Vázquez-Nin, G. H. (2012). Immunohistochemical and ultrastructural visualization of different routes of oocyte elimination in adult rats. *European Journal of Histochemistry*, 56(2), 102–110. <https://doi.org/10.4081/ejh.2012.e17>
- Funderburk, S. F., Wang, Q. J., & Yue, Z. (2010). The Beclin 1-VPS34 complex - at the crossroads of autophagy and beyond. *Trends in Cell Biology*, 20(6), 355–362. <https://doi.org/10.1016/j.tcb.2010.03.002>
- Galluzzi, L., Vitale, I., Aaronson, S. A., Abrams, J. M., Adam, D., Agostinis, P., ... Kroemer, G. (2018). Molecular mechanisms of cell death: Recommendations of the Nomenclature Committee on Cell Death 2018. *Cell Death and Differentiation*, 25(3), 486–541. <https://doi.org/10.1038/s41418-017-0012-4>
- Ganley, I. G., Lam, D. H., Wang, J., Ding, X., Chen, S., & Jiang, X. (2009). ULK1·ATG13·FIP200 complex mediates mTOR signaling and is essential for autophagy. *Journal of Biological Chemistry*, 284(18), 12297–12305. <https://doi.org/10.1074/jbc.M900573200>
- Gartner, L. P., Hiatt, J. L., Negrete, J. H., & Gartner, L. P. (2015). “Sistema reproductor femenino” pp. 439-462 en *Atlas en color y texto de histología*. México, D. F. : Editorial Médica Panamericana, [2015].
- Harrington, H. A., Ho, K. L., Ghosh, S., & Tung, K. (2008). Construction and analysis of a modular model of caspase activation in apoptosis. *Theoretical Biology and Medical Modelling*, 5(1), 26. <https://doi.org/10.1186/1742-4682-5-26>
- Hou, W., Han, J., Lu, C., Goldstein, L. A., Rabinowich, H., Hou, W., ... Rabinowich, H. (2010). Autophagic degradation of active caspase-8 A crosstalk mechanism between autophagy and apoptosis. *Autophagy*, 6(7), 891–900. <https://doi.org/10.4161/auto.6.7.13038>
- Huang, S., Okamoto, K., Yu, C., & Sinicrope, F. a. (2013). P62/sequestosome-1 Up-regulation promotes ABT-263-induced caspase-8 aggregation/activation on the autophagosome. *Journal of Biological Chemistry*, 288(47), 33654–33666. <https://doi.org/10.1074/jbc.M113.518134>

- Jason B. Garrison, Andreas Krieg, Kate Welsh, Yunfei Wen, and J. C. R. (2011). Inhibitor of apoptosis proteins (IAPs). In *Apoptosis Physiology and Pathology* (Vol. Volume 5, pp. 297–321). Cambridge: Cambridge University Press. [https://doi.org/https://doi.org/10.1016/S1566-3124\(01\)05011-8](https://doi.org/https://doi.org/10.1016/S1566-3124(01)05011-8)
- Kaipia, A., & Hsueh, A. J. W. (1997). Regulation of ovarian follicle atresia. *Annual Review of Physiology*, 59(22), 349–363. <https://doi.org/10.1146/annurev.physiol.59.1.349>
- Kasuya, K. (1997). Elimination of apoptotic granulosa cells by intact granulosa cells and macrophages in atretic mature follicles of the guinea pig ovary. *Arch Histol Cytol*, 60(2), 175–184. <https://doi.org/10.1679/aohc.60.175>
- Kerr, J. F. R. (1972). Apoptosis: a Basic Biological Phenomenon With Wide- Ranging Implications in Tissue Kinetics. *Journal of Internal Medicine*, 258(6), 479–517. <https://doi.org/10.1111/j.1365-2796.2005.01570.x>
- Lee, J. W., Park, S., Takahashi, Y., & Wang, H. G. (2010). The association of AMPK with ULK1 regulates autophagy. *PLoS ONE*, 5(11), 1–10. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0015394>
- Lee, Y. K., & Lee, J. A. (2016). Role of the mammalian ATG8/LC3 family in autophagy: Differential and compensatory roles in the spatiotemporal regulation of autophagy. *BMB Reports*, 49(8), 424–430. <https://doi.org/10.5483/BMBRep.2016.49.8.081>
- Letai, A. (2011). The Control of Mitochondrial Apoptosis by the BCL-2 Family. In *Apoptosis Physiology and Pathology* (pp. 44–50). Cambridge: Cambridge University Press.
- Levine, B., & Yuan, J. (2005). Autophagy in cell death: An innocent convict? *Journal of Clinical Investigation*, 115(10), 2679–2688. <https://doi.org/10.1172/JCI26390>
- Liszewska, E., Rekawiecki, R., & Kotwica, J. (2005). Effect of progesterone on the expression of bax and bcl-2 and on caspase activity in bovine luteal cells. *Prostaglandins and Other Lipid Mediators*, 78(1–4), 67–81. <https://doi.org/10.1016/j.prostaglandins.2005.03.003>
- Manabe, N., Inoue, N., Sugimoto, M., Miyamoto, H., Miyano, T., & Sakamaki, K. (2003). Follicle Selection in Mammalian Ovaries: Regulatory Mechanisms of Granulosa Cell Apoptosis during Follicular Atresia. In *The Ovary: Second Edition* (Second Edi, pp. 369–385). Elsevier Inc. <https://doi.org/10.1016/B978-012444562-8/50022-7>

- Mariño, G., Niso-Santano, M., Baehrecke, E. H., & Kroemer, G. (2014). Self-consumption: The interplay of autophagy and apoptosis. *Nature Reviews Molecular Cell Biology*, *15*(2), 81–94. <https://doi.org/10.1038/nrm3735>
- Matikainen, T., Perez, G. I., Zheng, T. S., Kluzak, T. R., Rueda, B. R., Flavell, R. A., & Tilly, J. L. (2001). Caspase-3 gene knockout defines cell lineage specificity for programmed cell death signaling in the ovary. *Endocrinology*, *142*(6), 2468–2480. <https://doi.org/10.1210/en.142.6.2468>
- Maycotte, P., Blancas, S., & Morán, J. (2008). Role of inhibitor of apoptosis proteins and Smac/DIABLO in staurosporine-induced cerebellar granule neurons death. *Neurochemical Research*, *33*(8), 1534–1540. <https://doi.org/10.1007/s11064-008-9637-5>
- McStay, G. P., & Green, D. R. (2011). Mitochondria and cell death. In *Apoptosis Physiology and Pathology* (Vol. 28, pp. 37–43). Cambridge: Cambridge University Press. <https://doi.org/10.1042/bst0280170>
- Meijer, A. J., & Codogno, P. (2004). Regulation and role of autophagy in mammalian cells. *International Journal of Biochemistry and Cell Biology*, *36*(12), 2445–2462. <https://doi.org/10.1016/j.biocel.2004.02.002>
- Mizushima, N., Hosokawa, N., Hara, T., Kaizuka, T., Kishi, C., Takamura, A., ... Oshiro, N. (2009). Nutrient-dependent mTORC1 Association with the ULK1-Atg13-FIP200 Complex Required for Autophagy. *Molecular Biology of the Cell*, *20*(7), 1981–1991. <https://doi.org/10.1091/mbc.E08-12-1248>
- Mizushima, N., Levine, B., Cuervo, A. M., & Klionsky, D. J. (2008). Autophagy fights disease through cellular self-digestion. *Nature*, *451*(7182), 1069–1075. <https://doi.org/10.1038/nature06639>
- Morais, R. D. V. S., Thomé, R. G., Santos, H. B., Bazzoli, N., & Rizzo, E. (2016). Relationship between bcl-2, bax, beclin-1, and cathepsin-D proteins during postovulatory follicular regression in fish ovary. *Theriogenology*, *85*(6), 1118–1131. <https://doi.org/10.1016/j.theriogenology.2015.11.024>
- Morrissy, S. J., Sun, H., Zhang, J., Strom, J., & Chen, Q. M. (2016). Differential Regulation of Bcl-xL Gene Expression by Corticosterone, Progesterone, and Retinoic Acid. *Journal of Biochemical Molecular Toxicology*, *30*(6), 309–316. <https://doi.org/10.1002/jbt>
- Murphy, B. D. (2004). Luteinization. In *The Ovary: Second Edition*. <https://doi.org/10.1016/B978-0-12-444562-8.50012-4>

- Norris, D. O., & Lopez, K. H. (2011). *The Endocrinology of the Mammalian Ovary. Hormones and Reproduction of Vertebrates - Volume 5* (Vol. 5). Elsevier.
<https://doi.org/10.1016/B978-0-12-374928-4.10004-5>
- Orisaka, M., Hattori, K., Fukuda, S., & Fumikazu, K. (2011). Oocyte-thecal Cell Regulatory Loop in the Control of Preantral Follicle Development. *Journal of Mammalian Ova Research*, 28(1), 2–7.
- Ortiz, R., Echeverría, O. M., Salgado, R., Escobar, M. L., & Vázquez-Nin, G. H. (2006). Fine structural and cytochemical analysis of the processes of cell death of oocytes in atretic follicles in new born and prepubertal rats. *Apoptosis*, 11(1), 25–37.
<https://doi.org/10.1007/s10495-005-3347-0>
- Park, J. M., Seo, M., Jung, C. H., Grunwald, D., Stone, M., Otto, N. M., ... Kim, D. H. (2018). ULK1 phosphorylates Ser30 of BECN1 in association with ATG14 to stimulate autophagy induction. *Autophagy*, 8627, 1–14.
<https://doi.org/10.1080/15548627.2017.1422851>
- Pattingre, S., Tassa, A., Qu, X., Garuti, R., Xiao, H. L., Mizushima, N., ... Levine, B. (2005). Bcl-2 antiapoptotic proteins inhibit Beclin 1-dependent autophagy. *Cell*, 122(6), 927–939. <https://doi.org/10.1016/j.cell.2005.07.002>
- Ranaghan, M. J., Durney, M. A., Mesleh, M. F., McCarren, P. R., Garvie, C. W., Daniels, D. S., ... Perez, J. R. (2017). The Autophagy-Related Beclin-1 Protein Requires the Coiled-Coil and BARA Domains to Form a Homodimer with Submicromolar Affinity. *Biochemistry*, 56(51), 6639–6651. <https://doi.org/10.1021/acs.biochem.7b00936>
- Rojas, J., Chávez-Castillo, M., Olivar, L. C., Calvo, M., Mejías, J., Rojas, M., ... Bermúdez, V. (2015). Physiologic Course of Female Reproductive Function: A Molecular Look into the Prologue of Life. In *Journal of Pregnancy* (Vol. 2015).
<https://doi.org/10.1155/2015/715735>
- Ross, M. H., Pawlina, W., Negrete, J. H., & Ross, M. H. (2012). “Sistema Genital Femenino” pp. 830-870 en *Histología : texto y atlas color con biología celular y molecular*. Buenos Aires, Argentina : Editorial Médica Panamericana, [2012].
- Rubinstein, A. D., & Kimchi, A. (2012). Life in the balance – a mechanistic view of the crosstalk between autophagy and apoptosis. *Journal of Cell Science*, 125(22), 5259–5268. <https://doi.org/10.1242/jcs.115865>
- Salminen, A., Kaarniranta, K., & Kauppinen, A. (2013). Beclin 1 interactome controls the crosstalk between apoptosis , autophagy and inflammasome activation : Impact on the aging process. *Ageing Research Reviews*, 12(2), 520–534.
<https://doi.org/10.1016/j.arr.2012.11.004>

- Santos, H. B., Thomé, R. G., Arantes, F. P., Sato, Y., Bazzoli, N., & Rizzo, E. (2008). Ovarian follicular atresia is mediated by heterophagy, autophagy, and apoptosis in *Prochilodus argenteus* and *Leporinus taeniatus* (Teleostei: Characiformes). *Theriogenology*, 70(9), 1449–1460. <https://doi.org/10.1016/j.theriogenology.2008.06.091>
- Shalini, S., Dorstyn, L., Dawar, S., & Kumar, S. (2015). Old, new and emerging functions of caspases. *Cell Death and Differentiation*, 22(4), 526–539. <https://doi.org/10.1038/cdd.2014.216>
- Shimizu, S., Kanaseki, T., Mizushima, N., Mizuta, T., Arakawa-Kobayashi, S., Thompson, C. B., & Tsujimoto, Y. (2004). Role of Bcl-2 family proteins in a non-apoptotic programmed cell death dependent on autophagy genes. *Nature Cell Biology*, 6(12), 1221–1228. <https://doi.org/10.1038/ncb1192>
- Singh, N., & Bose, K. (2015). Apoptosis: Pathways, Molecules and Beyond. In *Proteases in Apoptosis: Pathways, Protocols and Translational Advances* (pp. 1–30).
- Sperandio, S., de Belle, I., & Bredesen, D. E. (2000). An alternative, nonapoptotic form of programmed cell death. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 97(26), 14376–14381. <https://doi.org/10.1073/pnas.97.26.14376>
- Suzuki, S. W., Onodera, J., & Ohsumi, Y. (2011). Starvation Induced Cell Death in Autophagy-Defective Yeast Mutants Is Caused by Mitochondria Dysfunction. *PLoS ONE*, 6(2), 0–7. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0017412>
- Takahashi, Y., Coppola, D., Matsushita, N., Cuaing, H. D., Sun, M., Sato, Y., ... Wang, H. G. (2007). Bif-1 interacts with Beclin 1 through UVRAG and regulates autophagy and tumorigenesis. *Nature Cell Biology*, 9(10), 1142–1151. <https://doi.org/10.1038/ncb1634>
- Takahashi, Y., Meyerkord, C. L., Hori, T., Runkle, K., Fox, T. E., Kester, M., ... Wang, H. G. (2011). Bif-1 regulates Atg9 trafficking by mediating the fission of Golgi membranes during autophagy. *Autophagy*, 7(1), 61–73. <https://doi.org/10.4161/auto.7.1.14015>
- Tanida, I., Ueno, T., & Kominami, E. (2004). LC3 conjugation system in mammalian autophagy. *International Journal of Biochemistry and Cell Biology*, 36(12), 2503–2518. <https://doi.org/10.1016/j.biocel.2004.05.009>
- Tilly, J. L. (2001). Commuting the death sentence: how oocytes strive to survive. *Nature Reviews. Molecular Cell Biology*, 2(11), 838–848. <https://doi.org/10.1038/35099086>

- Tsujimoto, Y., & Shimizu, S. (2005). Another way to die: Autophagic programmed cell death. *Cell Death and Differentiation*, 12, 1528–1534. <https://doi.org/10.1038/sj.cdd.4401777>
- Wirth, M., Joachim, J., & Tooze, S. A. (2013). Autophagosome formation — The role of ULK1 and Beclin1 – PI3KC3 complexes in setting the stage. *Seminars in Cancer Biology*, 23(5), 301–309. <https://doi.org/10.1016/j.semcancer.2013.05.007>
- Worku, T., Rehman, Z. U., Talpur, H. S., Bhattarai, D., Ullah, F., Malobi, N., ... Yang, L. (2017). MicroRNAs: New insight in modulating follicular atresia: A review. *International Journal of Molecular Sciences*, 18(2), 1–14. <https://doi.org/10.3390/ijms18020333>
- Wu, H., Jeffrey Medeiros, L., & Young, K. H. (2017). Apoptosis signaling and BCL-2 pathways provide opportunities for novel targeted therapeutic strategies in hematologic malignances. *Blood Reviews*. <https://doi.org/10.1016/j.blre.2017.08.004>
- Vázquez-Nin, Gerardo H., María Luisa Escobar, M. De Felici, Olga Margarita Echeverría, and Francesca Gioia Klinger. 2011. *Cell death in mammalian ovary*. n.p.: Dordrecht : Springer, 2011, 2011. *LIBRUNAM*, EBSCOhost (accessed April 10, 2018).
- Yang, Z., & Klionsky, D. J. (2009). An Overview of the Molecular Mechanism of Autophagy. *Curr Top Microbiol Immunol*, 335, 1–32. <https://doi.org/10.1007/978-3-642-00302-8>
- Yang, Z., & Klionsky, D. J. (2010). Mammalian autophagy: core molecular machinery and signaling regulation. *Current Opinion in Cell Biology*, 22(2), 124–131. <https://doi.org/10.1016/j.ceb.2009.11.014>. Mammalian
- Young, A. R. J., Chan, E. Y. W., Hu, X. W., & Köchl, R. (2006). Starvation and ULK1-dependent cycling of mammalian Atg9 between the TGN and endosomes. *Journal of Cell Science*, 119(18), 3888–3900. <https://doi.org/10.1242/jcs.03172>
- Yue, Z., Jin, S., Yang, C., Levine, A. J., & Heintz, N. (2003). Beclin 1, an autophagy gene essential for early embryonic development, is a haploinsufficient tumor suppressor. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 100(25), 15077–82. <https://doi.org/10.1073/pnas.2436255100>