

REGULACIÓN FOLICULAR DE GENES APOPTÓTICOS ACTIVADA POR SELENOMETIONINA

FOLLICULAR REGULATION OF APOPTOTIC GENES ACTIVATED BY SELENOMETIONINE

Miranda-Jiménez, L* ; Guzmán-Landeros, E.R.; Quero-Carrillo, A.R.

*Colegio de Postgraduados Campus Montecillo. Carretera Federal México-Texcoco Km. 36.5 Montecillo, 56264 Texcoco de Mora, Méx.
* E-mail: miranda_leonor@yahoo.com*

Fecha de envío: 12, mayo, 2025

Fecha de publicación: 20, julio, 2025

Resumen:

La regulación del desarrollo folicular en mamíferos esta conducida en parte por apoptosis, asegurando la regresión o la persistencia de folículos ováricos. Este estudio investiga el impacto del selenio (selenometionina) en la regulación de genes apoptóticos en folículos preovulatorios de ovejas *in vitro*. Dos grupos (testigo y con adición de 10ng/mL de selenometionina) de folículos preovulatorios obtenidos de ovejas; se cultivaron por 24 h y del RNAm extraído de estos; se sintetizó a ADNc para realizar la técnica de microarreglos, diseñado para ratón (a detectar 22 mil genes). Los datos normalizados se sometieron a programas de bioinformática para clasificar genes diferencialmente expresados (DEGs). De los genes con expresión diferencial; 22 están asociados a procesos apoptóticos, incluyendo rutas intrínsecas y extrínsecas; en regulación positiva o negativa. Se observó sobreexpresión en genes como Pten, Ripk3 y Casp6, y represión notoria de Vdac1 y Tgfb1, lo que sugiere un efecto modulador de la selenometionina sobre las vías de muerte celular programada del folículo preovulatorio. Se concluye que, el selenio (selenometionina) presenta efecto positivo en la regulación génica durante la apoptosis de folículos preovulatorios de ovejas para promover la homeostasis celular folicular.

Palabras clave: Atresia folicular, folículos preovulatorios, selenio, cultivo folicular, reproducción ovina.

Abstract:

Follicular development regulation in mammals is driven in part by apoptosis, ensuring the ovarian follicles regression or persistence. This study investigates the selenium (selenomethionine) impact on apoptotic genes regulation in in vitro preovulatory follicles. Two groups [control and treatment (with the addition of 10 ng/mL of selenomethionine)] of preovulatory follicles obtained from ewes were cultured through 24h, mRNA extracted from these was synthesized into cDNA for development a mouse microarray (detecting 22,000 genes). Data were subjected to bioinformatics programs in order to classify differentially expressed genes (DEGs). 22 DEG were associated with apoptotic processes, including intrinsic and extrinsic pathways, either up- or down-regulated. Overexpression of genes such as *Pten*, *Ripk3* and *Casp6*, was observed, also notable repression of *Vdac1* and *Tgfb1*. Our conclusion is that, selenium (selenomethionine) has a positive effect on gene regulation during apoptosis of preovulatory follicles to promote follicular cell homeostasis.

Keywords: Follicular atresia, preovulatory follicle, selenium, follicular culture, sheep reproduction.

INTRODUCCIÓN

La apoptosis en folículos ováricos involucra la participación tanto de genes proapoptóticos como antiapoptóticos, la expresión de estos genes está finamente regulada por factores intra y extracelulares. La apoptosis, o muerte celular programada es un suceso fisiológico regulador de la atresia folicular. En las ovejas y otras hembras de mamíferos, los folículos ováricos atraviesan etapas de crecimiento y diferenciación antes de la ovulación. Durante este tiempo, la apoptosis resulta crucial para eliminar folículos que no son aptos para alcanzar la dominancia y la ovulación (Flores et al.,2005).

Como todo evento fisiológico la apoptosis está regulada por participantes génicos que la promueven, tal es el caso de *Bax* y *Bak* conocidos por actuar en la promoción de apoptosis; esto lo hacen a través de la permeabilización de la membrana mitocondrial; paso crítico en la vía intrínseca de la apoptosis (Youle & Strasser, 2008), la célula activa la vía intrínseca ante el efecto de elementos tóxicos, daño de ADN, estrés oxidativo e isquemia, entre otros. Además, en el momento oportuno, se observa la presencia de genes antiapoptóticos como *Bcl-2* y *Bcl-xl* que inhiben la apoptosis por bloqueo de la permeabilización membranal mitocondrial, promoviendo la supervivencia celular (Arder et al.,2019); esto propicia la persistencia del folículo.

El presente estudio se centró en la identificación y caracterización de genes que activan o inhiben la apoptosis en folículos preovulatorios *in vitro* provenientes de ovejas y que son expuestos a selenometionina. Para este estudio, se analizaron genes clasificados en diferentes procesos y vías apoptóticas; incluyendo el proceso apoptótico general, vías intrínsecas, vía extrínseca, señalización apoptótica y su regulación positiva y negativa.

MATERIALES Y MÉTODOS

Ovarios se obtuvieron de ovejas con lana, de razas mixtas, sexualmente maduras. Las ovejas se sacrificaron en un rastro de Texcoco, Estado de México (rastro el Rojo, Carretera Federal 136). Los ovarios extirpados de ovejas postmortem, se transportaron al laboratorio inmersos en solución salina estéril y fría (4°C; mantenida con hielo), a la cual, previamente se adiciono 0.01% de antibiótico de amplio espectro (Gentaerba, PISA Sulfato de Gentamicina base 10 g, Vehículo cbp 100 mL). Los ovarios se limpiaron, se lavaron y con ayuda de microscopio estereoscópico (Stemi 305, Trino, C/cámara digital; AxioCam ERC5S); se midió el diámetro folicular utilizando un vernier electrónico (Carbon Fiber, Composites), se seleccionaron solo folículos preovulatorios (diámetro \geq 6mm) y se extrajeron con tijeras, bisturí y pinzas de disección; todo en condiciones estériles. Los folículos se mantuvieron en solución salina preparada con medio de cultivo [Gentaerba PISA Sulfato de Gentamicina base 10 g, Vehículo cbp 100 MI) y medio esencial mínimo (MEM de Sigma-Aldrich-Merck, KGaA, Filial Toluca, Estado de México)]. La solución se preparó en base a un estudio realizado por Miranda et al., (2007), para cultivo de células de la granulosa.

Se seleccionaron 36 folículos preovulatorios y se colocaron tres folículos por tubo (tipo eppendorf de 2 mL) con 1 mL de medio de cultivo. El diseño experimental consistió en 2 grupos: testigo y tratamiento con selenometionina con 6 repeticiones por cada tratamiento: Los folículos del grupo testigo se mantuvieron en el medio de cultivo con adición de 100 UI mL⁻¹ de gonadotropina coriónica equina (eCG). A los del grupo con tratamiento se le adicionó 10 ng mL⁻¹ de

selenometionina (Sigma-Aldrich-Merck, KGaA, Filial Toluca, Estado de México). Todos los folículos permanecieron en incubación durante 24 horas con 37°C en aire humidificado al 95 % y 5% CO₂ según lo descrito por Nazario Pescador et al, (1999). Al término del cultivo, los folículos se retiraron del medio de cultivo y se enjuagaron con medio de cultivo fresco y se colocaron en tubos eppendorf nuevos para ser congelados con nitrógeno líquido, se almacenaron a -80°C hasta el momento en que se extrajo el ARN.

El ARN total de los folículos se extrajo utilizando la técnica de TRIzol (TRIzol™ Reagent, Invitrogen) de acuerdo con las instrucciones del producto. El ARN obtenido se evaluó cuantitativa y cualitativamente mediante absorbancia ; para lo cual se utilizó espectrofotómetro ND-2000 NanoDrop (NanoDrop, Thermo Scientific) y geles de agarosa al 1.5 % (Sigma-Aldrich-Merck, KGaA, Filial Toluca, estado de México). con base en el protocolo establecido por Green y Sambrook (2012).

Las muestras de ARN total se procesaron en la Unidad de Microarreglos de ADN de la Universidad Nacional Autónoma de México (<http://microarrays.ifc.unam.mx/>), para lo cual, del ARN total se sintetizó ADNc con el kit para transcriptasa reversa (SuperScript IV™, Reverse Transcriptase; INVITROGEN), el ADNc se hibridó con chip para microarreglo de ratón M22K_11_06 y adición de Alexa-555 y Alexa-647.

La matriz de salida de datos emitida por el escáner de análisis del microarreglo se normalizo con el paquete estadístico GenArise, el cual compara la expresión génica entre diferentes condiciones experimentales; en este caso folículos cultivados con selenio y sin selenio, los datos normalizados se consideraron para realizar el estudio de DEGs (genes diferencialmente expresados).

Para el caso específico en interacción génica en el proceso de apoptosis, se consideraron como DEGs los que presentaron valor de z-score de -2.5 a 2.5; dependiendo de la regulación positiva (sobrexpresados) o negativa (subepresados).

Para explorar las rutas biológicas afectadas por el tratamiento con selenometionina, se realizó análisis de clustering con el programa DAVID (<https://david.ncifcrf.gov/>) y se utilizó la columna de símbolos de la matriz, de esta manera se transformaron los datos a formato de símbolo génico oficial e identificaron los genes correspondientes a ovino (*Ovis aries*). La matriz de genes en *Ovis aries* se utilizó para la anotación de términos basados en: ontología de genes (GO; por sus siglas en inglés) y Kioto para Genes y Genomas (KEGG). La visualización de la interacción génica de las vías (red génica) se realizó con el programa Cytoscape v3.7.2. sin embargo, para este caso se consideraron otros cuatro términos que fueron: fase de la vía de señalización, la vía extrínseca, la vía intrínseca y genes de estas vías que activan a otros genes que culminan en la fase de ejecución de la apoptosis.

RESULTADOS Y DISCUSIÓN

La clasificación funcional en base a GO arrojó grupos de genes que participan en el proceso apoptótico.

De 22 DEGs involucrados en apoptosis se clasificaron de la siguiente manera: 12 genes pertenecen al proceso apoptótico general, tres genes a la señalización apoptótica, tres genes a la vía apoptótica extrínseca, tres genes a la vía apoptótica intrínseca y un gen a la fase de ejecución de la apoptosis.

En la Figura 1, se muestran las rutas génicas y los genes ejemplificados con círculos pequeños, mientras que, los términos o módulos génicos se muestran en círculos de mayor tamaño. Flechas discontinuas en color azul claro, muestran la ruta intrínseca de activación de apoptosis. Flechas en color verde muestran la ruta ejecutora de apoptosis. Las claves de ontología de genes son: GO:0006915: proceso apoptótico general, GO:0097190: Vía de señalización apoptótica, GO:0097191: Vía de señalización apoptótica extrínseca, GO:0097193: Vía de señalización apoptótica intrínseca, GO:0097194: Fase de ejecución de la apoptosis. En el panel inferior, se presenta la escala de colores considerada para el valor de expresión.

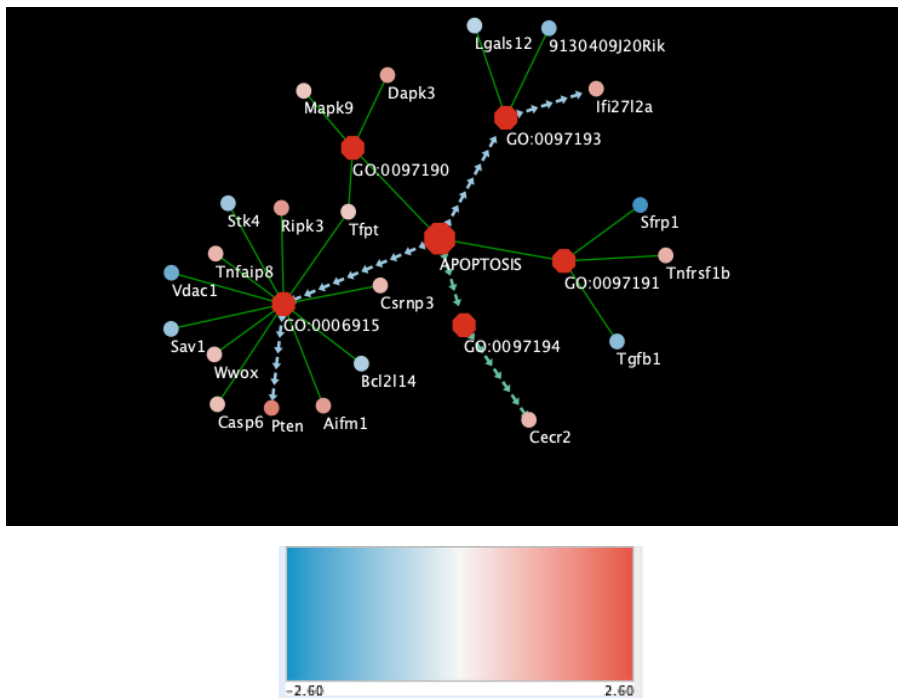


Figura 1. Rutas g3nicas involucradas con apoptosis de fol3culos preovulatorios expuestos *in vitro* a selenometionina.

Figure 1. Gene pathways involved with apoptosis of preovulatory follicles *in vitro* exposed to selenomethionine.

El an3lisis de la expresi3n g3nica revel3 activaci3n global de los procesos apopt3ticos en los fol3culos preovulatorios tratados, evidenciado por la regulaci3n diferencial de m3ltiples genes vinculados al t3rmino GO:0006915 (proceso apopt3tico). En particular, se observ3 la sobreexpresi3n significativa de genes clave promotores de apoptosis; entre los que destaca ***Pten*** (hom3logo de fosfatasa y tensina) un regulador negativo de la v3a PI3K/AKT; normalmente promueve la supervivencia celular. Cuando ***Pten*** est3 activado (sobreexpresado), inhibe **PI3K/AKT** y eso activa la apoptosis, particularmente a trav3s de la v3a mitocondrial, al permitir la translocaci3n de ***Bax/Bak*** a mitocondrias y liberar citocromo c.

Ifi2712a (Interferon alpha-inducible protein 27 like 2a), tambi3n en este caso sobreexpresado, es un gen inducido por interferones tipo I (IFN-I). Se ha vinculado a procesos apopt3ticos mediados por estr3s y da3o celular, incluyendo la apoptosis mitocondrial. Aunque menos estudiado, hay evidencia de que ***Ifi2712a*** puede actuar al inicio de se3ales de estr3s o supresi3n de v3as de supervivencia, como **PI3K/AKT**.

Ademas se evidenció sobreexpresión de **Ripk3**, el cual induce necroptosis y de igual forma puede modular rutas apoptóticas clásicas.

La activación mitocondrial de la apoptosis se corroboró con el aumento en la expresión de **Aifm1**, una flavoproteína implicada en la liberación de factores proapoptóticos desde la mitocondria. Genes adicionales como **Tnfaip8**, **Csrnp3**, **Casp6**, **Wwox** y **Tfpt**, todos ellos relacionados con la facilitación de la cascada apoptótica, se aumentaron con la presencia de selenometionina en el folículo preovulatorio de oveja, reforzando la hipótesis de activación transcripcional coordinada del programa apoptótico.

En contraste, genes clave mostraron represión significativa, sugiriendo mecanismos de retroalimentación o rutas de apoptosis no convencionales. En particular, **Vdac1**, canal mitocondrial esencial para la liberación de citocromo c, se encontró reprimido, lo cual podría limitar la ejecución clásica de apoptosis o reflejar un mecanismo de modulación fina de la muerte celular. De igual modo, genes de la vía Hippo como **Stk4** y **Sav1**, así como el miembro pro-apoptótico **Bcl2l14**, presentaron disminución en su expresión.

El aumento en la expresión de genes como **Pten** y **Ripk3** destaca la activación de vías pro-apoptóticas. **Pten** actúa como antagonista de la vía **PI3K/AKT**, una de las rutas más importantes en la supervivencia celular. Su sobreexpresión implica inhibición de señales proliferativas, favoreciendo la activación de caspasas y la progresión hacia apoptosis programada (Song et al., 2012). Por su parte, **Ripk3** es un mediador de la necroptosis, pero también puede promover apoptosis cuando interactúa con caspasas específicas, lo que indica una posible intercomunicación entre rutas de muerte celular regulada (Newton et al., 2016) o en última instancia la posibilidad que “algunas células integrantes de los compartimentos foliculares y, bajo circunstancias específicas se active una vía de muerte por necrosis”.

La sobreexpresión de **Casp6**, caspasa efectora de la fase de ejecución apoptótica, y **Dapk3**, una quinasa pro-apoptótica activada por señales de estrés, refuerzan el perfil de activación apoptótica. Esta activación coordinada sugiere que la selenometionina no solo desencadena las señales iniciales de apoptosis, sino que también promueve su ejecución terminal (Uhm et al., 2007).

Adicionalmente, genes como ***Klf11*** y ***Phlda2***, ambos con funciones en la regulación de la muerte celular y la respuesta a estrés, mostraron niveles aumentados. *Klf11* es un factor de transcripción que puede inducir expresión de genes pro-apoptóticos (Neve et al., 2005), mientras que ***Phlda2*** ha sido vinculado a inhibición del crecimiento celular y diferenciación (Qian et al., 2017). Su activación podría representar un mecanismo de control de calidad celular durante el cultivo, limitando la proliferación de células con daño subletal.

En contraste, la represión de ***Vdac1***; un canal de poro mitocondrial implicado en la liberación de citocromo c y de ***Tgfb1***, cuya señalización es dual (proliferativa o pro-apoptótica dependiendo del contexto), sugiere modulación fina del balance entre vida y muerte celular. Esta represión podría estar relacionada con la prevención de apoptosis mitocondrial descontrolada, contribuyendo a una eliminación selectiva de células (Shoshan-Barmatz et al., 2010).

Cabe destacar que la regulación tanto positiva como negativa de genes asociados a apoptosis sugiere que la selenometionina no actúa de forma unidireccional, sino que ejerce un efecto contextual dependiente del estado celular. Esta dualidad ha sido descrita en otros sistemas celulares donde el selenio puede actuar como pro-apoptótico en células dañadas y como protector en células viables (Uhm et al., 2007).

CONCLUSIÓN

En conjunto, estos resultados permiten observar el impacto que tiene el selenio (selenometionina) en la regulación de genes apoptóticos en folículos preovulatorios *in vitro*. La selenometionina actúa como modulador de genes tanto pro-apoptóticos como anti-apoptóticos para promover la homeostasis celular folicular.

AGRADECIMIENTOS

A la Línea de investigación, Innovación Tecnológica y Seguridad Alimentaria en Ganadería, Colegio de Postgraduados, *Campus Montecillo*.



REFERENCIAS:

- Flores-Pérez, F. I., Rosas-Velasco, C., Pardo, M. C. R., & Pérez-Martínez, M. (2005). Apoptosis y atresia folicular: Un binomio esencial en el desarrollo ovárico. *Veterinaria México*, 36(1), 87-103.
- Youle, R.J. y Strasser, A. (2008). La familia de proteínas BCL-2: actividades opuestas que median la muerte celular. *Nature Reviews, Molecular cell biology*, 9 (1), 47-59.
- Ader, N.R., Hoffmann, P. C., Ganeva, I., Borgeaud, A. C., Wang, C., Youle, R. J., & Kukulski, W. (2019). Molecular and topological reorganizations in mitochondrial architecture interplay during Bax-mediated steps of apoptosis. *Elife*, 8, e40712.
- Miranda-Jiménez, L., & Murphy, B. D. (2007). Lipoprotein receptor expression during luteinization of the ovarian follicle. *American Journal of Physiology-Endocrinology and Metabolism*, 293(4), E1053-E1061.
- Pescador, N., Stocco, D. M., & Murphy, B. D. (1999). Growth factor modulation of steroidogenic acute regulatory protein and luteinization in the pig ovary. *Biology of reproduction*, 60(6), 1453-1461.
- Song, M. S., Salmena, L., & Pandolfi, P. P. (2012). The functions and regulation of the PTEN tumour suppressor. *Nature Reviews Molecular Cell Biology*, 13(5), 283-296.
- Newton, K., Wickliffe, K. E., Dugger, D. L., Maltzman, A., Roose-Girma, M., Dohse, M., ... & Dixit, V. M. (2016). RIPK3 in cell death and inflammation: The Good, the Bad, and the Ugly. *Immunity*, 44(3), 453-465.
- Uhm, S. J., Gupta, M. K., Yang, J. H., & Lee, H. T. (2007). The effects of different concentrations of sodium selenite on the in vitro maturation of preantral follicles in serum-free and serum supplemented media. *Theriogenology*, 67(5), 1037-1047.
- Neve, B., Jonckheere, N., Vincent, A., Van Seuningen, I., & Haumonté, J. B. (2005). The role of Krüppel-like factor 11 in normal cell growth regulation and cancer as a mediator of TGF- β signaling pathway. *Biochimica et Biophysica Acta (BBA) - Reviews on Cancer*, 1756(1), 1-10.
- Qian, Y., Zhang, J., Yan, B., Chen, X., & Li, N. (2017). PHLDA2 inhibits cell proliferation and induces apoptosis in human glioma cells. *Oncology Reports*, 37(3), 1609-1616.
- Shoshan-Barmatz, V., Keinan, N., & Zaid, H. (2010). VDAC1 at the crossroads of cell metabolism, apoptosis and cell stress. *Cell Stress & Chaperones*, 15(3), 231-241.