



BENEMÉRITA UNIVERSIDAD AUTÓNOMA DE PUEBLA

Facultad de Ciencias Químicas
Departamento de Farmacia

Tesis Profesional

Expresión de la proteína Arl6ip1 en los ovarios de ratas neonatas

Que para obtener el título de
Lic. Químico Farmacobiólogo

Presenta
Maricela Otero Negrete

Directores de la Tesis

MC. Félix Luna Morales, Laboratorio de Neuroendocrinología.

Dra. María Isabel Martínez García, Laboratorio de Neuroquímica.

Puebla, Pue., 8 de diciembre de 2015

ÍNDICE

1. INTRODUCCIÓN.....	1
1.1 Familia de las proteínas reticulon (RTN).....	1
1.2 Localización de la proteína Arl6ip1 en membranas intracelulares.....	5
1.3 Estudios previos de las funciones Arl6ip1.....	7
1.4 Interacción de Arl6ip1 con otras proteínas por análisis in sílico.....	12
1.5 Evaluación de transcritos en el ovario de ratas Sprague-Dawley.....	14
1.6 Regulación de los ovarios por el eje hipotálamo-hipófisis-ovario.....	15
1.7 Foliculogénesis en los ovarios.....	15
1.8 Diferenciación y proliferación celular en los folículos ováricos.....	17
1.9 Transición de folículo primordial a folículo primario.....	18
1.10 Transición de folículo primario a folículo secundario.....	18
1.11 Atresia folicular.....	21
1.12 La foliculogénesis en los ovarios de la rata.....	22
2. JUSTIFICACIÓN.....	23
3. HIPÓTESIS.....	24
4. OBJETIVO GENERAL.....	24
4.1 Objetivos particulares.....	24
5. DIAGRAMA DE TRABAJO.....	25
6. MATERIALES Y MÉTODOS.....	26
6.1 Animales.....	26
6.2 Obtención y tratamiento de los ovarios.....	26
6.3 Tinción de hematoxilina y eosina.....	26
6.4 Inmunohistoquímica para localizar células Arl6ip1-positivas.....	26
6.5 Número de células Arl6ip1-positivas.....	27
6.6 Pruebas estadísticas.....	27

7. RESULTADOS.....	28
7.1 Folículos en los ovarios teñidos con H-E y visualizados por microscopia óptica.....	28
7.2 Células ováricas Arl6ip1-positivas visualizadas por inmunohistoquímica.....	29
8. DISCUSIÓN.....	35
9. CONCLUSIÓN.....	41
10. REFERENCIAS.....	42
ANEXOS.....	47

RESUMEN

En este trabajo estudiamos la proteína 1 de interacción semejante al factor 6 de ribosilación ADP (Arl6ip1). El nombre se deriva de la homología con las proteínas de ribosilación 6 de la familia Arl. La proteína Arl6ip1 está implicada en diversos procesos celulares como; tráfico de membranas, diferenciación, señalización, proliferación y apoptosis. En las ratas, para continuar su estudio, utilizamos ovarios de animales neonatas dado que la foliculogénesis ocurre durante la primera semana de vida y en ella ocurre diferenciación y proliferación de las células para formar los folículos primordiales, primarios y secundarios siendo un buen modelo de estudio de la expresión de las proteínas implicadas en estos procesos. A continuación explicaremos algunos estudios realizados sobre el gen y la proteína Arl6ip1, la mayoría de ellos realizados en líneas celulares en cultivo.

ABREVIATURAS

ADN	Acido desoxirribonucleico
ADP	Adenosina difosfato
AhR	Receptor de hidrocarburos de tipo arilo
AMH	Hormona anti-Mülleriana
ANOVA	Análisis de varianza
ARF	Factor de ribosilación del ADP
ARL	Factor de ribosilación semejante (ARF)
Arl6ip1	Factor de ribosilación semejante al factor 6 de interacción 1
ARMER	Regulador de la apoptosis en la membrana del retículo endoplásmico
ARNm	Ácido ribonucleico mensajero
AU	Unidades arbitrarias
bFGF	Factor de crecimiento básico derivado de fibroblastos
BMP15	Proteína morfogénica del hueso 15
Cep-4F	Vector 4F
CG	Células de la granulosa
CNP	Conofilina
COS	Células de riñón de simio
CT	Células de la teca
CTGF	Factor de crecimiento derivado del tejido conjuntivo
DHH	Desert Hedgehog
DPA	Vector de expresión
EEM	Error estándar de la media
EGF	Factor de crecimiento epidérmico
EGFR	Receptor del factor de crecimiento epidérmico
FSH	Hormona folículo estimulante
GDF9	Factor de crecimiento y diferenciación 9
GnRH	Hormona liberadora de las gonadotropinas
HA	Hemaglutinina

IL-6	Interleucina 6
KL	Ligando Kit
KKNE	Lisina, Lisina, Asparagina y glutamina
KKXX	Lisina, Lisina más dos aminoácidos
KGF	Factor de crecimiento derivado de queratinocitos
LH	Hormona luteinizante
LIF	Factor inhibidor de leucemia
MO	Modificado
NPA	Biotinylated Narcissus Pseudonarcissus
NSP	Proteína específica neuroendocrina
PBS	Buffer de fosfatos
PBS-T	Buffer de fosfatos con tritón
PCR	Reacción en cadena de la polimerasa
Rab	proteínas pequeñas de unión a GTP
Ras	Sarcoma en ratas.
RE	Retículo endoplásmico
SHH	Sonic hedgehog
SNX1	Sorting nexina-1
SSS	Vector de expresión
Sar	proteínas relacionadas con Ras y asociadas con la secreción
TM	Transmembrana
TNF- α	Factor de necrosis tumoral
UV	Ultravioleta

1. INTRODUCCIÓN

1.1 Familia de las proteínas reticulon (RTN)

En el año 2003 Luna y colaboradores reportaron un nuevo transcripto expresado en el ovario de las ratas (Figura 1A) (GenBank: AY316590.1), se trata del gen *Arl6ip1* que está constituido por 6 exones (Figura 1B) que codifican la proteína de interacción 1 semejante al factor 6 de ribosilación ADP también llamada proteína *Arl6ip1* que posee 203 aminoácidos (Figura 2A) que en la región c-terminal posee el dominio KKNE que identifica a la proteínas reticulon (RTN) (Figura 2B). Se trata de una proteína específica neuroendocrina (NSP) que en células en cultivo se ha identificado en las membranas del retículo endoplasmático.

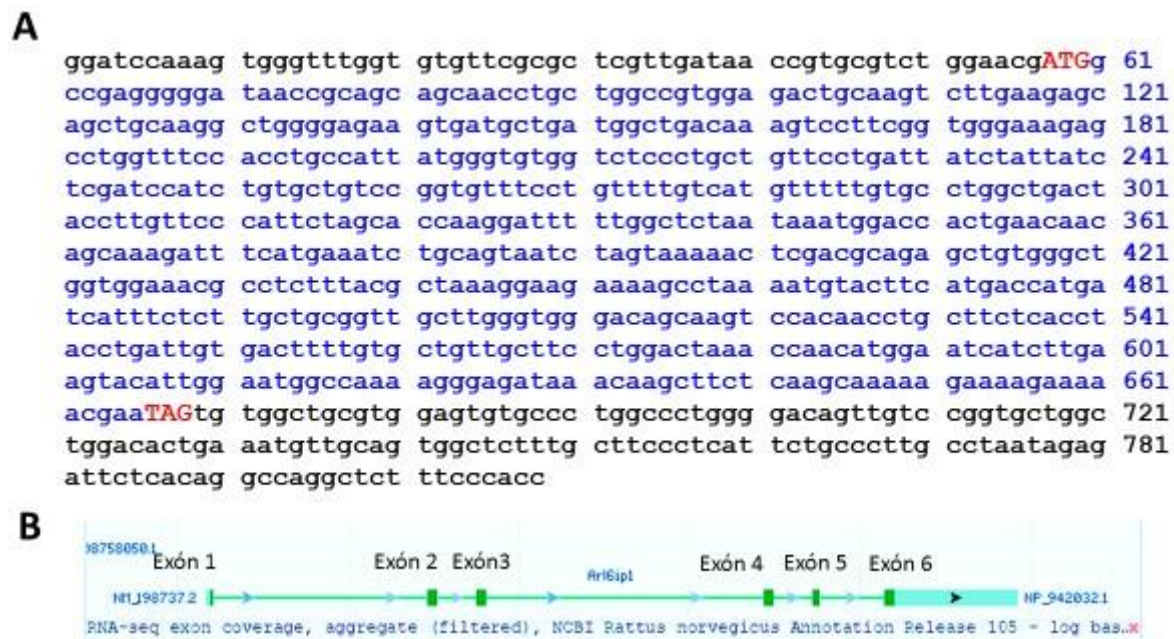


Figura 1. A. Secuencia genómica del ARNm de *Arl6ip1* de rata. Estructura genómica del gen *Arl6ip1*. B. El gen tiene 6 exones (cuadros de color verde). GeneBank AY316590 (Luna et al., 2003).

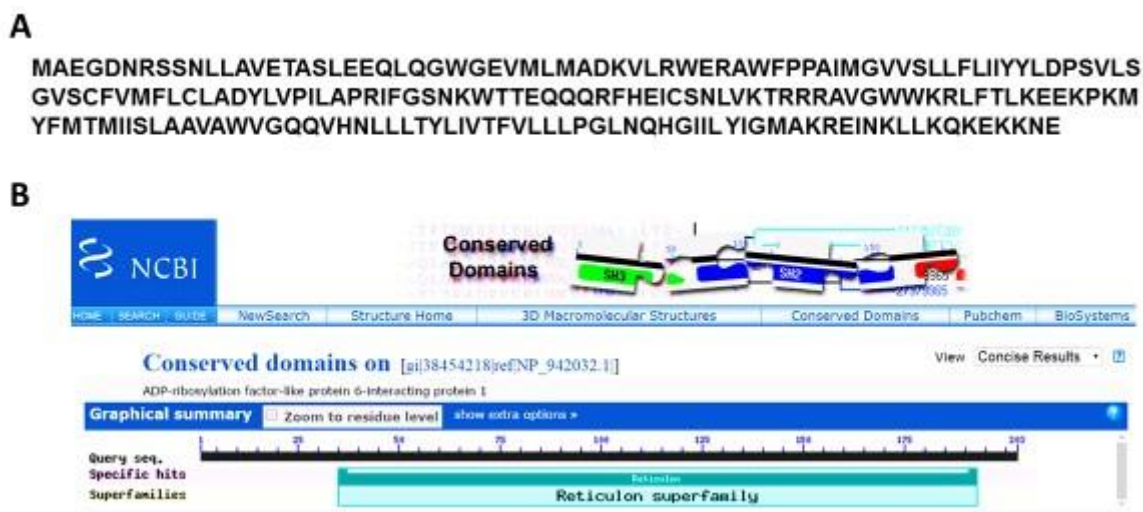


Figura 2. A. Secuencia de aminoácidos de la proteína Arl6ip1 con el dominio KKNE en el extremo c-terminal. B. Dominio conservado reticulon en la proteína Arl6ip. AY316590, GeneBank. http://www.ncbi.nlm.nih.gov/Structure/cdd/wrpsb.cgi?seqinput=NP_942032.1

La familia de proteínas RTN incluye nuevas secuencias de eucariontes que tienen amplia distribución filogenética. Sin embargo se han identificado a 250 proteínas semejantes o RTNL, los genes que se han identificado en muchas especies de animales vertebrados, también en hongos y en plantas (Figura 3). La proteína Arl6ip1 también tiene homólogos en diversas especies. Se comparó la secuencia de aminoácidos presentes en cuatro vertebrados y vemos que las secuencias humanas, de rata y de ratón muestran alta homología, solo tienen cuatro sustituciones de aminoácidos pero con dominio conservado (Figura 4). La secuencia completa de la rata diverge solo en un aminoácido con la del ratón (No mostrado) sin embargo, las secuencias tienen el 99 % de homología. Existen secuencias parciales del pez cebra, *Xenopus laevis*, y *Brugia malayi*, pero también con alta homología. Cabe señalar que homología significativa pero más distante se encuentra en las moscas *Drosophila melanogaster* (Figura 4) [Lui et al., 2003].

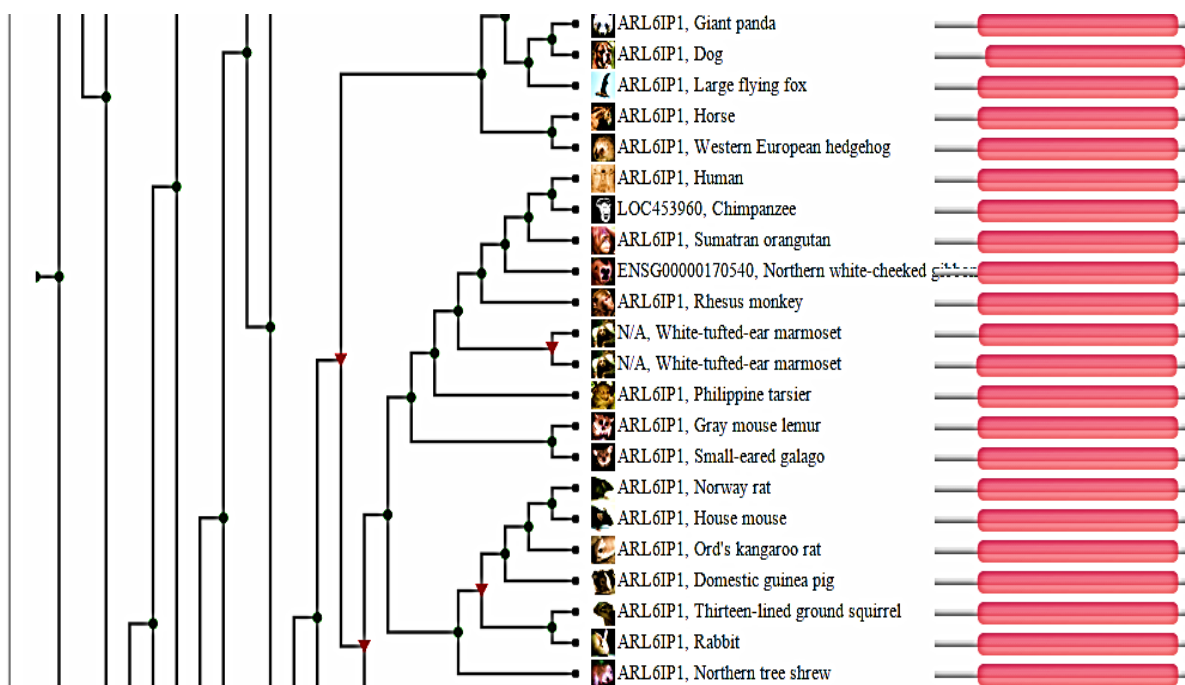


Figura 3. Parte del árbol genealógico del gen Arl6ip1. Se trata de genes conservados que se expresan en las diferentes especies de vertebrados e invertebrados. En todos ellos codifica una secuencia de 203 aminoácidos. TreeFam. <http://www.treefam.org/viewtree/TF105477>

Human	1	MAEGDNRSTNLLAAETASLEEQLQGWGEV	MLMA	33
Mouse	1	MAEGDNRSSNLLAVETASLEEQLQGWGEV	MLMA	33
Zebfish	1	MAEGDNKSANLLAQETSQLLEEQLQGWGEV	ILAG	33
<i>X.lav/B. mal</i>	1	MVEGDNRSTNQLAAETASLEEYFQGWGEV	ILVT	33
<i>D. melano</i>	1	MAASQVDQKRALL- - - - NKLKHDLEPFRTAIVGA		29
1 2				
Human	34	DKVLRWERAWFP PAIMGVVSLLVFLIIYYLDPSV		66
Mouse	34	DKVLRWERAWFP PAIMGVVSLLVFLIIYYLDPSV		66
Zebfish	34	DQILRWEK PWFPGALVSVTTILFTLLIYYLDPSV		66
<i>X.lav/B. mal</i>	34	DRVVRWEK PWFLLVVIIGTVS- - - - -		53
<i>D. melano</i>	30	YGVLTLWEKQYYAGVVF GVTISCLYLVLWYLDLSL		62
Human	67	LSGVSCFVMFLCLADYLVPILAPRIFGSNKWTT		99
Mouse	67	LSGVSCFVMFLCLADYLVPILAPRIFGSNKWTT		99
Zebfish	67	LTGLSCTVMILCLADYLVPILAPRVFGSNKWTT		99
<i>X.lav/B. mal</i>	54	- - - - - LVPILAPRIFGSNKWTT		70
<i>D. melano</i>	63	ITLLSLLGVISILLNYAFPMVSRLLIFGGVNWGDG		95
Human	100	EQQQRFFHEICSNLVKTRRRRAVGWWKRLFTLKEE		132
Mouse	100	EQQQRFFHEICSNLVKTRRRRAVGWWKRLFSLKEE		132
Zebfish	100	EQQQRFFHEICGNLVKTQRRVLGWKRLFALKEE		132
<i>X.lav/B. mal</i>	71	EQQQRFFHEICSNLVKTRRRRAVGWWKRLFSLKEE		103
<i>D. melano</i>	96	DQEAKFFEDVCGQVC AVKGSLLVVMYEYLF- - - NER		126
3 4				
Human	133	KPKMYFMTMIISLA AVAVVGQQVHNLLLTYLIV		165
Mouse	133	KPKMYFMTMIISLA AVAVVGQQVHNLLLTYLIV		165
Zebfish	133	KPKMYFVSVISLVAACAGIGQQ		154
<i>X.lav/B. mal</i>	104	KPKMYFVTMIISLAA		118
<i>D. melano</i>	127	KSTVFVIVMSLGLLAMAWIGAIINNLLLMYL		157
Human	166	TSLLLLPGLNQHGIIILKYIGMAKREINKLLKQK		198
Mouse	166	TFVLLLLPGLNQHGIIILKYIGMAKREINKLLKQK		198
Human	199	EKKNE		203
Mouse	199	EKKNE		203

Figura 4. Secuencias homólogas de aminoácidos de la proteína Arl6ip1 de varias especies. Humano (203 aas), ratón (203 aas), pez cebra (1-154 aas), *X. laevis* (51 aas), *B. malayi* (118 aas) y *D. melanogaster* (157 aas). La proteína está representada en código de letras; las iguales están en caja, las homologas están sombreadas. Con barras negras se marcan los dominios transmembrana [Lui et al., 2003].

Las proteínas RTN tienen longitud variada, van de 200 a 1200 aminoácidos, la mayoría presentes en los vertebrados. Todos ellos comparten en la región carboxilo-terminal de 150-201 aas, un dominio de homología (Figura 5) compuesto por dos regiones hidrofóbicas con una asa de aproximadamente 66 aminoácidos [Oertle et al., 2003]. La proteína RTN1 fue la primera identificada, se expresa en el sistema nervioso central (CNS) y en las células neuroendocrinas de los vertebrados. Las funciones de RTN1 y otras reticulon como RTN2 y RTN3 y RTN4/Nogo son desconocidas, pero todas son abundantes en las membranas del retículo endoplasmático. La nomenclatura "RTN" proviene del símbolo del gen chordata

reticulon, mientras que se ha designado "RTNL" para las proteínas homologas de no cordados. En metazoarios se designan como RTNL, en hongos como RTNLA, en las plantas como RTNLB y en protistas como RTNLC (Figura 5) [Schwab, 2003].

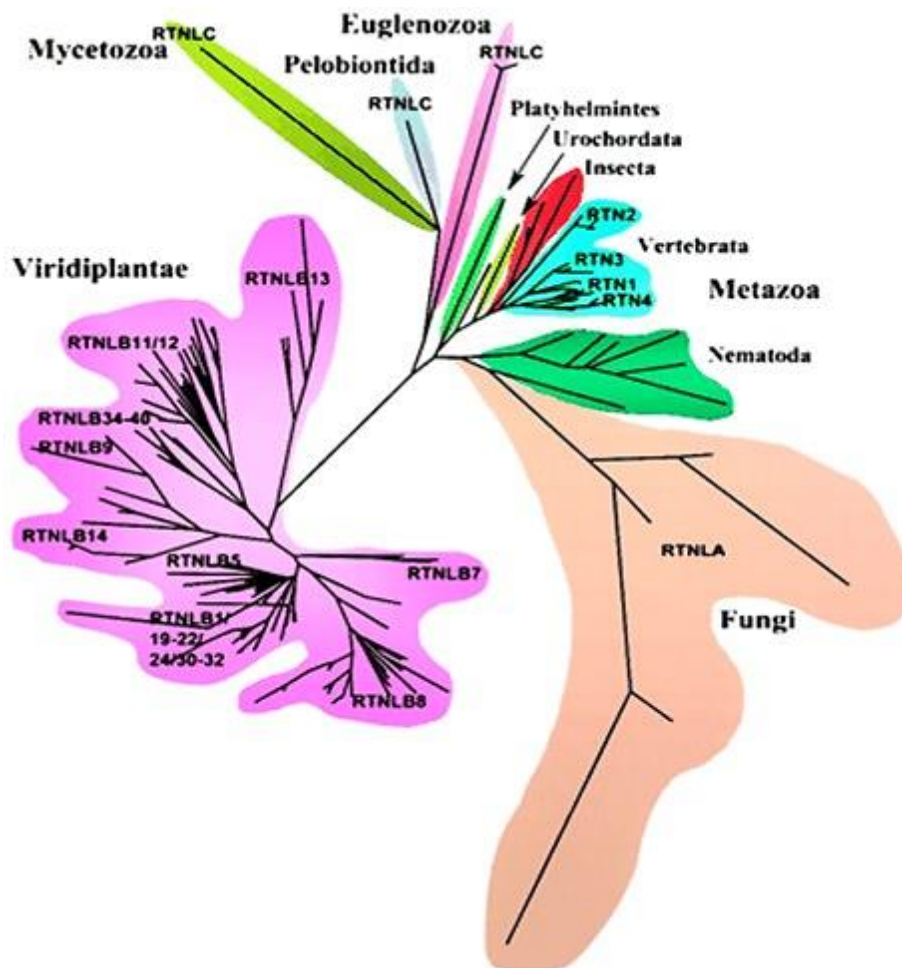


Figura 5. Diagrama de árbol de la distribución taxonómica de los genes reticulon. El gen Arl6ip1 es conservado y se encuentran en invertebrados y vertebrados. Existe en los nematodos, peces cebra, ratas y porcinos entre otros [Modificado de Oertle et al., 2003].

1.2 Localización de la proteína Arl6ip1 en membranas intracelulares

La proteína Arl6ip1 tiene 4 segmentos transmembrana con estructura alfa-hélice (Figura 6). El sitio 2 interacciona con conofilina (CNP), fármaco utilizado en el tratamiento de cáncer ya que es un inhibidor de la función de Ras. Para probar esta interacción se usaron mutaciones y vectores de expresión DPA, NPA y SSS. Los resultados sugirieron que la secuencia del sitio 2 es importante para la interacción con CNP además del segmento

transmembrana 1 (TM1). Los autores concluyeron que el dominio TM1 y TM2 son dominios estructurales transmembrana [Kuroda et al., 2013]. En el extremo C-terminal, la proteína Arl6ip1 tiene la secuencia KKNE, se ajusta al motivo KKXX que se encuentra en las proteínas de membrana del retículo endoplásmico que median su retención en ese organelo. Para investigar si la secuencia KKNE C-terminal también funciona como una señal de retención en el retículo endoplásmico se construyeron mutantes marcados con luciferasa Gausia, en estos se ha eliminado el péptido señal, viendo así que el dominio KKNE no funciona como un motivo de retención [Kuroda et al., 2013].

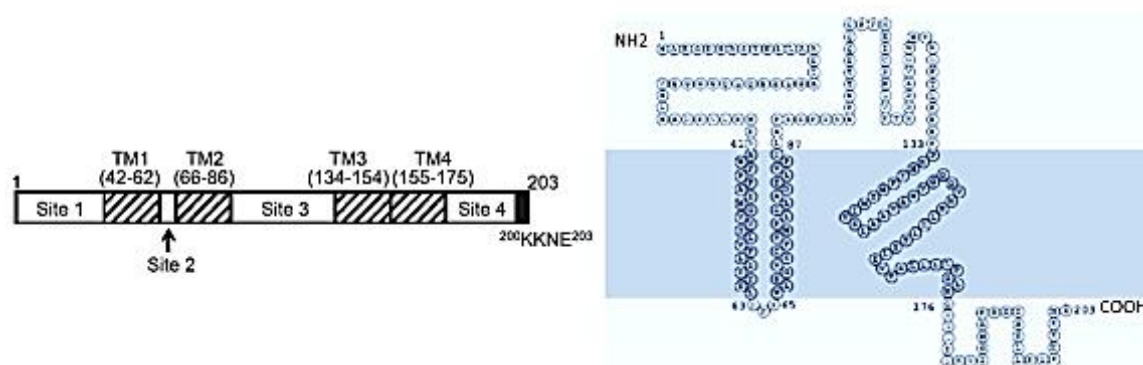


Figura 6. Dominios transmembrana putativos de la proteína Arl6ip1 (cajas rayadas, TM 1-4) y regiones no transmembrana (cajas abiertas; Sitio 1-4). La área de color negro indica la secuencia KKNE [Modificado de Kuroda et al., 2013].

La traducción de Arl6ip1 se ha estudiado *in vitro* en reticulocitos por el sistema de transcripción-traducción acoplado. El peso molecular de la proteína es de 23 kDa, el ARN mensajero tiene el AUG en la posición 60 de la secuencia de nucleótidos siendo el sitio de inicio de la traducción (Figura 7A). La secuencia unida al AUG coincide con la secuencia Kozak sugerida para la iniciación de la traducción en células de eucariotas [Pettersson et al., 2000]. Debido a la falta de anticuerpos específicos para localizar la proteína en las membranas se introdujo un péptido de 9 aminoácidos de la hemaglutinina (HA) del virus de la influenza en el extremo N-terminal, junto al sitio hipotético de inicio de transcripción observando la sobreexpresión por co-precipitación de HA-Arl6ip1 en la línea celular COS y 3T3. La localización de la proteína se determinó por inmunofluorescencia indirecta usando un anticuerpo antiHA. La proteína fue expresada en células COS estando distribuida en el citoplasma, una fracción significativa de ella fue encontrada en membranas del retículo

endoplásmico (Figura 7B), en los fibroblastos de ratón 3T3 se observó un patrón similar de distribución. Aunque la localización de la proteína en las membranas no es completa, estos resultados sugieren que la proteína Arl6ip1 es una proteína integral de la membrana del retículo endoplásmico [Pettersson et al., 2000].

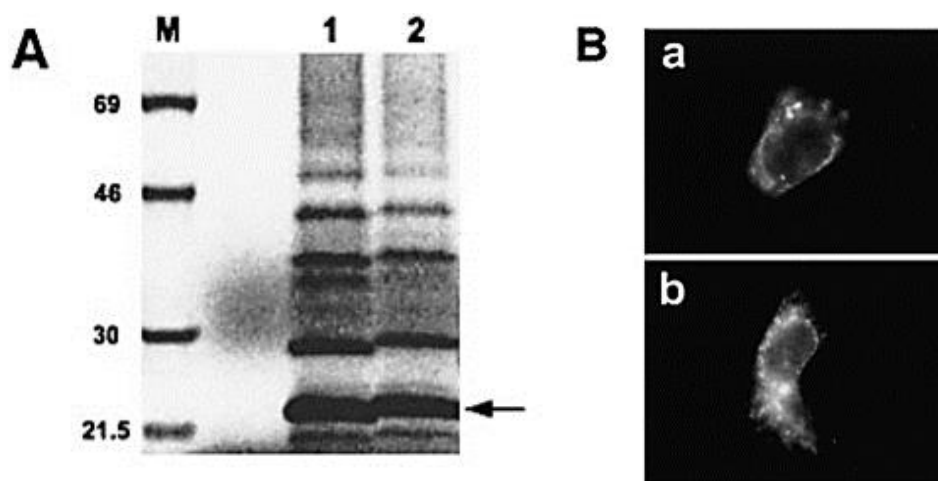


Figura 7. A. Expresión del gen Arl6ip1. Línea 1, cDNA de Arl6ip1. Línea 2, Arl6ip1 HA-etiquetado cDNA. Como marcador de peso molecular se usó la proteína 14C-metilada (M). La flecha indica la banda para la proteína Arl6ip1 con peso molecular de 23-kDa. B. Células COS (a) y células 3T3 (b). La expresión predominante está en las membranas del retículo endoplásmico [Modificado de Pettersson et al., 2000].

1.3 Estudios previos de las funciones Arl6ip1

En los ratones, la transcripción y la traducción del gen Arl6ip1 se ha estudiado en células mieloides en diferenciación. El gen, se ha llamado proteína de interacción 1 semejante al factor de ribosilación 6 (Arl6ip1). En los ratones, es un gen homólogo por su interacción con factor de ribosilación 6. Se expresa en todas las líneas de células hematopoyéticas, pero el más alto nivel de expresión se encuentra en las células progenitoras mieloides (Figura 8). Por inmunofluorescencia se ha mostrado que la proteína Arl6ip1 está predominantemente en membranas intracelulares, lo que se ha sugerido estar implicada en la señalización que ocurre durante la maduración hematopoyética, el tráfico de membranas y en el transporte de las proteínas y en la diferenciación en la proliferación de células hematopoyéticas [Pettersson et al., 2000].

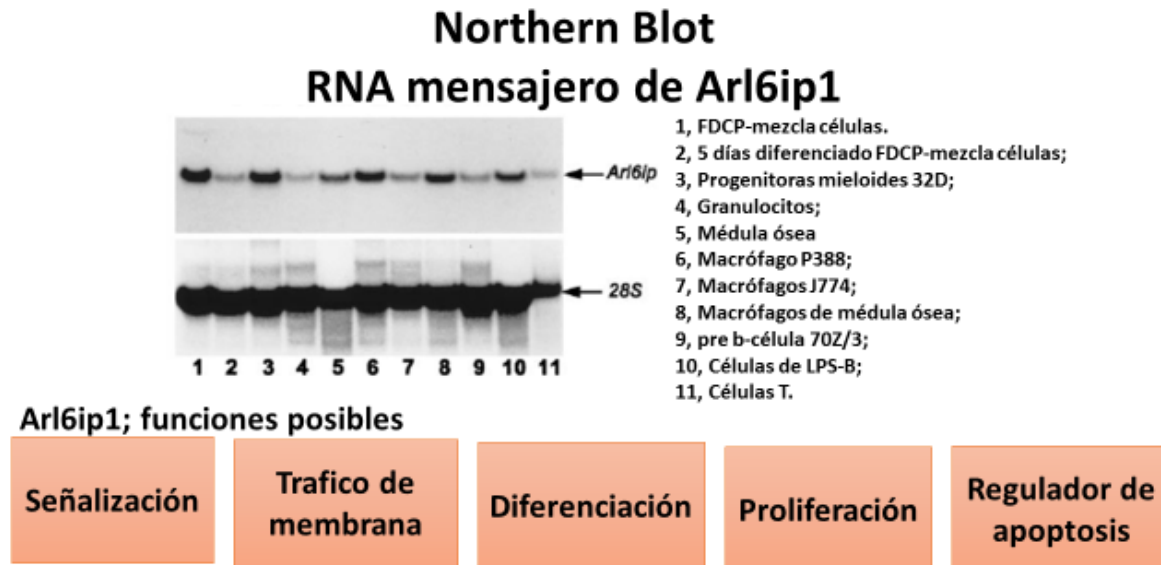


Figura 8. Northern blot para evaluar el peso molecular del mRNA de Arl6ip1 en diferentes líneas de células hematopoyéticas. Se utilizaron células indiferenciadas, células diferenciadas a los cinco días, células de la línea mieloide y células de la línea linfóide. El nivel del mensajero fue alto en células indiferenciadas mieloides [Modificado de Pettersson et al., 2000].

La relación que hay entre la proteína Arl6ip1 y la apoptosis se estudió en células HT1080 de fibrosarcoma. En este artículo le llamaron ARMER (Arl6ip) por su relación con la apoptosis (regulador de apoptosis) [Lui et al., 2003]. Para esto las células HT1080 fueron privadas de suero para inducir las a apoptosis celular y se utilizó el vector cep4F, el cual fue introducido a las células, pero también utilizaron el mismo vector unido a ARMER para observar el fenómeno de apoptosis. Se observó que el porcentaje de células que no sufrieron apoptosis fue mayor en las que tenían cep4F-ARMER a diferencia de las que tuvieron el vector sin el inserto. Esto se debe a que ARMER inhibe la actividad de la caspasa-9 que induce apoptosis, estos resultados los obtuvieron de un lisado de células HeLa y posteriormente midieron la cantidad de caspasas a través de western blot viendo una disminución de éstas, por lo que se ha sugerido que la proteína Arl6ip1 interviene en la supervivencia celular al poseer la capacidad de inhibir a la caspasa 9 (Figura 9) [Lui et al., 2003]. Partiendo de este hallazgo hipotetizamos que la expresión de Arl6ip1 es importante en el proceso de diferenciación celular debido a que las células en canasta presentes en folículos primordiales tienen que separarse y algunas de ellas sufren de apoptosis, por lo que la expresión de Arl6ip1 tendría que disminuir para que estas células en canasta se

separen. Además se ha probado que la proteína Arl6ip1 inhibe la apoptosis inducida por cisplatino, un fármaco usado en el tratamientos del cáncer [Fengjie et al., 2010].

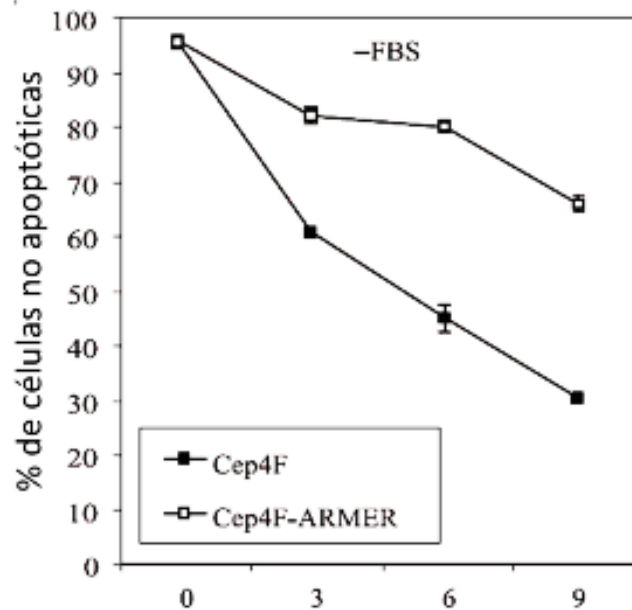


Figura 9. La proteína Arl6ip1/ARMER inhibe la apoptosis en las células HT1080 privadas de suero. Las células HT1080 se transfectaron con el vector (Cep4F) o vector que expresa F-ARMER (Cep4F-ARMER). Se mostró que la presencia de Arl6ip1 aumenta el porcentaje de células no apoptóticas. [Lui et al., 2003].

En otro estudio se ha reportado que la proteína Arl6ip1 participa en el proceso de diferenciación celular. En el desarrollo del embrión de peces cebra, el gen Arl6ip1 tiene alta expresión en las células primordiales de los ojos. La disminución de la expresión de la proteína Arl6ip1 indujo microftalmia, desorganización del patrón de pigmento, cabeza plana, tectum defectuos, además de edema en el pericardio. La disección histológica de las retinas reveló que la diferenciación neuronal se retrasa y faltan capas de células en la retina (Figura 10) [Hsing-Yen et al., 2008; Hsing-Yen et al., 2012]. El estudio se realizó con secuencias de nucleótidos de Arl6ip1-modificado (MO), en donde el Arl6ip1-MO1 se dirige a la región codificante del mRNA de Arl6ip1 y el Arl6ip1-MO2 se dirige a la región no traducida. El Arl6ip1-control-MO sirvió como control negativo siendo una secuencia de MO invertida de Arl6ip1-MO1 (Figura 10A). También se realizó el análisis de transferencia de proteínas totales extraída de individuos salvajes (WT) y de los embriones modificados (MO) con Arl6ip1-MO1-inyectado, como control positivo se usó tubulina.

Encontraron que el Arl6ip1 de los Arl6ip1-modificado estaba ausente (flecha) (Figura 10B). En los embriones inyectados con Arl6ip1-MO1 hubo defectos fenotípicos como microftalmia (ojos pequeños), edema del pericardio, cabeza plana, tronco deformado, pigmento irregular y defecto morfológico en las aletas (Figura 11 C-N). La proteína Arl6ip1-modificada (Figura 11Q) fue purificada (Figura 11 P), también hicieron co-inyección de Arl6ip1-ARNm salvaje y Arl6ip1-MO2. Las secciones histológicas para los embriones de tipo salvaje y de arl6ip-modificados fueron examinadas usando la tinción de hematoxilina-eosina (figura 11R, S). En comparación con la morfología de los tejidos de embriones de tipo salvaje, los Arl6ip1-modificado muestran anomalías del desarrollo de diferentes tejidos, incluyendo la retina, encéfalo, faringe, vejiga natatoria e intestino.

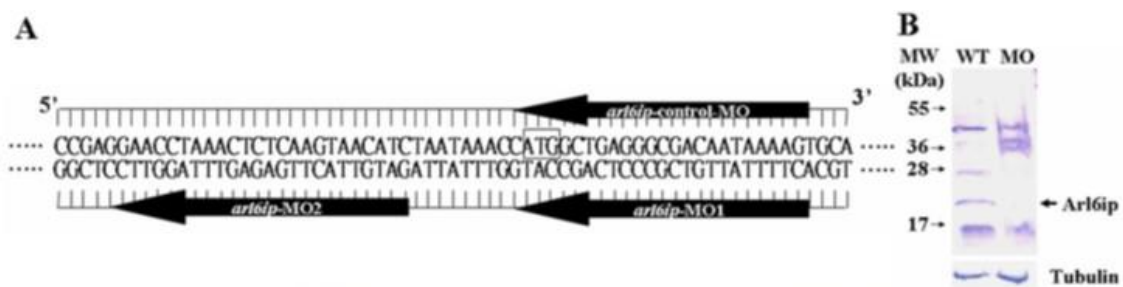


Figura 10. A Secuencias de nucleótidos de Arl6ip1-modificado (MO). Arl6ip1-MO1 se dirigió a la región codificante y Arl6ip1-MO2 se dirigió a la región no traducida. El Arl6ip1-control-MO fue el control negativo MO. **B:** Western de proteínas totales extraídos del tipo salvaje (WT) y de los embriones (MO) Arl6ip1-MO1-inyectados. El Arl6ip1 endógeno está marcado con la flecha [Hsing-Yen et al., 2012].

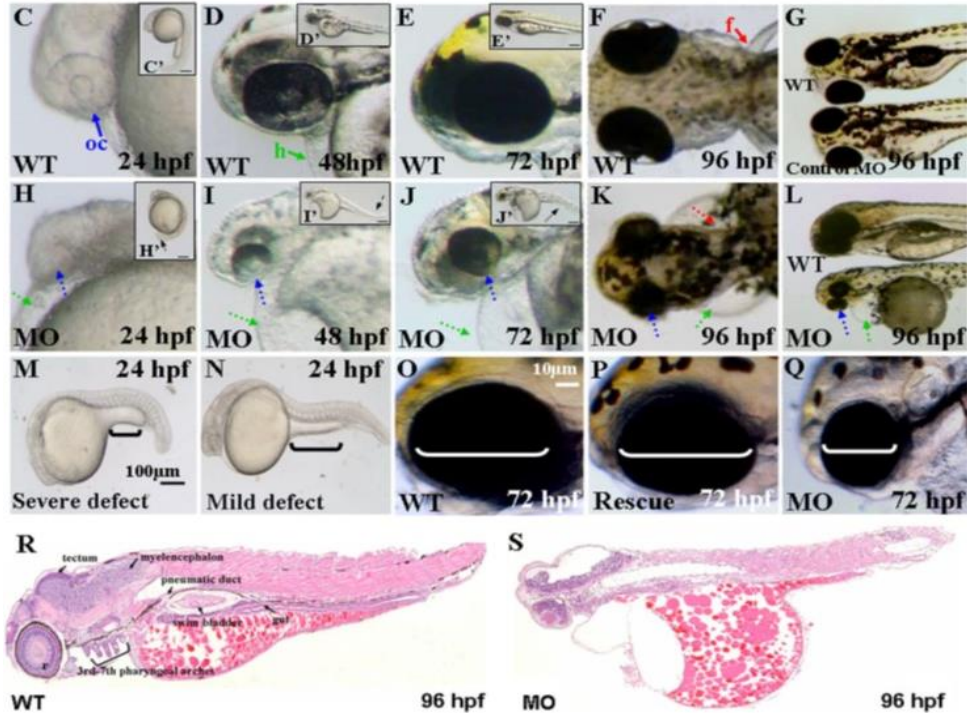


Figura 11. Defectos fenotípicos de los embriones de peces. Con flechas punteadas en color se señalan los embriones inyectados con Arl6ip1-MO1. Las flechas continuas representan el fenotipo normal. Flecha azul: se observa microftalmia. Flecha verde: edema pericárdico. Flecha negra: cabeza plana y tronco deformado. Flecha roja: trastorno en el patrón de pigmento y pectoral con defecto de la aleta. Corchetes: indican la longitud de los diferentes grados de defectos. Tinción de hematoxilina y eosina para comparar la morfología de los tejidos embrionarios salvajes y Arl6ip1-modificados (R, S) [Hsing-Yen et al., 2012].

Otro estudio ha mostrado que la proteína Arl6ip1 está implicada en la formación de los túbulos del retículo endoplásmico. Se observó que la sobreexpresión de Arl6ip1 altera la morfología del retículo endoplásmico. El estudio fue realizado en células HeLa, las cuales fueron transfectadas con HA-Arl6ip1 y con HA-Vapa, se visualizaron por inmunofluorescencia usando el anticuerpo anti-HA mAb y el anti-PDI mAb. En las células que sobre-expresaron HA-Vapa, la proteína ER estuvo en el lumen marcadas con HA-Vapa y PDI, mostraron un patrón característico del retículo endoplásmico (Figura 12) indicando que la sobreexpresión de Vapa no tenía efecto sobre la morfología celular. Por el contrario, la sobreexpresión de HA-Arl6ip1 indujo extenso marcaje de los túbulos del RE y disminuyó significativamente la tinción de PDI, lo que sugirió que Arl6ip1 constituye los túbulos del ER y excluye PDI de ellos (Figura 12), demás, las estructuras aberrantes en el retículo endoplásmico también se formaron. De estos reportes deducimos que Arl6ip1

estabiliza la estructura tubular del retículo endoplásmico y participa en la formación de vesículas de transporte [Yasunori et al., 2013]

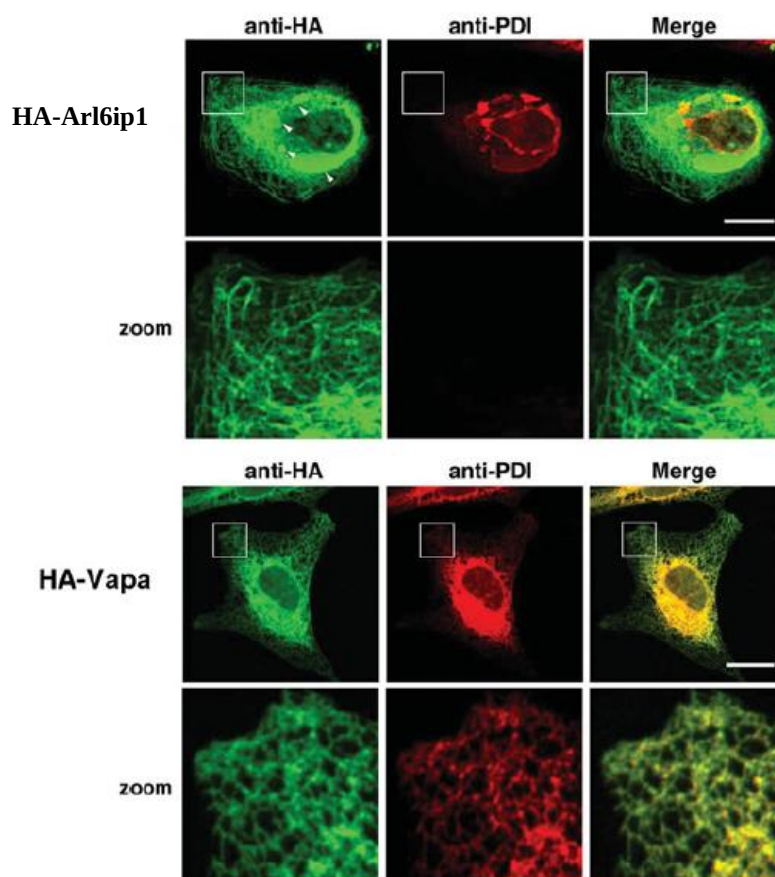


Figura 12. Inducción de la formación de túbulos del retículo endoplásmico por la sobreexpresión de Arl6ip1. Las células HeLa fueron transfectadas con HA-Arl6ip1 o HA-Vapa. Inmunofluorescencia con mAb anti-HA y mAb anti-PDI. Algunas áreas se agrandan para ver los túbulos del retículo endoplásmico. Las puntas de flecha indican las estructuras aberrantes inducidos por la sobreexpresión de Arl6ip1 [Yasunori et al., 2013].

1.4 Interacción de Arl6ip1 con otras proteínas por análisis in silico

Por los estudios realizados hasta ahora con Arl6ip1 se comienzan a establecer sus funciones (tráfico de membranas, señalización, diferenciación celular, apoptosis y proliferación celular) sin embargo aún no son suficientemente claras. Por lo que se realizaron ensayos in silico para abundar en las posibles interacciones de Arl6ip1 con otras proteínas. Encontramos que interactúa con proteínas de la familia ARF, proteínas implicadas en los inicios de la formación de vesículas, con una identidad del 95.8 %. La proteína Arl6ip1 interacciona con la proteína Rab la cual está implicada en unión y fusión

de vesículas. También interactúa con la proteína Desert hedgehog con una identidad del 96.8 %, con la ubiquitina con probabilidad de interacción del 100 % y con la proteína Sonic hedgehog con 99.4 % de probabilidad la cual interviene en los procesos de transcripción (Figura 13). Estas interacciones nos ayudan a entender el comportamiento de la proteína Arl6ip1 y dan directrices sobre las posibles funciones en la célula. Estos datos fortalecen su participación en el tráfico de membrana por su relación con las proteínas ARF debido a que se encuentran formando parte de la membrana de vesículas de transporte [Cooper et al., 2007 A] Otra posibilidad es que participe en la apoptosis y el desarrollo celular por la interacción con la ubiquitina, regulando el nivel de proteína Arl6ip1 presente en las membranas intracelulares.

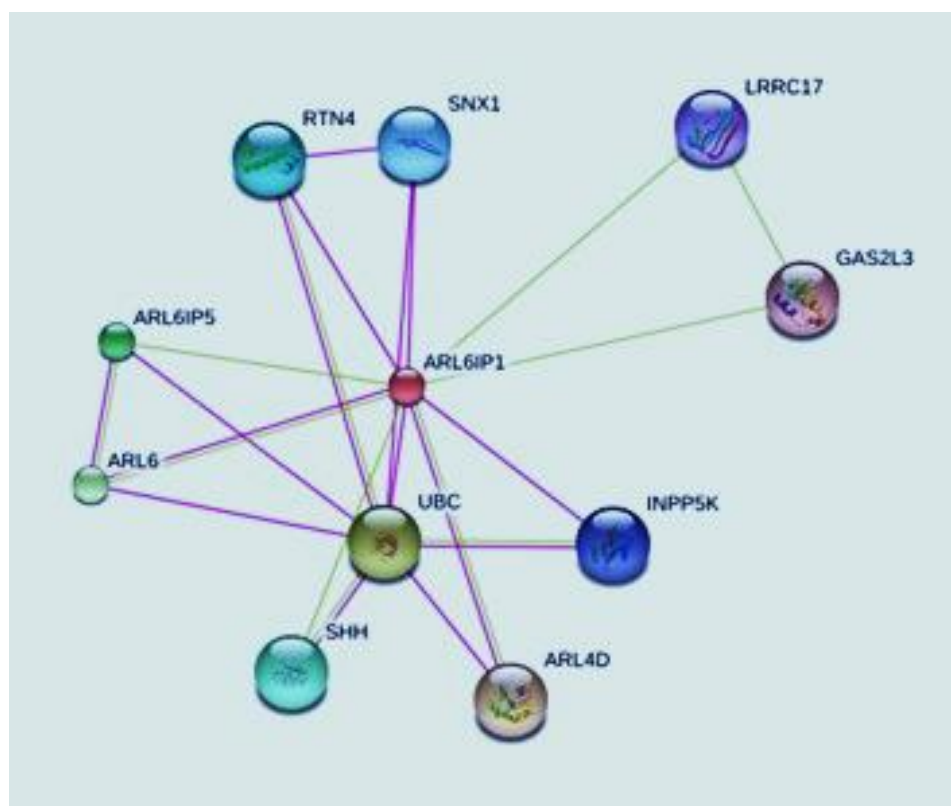


Figura 13. Interacción de Arl6ip1 con otras proteínas. Ubiquitina C, factor de combinación 0.97 (UBC), Proteínas semejantes a los factores de ribosilación, factor de combinación 0.97 (ARR4D, ARLIP5 y ARL6), Proteína Sonic Hedgehog, factor de combinación 0.80 (SHH), Proteína nexina 1, factor de combinación 0.74 (SNX1) y Proteína con repetidos de leucina, factor de combinación 0.62 (LRRC17). Programa String 10 (Szklarczyk et al., 2015).

1.5 Evaluación de transcripto en el ovario de ratas Sprague-Dawley

En ovarios de rata neonata se ha determinado el nivel del transcripto por transcripción reversa (RT) y reacción en cadena de la polimesasa (PCR). Al amplificar el transcripto del gen *Arl6ip1* se encontró que aumenta 62 % a 96 horas de edad y se mantiene alto a las 144 horas en relación a su nivel basal obtenido a los 21 días de gestación. En el adulto hay alto nivel de transcripto sin embargo es menor que a los 4 días de edad (Figura 14) [resultados aún no publicados].

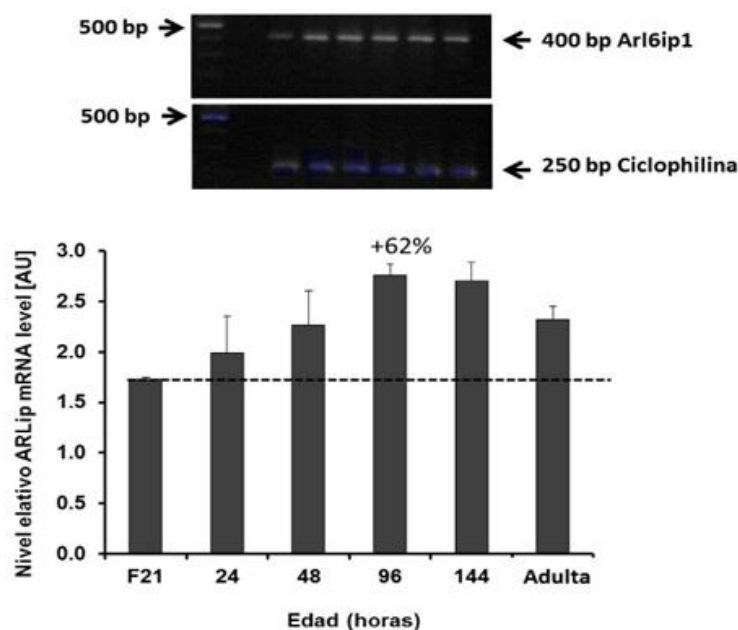


Figura 14. Transcripto del gen *Arl6ip1* en ovarios de rata Sprague-Dawley a la edad fetal 21 días, 24, 48, 96 y 144 horas postnatales y adultos jóvenes evaluados por RT-PCR. A los 4 días (96 horas) el transcripto aumenta en relación con la edad fetal 21 días (Laboratorio de neuroendocrinología, FCQB, Datos no publicados)

Considerando que la proteína *Arl6ip1* se ha considerado como una proteína neuroendocrina, pensamos que un buen modelo de estudio son los ovarios de ratas neonatas ya que son órganos neuroendocrinos en ocurren procesos de tráfico de membrana, diferenciación, señalización y apoptosis celular en el mismo intervalo del desarrollo de los ovarios.

1.6 Regulación de los ovarios por el eje hipotálamo-hipófisis-ovario

Los ovarios de la rata se localizan en la cavidad abdominal y en posición posterior con relación a los riñones, están unidos por el mesoovario al ligamento ancho, al que también se une el útero en la cavidad pélvica dorsal. Los ovarios presentan dos zonas; la corteza en la periferia y la médula en la región central. En la corteza se localizan los folículos inmaduros, y su número y tamaño depende de la edad del animal y del ciclo reproductivo (Luna y Martínez, 2005; Hofstetter et al., 2006). Durante el desarrollo folicular el hipotálamo produce la liberación pulsátil de la hormona liberadora de las gonadotropinas (GnRH) que estimula en la hipófisis la liberación de la hormona luteinizante (LH) y de la hormona estimulante de los folículos (FSH). Estas gonadotropinas estimulan el crecimiento de los folículos y la síntesis de estradiol el cual aumenta gradualmente en esta fase del desarrollo folicular. La concentración máxima de estradiol provoca la liberación de GnRH, que a su vez induce la liberación de LH y FSH. Al final de la fase folicular, el folículo maduro libera su ovocito a la cavidad peritoneal. Después de la ovulación inducida por el aumento de la LH, el estradiol disminuye a su nivel basal (3 a 12 ng/mL) (Figura 13) (Maeda et al., 2000). Las funciones fundamentales de los ovarios son la maduración del ovocito y la secreción de las hormonas esteroideas y peptídicas. Los ovarios proporcionan las células fertilizables y producen hormonas como el estradiol y la progesterona. Durante el desarrollo de los folículos, sus células se transforman caracterizando a los diferentes estados de desarrollo de los folículos, después de la ovulación, las células remanentes se transforman formando al cuerpo lúteo. Durante este proceso también se desarrollan las arterias y las venas siendo fundamentales para el aporte de nutrientes a las células del ovario [Pinilla et al, 2010].

1.7 Foliculogénesis en los ovarios

La foliculogénesis se lleva a cabo en la corteza del ovario y ayuda a la maduración y al desarrollo de los ovocitos. En las ratas es un proceso que inicia antes del nacimiento; los ovocitos se rodean de una capa de células planas llamadas células pregranulosas estableciendo estrecho contacto entre ellas. Estas células se encuentran envueltas a su vez por la lámina basal que las separa de las células intersticiales, de los vasos sanguíneos, de

los capilares y de los nervios periféricos. Los folículos tienen tres estadios de desarrollo: primordial, primario y secundario [Irusta, 2008]. Los folículos primordiales tienen un ovocito que está rodeado de una capa de células planas, son estructuras que se encuentran por debajo de la túnica albugínea y constituyen la reserva de folículos en reposo, su número disminuye progresivamente durante el periodo reproductivo de la hembra. Los folículos continuamente abandonan el reservorio para convertirse en folículos primarios. Esta transición implica diferenciación del ovocito, en las células foliculares y en el tejido intersticial adyacente. Inicialmente, el ovocito aumenta de tamaño y la capa de células pregranulosas se transforman a células cúbicas y cilíndricas, también hay mitosis con lo que aumentará el espesor del epitelio estratificado del folículo. Entre el ovocito y las células granulosas circundantes, se originan espacios donde se deposita la zona pelúcida que se forma por mucopolisacáridos secretados por las células de la granulosa, después originarán un halo translúcido que rodea al ovocito. Además, hay glicoproteínas y su presencia es característica del folículo primario y preantral (Figura 15) [Elvin y Matzuk, 1998].

El folículo primario (uni-laminar) pasa secundario (multilaminar). Los folículos secundarios poseen arteriolas que forman una red vascular fuera de la lámina basal, por esta vía, las células del folículo entran en contacto con diversos factores tróficos que se encuentran en la sangre. En este estadio del desarrollo folicular, las células de la granulosa forman una población homogénea y adquieren receptores de alta afinidad para la FSH y al estradiol. Simultáneamente a la proliferación de las células de la granulosa, se desarrolla otra capa de células a partir del estroma que forma la teca, la aparición de las células de la teca se asocia a mayor vascularización del folículo. A medida que se forman los capilares, las células teca-intersticiales comienzan a diferenciarse y adquieren receptores a LH, a la vez que aumenta la síntesis de esteroides. La capa de células de la teca se diferencia en interna y externa y junto a ellas hay abundante tejido conectivo. Algunos los vasos sanguíneos penetran la teca externa y después forman el plexo capilar de la teca interna. Dado que estos capilares no penetran la membrana basal, la capa de células de la granulosa permanece libre de ellos durante todo el crecimiento del folículo [Geva y Jaffe, 2004]. Al final de la fase de desarrollo de los folículos preantrales, el ovocito detiene su crecimiento pero mantiene su competencia para posteriormente reiniciar la meiosis. En las mujeres, cuando el folículo alcanza un diámetro aproximado de 0.2 milímetros tiene de seis a doce

capas de células de la granulosa, aparecen espacios irregulares entre ellas que se llena de líquido folicular. Este líquido aumenta en volumen a medida que crece el folículo y los espacios irregulares que se forman entre las células de la granulosa confluyen para constituir el antro. Con la aparición del antro, el folículo se convierte en folículo terciario, a esta fase del desarrollo se denomina fase antral. El folículo antral además tiene epitelio estratificado de células granulosas que se engrosan en uno de sus lados llamado *cumulus*, lo forman células de la granulosa que se unen al ovocito mediante uniones estrechas. Después, la relación con estas células se vuelve laxa debido a la aparición gradual del líquido que llena los espacios intercelulares. Al desprenderse el ovocito, una o más capas de las células del *cumulus* permanecen unidas a él junto con la corona radiada, envoltura celular que persisten alrededor del ovocito aún después de la ovulación. Además, estos folículos se caracterizan por tener baja tasa mitótica y alta relación estrógenos/andrógenos y estrógenos/progesterona en el líquido folicular. Un fenómeno contrario se observa en los folículos atrésicos donde las células de la granulosa pierden su capacidad de aromatización. Desde que el folículo se ha seleccionado, aumenta notablemente de tamaño dando origen al folículo dominante [Kumar et al., 1997].

1.8 Diferenciación y proliferación celular en los folículos ováricos

El desarrollo de folículos primordiales requiere de la capacidad de los ovocitos de desprenderse de los "nidos" y asociarse a las células pregranulosas. Los ovocitos en estos nidos sufren apoptosis al azar hasta que se aíslan y luego se asocian a las células pregranulosas planas para formar el folículo primordial. En un principio, el desarrollo folicular será guiado por el ovocito y posteriormente las células planas y granulosas regularán el crecimiento del ovocito [Rajkovic et al., 2006; Palma et al., 2011]. El conocimiento de proteínas que regulan este proceso es aún fragmentario, sin embargo apoyados en el experimentos realizados en células del fibrosarcoma se propone que la inhibición y expresión de Arl6ip1 regula este proceso. Por otra parte, células de la granulosa son indispensables para el crecimiento de los ovocitos, la diferenciación, la meiosis, la maduración citoplasmática y el control de la transcripción en el ovocito. Cuando el ovocito alcanza un determinado de tamaño, secreta factores que inhiben el crecimiento

de las células de la granulosa. Esto indica que el ovocito determina no sólo el crecimiento del folículo, sino también su propio crecimiento [Rajkovic et al., 2006; Palma et al., 2011].

1.9 Transición de folículo primordial a folículo primario

En los folículos primordiales, el ovocito detenido en la fase I del diploteno expresa el factor de transcripción (Figα) que participa en la formación del folículo primario. Figα regula la expresión de genes que codifican para algunos componentes de la zona pelúcida y células de la pregranulosa que rodean al ovocito desnudo, son proteínas quimiotácticas y proteínas de adhesión. Otras moléculas que intervienen en este proceso son el ligando kit (KL), el factor inhibidor de la leucemia (LIF), el factor de crecimiento básico derivado de fibroblastos (bFGF) y la insulina. El ligando KL y el factor LIF se producen en las células pregranulosas y su acción aumenta por la insulina, mientras que el bFGF se produce en el ovocito y actúa sobre las células pregranulosas contribuyendo a la supervivencia de los folículos primarios, de esta forma se establece un circuito de retroalimentación entre ambos tipos de células del folículo. También interviene la hormona anti-Mülleriana (AMH), producida por las células de la granulosa ya diferenciadas, esta hormona inhibe el desarrollo de los folículos primordiales. Otro regulador es el receptor de hidrocarburos de tipo arilo (AhR) que regula el número de ovocitos reunidos antes de su diferenciación, aunque su mecanismo de acción se desconoce (Figura 15) [Velázquez y mendieta, 2002A]. Las primeras fases del desarrollo folicular no dependen de las gonadotropinas, su desarrollo de regula por señales paracrinas entre el ovocito y las células circundantes (Tabla 1) [Rajkovic et al., 2006].

1.10 Transición de folículo primario a folículo secundario

Los mecanismos que inician el desarrollo no se comprenden en su totalidad, sin embargo el ovocito tiene un papel clave en la maduración folicular, lo hace a través de diversos factores que están implicados en la proliferación de las células de la granulosa y en el reclutamiento de las células de la teca. Se ha reportado que los factores que intervienen para la transición de folículo primario a folículo secundario son el bFGF, el factor de crecimiento y diferenciación 9 (GDF9), la proteína morfogénica del hueso 15 (BMP15), el

KL, el LIF, el factor de crecimiento derivado del tejido conjuntivo (CTGF), la activina y el factor de crecimiento derivado de queratinocitos (KGF). Los tres primeros los sintetiza el ovocito, mientras que el KL, el LIF, el CTGF y la activina los producen las células de la granulosa, mientras que el KGF la producen las células de la teca. En esta etapa del desarrollo, el bFGF primero actúa estimulando la mitosis y posteriormente favoreciendo la diferenciación de las células de la granulosa que rodean al ovocito, un efecto reforzado por el GDF9 y el BMP15. Por otra parte, KL y LIF favorecen la supervivencia del ovocito y su maduración citoplasmática estimulando su crecimiento y desarrollo. Mientras que el CTGF permite el mantenimiento del fenotipo de las células en el folículo primario, contribuye al reclutamiento de las células de la teca y a su proliferación. Finalmente, las activina y el KGF junto con el bFGF y el estradiol promueven el crecimiento y proliferación de los folículos a través de sus receptores.

Un modelo para estudiar la participación de los factores producidos por los ovocitos o por las células de la granulosa son los folículos en crecimiento y es característico de cada estadio del desarrollo folicular. El KL producido por las células de la granulosa estimula el crecimiento del ovocito y la síntesis de sus productos reguladores, por su parte, el GDF9 produce regulación negativa, suprime la síntesis del primero y disminuye el crecimiento del ovocito. Si bien este modelo parece funcionar en folículos preantrales, la presencia de gonadotropinas altera este equilibrio dinámico (Figura 15). Al final de esta transición celular, las células del folículo comienzan a expresar características fenotípicas que las preparan para el desarrollo folicular dependientes de las gonadotropinas circulantes [Velázquez y mendieta, 2002 B]. Una lista de las proteínas que intervienen en este proceso se presenta en la tabla 1 [Velázquez et al., 2002 B].

DIFERENCIACIÓN Y PROLIFERACIÓN CELULAR EN FOLÍCULOS OVARICOS

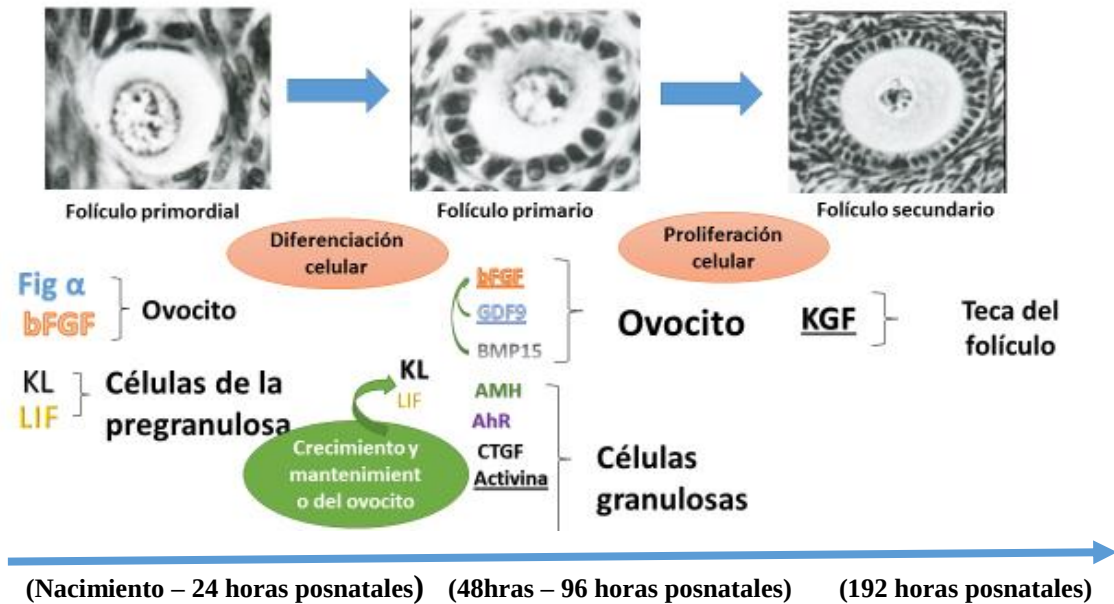


Figura 15. Esquema de los folículos primordiales, primarios y secundarios del ovario. En el esquema también se indican proteínas que participan en la diferenciación del ovocito y en la diferenciación y proliferación de las células de la granulosa. (Modificado de Ross y Pawlina, 2007).

Tabla 1. Factores que participan en la foliculogénesis

FACTOR	ORIGEN	FUNCIÓN
Ligando c-kit	Células somáticas	Migración y proliferación de células germinales
BMP4 y BMP8b	Ectodermo	Generación de células germinales
Conexina 43	Ectodermo	Generación de células germinales
Figα	Ovocito	Coordinación de genes estructurales que codifican la zona pelúcida
BMP15	Ovocito	Diferenciación y proliferación de las células de la granulosa
GDF9	Ovocito	Diferenciación y proliferación de las células de la granulosa
bFGF	Ovocito	Estimulación de la mitosis y diferenciación de las células de la granulosa
KL	Células pregranulosa	Promoción de la transición de folículo primordial a folículo primario
LIF	Células pregranulosa	Promoción de la transición folículo primordial a folículo primario
Insulina	Endocrino	Promoción de la transición de folículo primordial a folículo primario Estimulación de la esteroidogénesis en células de la granulosa y células de la teca
AMH	Células de la granulosa	Inhibición del desarrollo de los folículos primordiales
AhR	Células de la granulosa	Regulación del tamaño de la poza del ovocito
CTGF	Células de la granulosa	Mantenimiento del fenotipo y reclutamiento de las células tecaes
Activina	Células de la granulosa	Proliferación celular y estimulación de la esteroidogénesis
KGF	Células de la teca	Proliferación celular y crecimiento folicular

1.11 Atresia folicular

En los folículos en desarrollo pueden ocurrir dos fenómenos; crecer hasta folículo preovulatorio o degradarse por atresia. Hay atresia tipo A y B. En la atresia A se degenera el ovocito, siendo común en los folículos preantrales, mientras que en la atresia tipo B, la degeneración afecta a las células de la granulosa y es frecuente en los folículos antrales. Ambos tipos de atresia pueden presentarse en cualquier momento del desarrollo de los folículos [Rajkovic et al., 2006]. En la atresia folicular intervienen hormonas esteroides, hormonas peptídicas, factores de crecimiento y diversa citocinas, entre otras. Lo hacen a través de receptores específicos, algunos son ligandos de muerte celular que promueven la apoptosis. Entre los factores que inducen atresia esta la hormona liberadora de gonadotropinas (GnRH) de origen ovárico, los andrógenos, factores pro-inflamatorios

como la interleucina IL-6 y al factor de necrosis tumoral [TNF α]. Otros son los radicales libres acopladas a la síntesis de ceramidas y a través del ligando Fas [Velázquez y Mendieta, 2002 B].

1.12 La foliculogénesis en los ovarios de la rata

En la rata, los folículos primordiales se forman al tercer día de edad postnatal y son el primer grupo que llegará al estadio antral. En el séptimo día después del nacimiento ya hay folículos secundarios. La pubertad ocurre a los 34 días en promedio y los ciclos reproductivos continúan hasta aproximadamente 10-12 meses de edad, momento en el las ratas empiezan a tener ciclos estrales irregulares. El tiempo que lleva el desarrollo de los folículos primordiales hasta folículos preovulatorios es mayor a sesenta días, equivale a 15 ciclos estrales del animal. Dentro de este período se necesitan más de 30 días para que los folículos primordiales se desarrollen hasta folículos secundarios e igual período para que los folículos secundarios lleguen al estado preovulatorio (Figura 16) [McGee y Hsueh, 2000; Parker y Schimmer, 2006].

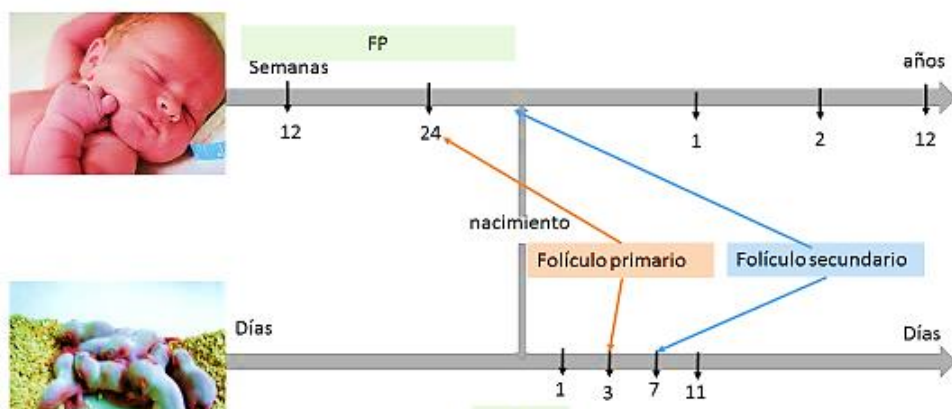


Figura 16. Periodos comparativos del desarrollo folicular en las ratas y mujeres. FP: folículos primordiales (Modificado de McGee y Hsueh, 2000).

2. JUSTIFICACIÓN

En la fisiología del ovario, un tema complejo es la foliculogénesis y su mantenimiento, son fenómenos que involucran tanto factores de diferenciación como de proliferación, sin embargo también ocurre atresia de las células germinales y somáticas. El conocimiento sobre los genes que controlan los procesos de diferenciación y maduración de las células del ovario es fragmentario, algunos estudios sugieren que la proteína Arl6ip1 interviene en la foliculogénesis participando en la señalización intracelular, en el tráfico de proteínas en la membrana, en la proliferación, en la diferenciación, incluso como regulador de la apoptosis. [Pettersson y Cols, 2000]. La localización de la proteína Arl6ip1 por inmunohistoquímica en las células de los folículos ováricos de ratas neonatas dará detalles de su participación en la diferenciación y en la proliferación del ovocito.

3. HIPÓTESIS

La proteína Arl6ip1 se expresa en los ovocitos, células planas y células cúbicas foliculares del ovario de rata neonata.

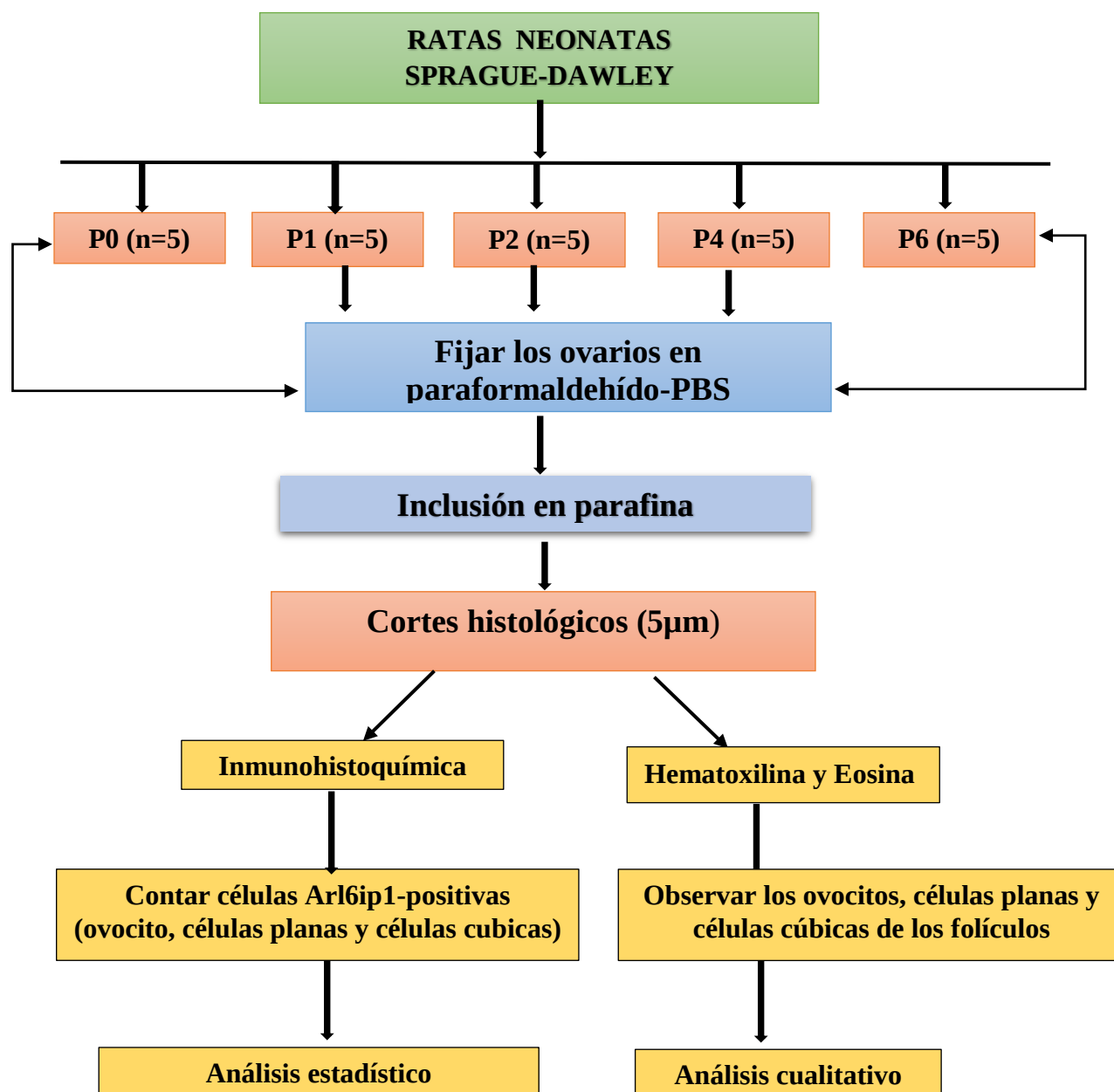
4. OBJETIVO GENERAL

Evaluar la expresión de la proteína Arl6ip1 durante la foliculogénesis del ovario de la rata.

4.1. OBJETIVO PARTICULAR

Evaluar por inmunohistoquímica la presencia de la proteína Arl6ip1 en los folículos primordiales, folículos primarios y folículos secundarios en los ovarios de ratas neonatas

5. DIAGRAMA DE TRABAJO



6. MATERIALES Y MÉTODOS

6.1 Animales

Se emplearon ratas neonatas de la cepa Sprague-Dawley del bioterio “Claude Bernard” de la BUAP de las siguientes edades; al día del nacimiento (P0), al día 1 (P1), día 2 (P2), día 4 (P4 y día 6 (P6). De cada edad se usaron 5 animales (n=5). Los animales empleados en este trabajo fueron tratados siguiendo los criterios para el cuidado y uso de animales en experimentación que estipula la norma oficial mexicana **NOM-062-ZOO-1999** [Secretaría de Agricultura, Ganadería, Desarrollo rural, Pesca y Alimentación. 2001]. Cabe mencionar que esta norma está en concordancia con criterios internacionales como los del NIH de USA.

6.2. Obtención y tratamiento de los ovarios

Las ratas fueron sacrificadas por decapitación, posteriormente se obtuvieron los ovarios que fueron fijados en paraformaldehído al 4% disuelto en buffer de fosfatos (PBS). Después fueron incluidos en parafina siguiendo los protocolos convencionales de deshidratación, infiltración y realización de los bloques de parafina. Finalmente con un micrótopo de deslizamiento (Leica SM2010R) realizamos cortes histológicos del ovario completo de 5 micras de espesor.

6.3. Tinción de Hematoxilina-Eosina

Seleccionamos cortes histológicos de los ovarios y teñimos con la técnica de hematoxilina-eosina. Los cortes fueron desparafinados con xilol 100%, hidratados con soluciones de alcohol y agua. Posteriormente fueron coloreados con hematoxilina, eosina, deshidratados con alcohol a concentraciones crecientes y aclarados en xilol. Finalmente, fueron montados con resina sintética (Anexo 1) para finalmente ser fotografiados en un microscopio Leica DM1000 LED.

6.4. Inmunohistoquímica para localizar células Arl6ip1-positivas

Los cortes histológicos se desparafinaron, se hidrataron y lavaron con buffer de fosfatos-tritón al 2%. La recuperación antigénica se realizó con buffer de citratos (0.1 mM, pH=6) y permeabilizarán con PBS-T. Los epítipes fueron bloqueados con albumina bovina

libre de IgG al 0.5% en PBS-T. Posteriormente fueron lavados con PBS-T por 10 minutos y se añadió el anticuerpo policlonal de ratón ARMER (Santa Cruz, Biotechnology, Inc.) fue diluido 1:50 y se dejado incubar por 20 horas a temperatura de 4 grados Celsius. Transcurrido este tiempo y en oscuridad se realizó un lavado en PBS-T por 5-10 minutos y se le añadió el anticuerpo secundario anti-IgG de cabra acoplado a FITC (Santa Cruz, Biotechnology, Inc.) diluido 1:200, se dejó en agitación por 3 horas. Posteriormente se realizaron lavados cada 15 minutos con PBS-T y 3 minutos en PBS. Los núcleos fueron teñidos con yoduro de propidio (Millipore) diluido 1:1000 por 1:30 minutos. En seguida se realizaron dos lavados con PBS por 10 minutos y 5 minutos con PBS-T. Por último, las laminillas se sellaron con medio de montaje (Millipore) (Anexo 2). La fluorescencia se observó con un microscopio Leica DM1000 LED.

6.5. Número de células Arl6ip1-positivas

Para cada grupo experimental usamos 5 ovarios de ratas diferentes, de los cuales realizamos ensayos independientes de inmunohistoquímica. De los cortes histológicos contamos las células Arl6ip1-positivas en campos representativos usando la herramienta “cell counter” software NIH ImageJ. El resultado cuantitativo final fue medido usando programa “measure” y las células fueron positivas cuando la medición de color fue $\geq$ a 50 unidades arbitrarias (AU), y negativas cuando tuvieron $\leq$ a 49 AU de color.

6.6. Pruebas estadísticas

Los datos fueron sometidos a la prueba estadística ANOVA de una vía junto con comparaciones múltiples de Tukey. Se consideraron diferencias significativas cuando la p fue menor a 0.05 %.

7.0 RESULTADOS

7.1 Folículos en los ovarios teñidos con HE y visualizados por microscopia óptica

En la figura 17 se muestran los folículos del ovario de rata en diferentes estados del desarrollo, al día del nacimiento (P0), al postnatal 1 (P1), P2, P4 y P6. En el P0 y P1 los ovocitos estuvieron agrupados “en canasta” y están señalados con una flecha, los ovocitos están unidos por membranas de las células pregranulosas, posteriormente, algunos ovocitos sufren de apoptosis y los que quedan se separan y se rodean de células planas formando los folículos primordiales. Al P2 mostramos folículos primordiales (flecha), los cuales comienzan a diferenciarse en células cubicas (triangulo). Mientras que al P4 mostramos folículos primarios (flecha), el ovocito está rodeado de una capa de células granulosas cubicas, y al P6 mostramos ovocitos rodeados de dos capas de células cubicas que representan a folículos secundarios (flecha).

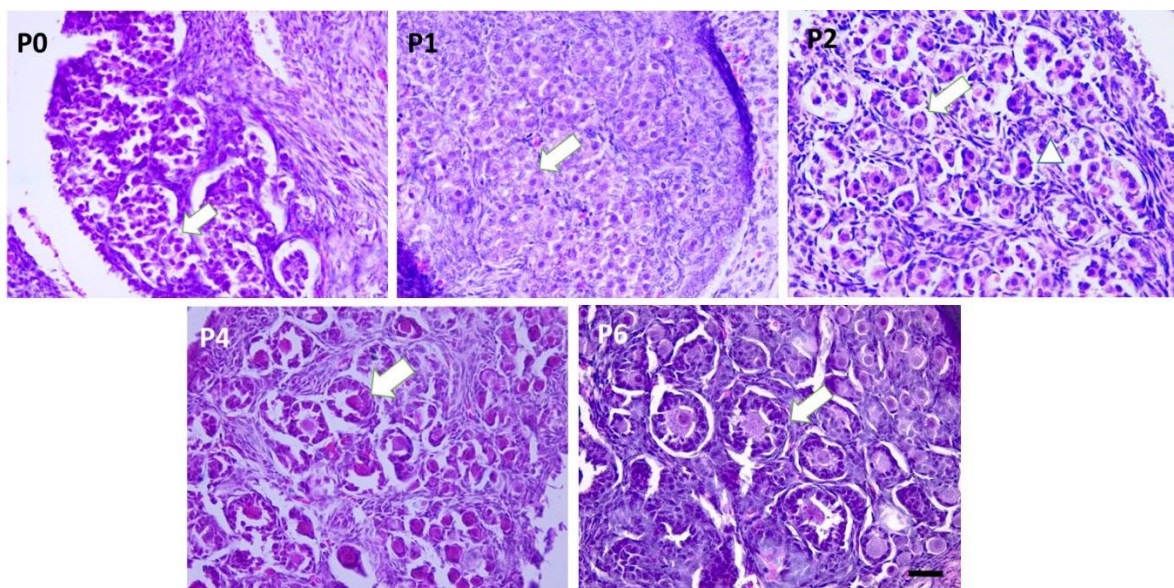


Figura 17. Cortes histológicos representativos de los ovarios rata Sprague-Dawley a diferentes edades posnatales 0, 1, 2, 4 y 6 días de edad (P0, P1, P2, P4 y P6) teñidos con Hematoxilina-Eosina. Escala 25 micras.

7.2 Células ováricas Arl6ip1-positivas visualizadas por inmunohistoquímica

El análisis cualitativo por inmunohistoquímica mostró que las células Arl6ip1-positivas estuvieron en los ovarios de ratas neonatas a todas las edades estudiadas (P0, P1, P2, P4 y P6) (Figura 18). La inmuno-reactividad correspondió tanto a los ovocitos como en las células pre-granulosas (planas) y granulosas (cúbicas) del ovario en desarrollo (Figura 18). En las figuras 19-20 se muestran los ovocitos agrupados formando ordenamiento descritos como células “en canasta”. En la figura 21 folículos primordiales, formados por el ovocito y células pre-granulosas planas. En la figura 22 folículos primarios y en la figura 23 folículos secundarios. Estos últimos están formados por el ovocito y células granulosas cúbicas. Estas imágenes corresponden a los diferentes estadios de la foliculogénesis, un proceso independiente de las hormonas hipotalámicas e hipofisiarias de los animales en desarrollo.

El análisis cuantitativo mostró que al P0, el número de ovocitos Arl6ip1-positivos fue mayor (80 %) en comparación con el número de ovocitos al P1, P2, P4 y P6 respectivamente (Figura 24A), el valor menor lo obtuvimos a los 6 días de edad (Figura 24A). El número de células pre-granulosas Arl6ip1-positivas fue similar a lo encontrado en los ovocitos, alto al día del nacimiento y disminuye en los días subsecuentes (Figura 24B). Las células granulosas Arl6ip1-positivas es baja al nacimiento y después aumenta significativamente al P4 (Figura 24C). A los 6 días de edad (P6), el número de células granulosas Arl6ip1-positivas disminuyó en comparación con el número de ellas obtenido al P6 (Figura 24C).

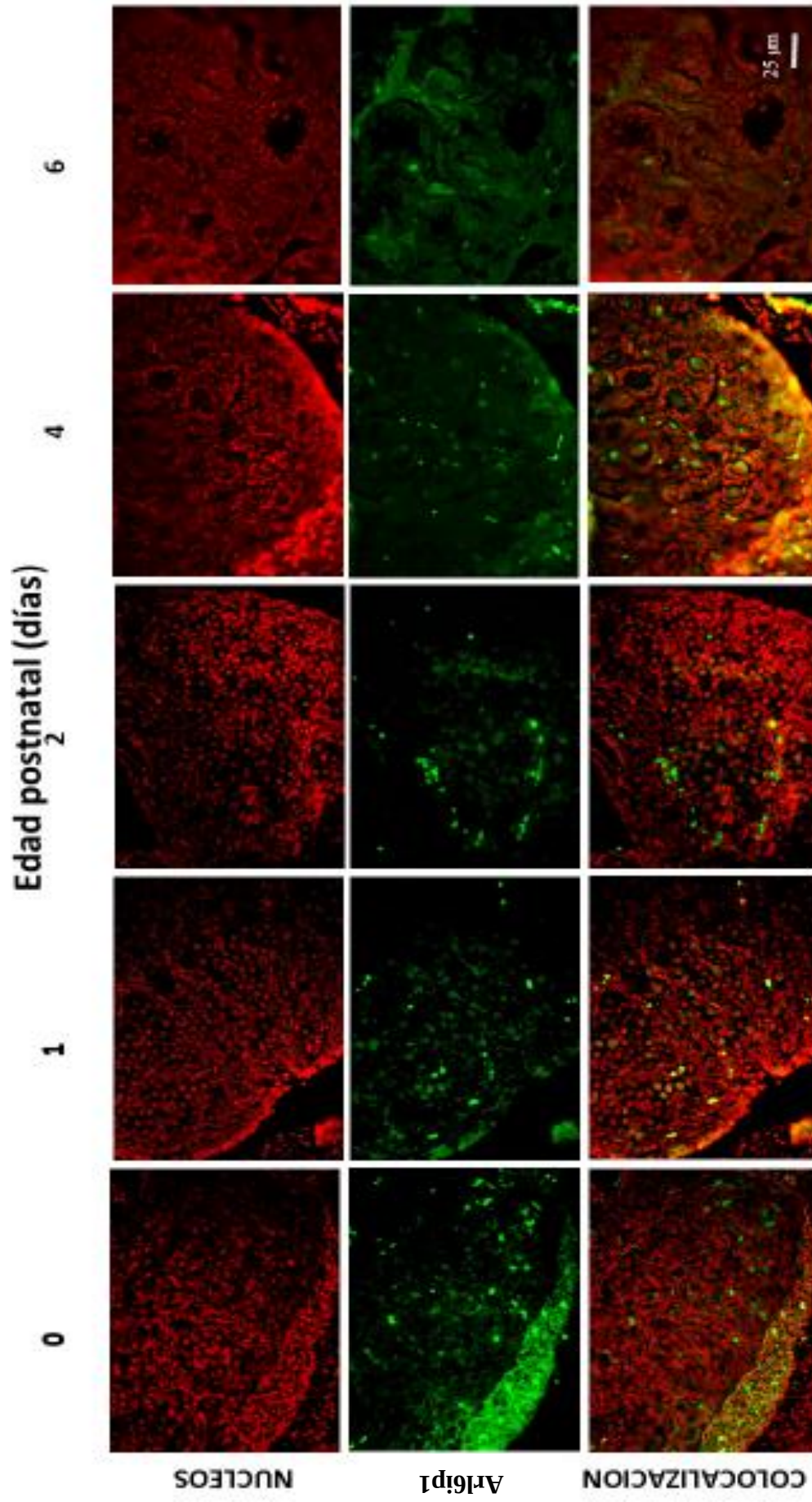


Figura 18. Identificación por inmunohistoquímica de las células Arl6ip1-positivas en ovarios de rata Sprague-Dawley al nacimiento, 1, 2, 4 y 6 días de edad (P0, P1, P2, P4 y P6) respectivamente. En la primera fila, se muestran los núcleos que fueron marcados con iodo de propidio (rojo). En la segunda fila, las células Arl6ip-positivas marcadas con FITC (verde) y en la tercera fila, la co-localización de los dos marcadores. Amplificación 400X. 25 micras.

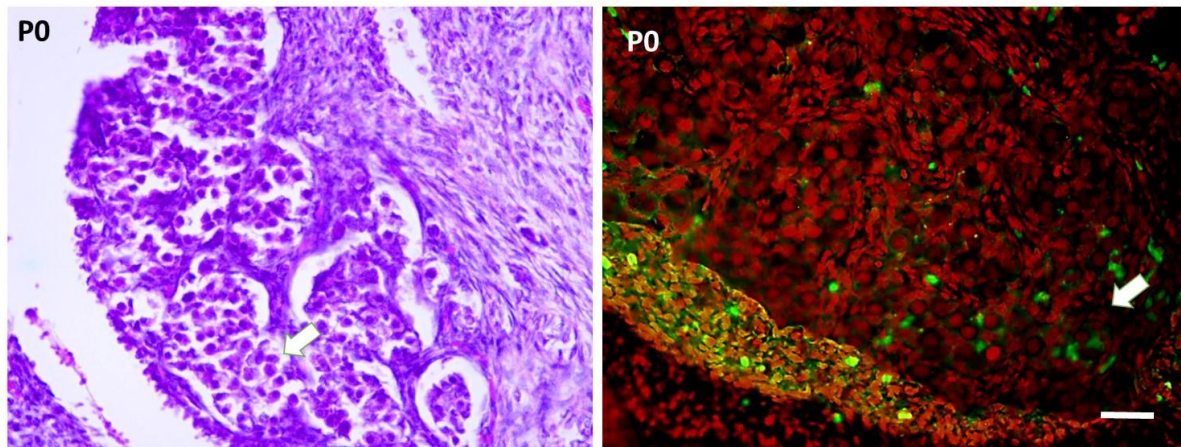


Figura 19. A la izquierda se muestran ovocitos pequeños agrupados “en canasta” de ovarios de rata al P0 teñidos con HE (flecha). Hay alto número de ovocitos, algunos sufren de apoptosis y los restantes se separan rodeándose de células planas y formando los folículos primordiales del ovario. A la derecha mostramos por inmunohistoquímica los ovocitos Arl6ip1-positivos al P0 (punta de flecha). Escala 25 micras.

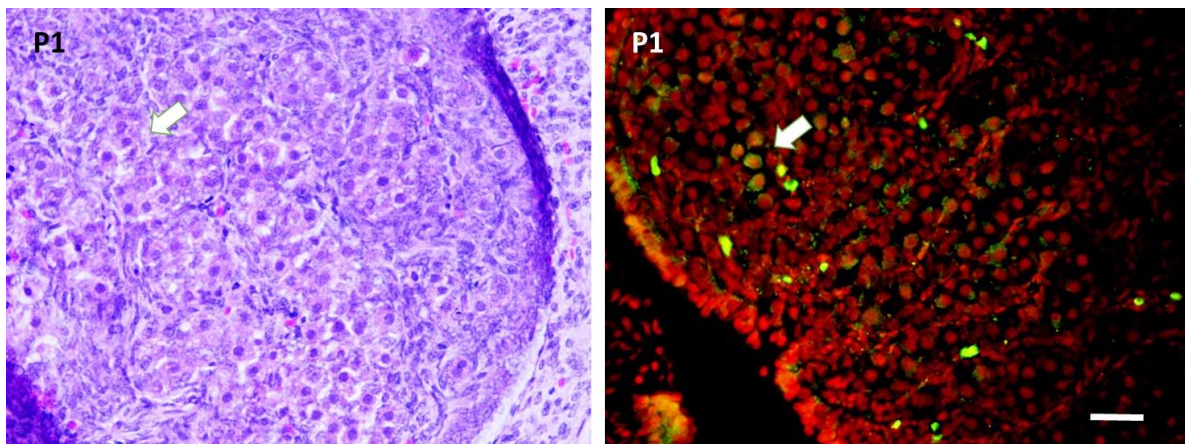


Figura 20. A la izquierda se muestran los ovocitos agrupados “en canasta” al P1 teñidos con HE (flecha), el número de ovocitos disminuye por apoptosis y los ovocitos sanos continúan su proceso de maduración. A la derecha mostramos por inmunohistoquímica los ovocitos Arl6ip1-positivos (punta de flecha). Escala 25 micras.

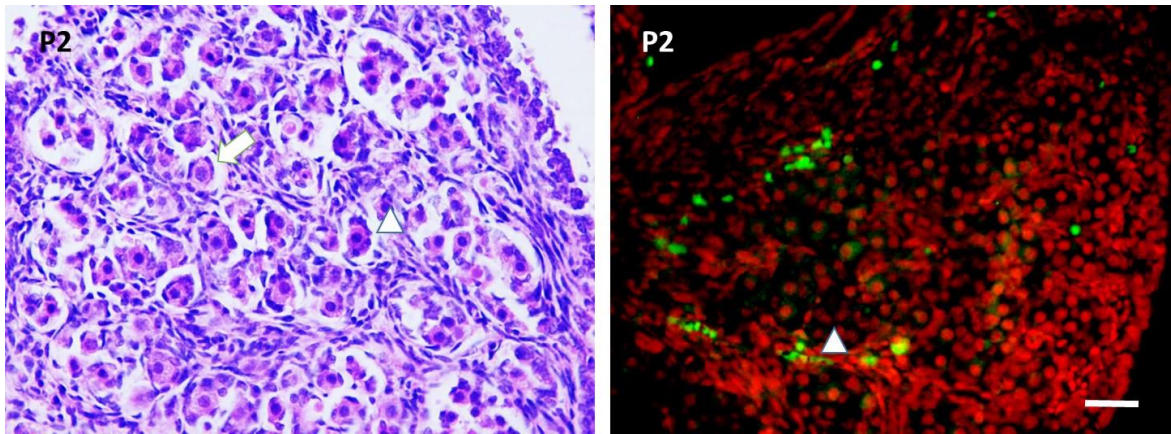


Figura 21. A la izquierda mostramos folículos primordiales en los ovarios de rata al P2 teñidos con HE (flecha 1), son folículos primordiales, los ovocitos están rodeados de una capa de células planas. A la derecha mostramos por inmunohistoquímica las células Arl6ip1-positivas (punta de flecha). Escala 25 micras.

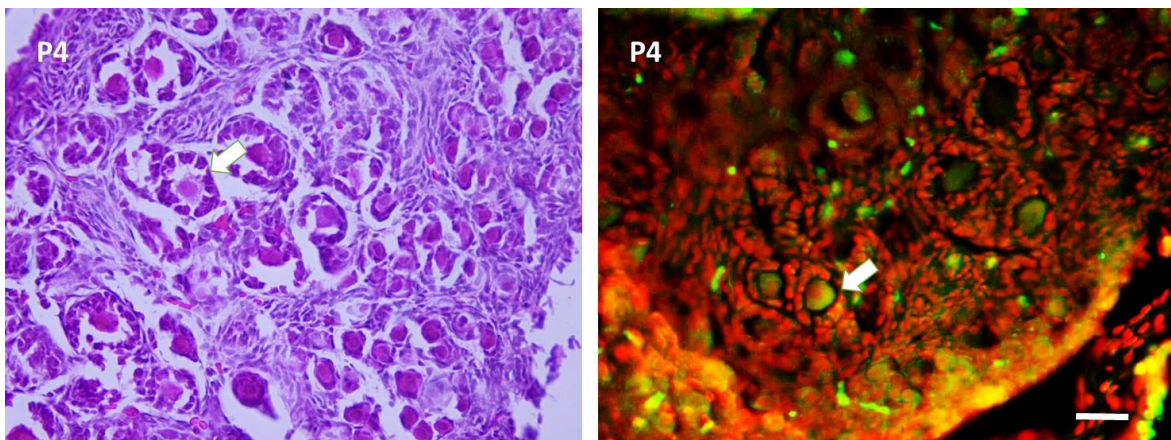


Figura 22. A la izquierda se muestran folículos primarios de ovarios de rata al P4 teñidos con HE, los ovocitos están rodeados de una capa de células cubicas (flechas). Las células planas cambiaron a células cubicas por diferenciación. En la fotografía de la derecha vemos ovocitos y células granulosas Arl6ip1-positivas (punta de flecha). Escala 25 micras.

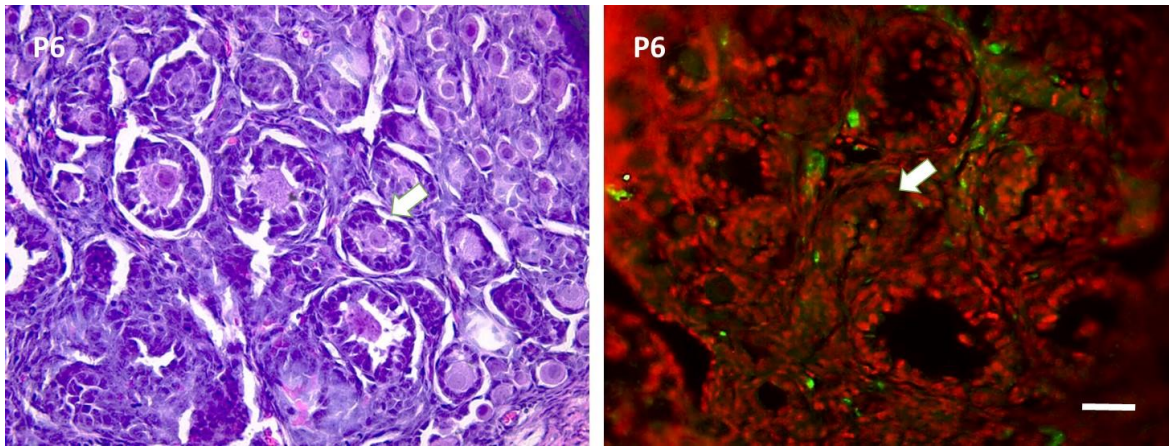


Figura 23. A la izquierda se muestran folículos secundarios de ovarios de ratas al P6 teñidos con HE (flechas). Los ovocitos están rodeados por dos capas de células granulosas cúbicas. A la derecha se muestran las células Arl6ip1-positivas (punta de flecha). Escala 25 micras.

La diferenciación y proliferación celular en ovarios involucra múltiples factores de regulación. Se ha reportado que Arl6ip1 interviene en el tráfico de membrana, señalización, diferenciación, proliferación y apoptosis celular. Aunque no está totalmente clara la forma en como realiza estas funciones, se sabe que la proteína Arl6ip1 es regulada por otras proteínas como la ARF, Sar1, Rab, las cuales intervienen en la formación de vesículas y son necesarias para que se lleve a cabo el tráfico de membranas por las vesículas. En los ovocitos podemos ver que hay mayor número de células Arl6ip1-positivas por campo a la edad de P0, sugerimos que es debido a que el ovocito regula la diferenciación de células planas a células cúbicas (Figura 24A). La alta expresión de Arl6ip1 junto con la participación de las demás proteínas como ARF, Sar y Rab es necesaria para que sucedan los procesos de señalización en la membrana y de esta forma la diferenciación de las células. En la misma gráfica disminuyó 74 % la expresión de Arl6ip1 en los ovocitos de las ratas en las edades de P1, P2, P4 Y P6. Cabe señalar que los ovocitos entran en apoptosis, lo aún viables se rodeen de células planas y formen folículos primordiales que observamos al P2. La Arl6ip1 al ser inhibida promovería la apoptosis al ser degradada por la ubiquitina, proteína a la cual se une la Arl6ip1. En la gráfica B (Figura 15) correspondiente a células pregranulosas vemos un patrón similar, las células pregranulas o planas en un principio muestran alta actividad pero no igual a la que presentan los ovocitos, esto debido a que estas células también se van a diferenciarse.

En el grafica 24C mostramos que las células granulosas aumentaron 90 % en relación con el P0 y P1. En este estado de foliculogénesis, las células granulosas regulan el crecimiento del ovocito. Los análisis in sílico sugieren que Arl6ip1 interacciona con Nexina 1, Reticulón 4, sonic hedgehog y desert hedgehog, proteínas regulan el crecimiento y la transcripción en los procesos de proliferación celular.

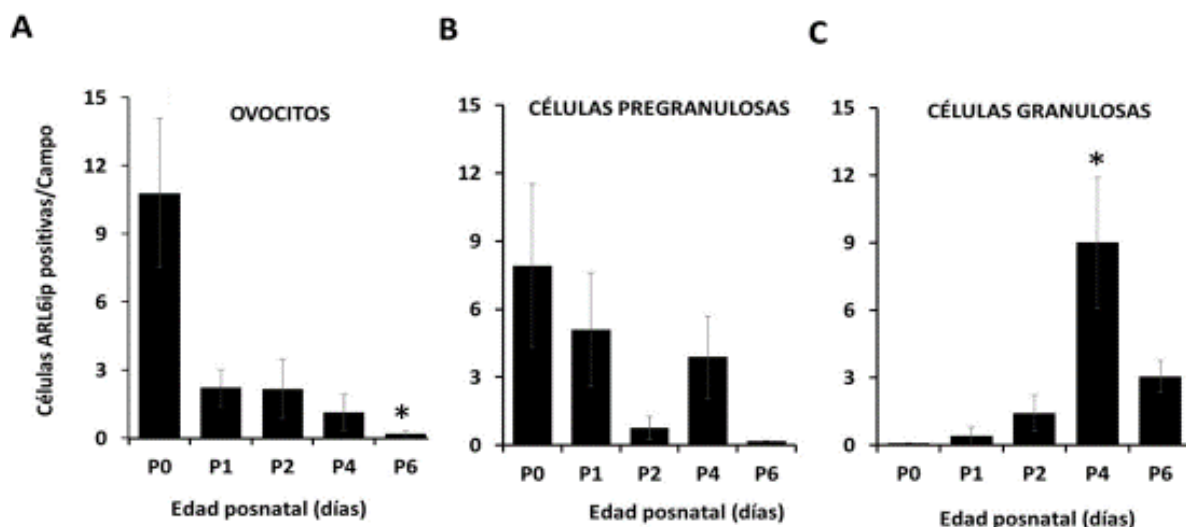


Figura 24. Células Arl6ip1-positivas en los ovarios de ratas Sprague-Dawley a las edades postnatales 0, 1, 2, 4 y 6 días de edad, n=5 (P0, P1, P2, P4 y P6). A. ovocitos. B, células pregranulosas o planas. C, células granulosas. Los gráficos representan el promedio y el EEM de células Arl6ip1-positivas, * $p < 0.05$, ANOVA de una vía seguida de la prueba de Tukey.

8. DISCUSIÓN

La proteína Arl6ip1 fue reportada por primera vez por Ingley y colaboradores en 1999 en una la línea celular J2E de neoplasias de eritrocitos (Ingley et al., 1999). En un sistema híbrido de levadura se ha probado que la proteína Arl6ip1 interacciona con factores de ribosilación (ARL) y participa en la señalización intracelular. En otros organismos más evolucionados como las moscas, peces y roedores, la mutación del gen Arl6ip1 causa importantes alteraciones morfológicas y funcionales como polidactilia, anormalidades en el desarrollo de los riñones, ceguera y obesidad. [Beales et al., 1999, Chiang et al., 2004; Fan et al., 2004].

En general, las proteínas recién sintetizadas pueden ser secretadas al medio o ser incorporadas a las membranas intracelulares como las del retículo endoplásmico, la del aparato de Golgi, la de los lisosomas o incluso a la membrana plasmática. Cuando las proteínas forman parte de las membranas intracelulares se insertan inicialmente en el retículo endoplásmico, las otras son liberadas a la luz de él. Desde la membrana del retículo endoplásmico continúan su transporte pasando por aparato de Golgi y los lisosomas, siempre lo hacen como componentes de la membrana, las otras son proteínas solubles [Cooper et al., 2007 A]. La diferencia entre proteínas que serán retenidas en el retículo endoplásmico y las que serán exportadas es que las primeras poseen un dominio específico de retención. Las que serán exportadas llegan al aparato de Golgi donde ocurre la fosforilación de los residuos de manosa siendo un paso crucial en la distribución de las proteínas a los lisosomas. La exportación y distribución de las proteínas se da por medio de las vesículas, donde la formación de estas se regula por las proteínas de unión a GTP a través de proteínas adaptadoras que interaccionan directamente con las proteínas del revestimiento vesicular. Específicamente se ha reportado que la proteína Arl6ip1 es una proteína de unión a GTP por lo cual también se ha propuesto interviene regulando la formación de vesículas de transporte, de esta manera regula el tráfico de las proteínas y la señalización intracelular [Pettersson et al., 2000].

Hasta ahora se han reportado tres familias de proteínas de unión a GTP implicadas en la gemación de las vesículas: la familia de los factores de ribosilación ADP, de la cual, la más conocida es la ARF1, otra es la Sar1 y las proteínas Rab. La unión secuencial y cooperativa de proteínas de unión a GTP, proteínas adaptadoras y proteína efectoras

establecen un complejo proteico sobre la membrana, específico para el ensamble y la gemación de las vesículas de transporte [Cooper et al. 2007 B]. Esta interacción de las proteínas es fundamental para entender la función de la proteína Arl6ip1 en las células de los ovarios.

Además, la proteína Arl6ip1 interactúa con proteínas de la familia ARF formando parte de los túbulos que dan forma a la membrana en la región de transición entre el retículo endoplásmico y el aparato de Golgi. Se ha reportado que la sobreexpresión de Arl6ip1 altera la morfología del retículo endoplásmico [Yasunori et al., 2013]. También, el complejo ARF/GDP se une a proteínas de la membrana en el aparato de Golgi, y la proteína ARF estimula el intercambio de GDP por GTP [Pettersson et al., 2000]. Cabe señalar que la unión de ARF/GTP inicia el proceso de gemación reclutando a las proteínas adaptadoras, donde estas funcionarán como sitios de unión para el receptor de manosa-6-fosfato y clatrina ensamblándose una red en forma de “cesta” que distorsiona la superficie de la membrana conduciendo a la formación de la vesícula. Específicamente, la unión y la fusión de las vesículas de transporte a las membranas dianas específicas esta mediada por un complejo proteico formado de manera secuencial en las que también intervienen las proteínas Rab. Se ha sugerido que la proteína Arl6ip1 interviene en este proceso, dando forma a la membrana y por consecuencia a la célula en los proceso de diferenciación [Cooper et al., 2007 B]. Basándonos en estos datos experimentales y en la interacción de Arl6ip1 con ARF, Rab y ubiquitina C [Szklarczyk et al, 2015] deducidos por los análisis in silico fortalecen la idea de que la proteína Arl6ip1 interviene en el tráfico de membranas, en la señalización y en el proceso de diferenciación de las células.

El incremento de la proteína Arl6ip1 que encontramos al nacimiento (P0) en los ovocitos y en las células preanulares del ovario de la rata coincide con el inicio de la diferenciación celular que ocurre para la formación de los folículos primordiales, es un proceso fisiológico en el que el transporte vesicular de las proteínas aumenta. La mayor expresión de la proteína Arl6ip1 contribuiría a la formación de los folículos primordiales en los ovarios de la rata. Considerando que la Arl6ip1 puede unirse a ubiquitina C, su regulación puede ser por ubiquitinación. La ubiquitina se activa por la enzima E1, una vez activada se transfiere a una de las distintas enzimas conjugantes de la ubiquitina o E2, posteriormente se transfiere a la ubiquitina ligasa E3 y finalmente a una proteína diana

específica. De esta forma, se añaden mas moléculas de ubiquitina y posteriormente se degradan por proteólisis [Cooper et al., 2007 B]. Durante el desarrollo postnatal de los ovarios, los ovocitos deben disgregarse y unirse a las células pregranulosas por lo que si Arl6ip1 es degradada por ubiquitinación su expresión disminuye al P1 y P2 permitiendo así la unión con las células pregranulosas en los folículos primordiales [Lui et al., 2003]. También, los ovocitos agrupados “en canasta” sufren apoptosis al azar, fenómeno que contribuye a que se aíslan y después se asocian a las células pregranulosas planas para formar los folículos primordiales [Palma et al., 2011]. En este proceso la proteína Arl6ip1 se degrada por ubiquitinación, su ausencia también puede conducir a la apoptosis por lo que la expresión de Arl6ip1 disminuye en células pregranulosas. Sin embargo, a los 4 días de edad (P4) la expresión de Arl6ip1 aumenta lo que contribuiría al proceso de proliferación celular, ya que pasan de folículos primarios a folículos secundarios. Es importante considerar que la proteína Arl6ip1 interacciona con otras proteínas como la “*sonic hedgehog*” y “*desert hedgehog*”, proteínas que intervienen en la transcripción de genes en los tejidos en desarrollo. Específicamente, la proteína desert hedgehog es una proteína de señalización que activa la transcripción de genes durante la foliculogénesis del ovario y en las células Leydig de los testículos [Spicer et al., 2009].

Los análisis múltiples del genoma de las secuencias expresadas “High-throughput” y ensayos de co-expresión realizados con el Software String 10 (Szklarczyk et al., 2015) fortalecen la idea que la proteína Arl6ip1 interacciona con la ubiquitina C (UBC, 100% de identidad), con nexina 1 (SNX1, 100% de identidad), con reticulon 4 (RNT4, 98.3 % de identidad), con desert hedgehog (96.8% de identidad) y con sonic hedgehog (SHH, 97.8 % de identidad). Estas interacciones permiten relacionar el comportamiento de la proteína Arl6ip1 con sus posibles funciones en las células. La interacción con RTN4 fortalece la idea de participar en el tráfico de membranas, se trata de una proteína de las vesículas de transporte [Cooper et al., 2007]. La interacción con ubiquitina C sugiere su participación en desarrollo y la apoptosis regulando la degradación de Arl6ip1 y el transporte de las proteínas. Por su unión a SNX1 sugiere regular la unión al receptor del factor de crecimiento epidérmico (EGFR), a las vesículas y posteriormente a su degradación, lo cual intervendría en procesos de proliferación. El factor de crecimiento epidérmico y su receptor (EGF y EGFR) respectivamente aumentan su expresión durante la foliculogénesis del

ovario dado que regulan la interacción entre el ovocito y las células de la granulosa [Tse y Ge, 2009]. Finalmente, la SHH es un factor de transcripción esencial para la organogénesis durante el desarrollo del ovario. Cuando aumenta la expresión de SHH hay formación de tumores y malformación de los ovarios en desarrollo. Este resultado se ha atribuido a aberraciones meióticas en las células germinales del ovario [Sabol et al., 2012]. En la figura 25A, indicamos la participación de Arl6ip1 en el tráfico de las membranas intracelulares y en las figuras 25B y C su interacción con otras proteínas identificadas usando el software String 10 con los índices más altos de probabilidad de unión (97.8-100 %) [Szkarczyk et al., 2015].

En la figura 26 se resume la localización y la posible acción de la Proteína Arl6ip1. Con base en la interacción de Arl6ip1 con otras proteínas como ARF, Sar, Rab, nexina1, reticulon 4, desert hedgehog, sonic hedgehog y ubiquitina hipotetizamos la función de Arl6ip1. La proteína Arl6ip1 forma parte de membranas vesiculares [Yasunori, et al., 2013], así como las proteínas ARF, Sar, Rab, las cuales participan en la iniciación, unión y fusión vesicular y participan formando las vesículas. Además sugerimos que Arl6ip1 participa en el transporte de las proteínas que viajan al aparato de Golgi y posteriormente a la membrana celular. Al fusionarse con la membrana celular, liberan las proteínas de membrana que van en las vesículas activando a otras proteínas como SHH y DHH encargadas de la señalización celular.

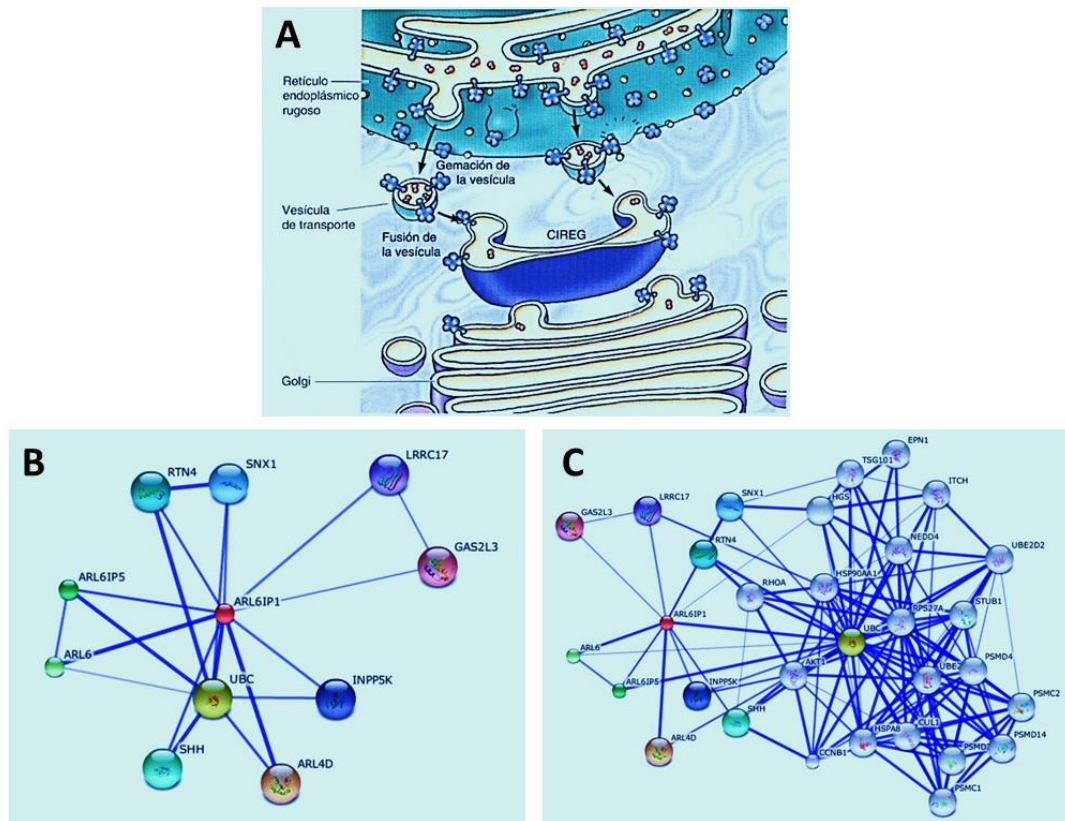


Figura 25. Señalización intracelular e interacción de Arl6ip1 con otras proteínas. A. Transporte vesicular del retículo endoplásmico (RE) al aparato de Golgi mediante vesículas originadas por gemación de la membrana, fusión a otras y la interacción con túbulos en la región trans-Golgi (RE-Golgi, CIREG). B. Nivel 1 de interacción de Arl6ip1 con Ubiquitina C (UBC), factor 4D de ribosilación semejante a ADP (Arl4d), nexina 1 (SNX1) y sonic hedgehog (SHH), entre otras. C. nivel 2 de interacción con las proteínas. Programa, String 10 (Szkarczyk et al., 2015).

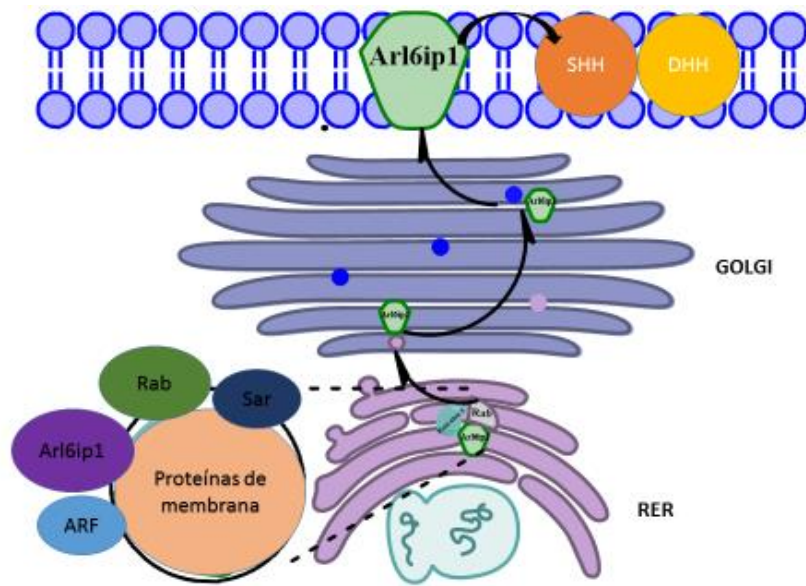


Figura 26. Esquema hipotético que ilustra la localización de Arl6ip1 en las membranas intracelulares y su interacción con otras proteínas.

9. CONCLUSIÓN

La proteína Arl6ip1 se expresó en los ovocitos, en las células pre-granulosas y en las células de la granulosa del ovario. En los ovocitos y células pre-granulosas, su expresión fue alta al P0 y disminuyó en los días postnatales subsecuentes (1-6 días). Sin embargo, en las células de la granulosa su expresión fue baja al P0 y posteriormente aumentó paulatinamente a un máximo valor a los 4 días de edad. Sugerimos que la proteína Arl6ip1 interviene en la diferenciación de las células pre-granulosas a granulosas, mientras que su ausencia produce apoptosis, fenómeno que ocurre en la formación de los folículos primordiales y primarios del ovario.

10. REFERENCIAS

- Beales, P.L., Elcioglu, N., Woolf, A., Parker, D., Flinter, F.A. (1999) New criteria for improved diagnosis of Bardet-Biedl syndrome: results of a population survey. *J Med Genet* 36: 437– 446.
- Chiang, A.P., Nishimura, D., Searby, C., Elbedour, K., Carmi, R., Ferguson, A.L., Secrist, J., Braun, T., Casavant, T., Stone, E.M., Sheffield, V.C. (2004) Comparative genomic analysis identifies an ADP-ribosylation factor-like gene as the cause of Bardet-Biedl syndrome (BBS3). *Am J Hum Genet* 75: 475-484.
- Cooper, G., Hausman, R. (A) (2007). Distribución y transporte de proteínas. La célula. Madrid, España: MARBÁN. pp. 355-397.
- Cooper, G., Hausman, R. (B) (2007). Síntesis de proteínas, procesamiento y regulación. La célula. Madrid, España: MARBÁN, pp. 313-316.
- Elvin, J., Matzuk, M. (1998). Mouse models of ovarian failure. *Review of Reproduction*. 3: 183-195.
- Fan, Y., Esmail M.A., Ansley, S.J., Blacque, O.E., Boroevich, K., Ross, A.J., Moore, S.J., Badano, J.L., May-Simera, H., Compton, D.S., Green, J.S., Lewis, R.A., van Haelst, M.M., Parfrey, P.S., Baillie, D.L., Beales, P.L., Katsanis, N., Davidson, W.S., Leroux, M.R. (2004) Mutations in a member of the Ras superfamily of small GTP-binding proteins causes BardetBiedl syndrome. *Nat Genet* 36: 989-993.
- Fengjie, G., Yan, L., Jiajia, W., Guancheng, L. (2010). ARL6IP1 mediates cisplatin-induced apoptosis in CaSki cervical cancer cells. *Oncology Reports*, 23:1449-1455.
- Geva, E, Jaffe, R. (2004). The ovary: ovarian angiogenesis. Eds. Leung P.C., Adashi E.Y., Second edition. San Diego, California. USA: Elsevier Academic Press: 305-317.

- Hofstetter, J., Suckow, M., Hickman, D. (2006). Morphophysiology. En: The laboratory rats. Eds. Mark A. Suckow, Steven H. Weisbroth y Craig L. Franklin. Academic Press. USA. pp. 93-128.
- Hsing-Yen, H., En-Sheng, D., Jeng-Ting, L., Chi-Tung, T., Tzu-Ching, Y., Huai-Jen, T. (2008). The embryonic expression patterns and the knockdown phenotypes of zebrafish ADP-ribosylation factor-like 6 interacting protein gene. *Developmental Dynamics*, 238:232-240.
- Hsing-Yen, H., Jeng-Ting, L., Hong-Young, Y., Huai-Jen, T. (2012). Arl6ip1 plays a role in proliferation during zebrafish retinogenesis. *Cells Tissues Organs*, 196:161-174.
- Ingle, E., J.H. Williams, C.E. Walker, S. Tsai, S. Colley, M.S. Sayer, P.A. Tilbrook, M. Sarna, J.G. Beaumont, S.P. Klinken (1999) A novel ADP-ribosylation like factor (ARL-6), interacts with the protein-conducting channel SEC61beta subunit. *FEBS Lett* 459: 69–74.
- Irusta, G. (2008). Mecanismos involucrados en la atresia del folículo ovárico: relación entre esteroidogénesis, angiogénesis y apoptosis. Tesis doctoral, Facultad de Ciencias Exactas y Naturales, Universidad de Buenos Aires Argentina.
- Kumar, T, Wang Y, Lu, N, Matzuk, M. (1997). Follicle stimulating hormone is required for ovarian follicle maturation but not male fertility. *Nature Genetic*, 15: 201-204.
- Kuroda, M., Funasaki, S., Saitoh, T., Sasazawa, Y., Nishiyama, S., Umezawa, K., Simizu, S. (2013). Determination of topological structure of ARL6ip1 in cells: Identification of the essential binding region of ARL6ip1 for conophylline. *FEBS Letters* 587:3656-3660

- Lui, H., Chen, J., Wang, L., Naumovsk, L. (2003). ARMER, apoptotic regulator in the Membrane of the endoplasmic reticulum, a novel inhibitor of apoptosis. *Molecular Cancer Research*, 1:508-518.
- Luna, F., de la Chesnaye, E., Ojeda, S.R. (2003). *Rattus norvegicus* ADP-ribosylation-like factor 6-interacting protein mRNA, GenBank, Nucleotide, AY316590, <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/nuccore/AY316590.1>
- Luna, F., Martínez-García, M.I. (2005). Fisiología celular del ovario de los mamíferos y su regulación neuroendócrina. En: Fisiología y conducta. Textos científicos. BUAP. México. p. 153-180.
- Maeda, K., Ohkura, S. Tsukamura, H. (2000). Physiology of reproduction. En: The rat laboratory. Ed. Georg J Krinke, Academic Press. USA. p. 145-176.
- McGee, E.A, Hsueh, A.J. (2000). Initial and cyclic recruitment of ovarian follicles. *Endocrinology Rev.*; 21: 200-214.
- Oertle, T., Klinger, M., Stuermer, C., Schwab, M. (2003). A reticular rhapsody: phylogenic evolution and nomenclature of the RTN/Nogo gene family. *The FASEB Journal*, 17:1238-1247.
- Palma, G., Argañaras, M., Barrera, A., Rodler, D., Mutto, A., Sinowatz, F. (2011). Biology and Biotechnology of Follicle Development. *The Scientific World Journal*, pp. 1-14.
- Parker, L.K., Schimmer, P.B. (2006). Embryology and Genetics of the Mammalian Gonads and Ducts. *Follicular Development: Mouse, Sheep, and Human Models*. Knobil and Neill's Physiology of Reproduction Third Edition Elsevier Academic Press pp 313-336.

- Pettersson, M., Bessonova M., Feng Gu, H., Groop, L., Jönsson, J. (2000). Characterization, chromosomal localization, and expression during hematopoietic differentiation of the gene encoding arl6ip, ADP-Ribosylation-like factor-6 interacting protein (ARL6). *Genomics*, 68:351-354.
- Pinilla, J.L. (2010). Determinación y diferenciación sexual. *Fisiología humana*. Ed. Fernández-Tresguerres, J. Interamericana-McGRAW-Hill, México, pp. 1030-1040.
- Rajkovic, A., Pangas, S. A., Matzuk, M. M. (2006). Follicular Development: Mouse, Sheep, and Human Models. *Knobil and Neill's Physiology of Reproduction*. Third Edition Elsevier Academic Press. Pp 383-424.
- Ross, M., Pawlina, W. (2007). *Histología: texto y atlas a color con biología celular y molecular*. Buenos Aires: Medica Panamericana, 5:831-839.
- Sabol M, Car, D., Musani, V., Ozretic, P., Oreskovic, S., Weber, I., Levanat, S. (2012). The Hedgehog signaling pathway in ovarian teratoma is stimulated by Sonic Hedgehog which induces internalization of Patched. *Int J Oncol*. 2012; 41(4):1411-8.
- Schwab, M. (2003). Nogo and its paRTNers. *TRENDS in Cell Biology*, 13:187-194.
- Secretaría de Agricultura, Ganadería, Desarrollo rural, Pesca y Alimentación (2001). Especificaciones Técnicas para la Producción, Cuidado y Uso de los Animales de Laboratorio. *Diario Oficial de la Federación de México*. Estados Unidos Mexicanos.
- Spicer, L. J., Sudo, S., Aad, P.Y., Wang, L.S, Chun, S.Y., Ben-Shlomo. I., Klein, C., Hsueh, A.J., (2009). The hedgehog-patched signaling pathway and function in the

mammalian ovary: a novel role for hedgehog proteins in stimulating proliferation and steroidogenesis of theca cells. *Reproduction*. 138(2):329-39.

Szklarczyk, D., Franceschini, A., Wyder, S., Forslund, K., Heller, D., Huerta-Cepas J, Simonovic, M, Roth, A., Santos, A., Tsafou, K.P., Kuhn, M, Bork, P, Jensen LJ, von Mering. C. (2015) STRING v10: protein-protein interaction networks, integrated over the tree of life. *Nucleic Acids Res*. 2015;43(Database issue):D447-52.

Tse, A.C., Ge, W. (2009) Spatial localization of EGF family ligands and receptors in the zebrafish ovarian follicle and their expression profiles during folliculogenesis. *Gen Comp Endocrinol*. 2010;167(3):397-407.

Velázquez, J. Mendieta, E. (A) (2002). Factores que regulan el desarrollo folicular I: folículos preantrales. *Encuentros en la biología*. <http://www.encuentros.uma.es/>

Velázquez, J., Mendieta, E. (B) (2002). Cuerpo lúteo y atresia folicular. *Encuentros en la biología*. <http://www.encuentros.uma.es/>

Yasunori, Y., Asuka, Y., Naoyuki, M., Kenji, I., Toshiaki, S. (2013). Arl6IP1 has the ability to shape the mammalian ER membrane in a reticulon-like fashion. *Biochem. J.*, 458, pp. 69-79.

ANEXOS 1

TECNICA DE HEMATOXILINA Y EOSINA

- 1- Desparafinar con xilol con dos lavados de 10 minutos cada uno.
- 2- Baño de alcohol al 96 % por 10 minutos.
- 3- Hidratar con agua destilada por 3 minutos.
- 4- Teñir con hematoxilina por tres minutos.
- 5- Lavar en agua de la llave, cambiar hasta que el agua quede limpia.
- 6- Diferenciar en alcohol ácido 2 veces e inmediatamente lavar con agua de la llave.
- 7- Lavar en baño con solución saturada de carbonato de litio hasta cambio de color a azul brillante. Inmediatamente lavar con agua de la llave.
- 8- Teñir con Eosina por 2 minutos.
- 9- Alcohol al 96% por 2 minutos.
- 10- Deshidratar con alcohol absoluto por 2 minutos.
- 11- Sumergir las laminillas en alcohol-xilol por 3 minutos.
- 12- Sumergir en xilol por 15 minutos.
- 13- Montar con resina sintética de cualquier marca comercial

ANEXO 2

TECNICA DE INMUNOHISTOQUIMICA

DESPARAFINADO E HIDRATACIÓN DE LOS TEJIDOS

- 1- Sumergir en xilol por 10 minutos.
- 2- Sumergir en alcohol-xilol por 10 minutos.
- 3- Sumergir en alcohol absoluto por 10 minutos.
- 4- Sumergir en alcohol absoluto por 3 minutos.
- 5- Sumergir en alcohol al 96 % por 10 minutos.
- 6- Sumergir en alcohol 70 % por 10 minutos.
- 7- Lavar con agua destilada por 5 minutos.
- 8- Enjuagar con buffer de fosfatos a pH 7.4 (PBS) por 5 minutos.

RECUPERACION ANTIGENICA

- 9- Incubar con el buffer de citratos por 30 minutos a 55 grados Celsius
- 10- Incubar con PBS-T al 2% por 10 minutos

BLOQUEO DE MARCAJE INESPECIFICO

- 11- Incubar con albumina libre de IgG al 0.5% por 30 minutos.
- 12- Lavar con PBS-T 2 % por 10 minutos.

INCUBACION CON EL ANTICUERPO PRIMARIO

- 13- Incubar con el anticuerpo primario ARMER diluido en PBS-T 1:50. La incubación es en cámara húmeda cerrada por 20 horas a 4 grados Celsius
- 14- Lavar 3 veces por 5 minutos con PBS-T

INCUBACION CON EL ANTICUERPO SECUNDARIO

- 15- Incubar con el anticuerpo secundario (marcado con FITC) diluido en PBS-T a temperatura ambiente en cámara húmeda y protegido de la luz.
- 16- Lavar 3 veces por 5 minutos con PBS-T.
- 17- Lavar 1 vez por 3 minutos con PBS.
- 18- Teñir núcleos con yoduro de propidio por 3 minutos.
- 19- Lavar 2 veces por 5 minutos con PBS agitando suavemente.
- 20- Lavar 2 veces por 5 minutos con agua bidestilada.
- 21- Lavar 1 vez por 5 minutos con PBS-T.
- 22- Montar los cubreobjetos con vectashield

23- Observar al microscopio de fluorescencia.

Anticuerpos y marcador nuclear

Reactivos	Dilución
Anticuerpo primario policlonal ARMER (Santa Cruz Biotechnology, Inc.)	1:50
Anti-IgG de cabra acoplado a FITC (Santa Cruz Biotechnology, Inc.)	1:200