

183



UNIVERSIDAD NACIONAL AUTONOMA DE MEXICO

FACULTAD DE CIENCIAS

"ESTUDIO CITOQUIMICO DEL NUCLEO DE OVOCITOS Y CELULAS FOLICULARES DURANTE LA ATRESIA EN RATA."

T E S I S

QUE PARA OBTENER EL TITULO DE:

B I O L O G O

P R E S E N T A :

ROBERTO CARLOS SALGADO DELGADO

DIRECTOR DE TESIS: DR. GERARDO HEBERT VAZQUEZ NIN



FACULTAD DE CIENCIAS UNAM

MEXICO, D. F.



FACULTAD DE CIENCIAS SECCION ESCOLAR

2001

295162



Universidad Nacional
Autónoma de México

Dirección General de Bibliotecas de la UNAM

Biblioteca Central



UNAM – Dirección General de Bibliotecas
Tesis Digitales
Restricciones de uso

DERECHOS RESERVADOS ©
PROHIBIDA SU REPRODUCCIÓN TOTAL O PARCIAL

Todo el material contenido en esta tesis esta protegido por la Ley Federal del Derecho de Autor (LFDA) de los Estados Unidos Mexicanos (México).

El uso de imágenes, fragmentos de videos, y demás material que sea objeto de protección de los derechos de autor, será exclusivamente para fines educativos e informativos y deberá citar la fuente donde la obtuvo mencionando el autor o autores. Cualquier uso distinto como el lucro, reproducción, edición o modificación, será perseguido y sancionado por el respectivo titular de los Derechos de Autor.



UNIVERSIDAD NACIONAL
AUTÓNOMA DE
MÉXICO

M. EN C. ELENA DE OTEYZA DE OTEYZA
Jefa de la División de Estudios Profesionales de la
Facultad de Ciencias
Presente

Comunicamos a usted que hemos revisado el trabajo de Tesis:

" Estudio citoquímico del núcleo de ovocitos y células
foliculares durante la atresia en rata."

realizado por Roberto Carlos Salgado Delgado

con número de cuenta 9756363-7 , pasante de la carrera de Biología

Dicho trabajo cuenta con nuestro voto aprobatorio.

Atentamente

Director de Tesis

Propietario Dr. Gerardo Hebert Vázquez Nín

Propietario Dra. Olga Margarita Echeverría Martínez

Propietario Dr. Luis Felipe Jiménez García

Suplente Dra. Guadalupe Trinidad Zavala Padilla

Suplente M. en C. Ernestina Ubaldo Pérez.

CGHVg

Olga M. Echeverría

Luis Felipe

Ernestina Ubaldo Pérez

FACULTAD DE CIENCIAS
U N A M.

Consejo Departamental de Biología

Patricia Ramos Morales



Dra. Patricia Ramos Morales
DEPARTAMENTO
DE BIOLOGIA

Este trabajo se realizó en el Laboratorio de Microscopia Electrónica de
la Facultad de Ciencias de la Universidad Nacional Autónoma de México,
bajo la dirección del Dr. Gerardo Hebert Vázquez Nin.

Con apoyo económico del proyecto “estudio citoquímico de las partículas ribonucleoproteicas y de
la cromatina del núcleo del ovocito y las células foliculares durante la atresia en rata ”
de la Dra. Olga M. Echeverría.

A mis padres: Con todo mi amor y agradecimiento por la oportunidad que me dieron de superarme

A mis hermanos Nancy, Marco Antonio y Norfol por su cariño y confianza.

A la memoria de mi hermano Lenin.

A todos mis compañeros y profesores del laboratorio de Microscopia electrónica de la Facultad de Ciencias de la U.N.A.M., por todo el apoyo recibido, gracias. Biol. Silvia Juárez Chavero, Biol. Marco Antonio Gonzáles, M. en C. Rosario Ortiz, Biol. Gabriel López, Pablo F. Molina, Fernando Ontiveros y Alberto Carlos Martínez.

A ti Ana María por todo lo que tu sabes. Gracias amor.

Sabía que nosotros significábamos poco en comparación con el universo, sabía que no éramos nada; Pero el hecho de ser nada de una manera tan inconmensurable me parece, en cierto sentido, abrumador y a la vez alentador.

Aquellos números, aquellas dimensiones mas allá del alcance del pensamiento humano no subyugan por completo. ¿Existe algo, sea lo que fuere, a lo que podamos aferrarnos?.

En medio de este caos de ilusiones en el que estamos sumergidos de cabeza, hay una sola cosa que se erige verdadera; el Amor.

Todo el resto es la nada, un vacío hueco, Nos asomamos al inmenso abismo negro.
Y tenemos miedo.

AGRADECIMIENTOS

Al Dr. Gerardo H. Vázquez Nin por la dirección de este trabajo, así como por las valiosas lecciones brindadas durante mi estancia en su laboratorio.

A la Dra. Olga Margarita Echeverría Martínez, por el apoyo recibido durante la investigación del presente trabajo.

Al Dr. Luis Felipe Jiménez García y a la Dra. Guadalupe Trinidad Zavala por aceptar formar parte del jurado y por la revisión crítica del manuscrito

A Ernestina Ubaldo, por aceptar ser parte de jurado y por todo el apoyo brindado en la elaboración de esta tesis, así como por compartir su experiencia y conocimiento conmigo, mil gracias.

A PROBETEL por su amable disposición en el otorgamiento de una beca para realizar mi Tesis de Licenciatura. Gracias.

A mis compañeros, amistades, familiares y demás personas que contribuyeron a la conclusión de mi formación profesional les estaré siempre agradecido.

I N D I C E

INTRODUCCIÓN	
CARACTERÍSTICAS GENERALES DEL OVARIO DE LOS MAMÍFEROS	9
FOLICULOGÉNESIS	10
DESARROLLO DEL OVOCITO	11
FOLÍCULOS ATRESICOS	14
ANTECEDENTES DE LA MUERTE CELULAR PROGRAMADA	17
CARACTERIZACIÓN DE LA APOPTOSIS	20
CICLO ESTRAL DE LA RATA	22
ANTECEDENTES NUCLEARES	23
ULTRAESTRUCTURA DEL NÚCLEO EN INTERFASE	24
ENVOLTURA NUCLEAR	24
LÁMINA NUCLEAR	25
CROMATINA	25
ESTRUCTURAS RIBONUCLEOPROTEICAS	28
GRÁNULOS INTERCROMATINIANOS	29
GRÁNULOS PERICROMATINIANOS	32
FIBRAS PERICROMATINIANAS	32
CUERPOS NUCLEARES	33
NUCLEOLO	33
OBJETIVO	35
MATERIAL Y MÉTODOS	35
FIJACIÓN	35
DESHIDRATACIÓN	36
PREINCLUSIÓN	36
INCLUSIÓN	37

CORTE	37
CONTRASTE	37
REACCIÓN DE FEULGEN	38
RESULTADOS	40
DISCUSIÓN	54
CONCLUSIONES	56
BIBLIOGRAFÍA	58

RESUMEN

La atresia folicular es un fenómeno que en los últimos años se ha estudiado intensamente y aunque es frecuente encontrar que “los mecanismos que subyacen a la atresia son desconocidos” (Guo, et al. 1994; Kaipia, et al. 1996); es importante señalar que se conocen múltiples parámetros bioquímicos y moleculares.

La palabra atresia proviene del griego (a=no; tresia = perforar) y en su definición estricta de atresia se refiere a los cambios degenerativos que sufren los folículos antrales antes de la ovulación.

El desarrollo de los ovarios se caracteriza por el constante agotamiento de células germinales y somáticas. Esta preponderancia de degeneración celular ordenada en el ovario, está probablemente relacionada con el remodelamiento masivo del tejido durante repetidas oleadas de crecimiento folicular, ovulación, luteinización y muerte de cuerpos lúteos. (Aaron J. et al. 1994).

Los mecanismos fundamentales para la muerte masiva de células somáticas y germinales encontradas en los ovarios son poco claros, una posible ventaja evolutiva del proceso de agotamiento puede ser la selección de folículos para ovular únicamente el ovocito sano.

Prácticamente todos los estudios conocidos sobre este tema se han llevado a cabo en hembras adultas o en folículos cultivados también de adulto .

La(s) oleada(s) de atresia que ocurren en la etapa prepúber no han sido estudiadas suficientemente en mamíferos.

En la bibliografía no aparecen datos relacionados con evaluaciones ultraestructurales que se correlacionen con fenómenos bioquímicos. A la fecha no se han publicado estudios sobre las partículas ribonucleoprotéicas (RNPs) de las células foliculares durante el proceso de atresia-apoptosis.

Para el reciente trabajo se utilizaron ovarios de ratas prepúberes de la raza Wistar desde uno hasta 19 días. Además el ovario de ratas sexualmente maduras de las siguientes edades 22, 25, 30, 35, 40, 45 y 50 días de nacidas. Se ovariectomizaron todas las ratas y después de tomadas las muestras se colocaron en una gota de glutaraldehído 2.5%, paraformaldehído al 4% y glutaraldehído + paraformaldehído al 2.5% en amortiguador de fosfatos 0.16 M a pH 7.2 y el ovario se fragmentó en cubos de 2 mm de lado aproximadamente, se pasaron a los frascos con fijador y permanecieron ahí durante una hora y media prosiguiendo a los lavados con amortiguador de fosfatos 0.16 M a pH 7.2 por 10 minutos.

Posteriormente se realizó la deshidratación, preinclusión, inclusión y finalmente el corte de las muestras.

Después se prosiguió al contraste. Se contrastó con acetato de uranilo y citrato de plomo los cuales son sales con poca capacidad de ionizarse. Además se contrastaron con la técnica preferencial para ribonucleoproteínas (EDTA) y para DNA (Amina de Osmio).

Con respecto a las células foliculares atrésicas, los parámetros utilizados para distinguir las alteraciones fueron muy difíciles de clasificar ya que las características de la atresia no están del todo claras y al parecer observamos varios tipos de atresia o varios inicios de esta, debido a que las características degenerativas varían en diferentes ovocitos, por ejemplo, en algunos la corona radiada permanece intacta, en otros, esta corona radiada se despega de las células foliculares y también existe el caso en el cual la corona radiada se desintegra.

Otra característica que llama la atención es que en algunos ovocitos atrésicos se presentan estructuras laminares. Además existen casos mas raros como aquellos ovocitos que se desintegran y la corona radiada queda casi intacta.

Observamos dos tipos de células foliculares, un tipo cuyo citoplasma aparece denso en el microscopio electrónico y las otras con un citoplasma claro.

Muchas otras características apoyan la hipótesis de la existencia de varias clases de atresia, las cuales se pueden dividir en dos grupos, en atresia temprana y atresia tardía.

Se debe destacar la relativa independencia de parte de los componentes citoplasmáticos para alterarse, permaneciendo el resto aparentemente sano y la variabilidad en el orden en que suceden los cambios; así por ejemplo aparecen ovocitos segmentados en un avanzado estado atrésico sin estructuras laminares y se presentan estructuras laminares sin ninguna alteración ni ovular ni folicular.

Dado que la pubertad representa el inicio de ciclos sexuales desencadenados por la secreción cíclica de LH y FSH, consideramos que el incremento en las concentraciones de estas hormonas es un factor importante en la atresia vía apoptosis

Sobre la base de algunas observaciones que se presentan en este trabajo, podemos señalar que en los días 11, 12, 14, 15 y 16 en el ovario se encuentran tanto folículos sanos como atrésicos, los cuales aunque coexisten, no están mezclados, esto permite sugerir que el órgano podría estar regionalizado en áreas de atresia y de folículos sanos.

La atresia, tal y como se ha reconocido en todas las edades prepúberes, es un proceso que transcurre desde etapas tempranas y que progresa, aparentemente, de manera lenta ya que en etapas prepúberes no es frecuente encontrar las imágenes clásicas de atresia que se han descrito (Vázquez Nin G. y Sotelo J. 1967) las cuales corresponden a eventos tardíos, en cambio sí son frecuentes las etapas tempranas, las cuales son difíciles de valorar como de atresia.

Por lo tanto el dato que a nuestro juicio resulta más importante después de haber estudiado prácticamente todas las edades prepuberales y algunas de la madurez sexual temprana (18, 19, 22, 25 días) es que en ninguna de las primeras se identifican cuerpos apoptóticos abundantes. Mientras que en grandes folículos antrales de ratas sexualmente maduras, estos cuerpos son bien reconocibles. En relación con este hecho, es interesante señalar que en ovarios prepuberales no se localizan grandes folículos antrales, sólo antrales jóvenes. Por tanto podemos pensar que estos cuerpos solo se forman en etapas avanzadas de desarrollo folicular.

INTRODUCCIÓN

CARACTERÍSTICAS GENERALES DEL OVARIO DE LOS MAMÍFEROS

El ovario de los vertebrados es un órgano que produce óvulos y hormonas esteroides, que tiene como función regular el tracto reproductor, las características sexuales secundarias y la conducta sexual. El ovario está suspendido del cuerpo de la pared dorsal por el mesovario (Phillips B. 1975). El ovario presenta médula y corteza. La médula está formada por tejido conjuntivo fibroelástico. La corteza contiene el estroma con los folículos, su aspecto depende de la edad del organismo; antes de la madurez sexual sólo se observan ovocitos primarios, en la madurez sexual se observan folículos en crecimiento en diversas fases y cuerpos amarillos.

La mayoría de los vertebrados tienen dos ovarios y en Ciclostomos sólo se presenta uno, que probablemente es la fusión de dos (Andrew W. y Hickman P. 1984, Phillips B. 1975); en otros peces como el pez bruja existe una gónada cuya parte anterior es ovario y la posterior es testículo (Andrew W. y Hickman P. 1984). En algunos elasmobranquios sólo se desarrolla el ovario derecho (Romer A. et al. 1981); en aves el lado izquierdo del aparato reproductor se desarrolla y el oviducto derecho degenera o permanece inactivo, pero los falconiformes tienen ambos (Andrew W. y Hickman P. 1984, Patt I. y Patt R. 1979). Los mamíferos tienen dos ovarios pero los monotremas (equidna y el ornitorrinco) tienen solo el izquierdo (Romer A. et al. 1981).

La forma y el tamaño del ovario varía de acuerdo al vertebrado del que se trate y al momento del ciclo reproductor del que se encuentre (Andrew W. y Hickman P. 1984). Estas variaciones cíclicas son menos acentuadas en los mamíferos en comparación con los demás vertebrados.

El tamaño del folículo indica el estado de desarrollo del ovocito. Las etapas iniciales de la ovogénesis ocurren durante la vida fetal, cuando las divisiones mitóticas aumentan en forma masiva la cantidad de ovogonias. En condiciones normales sólo un ovocito alcanza la madurez (en los que tienen solo una cría) y es liberado por el ovario en cada ciclo menstrual. Una hembra

produce aproximadamente 400 óvulos maduros, la mayor parte (99%) de los 600 000 - 800 000 ovocitos primarios presentes en el nacimiento no maduran y se pierden gradualmente por **atresia** (Nahum R. et al 1996).

La atresia describe la muerte espontánea y la consecuente desaparición de los ovocitos inmaduros.

FOLICULOGÉNESIS

La foliculogénesis es el fenómeno que se refiere al desarrollo y crecimiento de los ovocitos, en un compartimiento ovárico de varias capas que de acuerdo con la etapa de desarrollo está formado sólo por células foliculares y/o también por células tecales, una membrana basal y por células semejantes a fibroblastos. (Richards J. y Midgley R. 1976).

En determinadas condiciones los folículos primordiales inician su crecimiento en ausencia de estímulos gonadotróficos, aparentemente bajo el control de señales provenientes del ovocito. En esta etapa de folículos preantrales aunque no hay estimulación de LH y FSH, las células foliculares y tecales empiezan a sintetizar receptores para estas hormonas. (Hirsfield A. y Midgley R. 1978).

Una vez que han llegado a la etapa de folículo antral, son “reclutados” y crecen bajo los efectos tróficos de LH y FSH, por tanto entran a una etapa de dependencia gonadotrófica. En esta fase la FSH juega un papel central ya que es la promotora de la proliferación de células foliculares, induce la actividad de aromatasas así como el aumento de sus propios receptores en células de la granulosa y de los de LH en las tecales. (Nokano R. et al . 1975).

La FSH estimula también la síntesis de péptidos reguladores locales y factores de crecimiento como: IGF, FGF, EGF, TGF-Beta, inhibina, activina y foliculostatina.

Durante la etapa de folículo antral se sintetizan abundantes cantidades de estrógenos, esta hormona conjuntamente con la inhibina inducen disminución de FSH hasta un nivel umbral requerido para el mantenimiento de folículos dependientes de gonadotropinas. Después de la selección del folículo dominante el desarrollo de receptores a LH en las células de la granulosa garantiza que el folículo pueda responder a la oleada ovulatoria de LH. (Richards J. y Midgley R. 1976).

DESARROLLO DEL OVOCITO

Desde el punto de vista histológico se identifican cuatro tipos de folículos ováricos de acuerdo con el estado de desarrollo:

- ◆ Folículos primordiales
- ◆ Folículos primarios
- ◆ Folículos secundarios (antrales)
- ◆ Folículos maduros o de Graaf

En el ovario en ciclo se encuentran folículos en todas las etapas de desarrollo, pero predominan los folículos primordiales (Ross M. et al. 1998).

FOLÍCULO PRIMORDIAL

Como su nombre lo indica, los folículos primordiales, son los folículos, más primitivos que aun no han comenzado a desarrollarse. Consiste de un ovocito central de alrededor de 20 micras de diámetro, rodeado por una sola capa aplanada de células epiteliales (foliculares). Estos pequeños folículos se presentan en grandes cantidades por debajo de la túnica albugínea. A medida que los folículos comienzan a madurar, emigran al interior dirigiéndose hacia la parte profunda de la corteza.

FOLÍCULO PRIMARIO

A medida que el folículo comienza a crecer, ocurren cambios a tres niveles:

- 1.- El ovocito crece de 50 a 80 micras y desarrolla múltiples complejos de Golgi y abundantes ribosomas libres. Las microvellosidades sobre la superficie del ovocito penetran a la zona pelúcida en formación, una cubierta glucoproteica neutral gruesa, que se tiñe intensamente y al parecer es elaborada por el ovocito en combinación con las células epiteliales circundantes.
- 2.- La capa única y plana de las células foliculares, primero es cúbica y luego se divide para formar una capa estratificada de células de la granulosa, sostenida sobre una membrana basal.

3.- El tejido conectivo que rodea al folículo comienza a condensarse y forma una teca (del griego, "caja"), que encapsula al folículo. En una etapa más tardía, esta teca se diferencia en dos capas funcionales (Borysenko M. et al.1985).

FOLÍCULO SECUNDARIO (ANTRAL)

Cuando los folículos alcanzan alrededor de 0.2mm de diámetro, con 6 a 12 capas de células de la membrana granulosa, aparecen pequeñas lagunas de líquido folicular. La acumulación de este líquido aumenta en diversos sitios que se unen para formar el antro folicular. Las células foliculares de la granulosa rodean esta cavidad dándole una apariencia semilunar debido al cumulus oophorus (Borysenko M. et al. 1985).

Al formarse el antro, el folículo primario se convierte en secundario o vesicular. El líquido folicular es claro y viscoso, rico en ácido hialurónico, contiene iones sodio y potasio, magnesio, cloro, calcio, zinc, cobre y fosfatos, su pH es mayor que 7.

La teca, que está separada de las células de la granulosa por la membrana basal, se diferencia en dos capas, una teca interna vascularizada y cuyas células elaboran estrógenos y una teca externa fibrosa (Nakano R. et al. 1975).

En su máximo desarrollo, el folículo está cerca de la superficie, la túnica albugínea se adelgaza en un punto llamado estigma, donde se efectúa la ruptura. Se forman espacios entre las células del cumulus oophorus y se constituye el folículo de Graaf, con lo que se debilita la conexión del ovocito con la granulosa, se desprende posteriormente con las células foliculares que lo rodean, que forman la corona radiada. (Lunenfeld B. et al. 1975).

FOLÍCULOS MADUROS O DE GRAAF.

Entre los 18 y 24 días, el folículo alcanza la madurez y ocupa todo el grosor de la corteza ovárica y sobresale visiblemente en la superficie libre. El líquido folicular comienza a acumularse entre las células del cumulus oophorus, de esta manera se libera al ovocito de todas las células, excepto una capa de células laxamente adheridas, llamada corona radiada. Mediante el control endocrino se presenta un aumento repentino en la cantidad del líquido folicular, y después de un periodo de varios minutos, el folículo se prepara para liberar al ovocito (Borysenko M. et al. 1985).

ORGANIZACIÓN DE LAS CÉLULAS FOLICULARES.

En el embrión las células del estroma se mueven y se unen al ovocito, diferenciándose en células foliculares (Byskov G. et al. 1978). Cuando los ovocitos quedan cerca de la periferia, el epitelio superficial es estimulado y también forma células foliculares (Patt I. y Patt R. 1979).

Mucho más tarde con el crecimiento del folículo se forma la zona pelúcida, entre ella están las microvellosidades del ovocito y de las células foliculares, éstas se ponen en contacto por medio de desmosomas. La zona pelúcida está formada por 2 capas, la que se encuentra hacia el ovocito contiene mucopolisacáridos neutros y la que está hacia las células foliculares contiene mucopolisacáridos ácidos.

ORGANIZACIÓN DE LA TECA

La teca folicular se subdivide en dos capas:

- **La teca interna** es una capa muy vascularizada, formada de células secretoras cúbicas. Las células totalmente diferenciadas de la teca interna poseen características ultraestructurales de las células productoras de esteroides. Las células de la teca interna poseen abundantes receptores para la hormona luteinizante (LH), sintetizan y secretan los andrógenos precursores del estrógeno. Además de las células secretoras, la teca interna contiene fibroblastos, haces colágenos y una rica red de vasos de pequeño calibre.
- **La teca externa** está formada por células de tejido conectivo, células musculares lisas y haces de fibras colágenas.

Los límites entre las capas tecales, la teca externa y el estroma circulante no están del todo definidos. Sin embargo, la lamina basal entre la capa de la granulosa y la teca interna establece un límite definido entre estas capas y separa el rico lecho capilar de la teca interna de la capa granulosa avascular, durante el período de crecimiento folicular. (Morales M. et al. 1983)

FOLÍCULOS POSTOVULATORIOS.

Después de la ovulación, la pared del folículo se colapsa, entonces un poco de sangre llena la cavidad folicular, el tejido conjuntivo invade el folículo y las células foliculares se organizan entre los capilares en cordones, posteriormente, las células crecen y toman las características de células endocrinas: su citoplasma presenta gránulos llamados lipocromos que contienen pigmentos carotenoides, a estas células se les denomina luteínicas. Las células de la teca interna se ensanchan y son llamadas tecoluteínicas (Delgado M. et al.1995. Greep O y Weiss L. 1975. Greenwald G y Terranova P. 1988 y Guo M. et al. 1994).

El cuerpo lúteo es una glándula transitoria, cuando hay fecundación involuciona muy lentamente en comparación con los ciclos infértiles, disminuye la grasa, la vascularización y sus células reducen su tamaño y se transforma en una cicatriz llamada cuerpo albicans, el cual es substituido por el estroma. Si hay embarazo el cuerpo luteo es estimulado por el trofoblasto y permanece toda la gestación, al menos en algunas especies (Austin C. y Short R. 1982 y Echeverría O. et al. 1980).

FOLÍCULOS ATRÉSICOS

La palabra atresia proviene del griego (a = no; tresia = perforar) y en su definición estricta atresia se refiere a los cambios degenerativos que sufren los folículos antrales antes de la ovulación

La historia de vida de los ovarios es ejemplificada por el constante agotamiento de células germinales y somáticas. Esta preponderancia de degeneración celular ordenada en el ovario está probablemente relacionada con el remodelamiento masivo del tejido durante repetidas oleadas de crecimiento folicular, ovulación, luteinización y fallecimiento de cuerpos lúteos. (Aaron J. et al.1994)

Los mecanismos fundamentales de la muerte masiva de células somáticas y germinales encontradas en los ovarios son poco claros, una posible ventaja evolutiva del proceso de agotamiento puede ser la selección de folículos para ovular únicamente el ovocito sano. Los mecanismos de selección del folículo durante el ciclo reproductivo normal es la exposición de folículos a FSH durante un estado critico del desarrollo.

Los folículos que reciben insuficiente apoyo de FSH durante este periodo crítico de desarrollo son eliminados por degeneración atrésica. (Aarón J. et al. 1994.)

En la atresia de los folículos grandes, en desarrollo, la degeneración del ovocito parece ocurrir como consecuencia de cambios degenerativos de la pared folicular, que incluye la siguiente secuencia de procesos:

- * Cese de la mitosis y expresión de endonucleasas y enzimas hidrolíticas en las células de la granulosa
- * Hipertrofia de las células de la teca interna.
- * Colapso del folículo a medida que continúa la degeneración
- * Invasión del tejido conectivo al interior de la cavidad folicular
- * Invasión de la capa granulosa por neutrófilos y macrófagos
- * Invasión de la capa granulosa por cordones de tejido conectivo vascularizado.
- * Esfacelación de células de la granulosa hacia el interior del antro folicular (Ross M. et al.1998).

La atresia es más acentuada en épocas de cambios hormonales como: después del nacimiento cuando cesa el efecto de las hormonas maternas en la pubertad y en la gravidez.

La atresia se ha descrito desde el punto de vista morfológico tanto a nivel de microscopía óptica (Grete A. et al. 1978) como electrónica (Vázquez Nin G. y Sotelo J. 1967). En microscopía óptica se ha señalado la separación de la capa de células de la granulosa de la membrana basal, desaparecen los nucleolos y en estados finales hay vacuolización del citoplasma y la presencia de núcleos picnóticos pertenecientes a este tipo celular.

A nivel de microscopía electrónica los eventos morfológicos que se presentan durante este fenómeno involucran a todo el folículo, es decir; se presentan cambios en las células foliculares, tecaes, la membrana basal, el ovocito y la zona pelúcida (Vázquez Nin G. y Sotelo J. 1978).

Con relación a las células foliculares se ha descrito la aparición de dos poblaciones, unas denominadas células claras y otras de mayor electrodensidad. Ambas presentan pérdida de microvellosidades y deformación celular, en estas células se ha descrito recientemente la formación de cuerpos laminares.

Cuando ocurre la atresia en folículos primarios, el contorno del ovocito se torna irregular y las células de la granulosa reducen su tamaño. Ambos se degradan, dejando al final un espacio que es ocupado por las células del estroma.

Con respecto a las células tecales existe cierta controversia en relación a si tienen o no cambios. En los ovocitos de folículos atrésicos se ha descrito pérdida de microvellosidades, deformación celular, pseudosegmentación y aparición de cuerpos laminados y cuerpos multivesiculares (Vázquez Nin G. y Sotelo J. 1967).

La atresia en folículos vesiculares se caracteriza por picnosis en el núcleo de las células de la granulosa, condensación de los cromosomas, los ovocitos son fagocitados por células de la granulosa o macrófagos. Algunos investigadores han propuesto que los materiales fagocitados pueden ser transformados en sustancias utilizadas por los ovocitos; la zona pelúcida es muy resistente, es la última en ser fagocitada. Durante la atresia, las células de la teca aumentan de tamaño y se organizan en la llamada reacción luteínica de la teca. Posteriormente pasan a formar parte de la glándula intersticial, en algunos roedores degeneran o en otros mamíferos son substituidas por tejido conjuntivo.

Se ha observado que ovocitos en degeneración fragmentan su núcleo, dando como resultado, numerosos cuerpos semejantes a núcleos.

A nivel ovárico se han descrito múltiples factores de crecimiento que contribuyen a la supresión de la atresia folicular, algunos de estos son:

El factor de crecimiento de hepatocitos (Zachowk K. et al. 1997), la interleucina 1 β , el factor de crecimiento de fibroblastos y el factor de crecimiento semejante a insulina, entre otros (Besnard N.

y Pisselet C. 1996). Bajo condiciones de cultivo se sabe que el suero fetal evita la atresia. (Frederick L. y Xinbo Z. 1998).

Basándose en las características bioquímicas como morfológicas, en años recientes se ha logrado establecer que el proceso de atresia presenta una estrecha relación con el fenómeno de la apoptosis. (Frederick L. y Xinbo Z. 1998).

ANTECEDENTES DE LA MUERTE CELULAR PROGRAMADA

La muerte es junto con el crecimiento y la diferenciación una etapa crucial en el ciclo celular de los organismos. El balance dinámico entre proliferación y muerte tiene como resultado la homeostasis en las poblaciones celulares (King K. y Cidlowski J. 1995).

Los investigadores se han enfocado al estudio de un tipo natural de muerte denominada apoptosis o muerte celular programada. Este fenómeno es de gran relevancia dado que tiene un papel crítico en varios procesos fisiológicos y patológicos. La función precisa de la apoptosis la manera de como se regula y sus mecanismos de acción, son temas de intensa investigación en el campo médico-biológico (Fournel S. et al. 1995).

La muerte se puede definir como la pérdida irreversible de la integridad celular causada por severos trastornos fisiológicos y morfológicos. La muerte en la célula se presenta por las más diversas causas. En 1951 luego de una serie de estudios embriológicos se estableció que la muerte tiene un papel especial durante la ontogenia normal de los vertebrados. Posteriormente en 1966, se señala la importancia de la muerte en los sistemas embrionarios y se llega a la conclusión de que el fenómeno es una actividad biológica programada. (Wyllie A, et al. 1980).

Hasta hace algunos años, los estudios realizados sobre este tema consideraban que la célula moría de una manera pasiva y accidental por acción de agentes lesivos. A este tipo de muerte celular se le conoce comúnmente como Necrosis (del griego necros: muerte y osis: estado).

y Pisselet C. 1996). Bajo condiciones de cultivo se sabe que el suero fetal evita la atresia. (Frederick L. y Xinbo Z. 1998).

Basándose en las características bioquímicas como morfológicas, en años recientes se ha logrado establecer que el proceso de atresia presenta una estrecha relación con el fenómeno de la apoptosis. (Frederick L. y Xinbo Z. 1998).

ANTECEDENTES DE LA MUERTE CELULAR PROGRAMADA

La muerte es junto con el crecimiento y la diferenciación una etapa crucial en el ciclo celular de los organismos. El balance dinámico entre proliferación y muerte tiene como resultado la homeostasis en las poblaciones celulares (King K. y Cidlowski J. 1995).

Los investigadores se han enfocado al estudio de un tipo natural de muerte denominada apoptosis o muerte celular programada. Este fenómeno es de gran relevancia dado que tiene un papel crítico en varios procesos fisiológicos y patológicos. La función precisa de la apoptosis la manera de como se regula y sus mecanismos de acción, son temas de intensa investigación en el campo médico-biológico (Fournel S. et al. 1995).

La muerte se puede definir como la pérdida irreversible de la integridad celular causada por severos trastornos fisiológicos y morfológicos. La muerte en la célula se presenta por las más diversas causas. En 1951 luego de una serie de estudios embriológicos se estableció que la muerte tiene un papel especial durante la ontogenia normal de los vertebrados. Posteriormente en 1966, se señala la importancia de la muerte en los sistemas embrionarios y se llega a la conclusión de que el fenómeno es una actividad biológica programada. (Wyllie A, et al. 1980).

Hasta hace algunos años, los estudios realizados sobre este tema consideraban que la célula moría de una manera pasiva y accidental por acción de agentes lesivos. A este tipo de muerte celular se le conoce comúnmente como Necrosis (del griego necros: muerte y osis: estado).

Además de la necrosis se ha descubierto otro tipo de muerte celular denominada apoptosis conocida también como muerte celular programada la cual manifiesta una actividad celular característica en donde se necesita la expresión de genes específicos y la presencia de una serie de fenómenos bioquímicos y moleculares. La apoptosis; término griego compuesto de las partículas *Apo* (aparte) y *ptosis* (caído) que en el mundo clásico se utilizaba para describir la caída otoñal de las hojas, que es un proceso activo de autodestrucción celular dirigido genéticamente y que cumple una función homeostática. (Earnshaw W. et al 1995).

La muerte celular programada y la apoptosis generalmente se han utilizado como sinónimos, sin embargo ambos términos no son completamente equivalentes. La apoptosis caracteriza un tipo de muerte celular que presenta un conjunto de rasgos morfológicos especiales. (Frederick L. y Xinbo Z. 1998). Por su parte la muerte celular programada es un término de uso general que significa la predeterminación del deceso celular, regulada genéticamente, en las fases embrionarias de un organismo, que puede manifestarse mediante la apoptosis o no. (Wyllie A, et al. 1980).

Es decir la muerte celular programada no indica necesariamente la presencia de la apoptosis en algunos organismos. Además la apoptosis puede inducirse con una amplia gama de drogas o estímulos físicos; aquí la muerte es claramente no programada puesto que representa la respuesta celular a cambios en su medio ambiente (Hughes F. y Gorospe W. 1991).

En los mamíferos los estudios se han enfocado a varios tejidos como el útero, la próstata, la corteza adrenal, las neuronas, el ovario, etc., en donde la remoción o adición de un cierto factor de crecimiento hormonal les induce la apoptosis (Tounekti O. et al 1995). En el sistema inmune de ratones se ha demostrado que los timocitos inmaduros experimentan un rápido recambio que hace que la mayoría de ellos mueran *in situ* debido principalmente a la apoptosis. (Earnshaw W. et al 1995).

En los seres humanos algunas evidencias de apoptosis se localizan en tejidos neoplásicos que incluyen a varios tipos de leucemias, en linfomas y en una línea carcinomica de colon. (Tounekti O. et al 1995).

La apoptosis también se presentan en las enfermedades infecciosas. Existen evidencias que indican que la patogénesis de una gran cantidad de virus incluye la inducción de apoptosis en sus hospederos; por ejemplo el virus de la anemia de pollo, de la influenza de pavos, el VIH en humanos y muchos otros mas. A su vez se sabe que las bacterias *Shigella flexneri* y *Brotella pertussis*, agentes de la disentería y la tos ferina respectivamente, eliminan a los macrófagos mediante la apoptosis. (Earnshaw W. et al 1995).

Necrosis	Apoptosis
<ul style="list-style-type: none"> ◆ Características Morfológicas ◆ Pérdida de la integridad de la membrana ◆ Inflamación de Mitocondrias y Citoplasma ◆ No hay formación de vesículas, lisis completa ◆ Desintegración de organelos. 	<ul style="list-style-type: none"> ◆ Expansión de membrana, pero no hay pérdida de integridad. ◆ Agregación de la cromatina en la membrana nuclear. ◆ Comienza una contracción del citoplasma y una condensación del núcleo. ◆ Fragmentación de células terminando en pequeños cuerpos ◆ Formación de vesículas rodeadas de membrana (cuerpos apoptóticos).
<ul style="list-style-type: none"> ◆ Características Bioquímicas ◆ Pérdida de la regulación de iones ◆ No hay requerimiento de energía (proceso pasivo, también ocurre a 4°C). ◆ Degradación de DNA al azar. ◆ Fragmentación de DNA postlítica. 	<ul style="list-style-type: none"> ◆ Proceso altamente regulado ◆ Dependiente de energía, ATP (Proceso activo, no ocurre a 4°C). ◆ Fragmentación de DNA, no al azar (Patrón de escalera en gel de electroforesis) ◆ Fragmentación prelítica de DNA ◆ Liberación de varios factores (citocromo C, AIF) en el citoplasma por la mitocondria. ◆ Activación de las caspasas ◆ Alteración en la asimetría de la membrana
<ul style="list-style-type: none"> ◆ Significado Fisiológico ◆ Afecta grupos de células contiguas ◆ Evocado por disturbios no patológicos (ataque al complemento, virus líticos, hipotermia hipoxia, isquemia, venenos metabólicos). ◆ Fagocitosis por macrófagos ◆ respuesta inflamatoria significativa. 	<ul style="list-style-type: none"> ◆ Afecta células individuales ◆ Inducidos por estímulos fisiológicos (pérdida de factores de crecimiento, cambios de ambientes hormonales). ◆ Fagocitosis por células adyacentes o macrófagos ◆ No hay respuesta inflamatoria.

Tabla 1: Características diferenciales de necrosis y apoptosis.

CARACTERIZACIÓN DE LA APOPTOSIS

El proceso de necrosis clásico se caracteriza por la hinchazón, rotura de membrana y estallido de las células. Las cuales son características morfológicas muy distintas con respecto a las de la apoptosis, ya que en lugar de hinchadas las células parecen haberse contraído, un hecho que determina el proceso de Apoptosis. (Frederick L. y Xinbo Z. 1998).

La morfología de las células en apoptosis se describió detalladamente con la ayuda del microscopio óptico y electrónico. Este proceso generalmente afecta a células aisladas o pequeños grupos celulares de una manera asincrónica. Los cambios se manifiestan de la siguiente forma:

El citoplasma se contrae y al mismo tiempo la cromatina se condensa en una o varias masas grandes que se adosan en la envoltura nuclear; a continuación el núcleo se fragmenta de tal forma que las fracciones resultantes todavía conservan la envoltura nuclear. La contracción del citoplasma se asocia a la pérdida de iones y fluido intracelular, que se acrecienta debido a que el retículo endoplasmico se dilata y forma las vesículas que más tarde son expulsadas al exterior (Wyllie A, et al. 1980).

A pesar de esta pérdida de volumen, los organelos, a excepción del núcleo, se mantienen intactos y la membrana celular no sufre ningún tipo de ruptura, en vez de esto la membrana pierde su consistencia normal pues se contrae y tiende a formar invaginaciones (Cohen J. et al 1994). Después la célula se rompe en varios fragmentos discretos llamados “cuerpos apoptóticos”, que consisten en vesículas con organelos intactos junto con porciones de cromatina; todo ello englobado con la misma membrana plasmática de la célula. (Frederick L. y Xinbo Z. 1998).

Los cuerpos apoptóticos varían en tamaño y su número depende del tamaño de la célula que los originó. Estos cuerpos son rápidamente fagocitados por células vecinas o por el sistema retículo endotelial. Una vez ingeridos, los cuerpos apoptóticos sufren una rápida degradación. En algunos casos estos cuerpos no son fagocitados y al degradarse entran en un proceso llamado “necrosis secundaria” (Frederick L. y Xinbo Z. 1998).

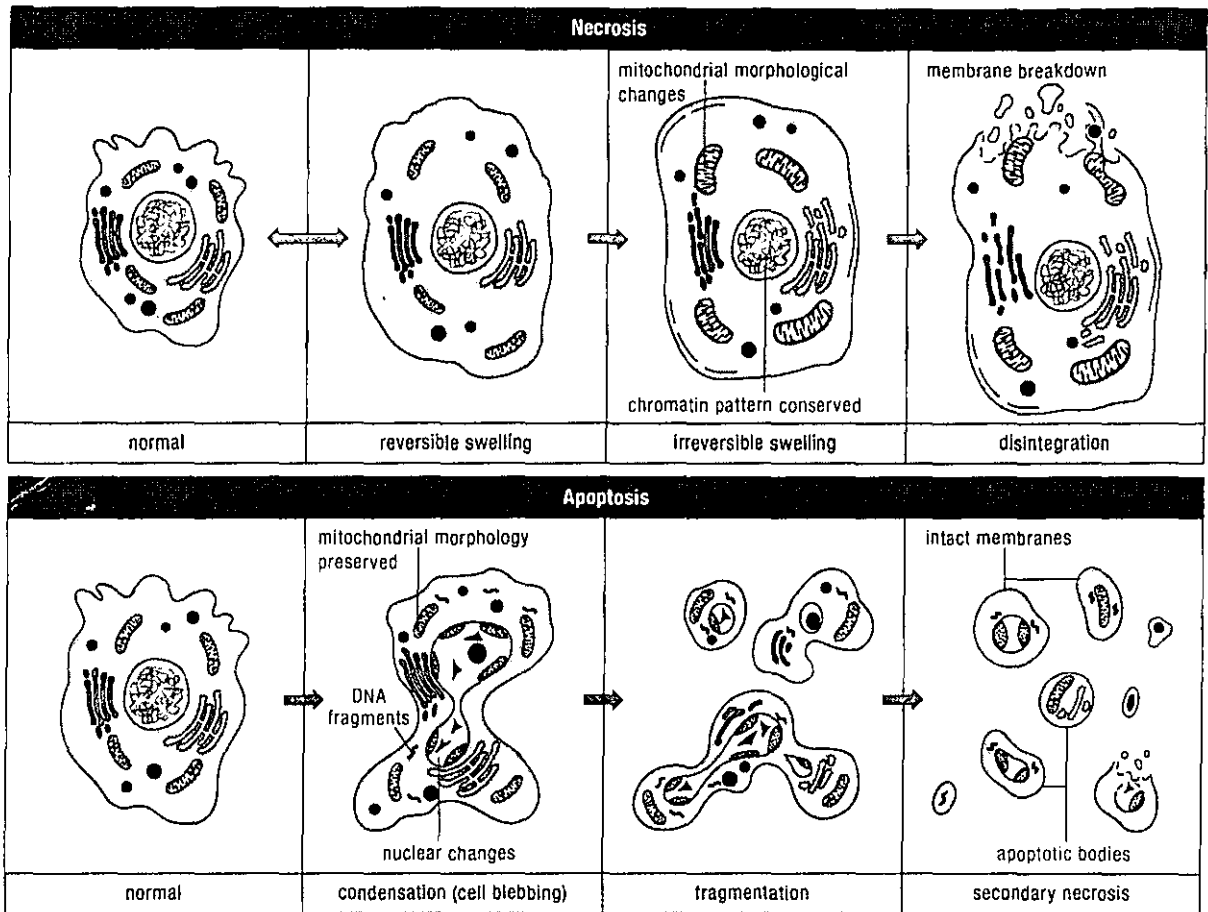


Figura 1. Ilustración de las características morfológicas de necrosis y apoptosis

El fenómeno apoptótico conlleva la manifestación de una multitud de acontecimientos bioquímicos que llevan a la degradación del ADN, la intervención de segundos mensajeros, factores de regulación de apoptosis, la activación de enzimas y otros mecanismos. (Wyllie A, et al. 1980).

Un fenómeno distintivo de la apoptosis es la degradación peculiar de la cromatina. Durante este proceso el ADN se degrada progresivamente por la acción de endonucleasas. Los fragmentos producidos tienen determinado tamaño, del orden de 180 a 200 pares de bases o sus múltiplos, a modo de fragmentos oligoméricos debido a que el ADN se rompe en los espacios internucleosómicos. (Kass G. et al 1996).

Los productos de la degradación se pueden detectar por medio de una electroforesis en gel de agarosa que revela un patrón peculiar: un bandeo horizontal regular llamado en escalera o "ladder". Cada una de las bandas expresa el tamaño de los fragmentos oligonucleosómicos. Esta escalera es una de las características de la apoptosis ya que si se realiza una electroforesis a un núcleo necrótico, su corrimiento se muestra como una franja difusa que revela la degradación caótica del ADN. (Wyllie A, et al. 1980).

En la actualidad se conocen varias enzimas intracelulares que intervienen en la regulación de la apoptosis. Entre ellas se mencionan a la proteincinasa C, las tirosinasinasas y la polimerasa de ADP ribosa. Del mismo modo también existe la injerencia de segundos mensajeros como el calcio, el AMP cíclico y la ceramida, así como los factores de regulación de apoptosis como son los miembros de la familia de la cininasas, proteasas, factores inductores de apoptosis (AIF), proteínas traductoras de apoptosis (P53, Caspasa, etc.), proteínas inhibidoras o anti-apoptóticas (BCL-2, BCL-X, Inhibidoras de Caspasas, TAP), etc. (Earnshaw W. et al 1995).

Por otra parte también se ha encontrado que la apoptosis se presenta en condiciones bioquímicas particulares, como el cambio del pH intracelular. También es probable que los sucesos oxidativos se presenten en el colapso celular o en las modificaciones estructurales de la cromatina. (Kass G. et al 1996).

CICLO ESTRAL DE LA RATA.

Las ratas presentan un ciclo estral de 4 días y su ovulación es espontánea, los cuerpos lúteos que se forman después de la ovulación nunca son funcionales, pero, si hay copula, se estimula el desarrollo de un cuerpo luteo funcional y entonces la rata tiene una preñez o una pseudopreñez, dependiendo de que la copulación haya sido fértil o no. Toda la cronología del ciclo estral se determina con base en el ritmo diurno, la ovulación siempre se presenta poco después de la media noche. Un día antes de que la rata entre en celo, en la mañana del proestro, la secreción del 17 β estradiol de los folículos de Graaf que se encuentran en desarrollo alcanza su valor máximo. Esto desencadena un incremento en la secreción del cuerpo lúteo de progesterona durante la tarde del

Los productos de la degradación se pueden detectar por medio de una electroforesis en gel de agarosa que revela un patrón peculiar: un bandeo horizontal regular llamado en escalera o "ladder". Cada una de las bandas expresa el tamaño de los fragmentos oligonucleosómicos. Esta escalera es una de las características de la apoptosis ya que si se realiza una electroforesis a un núcleo necrótico, su corrimiento se muestra como una franja difusa que revela la degradación caótica del ADN. (Wyllie A, et al. 1980).

En la actualidad se conocen varias enzimas intracelulares que intervienen en la regulación de la apoptosis. Entre ellas se mencionan a la proteincinasa C, las tirosinasinasas y la polimerasa de ADP ribosa. Del mismo modo también existe la injerencia de segundos mensajeros como el calcio, el AMP cíclico y la ceramida, así como los factores de regulación de apoptosis como son los miembros de la familia de las cininasas, proteasas, factores inductores de apoptosis (AIF), proteínas traductoras de apoptosis (P53, Caspasa, etc.), proteínas inhibidoras o anti-apoptóticas (BCL-2, BCL-X, Inhibidoras de Caspasas, TAP), etc. (Earnshaw W. et al 1995).

Por otra parte también se ha encontrado que la apoptosis se presenta en condiciones bioquímicas particulares, como el cambio del pH intracelular. También es probable que los sucesos oxidativos se presenten en el colapso celular o en las modificaciones estructurales de la cromatina. (Kass G. et al 1996).

CICLO ESTRAL DE LA RATA.

Las ratas presentan un ciclo estral de 4 días y su ovulación es espontánea, los cuerpos lúteos que se forman después de la ovulación nunca son funcionales, pero, si hay copula, se estimula el desarrollo de un cuerpo luteo funcional y entonces la rata tiene una preñez o una seudopreñez, dependiendo de que la copulación haya sido fértil o no. Toda la cronología del ciclo estral se determina con base en el ritmo diurno, la ovulación siempre se presenta poco después de la media noche. Un día antes de que la rata entre en celo, en la mañana del proestro, la secreción del 17 β estradiol de los folículos de Graaf que se encuentran en desarrollo alcanza su valor máximo. Esto desencadena un incremento en la secreción del cuerpo lúteo de progesterona durante la tarde del

proestro y la ovulación se presenta en las primeras horas de la mañana siguiente, (Austin C. y Short R. 1982). La liberación de 17β estradiol estimula la proliferación del endometrio y el aumento de LH en el torrente sanguíneo e inhibe la producción del factor liberador de gonadotropinas por el hipotálamo. (Tounekti O. et al 1995).

ANTECEDENTES NUCLEARES

Las células son las unidades estructurales y funcionales de la vida. Las células eucariontes están divididas en diferentes compartimentos, en los que se ejecutan distintas funciones. En el núcleo existen también varios compartimentos con actividades muy particulares como son la transcripción, el procesamiento del ARN y la replicación.

El núcleo fue descrito por primera vez por Leewenhoek en el siglo XVII. Brown le da el nombre en 1831. Inicialmente, se consideró como una estructura amorfa, teniéndose conocimientos muy limitados sobre la organización ultraestructural y funcional de éste. Con el desarrollo de nuevas técnicas en el campo del análisis ultraestructural, combinadas con técnicas citoquímicas, autorradiográficas, inmunolocalización e hibridación *in situ*, han dado como resultado una nueva visión de la estructura nuclear y de su funcionamiento. El núcleo es una estructura molecularmente muy organizada y altamente dinámica. (De Robertis 1981).

El núcleo celular presenta dos fases importantes, la interfase y la mitosis. El núcleo en interfase es un período de intensa actividad celular en la cual la célula se está preparando para empezar a dividirse y dar origen a dos células hijas con la misma información genética y características morfológicas de la célula madre. La interfase puede dividirse en tres periodos, designados como G1, S y G2. El período G1 tiene lugar después de la mitosis y es primariamente un tiempo de crecimiento del material citoplasmático, incluyendo varios organelos. También durante el periodo G1, de acuerdo con una hipótesis actual, se sintetizan sustancias que inhiben o estimulan el periodo S y el resto del ciclo, de tal modo que determinarán si la división celular tendrá o no lugar. El periodo S sigue al G1. Durante la fase S, el material genético (ADN) es duplicado. Durante el periodo G2 se forman algunas estructuras implicadas directamente con la mitosis, como son los componentes de las fibras del huso. Mediante estudios de microscopía óptica y electrónica, se han podido establecer los componentes estructurales del núcleo en interfase. (Alberts B. et al. 1995).

proestro y la ovulación se presenta en las primeras horas de la mañana siguiente, (Austin C. y Short R. 1982). La liberación de 17β estradiol estimula la proliferación del endometrio y el aumento de LH en el torrente sanguíneo e inhibe la producción del factor liberador de gonadotropinas por el hipotálamo. (Tounekti O. et al 1995).

ANTECEDENTES NUCLEARES

Las células son las unidades estructurales y funcionales de la vida. Las células eucariontes están divididas en diferentes compartimentos, en los que se ejecutan distintas funciones. En el núcleo existen también varios compartimentos con actividades muy particulares como son la transcripción, el procesamiento del ARN y la replicación.

El núcleo fue descrito por primera vez por Leewenhoek en el siglo XVII. Brown le da el nombre en 1831. Inicialmente, se consideró como una estructura amorfa, teniéndose conocimientos muy limitados sobre la organización ultraestructural y funcional de éste. Con el desarrollo de nuevas técnicas en el campo del análisis ultraestructural, combinadas con técnicas citoquímicas, autorradiográficas, inmunolocalización e hibridación *in situ*, han dado como resultado una nueva visión de la estructura nuclear y de su funcionamiento. El núcleo es una estructura molecularmente muy organizada y altamente dinámica. (De Robertis 1981).

El núcleo celular presenta dos fases importantes, la interfase y la mitosis. El núcleo en interfase es un período de intensa actividad celular en la cual la célula se está preparando para empezar a dividirse y dar origen a dos células hijas con la misma información genética y características morfológicas de la célula madre. La interfase puede dividirse en tres periodos, designados como G1, S y G2. El período G1 tiene lugar después de la mitosis y es primariamente un tiempo de crecimiento del material citoplasmático, incluyendo varios organelos. También durante el periodo G1, de acuerdo con una hipótesis actual, se sintetizan sustancias que inhiben o estimulan el periodo S y el resto del ciclo, de tal modo que determinarán si la división celular tendrá o no lugar. El periodo S sigue al G1. Durante la fase S, el material genético (ADN) es duplicado. Durante el periodo G2 se forman algunas estructuras implicadas directamente con la mitosis, como son los componentes de las fibras del huso. Mediante estudios de microscopía óptica y electrónica, se han podido establecer los componentes estructurales del núcleo en interfase. (Alberts B. et al. 1995).

ULTRAESTRUCTURA DEL NÚCLEO EN INTERFASE

La interfase es el período del ciclo celular, en que las células no están dividiéndose y no suceden cambios visibles con el microscopio óptico, pero existe gran actividad metabólica, (Echeverría O. y Vázquez Nin G. 1995). El núcleo en esta etapa es el organelo más grande en las células eucariontes, mide entre 5 y 10 μm de diámetro, (Echeverría O. y Vázquez Nin G. 1995).

Envoltura nuclear

El núcleo es el sitio que sirve como depósito del material genético de las células eucariontes, este material genético se encuentra rodeado por una doble membrana denominada envoltura nuclear, que juega un papel importante en la regulación del intercambio nucleocitoplásmico, de moléculas y complejos macromoleculares, y sirve como sitio de anclaje para la cromatina en la etapa de interfase. La membrana externa es continua con el retículo endoplásmico y muy frecuentemente posee ribosomas en su superficie, los cuales están involucrados en la síntesis de proteínas. La membrana nuclear interna está unida a la lámina nuclear y a la cromatina, el espacio entre las dos membranas se le conoce como espacio perinuclear, y es directamente continuo con el lumen del retículo endoplásmico, la membrana nuclear externa y la interna son fusionadas en diferentes puntos, formando los poros nucleares. Estos poros están ocupados por complejos macromoleculares ensamblados, denominados complejos de poro nucleares (NPC), los cuales controlan el pasaje de moléculas dentro y fuera del núcleo, su número varía entre diferentes tipos celulares, su diámetro es de 120 nm., su simetría es octagonal rodeando un eje central, el cual es perpendicular al plano de la membrana nuclear. Se ha propuesto que existe el paso de proteínas y RNAs entre el núcleo y el citoplasma por medio de los poros nucleares, (Spector D. et al. 1993)

Lámina nuclear.

Se encuentra entre la membrana interna de la envoltura nuclear; es una capa electrodensa de 10 nm. que contiene polipéptidos. Está formada por filamentos de 10 nm de diámetro orientados ortogonalmente, se ha propuesto que la lámina nuclear puede actuar como un sustrato para la formación de complejos de replicación, o bien, que puede regular la condensación del DNA o la formación de elementos de la matriz nuclear, los cuales son requeridos para que ocurra una replicación eficiente, además tiene una función estructural en el núcleo. (Spector D. et al.1993)

CROMATINA

La cromatina es el material genético o ADN de las células, histonas y otras proteínas, se encuentra de dos formas, compacta y dispersa o laxa. La cromatina compacta contiene la información genética que no se transcribe, al menos en este momento (Angus I. y Earnshaw W. 1998). La cromatina compacta se clasifica en dos tipos, la constitutiva y la facultativa, la constitutiva es altamente enriquecida en secuencias repetitivas y la función de este tipo de cromatina es desconocida, la facultativa es la cromatina potencialmente activa e involucra la condensación de un cromosoma, el caso más conocido es la condensación de un cromosoma X o cuerpo de Barr (Spector D et al. 1993). La cromatina esta constituida por ADN, proteínas asociadas y ARN.

En el núcleo encontramos proteínas histonicas y no histonicas, las primeras son una clase de proteínas básicas con un peso molecular de 8 000 a 26 000. A continuación describimos someramente a las cinco histonas que se encuentran formando parte de la cromatina.

La histona H1 tiene un peso molecular de 20 000, es rica en lisina y ampliamente variable en las especies. La histona H2A tiene un peso molecular de 13 700, es relativamente rica en lisina y, desde el punto de vista evolutivo, es relativamente conservada en las especies. La H2B posee las características de la H2A. La histona H3 tiene un peso molecular de 15 700, es rica en arginina y evolutivamente muy conservada en las especies.

En general podemos decir que alrededor de un 25% de los restos totales de los aminoácidos de las histonas pertenecen a la arginina, histidina y lisina a las cuales se debe la carga positiva que poseen

las histonas. La lisina ocupa la mayor proporción de todos los aminoácidos; entre 10 y 20% del total. Exceptuando la H1 la evolución de las histonas ha sido extremadamente conservada en particular la H3 y H4. La relación de ADN-histonas es de 1:1 (Karp, 1987).

En la cromatina se encuentran subunidades fundamentales repetidas denominadas nucleosomas que están constituidos de ADN e histonas (Kornberg, 1981; Inaga et al. 1991).

El núcleo de los nucleosomas está formado por un oligómero de histonas: dos unidades de H2A, dos unidades de H2B, dos unidades de H3 y dos unidades de H4. Las técnicas de difracción de rayos X y de neutrones sugieren que este octámero conforma una estructura cilíndrica de aproximadamente 1000 Å de diámetro y 500 Å de altura (Grunstein,1992). Se ha demostrado que la histona H2A y H2B, son capaces de intercambiarse dentro y fuera de la estructura del nucleosoma.

La histona H1 es igual que la H2A y la H2B, es intercambiable dentro y fuera de la cromatina. Sin embargo, no es parte del núcleo del nucleosoma y presenta algunas diferencias con aquellas. Las histonas H2A, H2B, H3 y H4 son las proteínas más conservadas durante la evolución, la H1 es la menos conservada de las histonas mencionadas (Kayne y col., 1988).

La cromatina en su nivel estructural más interna está ordenada de una forma simple mediante una subestructura fundamental repetitiva integrada por una agrupación nucleoproteica globular discreta, que contiene histonas asociadas a un fragmento de doble hebra de ADN de longitud determinada (Grunstein,1992). Con nucleasa micrococcal se obtienen fragmentos de ADN de 140 pares de bases lo que hace suponer que el nucleosoma posee dos partes diferenciadas. Una de ellas correspondería al núcleo de la partícula constituida por el oligómero de histonas y la otra a la hebra de ADN de 140 pares de bases (Kornberg, 1981; Getzenberg et al. 1991). Además de ADN estrechamente relacionado con el octámero, hay una parte de la hebra de ADN interconectado entre dichos octámeros. Cuando los fragmentos son mayores, equivalentes a dos o más nucleosomas, se puede demostrar la presencia de las cinco histonas, la H1 puede estar involucrada uniendo a los nucleosomas (Kornberg, 1981).

Los resultados de estudios por difracción de rayos X han demostrado que las histonas, exceptuando la H1, está densamente empaquetada. Por otra parte, no se aprecian en esta estructura orificios lo bastante espaciosos como para que quepa en ellos una molécula de ADN, por lo que se ha propuesto que el conjunto de histonas de la unidad estructural de un cromosoma es un complejo sólidamente empaquetado. El ADN asociado con las histonas debe estar unido a la parte exterior del complejo; una única y larga molécula de ADN, extendida a lo largo del cromosoma, pasaría de un juego de histonas al siguiente. (Kornberg, 1981).

Los experimentos con difracción de neutrones llevados a cabo por John F. Pardon y sus colegas aportaron pruebas de que el ADN está situado en la parte exterior del nucleosoma y la información procedente de los rayos X y la microscopia electrónica, hacen suponer que la disposición del ADN corresponde a la doble hélice de esta molécula enrollada en una hélice mayor o superhélice, dando aproximadamente dos vueltas en torno a la histona situada en medio de las partículas. Las dos vueltas de la superhélice deben hallarse muy próximas entre sí, pues la hélice de ADN mide 20 Å (Konberg, 1981).

Actualmente se acepta que un nucleosoma se estructura cuando las histonas forman un complejo con el ADN. Este complejo, llamado partícula central nucleosomal, incluye en su centro dos copias de histonas H3 y dos H4. Este tetrámero H3-H4 está franqueado por dos dímeros H2A-H2B. En el extremo de cada molécula de histona se cree que hay prolongaciones semejantes a colas que salen de la partícula central nucleosomal interactuando con otras moléculas. En muchos organismos, pero no en todos, la H1 ayuda a anclar el ADN a la partícula central nucleosomal (Grunstein, 1992).

A partir de la disposición espacial, se ha deducido la participación individual de las histonas en el plegamiento del ADN sobre el tetrámero $(H3)_2 (H4)_2$, este define el giro central de la superhélice de ADN. Las H2A y H2B enlazan al ADN al inicio, centro y fin de una molécula de H1 (Adams, 1993), lo que completa la superhélice.

Se cree que la cromatina tiene otros niveles de compactación como el propuesto por el modelo de selenoide, en este modelo los nucleosomas se disponen de forma helicoidal con un diámetro externo de 300 Å y un diámetro interno de 100 Å y una inclinación de 110 Å por vuelta. Cada

vuelta contiene de 4 a 10 nucleosomas. La máxima compactación de los nucleosomas permitiría que solamente hubiera 2.7 nucleosomas por vuelta, por lo que se ha propuesto que la parte central podría contener a la histona H1, o proteínas no histónicas u otros elementos de control o bien ADN desnudo (Finch y Klug, 1976). El diámetro de la fibra de cromatina "in situ" es equivalente a 250-300 A (Grosor de la fibra) ello es estable y discernible en la metafase, igual que la cromatina de interfase aislada después de dispersarla con disolventes catiónicos. Estas fibras se pueden convertir en fibras de 100 A, las fibras de 200-300 A son referidas como nucleómeros, en donde los nucleosomas se empaquetan en forma de solenoide que se caracteriza por una elevación de 110 A (el diámetro de un nucleosoma) y por un diámetro de cerca de 300 A (6-7 nucleosomas por giro) formando una vuelta del solenoide. Los nucleómeros parecen ser entidades de los cromosomas metafásicos e interfásicos. Su estructura no es clara pero se cree que podría ser interpretadas en términos de variaciones locales en unidades estructurales repetitivas. Micrografías electrónicas de cromosomas, revelan anillos de fibras de cromatina que emanan de un eje central, lo que hace suponer que hay niveles superiores de organización (Alberts, 1989).

El ADN no es la matriz directa que ordena las secuencias de aminoácidos. Los polipéptidos se sintetizan en los ribosomas que se localizan en el citoplasma, por lo que se requiere de una matriz intermedia para transmitir información genética hacia los lugares de síntesis, por esta razón, para que la información contenida en el ADN sea interpretada deben efectuarse dos importantes procesos: la transcripción y la traducción.

ESTRUCTURAS RIBONUCLEOPROTEICAS

Las estructuras formadas por ribonucleoproteínas, están involucradas en el proceso de transcripción y maduración del ARN mensajero, y están formadas por ARN y proteínas provenientes del citoplasma celular (Monneron A. y Bernhard M. 1969; Vázquez Nin G. y Echeverría O. 1996). La transcripción es el proceso por el cual se polimeriza una molécula de ácido ribonucleico (ARN) a partir de nucleótidos que contienen el azúcar ribosa en lugar de la desoxirribosa del ácido desoxirribonucleico (ADN). Las ARN polimerasas catalizan la formación de los enlaces estéricos entre el ácido fosfórico de un nucleótido y el oxidrilo en posición 3' de la ribosa de otro nucleótido.

De esta manera se va formando una molécula de ARN con una secuencia de bases complementaria a la hebra de ADN. Los transcritos primarios de ARN se les denomina ARN heterogéneo nuclear o ARN premensajero, hnARN o pre-mARN respectivamente. La nueva molécula de ARN se une a proteínas constituyendo partículas ribonucleoproteicas heterogéneas nucleares (hnRNP), las cuales sufren un proceso de maduración antes de salir del núcleo como ARN mensajero (Echeverría O. et al.1995). Esta maduración consiste en la adición de un capuchón o “cap” en el extremo 5’ de la molécula de ARN, la adición de una “cola” de ácido poliadenílico (poli A) en el extremo 3’ y el proceso de “ splicing”, que consiste en la eliminación de secuencias que no codifican para algún aminoácido denominadas intrones, (Jiménez García L. F. et al. 1985). Las ribonucleoproteínas son visibles al microscopio electrónico, en forma de:

Gránulos intercromatinianos (GIC)

Gránulos pericromatinianos (GPC)

Fibras pericromatinianas (FPC)

Nucleolo.

Los gránulos intercromatinianos (GIC)

Fueron descritos por primera vez por Swift H. 1959, aparecen en todas las células animales como grupos de partículas aisladas de un diámetro de 20 a 25 nm. Estas partículas se contrastan con el método preferencial (EDTA) (Bernhard W. et al 1969), y con oxinitrato de bismuto (Medina F. et al. 1989). Los GIC están interconectados con fibras y aparecen como cadenas que forman una malla o de red. Estas cadenas están presentes en pequeños fragmentos que parecen estar en contacto con cúmulos de cromatina en células vegetales. (Medina F. et al. 1989). Se sabe que son sitios de acumulación de partículas de ribonucleoproteínas que contienen ARNs de bajo peso molecular ricos en uridina (snARN-U), (Spector D et al. 1983, Puvion E et al. 1984). Estas snRNP son esenciales en el proceso de splicing que da como resultado la maduración de los mARNs y se les conoce como factores de “splicing”, algunos de los cuales están bien identificados, como el SC-35, SF2. (Spector D. et al 1993; Melcak I. y Raska I. 1996). En algunos núcleos las snRNP se encuentran organizadas en snurposomas de tres tipos: los snurposomas A, que varían de 1 a 5 µm de diámetro y contienen únicamente U1snRNP, los snurposomas de tipo B, tienen 4 µm de

diámetro y contienen U1, U2, U4, U5, U6, y SC-35, y los snurposomas C son los más grandes miden 20 μm de diámetro, y contienen inclusiones granulares. Se cree que los snurposomas de tipo B sean equivalentes a los cúmulos de gránulos intercromatinianos en células de mamíferos. (Spector D. et al. 1993; Pombo A. y Cook P. 1996). Se ha propuesto que los cúmulos de gránulos intercromatinianos juegan un papel en el almacenamiento de moléculas seleccionadas con el splicing y posiblemente que pueden ser un sitio de degradación de moléculas anormales incluyendo los RNA ribosomales ya que han sido detectados en los cúmulos de gránulos intercromatinianos, (Puvion E. y Puvion Dutilleul F. 1996).

Proceso postranscripcional del RNA mensajero

Durante o después de la transcripción de la molécula pre-mRNA, ésta sufre un proceso de maduración y después es transportada al citoplasma donde son traducidas en proteínas. Este proceso de maduración, incluye los siguientes pasos, la adición de un 7-metil-guanosina denominado cap en la terminación 5' del hnRNP, "splicing" de intrones, que son regiones que no codifican para alguna proteína y poliadenilación del extremo 3', (Jiménez L.F. 1985, Spector D. 1993 y Puvion E. y Puvion Dutilleul F. 1996).



Figura 2.- Estructura del núcleo celular, cromatina (chr), nucleolo (nu), gránulos Intercromatinianos (ig), gránulos pericromatinianos (pg), fibras pericromatinianas (→), cuerpos espiralados (cb), (tomado de Monneron A. and Bernhard W. 1969).

Los gránulos pericromatinianos.

Los GPC están formados por ribonucleoproteínas, (Monneron A. y Bernhard W. 1969). Tienen un diámetro de 30 a 45 nm., están rodeados de un halo claro de 25 nm. se encuentran localizados en la periferia de los cúmulos de cromatina y algunas veces en el área de los GIC, además entre la cromatina que forma canales en dirección a los poros nucleares donde se han visto desaparecer. (Vázquez Nin G. y Echeverría O. 1996). Los GPC se observan electrodensos, cuando se emplea (EDTA), su contraste es incrementado en tanto que la cromatina es blanqueada, esto facilita localizarlos en el área periférica a la cromatina, y revela su ultraestructura, que parece consistir de fibras entrecruzadas de alrededor de 30 μ . Estos gránulos también se pueden localizar entre la cromatina, o en el área intercromatiniana, en ocasiones, pequeños grupos de GPC se conectan entre sí por fibras, y se ha propuesto que podrían ser sitios de almacenamiento y/o transporte del RNA mensajero (Vázquez Nin G. y Bernhard W. 1971, Vázquez Nin G. et al. 1979; Melcak I. y Raska I. 1996, Pombo A. y Cook P.1996).

Fibras pericromatinianas.

Fueron descritas por Monneron y Bernhard (1969). Se encuentran rodeando a la cromatina periférica en algunas de sus áreas, su diámetro varía entre 30 y 50 Å en ocasiones aparecen plegadas. Algunas son más gruesas y miden alrededor de 200 Å . En otros casos se observan con conexiones hacia dentro de los gránulos con transiciones visibles que dan continuidad entre los GIC o GPC (Monneron y Bernhard, 1969), pero éstas no son equivalentes a las FPC. Se ha sugerido que la fibras pericromatinianas pueden representar el RNA heterogéneo (RNAhn) en proceso de transcripción o recién sintetizado (Fakan S. et al. 1976; Puvion E. y Moyne G. 1978), son estructuras que contienen fósforo. Se han observado en diferentes grados de enrollamiento que llegan a formar cuerpos irregulares y finalmente forman gránulos esféricos, este proceso es similar al de los gránulos de Balbiani, las fibras pueden emigrar a través del espacio intercromatiniano, desde los sitios de transcripción, se ha propuesto que en estas fibras se realiza el proceso de splicing (Vázquez Nin G. y Echeverría O. 1996), ya que se han localizado factores de splicing como SC-35 cerca de las fibras (Spector D. et al. 1993), así como las moléculas poli A, U1 y U2,

(Spector D. et al. 1993, Puvion E. et al. 1996) y por otra parte se ha sugerido pueden tener un papel más activo en el transporte de RNA mensajero del núcleo al citoplasma (Spector D. et al. 1993, Pombo A. y Cook P. 1996).

Cuerpos nucleares

Los cuerpos nucleares son estructuras entre 0.3 y 1.5 μm de diámetro, generalmente se encuentran en núcleos de células animales y vegetales, en núcleos de células malignas o hiperestimuladas, tienen apariencia fibrilar, granular o parecidas a lípidos. Están formados por proteínas y RNA, el cuerpo nuclear más estudiado es el cuerpo espiralado, identificado por Cajal en 1903 como cuerpo accesorio del nucleolo, su estructura es de tipo fibrilar (Spector D. 1993). Los cuerpos espiralados, tienen un diámetro de 0.3 a 0.5 μm , están formados por fibras espiraladas, con espesor de 40 a 60 nm, estas fibras son ligeramente teñidas con la técnica de EDTA. A grandes aumentos, los cuerpos espiralados parecen ser manojos de fibras finas de 50 Å de grosor, las cuales están irregularmente entre cruzadas a lo largo del eje de las fibras. Se han observado relaciones topológicas con el nucleolo pero algunas veces se encuentran en continuidad con la cromatina que lo rodea (Monneron A. y Bernhard W. 1969). La DNAsa no tiene ningún efecto visible en los cuerpos espiralados (Monneron A. y Bernhard W. 1969). Se han localizado en las cercanías de los cúmulos de gránulos intercromatinianos (Puvion E. y Puvion – Dutilleul F. 1996).

Nucleolo

El nucleolo, no tiene una estructura que lo delimite, pero en animales se encuentra rodeado de cromatina perinucleolar, la cual está conectada con regiones de cromatina intranucleolar de manera continua. El nucleolo es el sitio donde se encuentra el DNA que sirve como molde a partir del cual se sintetizan las moléculas precursoras de los ARN ribosomales. A las regiones donde se transcriben estos RNA que formaran parte de los ribosomas se denominan regiones organizadoras nucleolares (NOR) en (Jiménez L. F. et al. 1993). Desde el punto de vista estructural, el nucleolo está formado por cuatro áreas (Spector D. et al. 1993).

- a) componente fibrilar denso (DFC)
- b) centros fibrilares (CF)
- c) área granular o componente granular (GC) siendo junto con el componente fibrilar denso las más abundantes.
- d) cromatina nucleolar

Los centros fibrilares están rodeados, por el componente fibrilar denso, haciéndolos estructuras independientes de los demás componentes nucleolares. En la periferia de los centros fibrilares se encuentra el DNA que forma la región organizadora nucleolar (NOR) (Spector D. et al. 1993). Este DNA es matriz de la cual se transcriben las moléculas precursoras de los RNA ribosomales 18 y 28 S, en todas las células animales, vegetales y fúngicas (Jiménez L. F. et al. 1988). Trabajos de autorradiografía en microscopía electrónica han revelado que en el componente fibrilar denso y centros fibrilares se realiza la síntesis de RNA ribosomales (Shaw P. et al. 1995).

En el componente granular, se encuentran partículas de 15 a 20 nm de diámetro, las cuales corresponden a los RNAs prerribosomales en diversos estados de maduración, así como gran cantidad de proteínas enzimáticas y no enzimáticas, siendo éste el sitio específico para la combinación de RNA con las proteínas nucleolares específicas, tales como las argirofílicas, denominadas Ag-NOR. (Busch H. et al. 1977; Vázquez Nin G. et al. 1993; Hernández-Verdún P. et al. 1993), el componente granular es el sitio de almacenamiento o acumulación de las moléculas prerribosomales (Spector D. et al. 1993; Shaw P. et al. 1995).

La cromatina nucleolar condensada es transcripcionalmente inactiva, y se encuentra esparcida entre la cromatina laxa (Delgado M. et al. 1995).

OBJETIVO

OBJETIVOS GENERALES

Determinar la edad en la que existe mayor cantidad de atresia en ovarios prepúberes y de madurez sexual temprana en la rata

Comparar las características del proceso atrésico en etapas prepúberes y de madurez sexual temprana en la rata.

OBJETIVOS PARTICULARES

Evaluar las partículas de ribonucleoproteínas en las células de folículos sanos y atrésicos.

Evaluar la estructura y distribución de la cromatina en las células de folículos sanos y atrésicos.

MATERIAL Y MÉTODO

Se utilizaron ratas prepúberes hembras de la raza Wistar desde uno hasta 19 días. Además de ratas sexualmente maduras de las siguientes edades 22, 25, 30, 35, 40, 45 y 50 días de nacidas.

Se ovariectomizaron todas las ratas, con el siguiente método: se tomó al animal y se colocó en una cámara cerrada con un vaso de precipitado que a su vez contenía una borla de algodón mojado con éter, hasta que la rata se quedó dormida, en ese momento se pasó a una charola de disección. Se procedió a realizar una incisión longitudinal ventral de tal manera que nos permitiera localizar los ovarios, una vez localizados se disecaron los ovarios.

FIJACIÓN

Después de tomadas las muestras se colocaron en una gota de fijador sobre placas de cera, el fijador utilizado fue, glutaraldehído 2.5%, paraformaldehído al 4% y glutaraldehído + paraformaldehído al 2.5% en amortiguador de fosfatos 0.16 M a pH 7.2 y el ovario se fragmentó en cubos de 2 mm de lado aproximadamente, los fragmentos se pasaron a los frascos con fijador y permanecieron ahí durante una hora y media.

LAVADOS

Después de la fijación, con la ayuda de una pipeta se quitó el fijador y se colocó amortiguador de fosfatos 0.16 M a pH 7.2 por 10 minutos y se cambió en dos ocasiones más, dándoles el mismo tiempo.

DESHIDRATACIÓN

Se realizaron cambios graduales con alcohol etílico desde 60% y se continuó con 70%, 80%, 90% 96%, con periodos de duración de diez minutos, para las muestras que se incluyeron en EPÓN y con periodos de una hora para las que se incluyeran en LRW, se concluyó con etanol absoluto dos cambios de 20 y 60 minutos respectivamente.

PREINCLUSIÓN

Con el fin de lograr una inclusión adecuada se realizó una preinclusión usando como agente intermediario, óxido de propileno, que sirve por un lado para deshidratar y por otro sirve como solvente para la resina EPÓN, esto facilita la penetración de la resina al tejido. Se realizaron tres cambios de óxido de propileno de 10 min. cada uno, seguidos de una mezcla de óxido de propileno-Epón en concentración 2:1 y se dejaron ahí por 24 horas, se continuó con óxido de propileno-Epón en concentración 1:1 por 12 horas y óxido de propileno-Epón en concentración 1:2 por 12 horas.

Para los tejidos que se incluyeron en LRW se utilizó alcohol absoluto como agente intermediario que al igual que el óxido de propileno sirve por un lado para deshidratar y por otro sirve como solvente para la resina LRW. Se realizaron 6 cambios a diferentes concentraciones, alcohol absoluto-LRW a una concentración 3:1 por 12 horas a 4°C, se continuó con alcohol absoluto-LRW 2:1 por 3 horas a 4°C. se prosiguió con una concentración de alcohol absoluto-LRW 1:1 por 24 horas toda la noche, posteriormente se continuaron con concentraciones de 1:2, 1:3 y resina de LRW pura todas por 3 horas a 4°C.

INCLUSIÓN

La inclusión es el proceso por el cual el tejido adquiere la consistencia necesaria que pueda ser cortado, este soporte lo da la resina, que al polimerizar su consistencia pasa de viscosa a sólida, esto se logra con temperatura de 60 °C para EPON. De tal forma que después de la preinclusión, con la mezcla de la resina ya preparada, y habiendo realizado una prueba previa de polimerización en una estufa a 60°C, se incluyeron en la mezcla de la resina pura con dureza intermedia y se dejaron por 24 horas en la estufa a 60°C.

Para LRW se incluyen las muestras en la resina pura y se dejan en la estufa a 50°C o en luz ultravioleta a -20°C de 24 a 48 horas.

CORTE

Después de la inclusión se sacaron los bloques de la estufa y se realizaron cortes en un ultramicrotomo (Ultracut), donde se obtuvieron cortes semifinos entre 400 y 600 nm con el fin de localizar aquellas zonas del ovario que presentaran folículos atresicos, se colocaron en portaobjetos y se fijaron con calor, se contrastaron con azul de toluidina-borax y después se observaron con un microscopio óptico. Posteriormente se procedió a retallar nuevamente el bloque y se obtuvieron los cortes ultrafinos entre 50 y 100 nm que se colocaron en rejillas de cobre y níquel cubiertas con formvar y en rejillas de oro sin formvar.

CONTRASTE

Después de obtener los cortes ultrafinos se procedió al contraste. Se contrastó con compuestos químicos de elevado número atómico como el acetato de uranilo y citrato de plomo, los cuales son sales con poca capacidad de ionizarse. Estos compuestos se unen a las proteínas y a los ácidos nucleicos de las células cuando estén incluidas en resinas epóxicas, poliéstericas o acrílicas, por lo que se emplean colocando rejillas con los cortes en contacto con la solución de la sal.

Además se contrastaron con la técnica preferencial para ribonucleoproteínas (EDTA) y para DNA (Amina de Osmio).

Las diferentes rejillas se llevaron al microscopio electrónico Zeiss modelo EM-10 y se localizaron las regiones deseadas para proceder a la toma de fotografías.

REACCIÓN DE FEULGEN

Fue introducida por Feulgen y Roessenbeck en 1924, específicamente para ácidos timonucleoicos (ADN); Feulgen demostró que podía crear grupos aldehídos en las desoxipentosas del ADN. La reacción se usa porque es muy específica y puede dar una medida cuantitativa del ADN en la célula.

La tinción se lleva a cabo por medio de una hidrólisis en el tejido, después se lava y se coloca en una solución de Schiff reaccionando la fucsina decolorada por la acción del anhídrido sulfuroso con los grupos aldehídos, lo que da un color púrpura en la cromatina nuclear.

CUANTIFICACIÓN DE ESTRUCTURAS GRANULARES DE CUERPOS LAMINARES

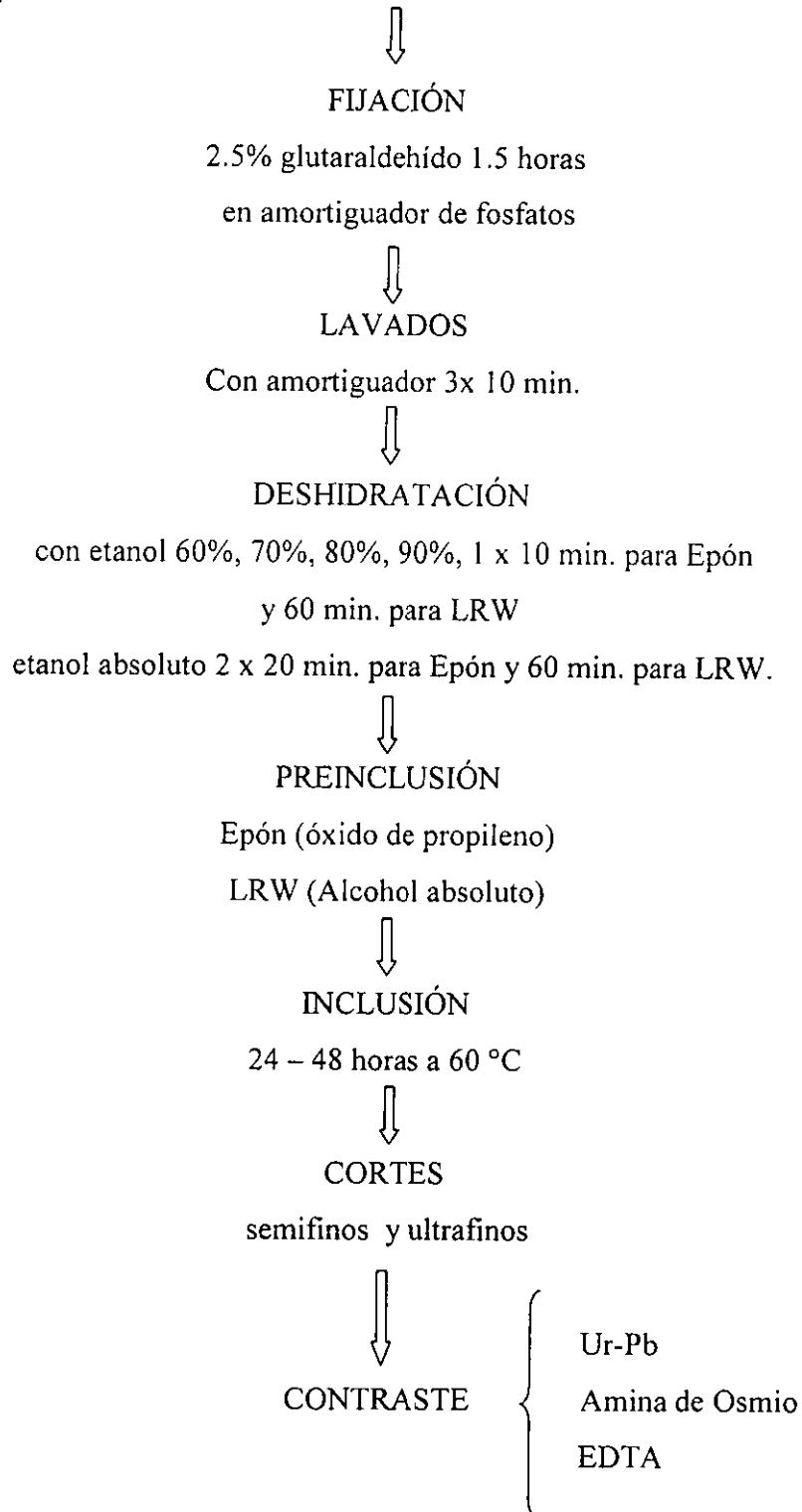
En las imágenes impresas, se evaluó la frecuencia numérica de los gránulos presentes en los cuerpos laminares de los ovocitos atresicos, midiendo el diámetro y la frecuencia de estas estructuras.

El diámetro y la frecuencia fue determinada mediante un cuenta hilos, tomando precauciones para estandarizar todos los procedimientos matemáticos de manera de hacer comparables las medidas en micras.

Los datos fueron procesados para obtener valores de media, desviación estándar y error estándar.

DIAGRAMA DE FLUJO

Ovarios de ratas prepúberes hembras de 1-19 días. Además de ratas sexualmente maduras de 22, 25, 30, 35, 40, 45 y 50 días de nacidas.



RESULTADOS

Considerando que en la rata la madurez sexual se alcanza entre los días 18 y 21, se evaluó la atresia durante las etapas prepuberal y de madurez sexual temprana.

EVALUACIÓN DE LA ATRESIA FOLICULAR EN CORTES SEMIFINOS.

En esta etapa se procedió al reconocimiento de los parámetros que definen folículos sanos y atrésicos durante las diferentes fases de desarrollo folicular. La Tabla 1 presenta las características de atresia para cada fase.

ESTADO	CARACTERÍSTICAS GENERALES
Primordial	Deformación del Ovocito Deformación del núcleo del ovocito.
Primario	Cambio de forma de las células foliculares La membrana del ovocito presenta invaginaciones o deformaciones. Gran vacuolización en el citoplasma.
Secundario	Deformación del Ovocito Aparición de células foliculares claras y oscuras Formación de cuerpos laminares en los ovocitos
Antrales jóvenes	Deformación del Ovocito Aparición de células foliculares claras y oscuras Formación de cuerpos laminares en los ovocitos Luteinización de la teca interna
Antrales grandes.	Deformación del ovocito Aparición de células foliculares claras y oscuras Formación de cuerpos laminares en los ovocitos Luteinización de la teca interna Formación de cuerpos apoptóticos
Los folículos sanos en ocasiones sólo presentaron cuerpos laminares en pequeñas cantidades.	

TABLA 1. Se enumeran las características que se tomaron como criterio para determinar una condición de atresia en los diferentes tipos de folículo.

En la figura 1 se muestra un folículo sano en la cual se observan muy pocos cuerpos laminares, su núcleo y el ovocito en general se observan esféricos, la corona radiada está en contacto con las células foliculares, las cuales se observan normales.

En la figura 6 se muestra una imagen clásica de un ovocito de 15 días de edad en estado atrésico, en el cual el ovocito se encuentra muy deformado, la corona radiada se ha despegado de las células foliculares, se presenta una gran vacuolización en el citoplasma del ovocito, aunque no presenta cuerpos laminares en el citoplasma, las células foliculares comienzan a presentar prolongaciones y se observan células foliculares claras y oscuras.

CARACTERÍSTICAS ULTRAESTRUCTURALES DE CÉLULAS FOLICULARES ATRÉSICAS.

Con respecto a las células foliculares atrésicas, los parámetros utilizados para distinguir la muerte fueron muy difíciles de clasificar, ya que los eventos de la atresia no están del todo caracterizados y al parecer existen varios tipos de atresia, debido a que las características degenerativas varían en diferentes ovocitos por ejemplo, en algunos la corona radiada permanece intacta (Fig.2), en otros ovocitos esta corona radiada se despega de las células foliculares (Fig. 6) y también existe el caso en el cual la corona radiada se desintegra.

En algunos ovocitos atrésicos se presentan estructuras laminares como se muestra en la Fig. 7. Además existen casos más raros como aquellos ovocitos que se desintegran y la corona radiada queda casi intacta.

Entre las células de la granulosa atrésicas, se presentan dos tipos de células, un tipo cuyo citoplasma es basófilo y que aparece denso en el microscopio electrónico, las células están aplastadas, sus contornos son cóncavos y forman una red tridimensional entre ellas. Las otras son redondeadas, su citoplasma claro y están desprovistas de gránulos densos. Las prolongaciones de estas células a menudo desaparecen al comienzo del proceso atrésico, aunque este rasgo no siempre se presentó.

Otras características que apoyan la hipótesis de la existencia de varias clases de atresia son los siguientes síntomas de degeneración, los cuales se pueden dividir en atresia temprana y atresia tardía:

ATRESIA TEMPRANA

- a) Las mitocondrias se presentan en grandes cantidades en la periferia del ovocito, principalmente donde todavía existe contacto con las células foliculares. (Fig. 5 y 6).
- b) Los ovocitos presentan mitocondrias hinchadas y sin crestas
- c) Presencia de células foliculares claras y células foliculares oscuras (Fig. 6)
- d) En ocasiones no se observa el Retículo Endoplasmático en células foliculares.
- e) Condensación de la cromatina en células foliculares.
- f) Existe una gran vacuolización en el citoplasma del ovocito (Fig. 2, 5 y 6).
- g) Deformación del Ovocito. (Fig. 6, y 12).
- h) Cambio de forma de las células foliculares. (Fig. 6 y 13).
- i) La mayoría de los ovocitos presentan estructuras laminares del mismo diámetro y conformación, así como pequeñas estructuras granulares, parecidas a ribosomas con un tamaño de 15 micras, además de ser positivas a la reacción de EDTA. (Fig. 2, 3, 7 y 12)
- j) La membrana del ovocito presenta invaginaciones o deformaciones. (Fig. 5 y 6)
- k) Deformación del núcleo del ovocito (Fig. 5).
- l) La corona radiada se despega de las células foliculares (Fig. 6 y 10).

ATRESIA TARDÍA

- m) presentan ovocitos segmentados
- n) La zona pelúcida se despega del ovocito (Fig.10).
- o) Existen células foliculares que presentan una mayor cantidad de RNP'S, con respecto a las normales. (Fig. 4).
- p) El núcleo se puede observar compacto o fragmentado.
- q) Se presenta una gran cantidad de apoptosis. (Fig. 9, 11 y 13).
- r) Existen células normales digiriendo células apoptóticas. (Fig. 11 y 13)

- s) Fragmentación del nucleolo en estructuras esféricas de aproximadamente 30 micras de diámetro.
- t) La corona radiada se desintegra. (Fig. 10).
- u) El ovocito se desintegra y la corona radiada queda casi intacta.

Se debe destacar la relativa independencia de parte de los componentes citoplasmáticos para alterarse, permaneciendo el resto aparentemente sano y la variabilidad en el orden en que suceden los cambios; así por ejemplo aparecen ovocitos segmentados en un avanzado estado atrésico sin estructuras laminares (Fig. 6) y se presentan estructuras laminares sin ninguna alteración ovular ni folicular (Fig.3).

EVALUACIÓN MORFOLÓGICA DE LA ATRESIA FOLICULAR EN RATA PREPUBER Y DURANTE LA PUBERTAD.

En ovarios prepúberes hemos podido observar que los folículos de todas las etapas del desarrollo pueden estar en atresia. La presentan los folículos primordiales, los primarios, los secundarios así como los antrales jóvenes.

OVARIOS DE UN DIA DESPUÉS DEL NACIMIENTO

En ovarios de ratas de un día de nacidas, se encontró que aún son evidentes algunas imágenes previas al dictioteno y que aún no se organizan folículos individuales pues la mayor parte de los ovocitos se encuentran agrupados. Además en esta edad es posible identificar ovocitos que presentan vacuolizaciones anormales, deformación nuclear del ovocito y el comienzo del desarrollo de las células foliculares deformadas, los cuales son rasgos característicos de la atresia.

OVARIO DE DOS DÍAS DESPUÉS DEL NACIMIENTO

En el día dos después del nacimiento aún se reconocen ovocitos con imágenes meióticas previas al dictioteno, aunque éstos están en menor cantidad que en el día uno. En esta edad la individualización de folículos primordiales es mayor y también se reconocen ovocitos atresicos, ya que algunas células foliculares tienen núcleos picnóticos, deformación celular, una gran vacuolización y deformación nuclear del ovocito.

OVARIO DE RATA DE 6 A 18 DÍAS DESPUÉS DEL NACIMIENTO.

En ovarios de 6 días y hasta los 18 se pueden localizar todas las fases de desarrollo folicular, en cualquier etapa se pueden reconocer tanto folículos sanos como atresicos, siendo más notorio entre las edades de 14-18 días de nacida. Los folículos sanos y atresicos no se entremezclan, sino que forman regiones de atresia y zonas de folículos sanos.

Uno de los resultados más sobresalientes es que en ovarios prepúberes, los folículos atresicos de cualquier fase de desarrollo presentan muy pocos cuerpos apoptóticos, estos no son evidentes ni en su morfología típica ni por su respuesta positiva a la reacción de Feulgen.

En ovarios de 12 y 13 días. La población folicular está formada por folículos primordiales y preantrales (primarios y secundarios). Existen aproximadamente en la misma proporción folículos sanos y atresicos. Estos últimos muestran imágenes de atresia temprana.

Ovario de 18 días.

La población folicular está constituida por folículos primordiales, preantrales primarios y secundarios. Se localizan tanto folículos sanos como atresicos.

Con relación a esto último, se encuentran imágenes de atresia tanto temprana como tardía en un mismo folículo. El aspecto de atresia tardía es el que con mayor claridad se pone en evidencia. Se presentan, elementos celulares con una alta fagocitosis de las células alteradas. (Fig. 8).

EVALUACIÓN MORFOLÓGICA DE LA ATRESIA FOLICULAR EN RATAS SEXUALMENTE MADURAS

Ovario de 23 a 28 días.

En cuanto a ovarios de ratas con madurez sexual temprana, dos son los rasgos que los distinguen de los ovarios prepúberes; el primero es la presencia de grandes folículos antrales, los cuales pueden estar atresicos, y el segundo es que en estos grandes folículos atresicos es posible reconocer cuerpos apoptóticos en gran cantidad (Fig. 11 y 13).

Los folículos sanos presentan cuerpos apoptóticos en pequeñas cantidades. (Fig. 3).

EVALUACIÓN ULTRAESTRUCTURAL DE FOLÍCULOS ATRÉSICOS EN RATA PREPUBER

Folículos atrésicos de 13-15 días.

Se estudiaron aquellos folículos que presentaron atresia bien definida.

Los ovocitos presentaron una marcada deformación, la presencia de cuerpos laminares se tomó como un criterio importante, ya que la mayoría de los ovocitos que presentan alteraciones cuentan con estas estructuras.

En cuanto a las células foliculares, se observa a nivel nuclear un marcado desarrollo de lobulaciones, el cual es más pronunciado cuando la atresia está más avanzada; esta imagen contrasta con los núcleos esféricos de células foliculares normales.

La reacción de EDTA además de poner en evidencia partículas de RNP permite reconocer condensación y distribución de la cromatina. (Fig. 4).

La cromatina se observó condensada en la periferia de la membrana nuclear, observándose una gran cantidad de cromatina compacta en la mayoría de las células foliculares. En algunos casos la distribución y cantidad de la cromatina compacta variaba en cada célula folicular, sin que tuvieran un patrón definido.

En cuanto a los gránulos pericromatinianos (GP), se observó que existen muy poca cantidad de estos con respecto a las células foliculares normales y en algunos casos no se observaba un solo GP.

En algunos casos los GP se observaban muy cerca del nucleolo y muy pocos en el nucleoplasma de la célula además de ser muy raro observarlos en la periferia de la membrana nuclear.

En cuanto a las partículas ribonucleoproteicas (RNPs), la distribución es muy diferente en cada células foliculares, ya que en algunas se presentaba una gran cantidad de RNPs distribuidas en el nucleoplasma y en otras presentaban cantidades de RNPs apenas visibles.

En los folículos atrésicos de esta edad que se estudiaron a nivel ultraestructural, se confirmaron algunas de las observaciones hechas por Vázquez Nin y Sotelo (1967). A nivel de las células foliculares aparecen dos poblaciones de células unas claras y otras electrodensas.

Después de analizar las características atrésicas en los folículos de ratas de distintas edades es posible resaltar varios hechos; el primero es que en ovarios prepúberes es posible reconocer que la mayoría de los folículos están en etapas tempranas de desarrollo y los folículos atrésicos se presentan en una etapa intermedia y muy pocos tienen las características de las etapas de atresia tardías.

EVALUACIÓN ULTRAESTRUCTURAL DE OVOCITOS ATRESICOS.

En cuanto al ovocito, el parámetro más constante para identificar la muerte celular en las ratas prepúberes, fue la deformación celular; la cual puede ir desde leve hasta severa, en ocasiones la deformación está acompañada de "encogimiento" y de manera excepcional se observaron imágenes de pseudosegmentación.

Se reconoce además pérdida de microvellosidades y deterioro de la zona pelúcida. A nivel citoplásmico se identificaron cuerpos laminares y cuerpos multivesiculares.

La cromatina en el núcleo del ovocito, no se observa condensada en la periferia de la membrana nuclear, esta se encuentra en muy poca cantidad distribuida en la mayoría de los ovocitos en el nucleoplasma y solo en algunos casos se observa cromatina compacta en la periferia de la membrana nuclear formando un pequeño halo.

Figura 1.- Micrografía de una sección de ovocito de rata de 15 días de edad. Aquí se observa un ovocito aparentemente normal, aunque presentan muy pocos cuerpos laminares (L), el núcleo (N) y el ovocito (OV) se observan esféricos, la corona radiada (R) se encuentra en contacto con las células foliculares (F), las cuales se observan normales. Contraste Uranilo - plomo. 2500X.

Figura 2.- Fotomicrografía de secciones de rata de 11 días de edad. Observe que el folículo presenta una apariencia casi normal, el ovocito (OV) presenta una leve deformidad aunque presenta una enorme cantidad de vacuolas (V) en la periferia del ovocito, presenta gran cantidad de cuerpos laminares (L), la zona pelúcida (P) aparentemente se encuentra normal, no existen cuerpos apoptóticos visibles. Contraste uranilo - plomo. 7500X.

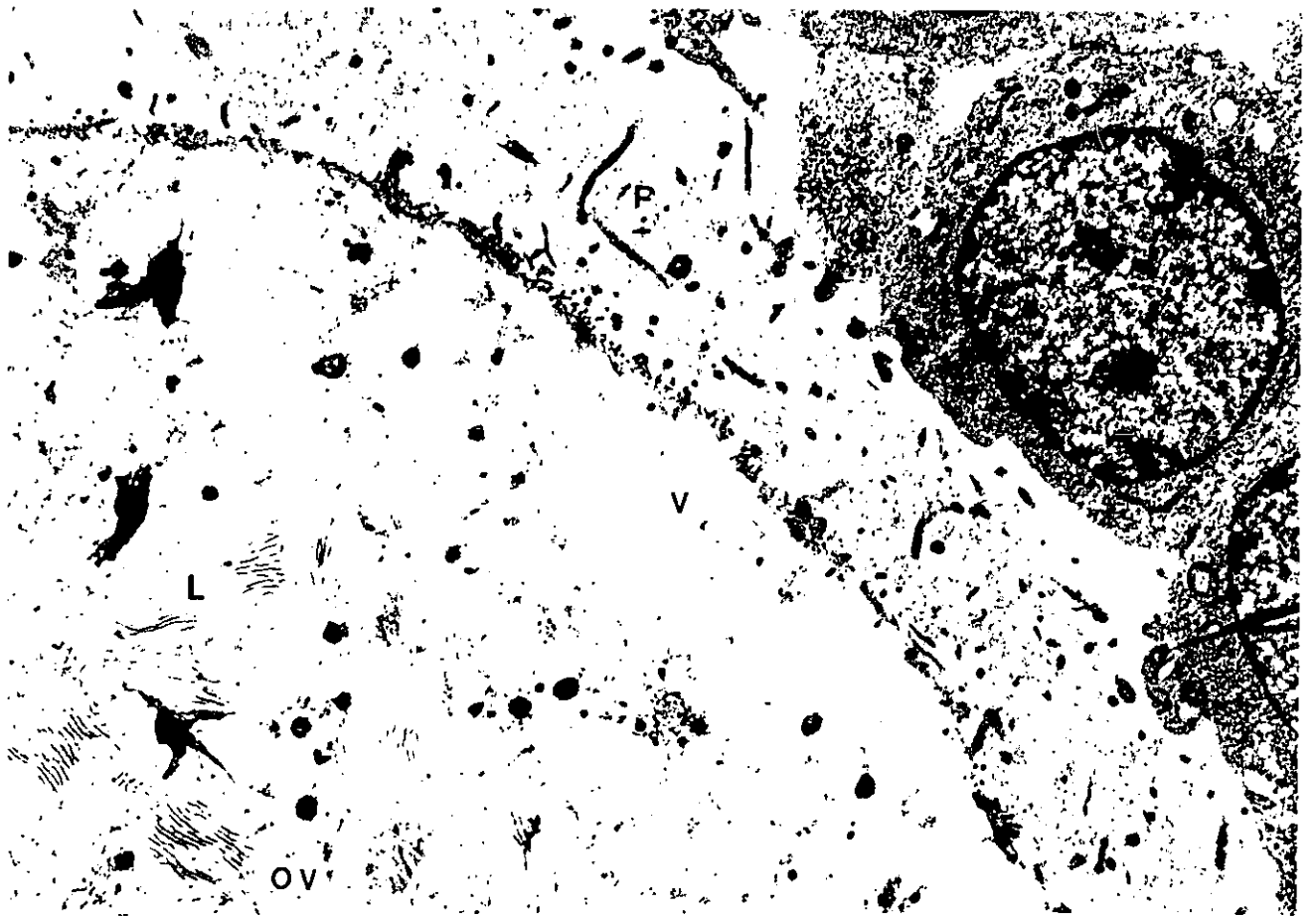
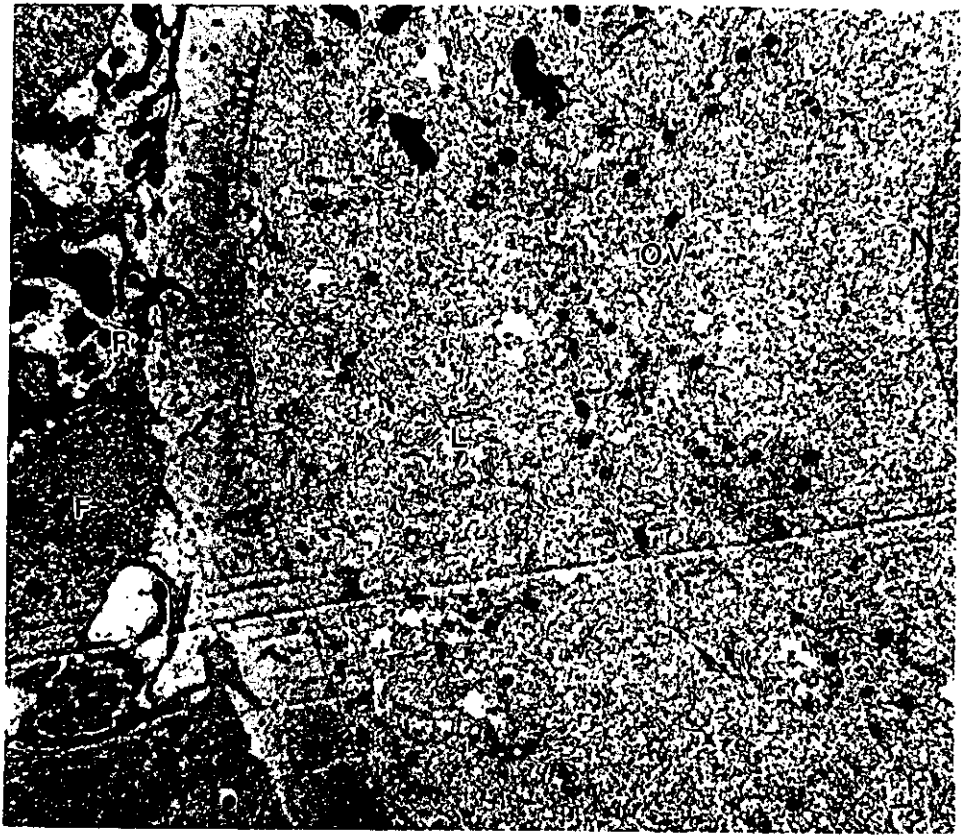


Figura 3.- Fotomicrografía de un folículo de ovario de rata de 15 días de edad. Aquí se muestra un folículo normal, en el cual se muestran divisiones (D), apoptosis (Ap) y el ovocito presenta gran cantidad de cuerpos laminares (L), pero a pesar de esto no es representativo de atresia o tal vez sea un inicio. Contraste Uranilo - plomo. 7750X.

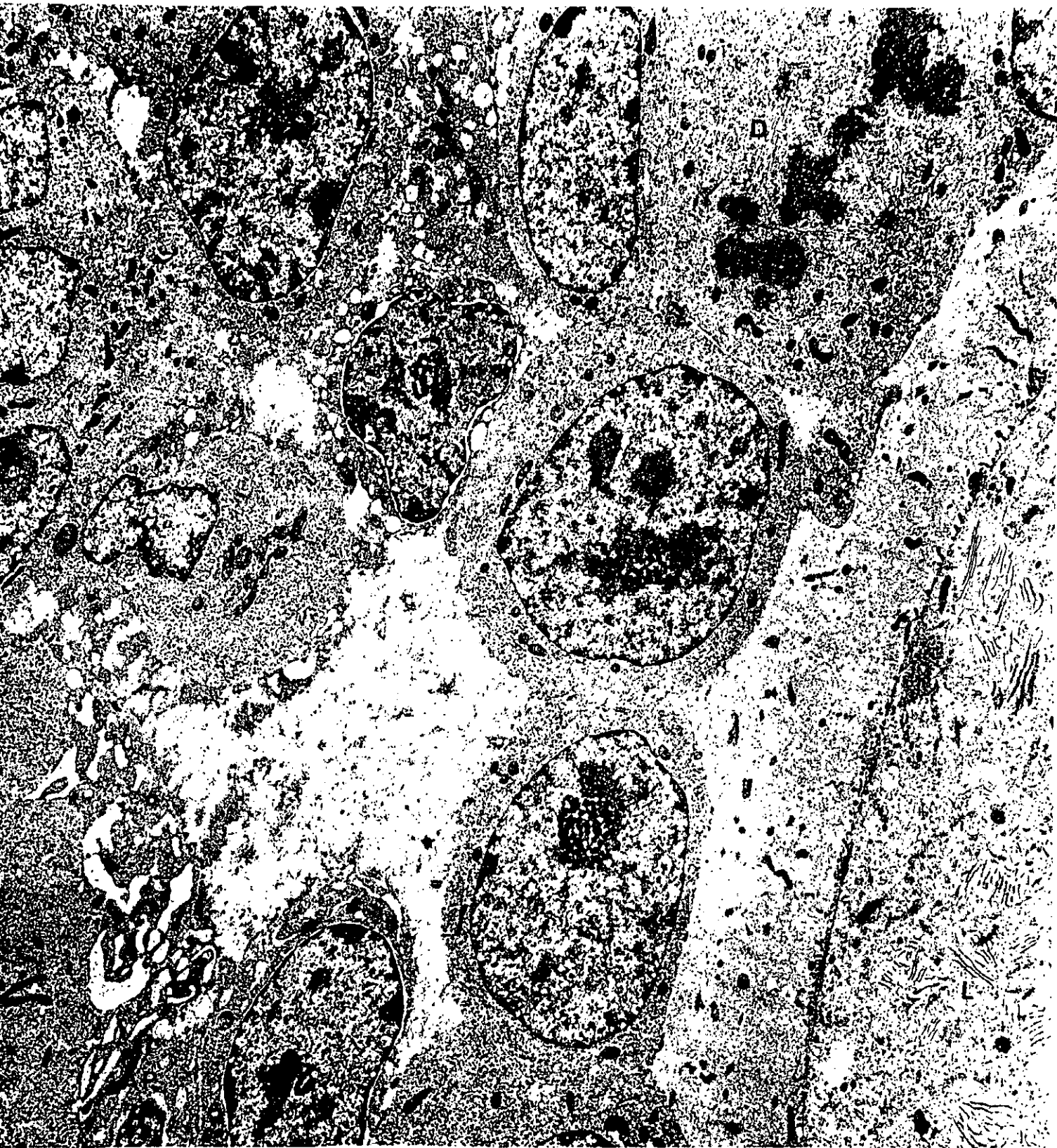


Figura 4.- Fotomicrografía de un corte de ovario de rata de 13 días posparto. Se observa que las células foliculares (F) presentan degeneración celular muy avanzada con gran cantidad de vacuolización (V), existe una gran condensación de la cromatina (R) en la periferia del núcleo y un número elevado de estructuras ribonucleoproteicas dispersas en gran parte del núcleo. Contraste EDTA. 6000X.

Figura 5.- Fotomicrografía de un corte de ovario de rata de 13 días de edad. Se observa un ovocito de un folículo antral joven el cual se encuentra bastante degenerado, existe una gran vacuolización (V) y se observa el núcleo bastante deformado, además se presentan estructuras laminares (L) en forma ovoide. EDTA. 19200X

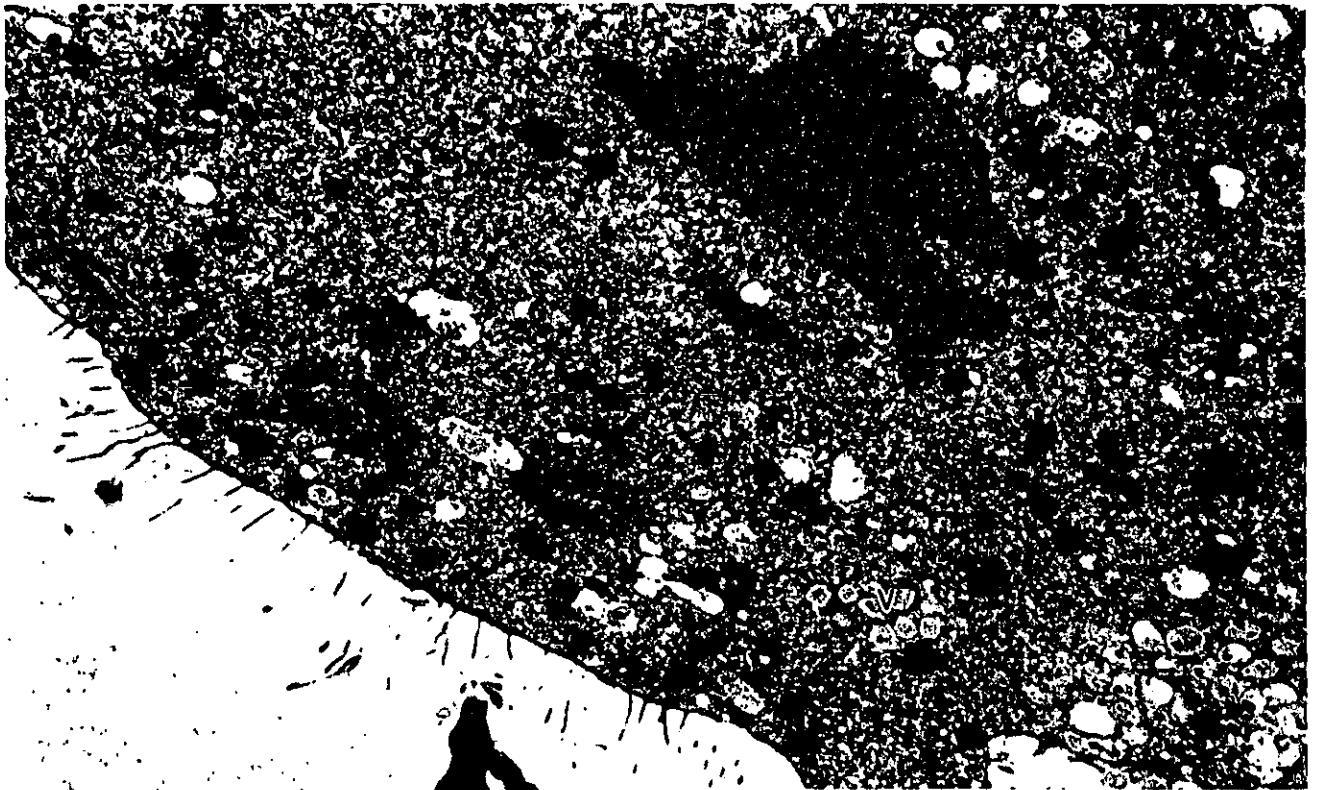
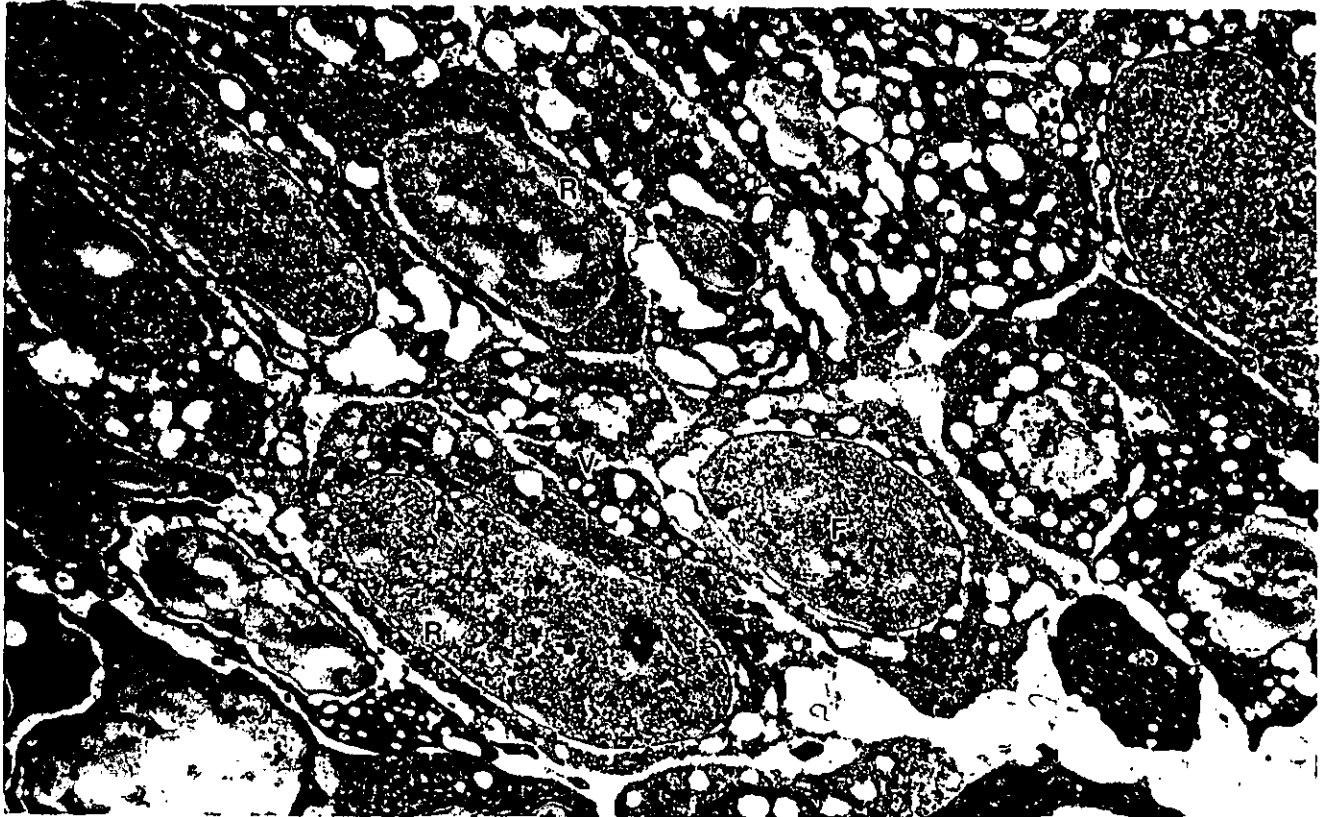


Figura 6.- Fotomicrografía de una sección de ovario de rata de 14 días posparto. Se observa un folículo antral joven el cual presenta un ovocito muy deformado (OV), la corona radiada (R) se ha despegado de las células foliculares, se observan células foliculares (F) claras (FC) y células foliculares oscuras (FO), las cuales perdieron contacto con el ovocito pero presentan extensiones membranosas (EM) y comienzan a sufrir alteraciones. EDTA. 6000X.

Figura 7. Fotomicrografía de una sección de ovario de rata de 17 días de edad. Aquí se identifican estructuras laminares, destacando que existe una uniformidad entre láminas. Uranilo – plomo. 25000X.

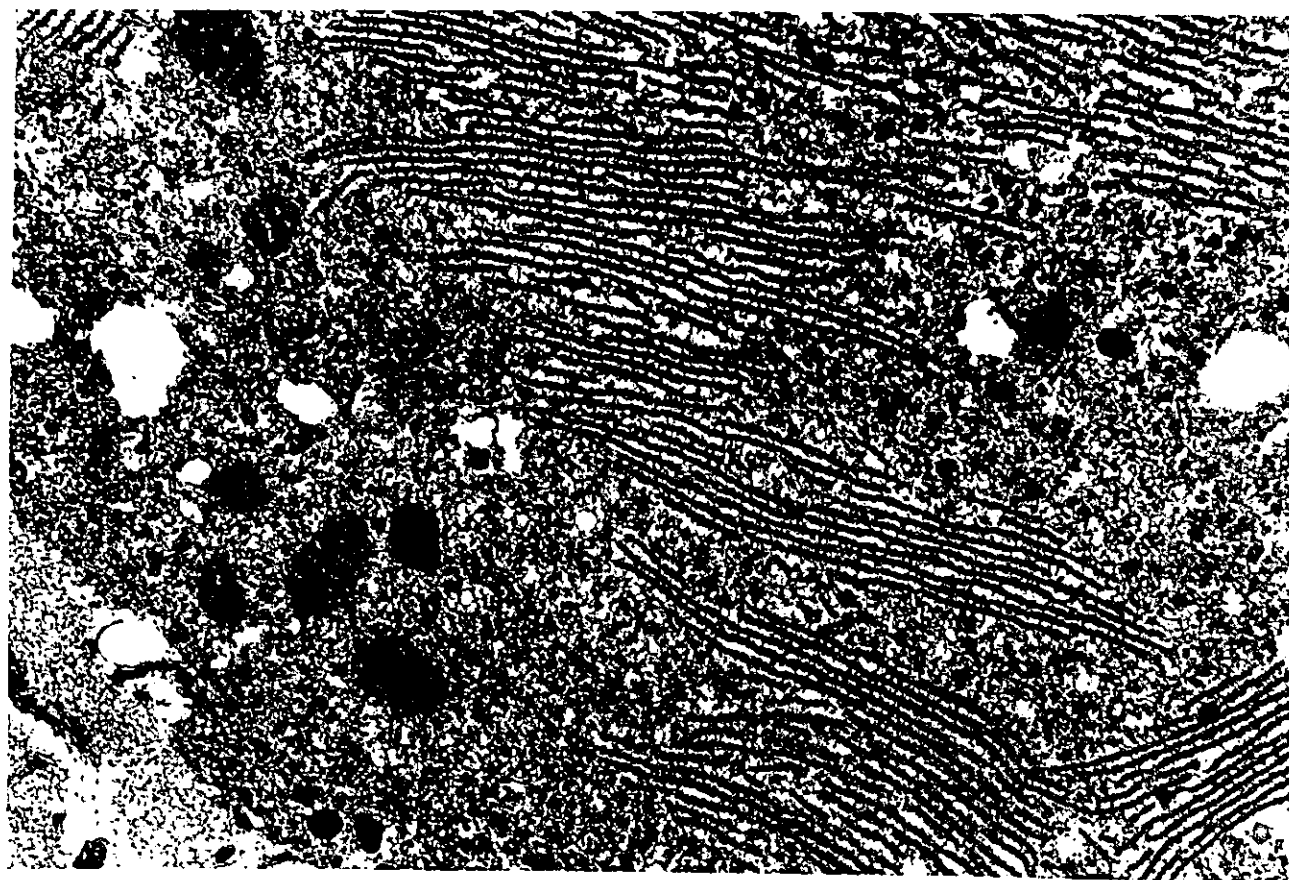
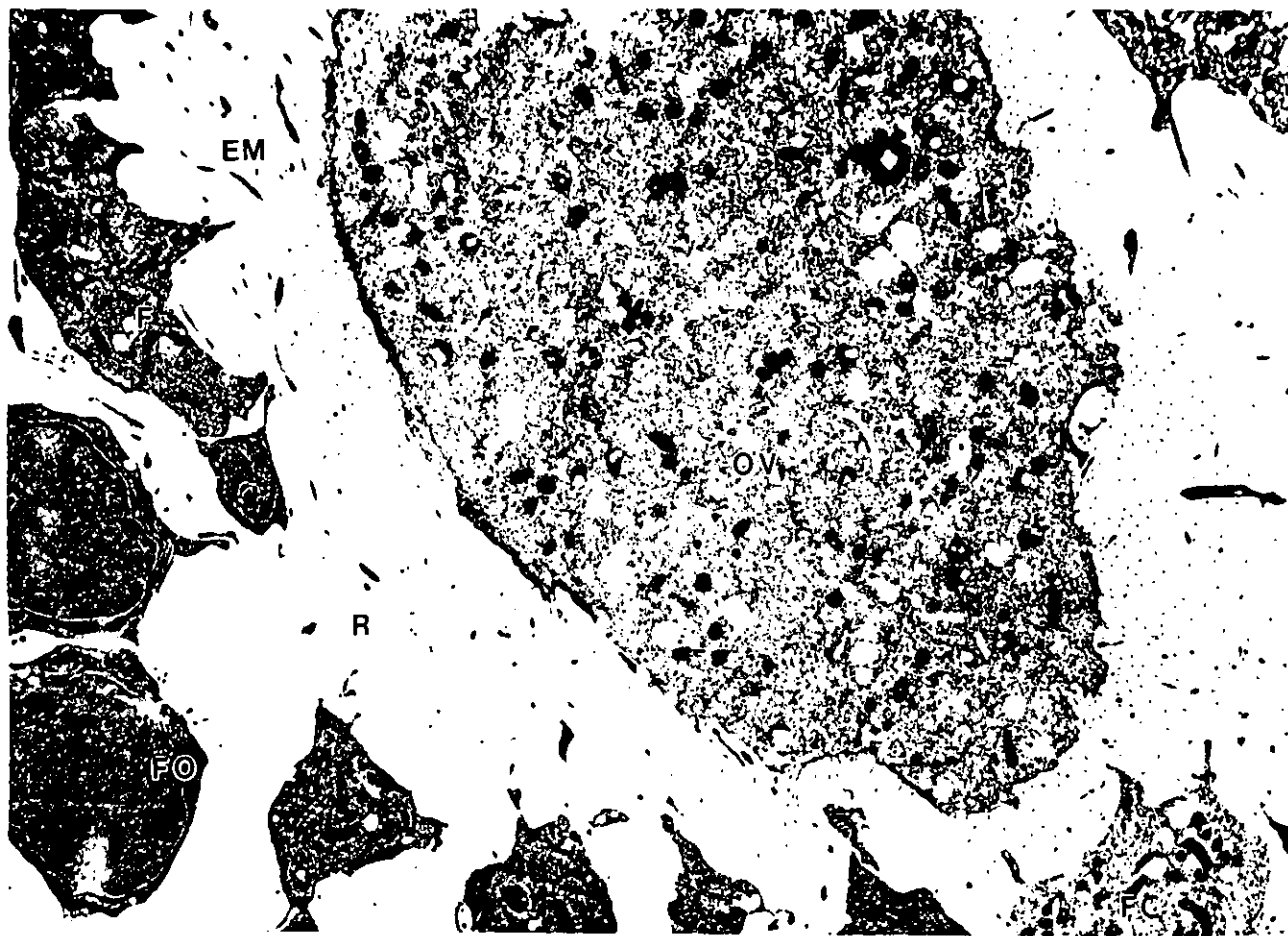


Figura 8. Fotomicrografía de secciones de ovario de rata de 16 días de edad. Se observan células foliculares (F) alteradas. Se observa también células foliculares normales engullendo a células alteradas. Existen cuerpos apoptóticos (Ap). Contraste Uranilo - plomo. 6750X

!

Figura 9. Fotomicrografía de un corte fino de ovario de rata de 28 días posparto. Se observan varios componentes de un folículo atrésico. Se reconocen restos celulares (RC) debido a un estado apoptótico (Ap) muy avanzado. Contraste Uranilo - plomo. 30000X.

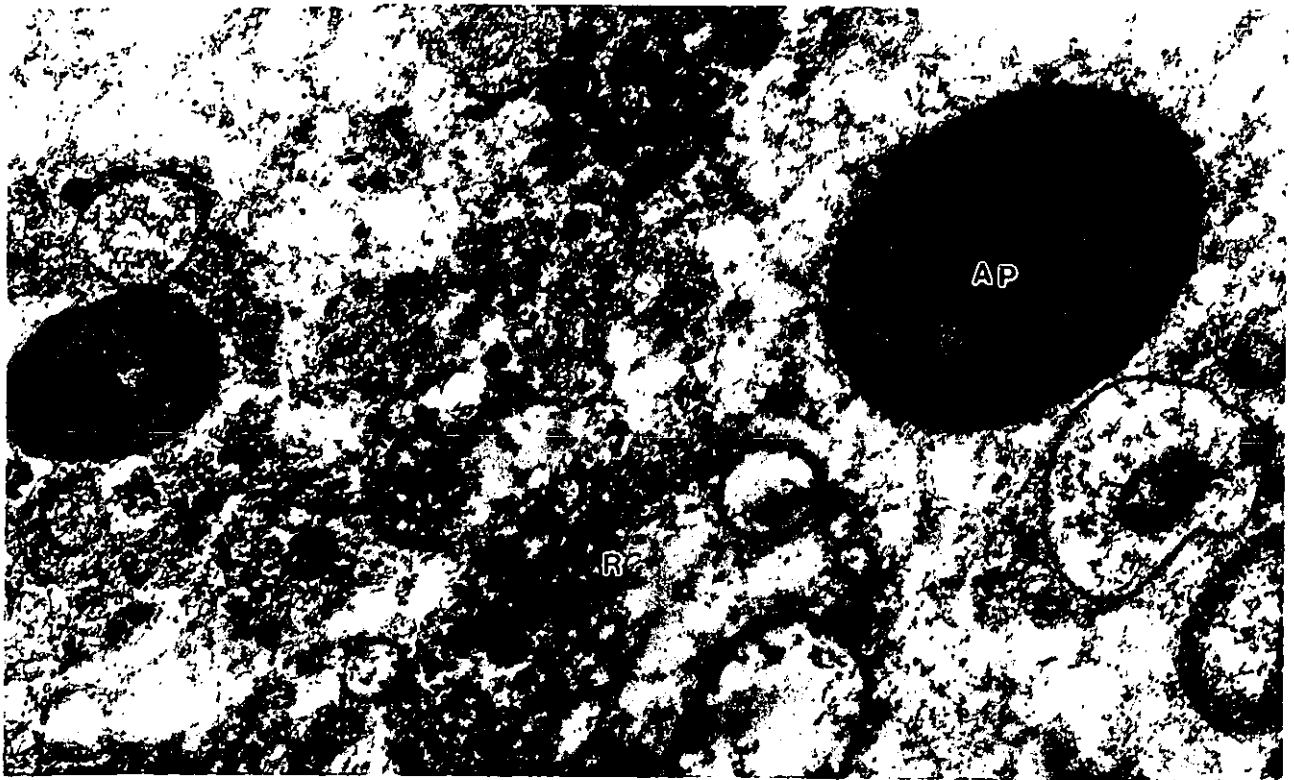
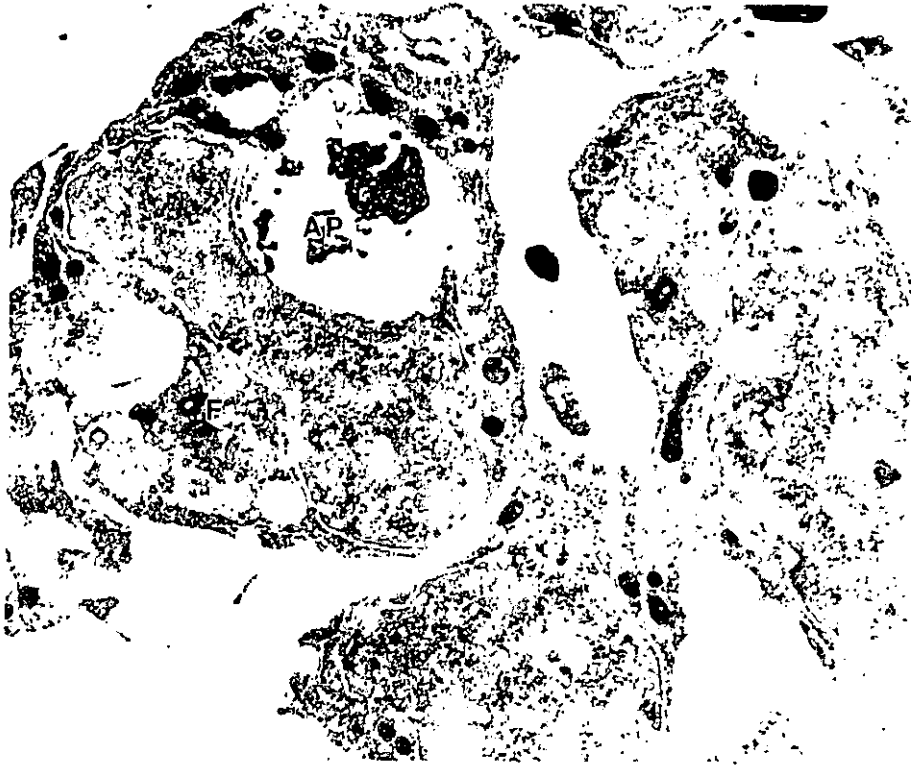


Figura 10. Fotomicrografía de un corte fino de ovario de rata de 23 días posparto. Se observan células foliculares en estado apoptótico (Ap) avanzado, se observa claramente la gran cantidad de cuerpos laminares, se ha perdido el contacto de la zona pelúcida (Z) con las células foliculares (F) y se comienza a separar la zona pelúcida del ovocito (S). Contraste Uranilo - plomo. 12500X.

Figura. 11. Fotomicrografía de un corte de ovario de rata de 15 días posparto. Se observa una gran cantidad de alteraciones en las células foliculares (F), las cuales varían entre cada célula o tienen diferentes inicios, además se observan muchos cuerpos apoptóticos (Ap). Contraste Uranilo - Plomo. 27400 X.

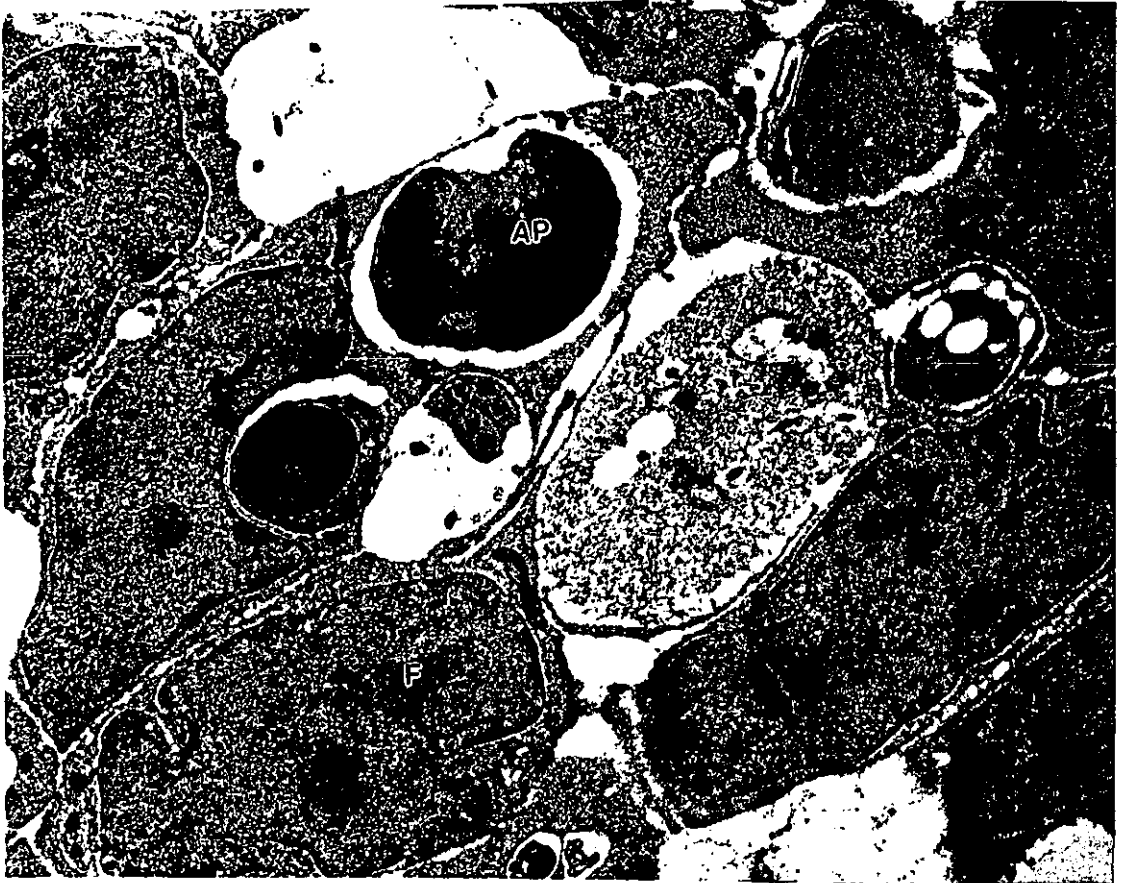
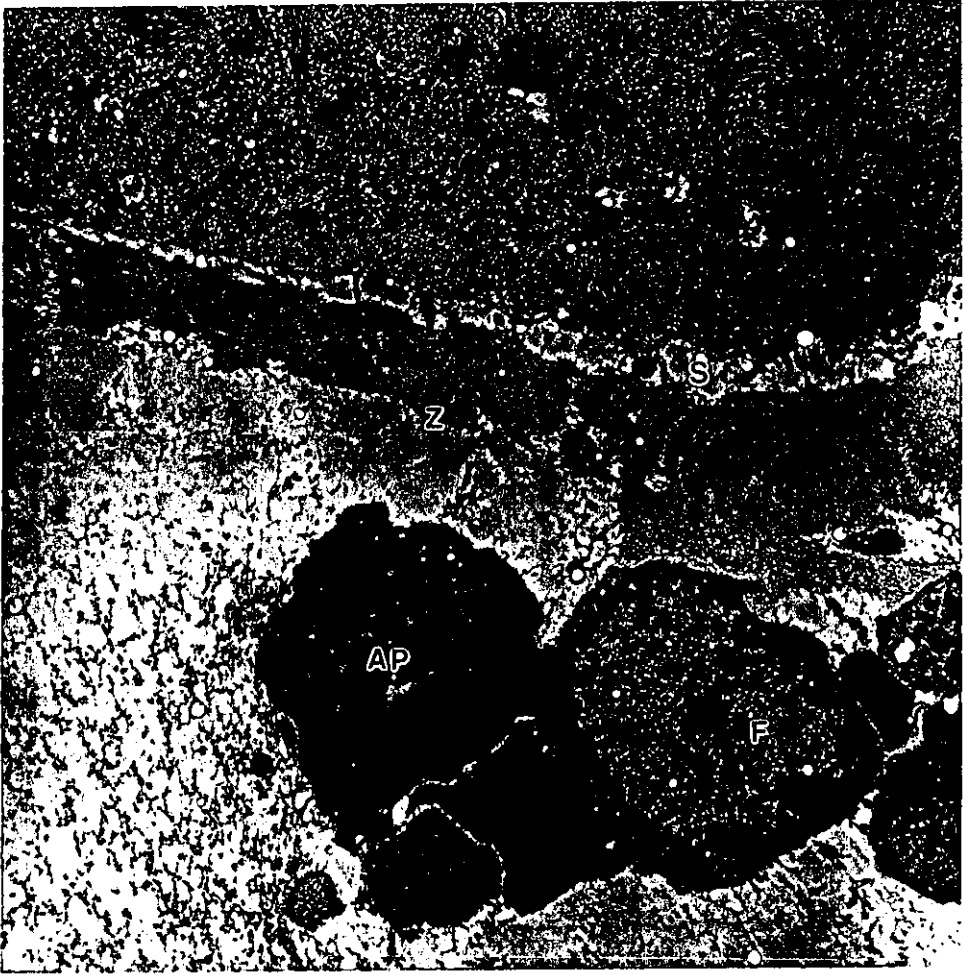
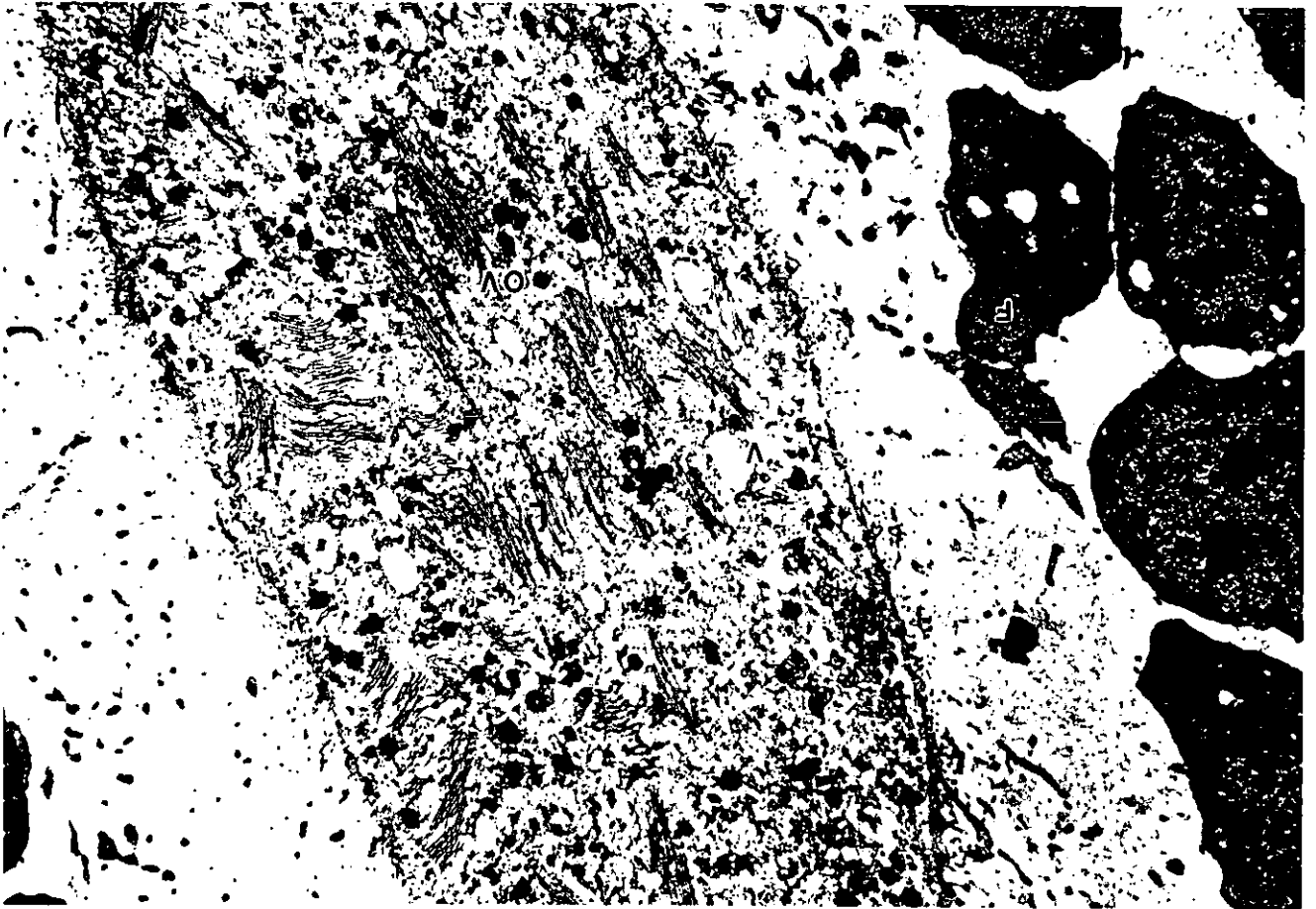
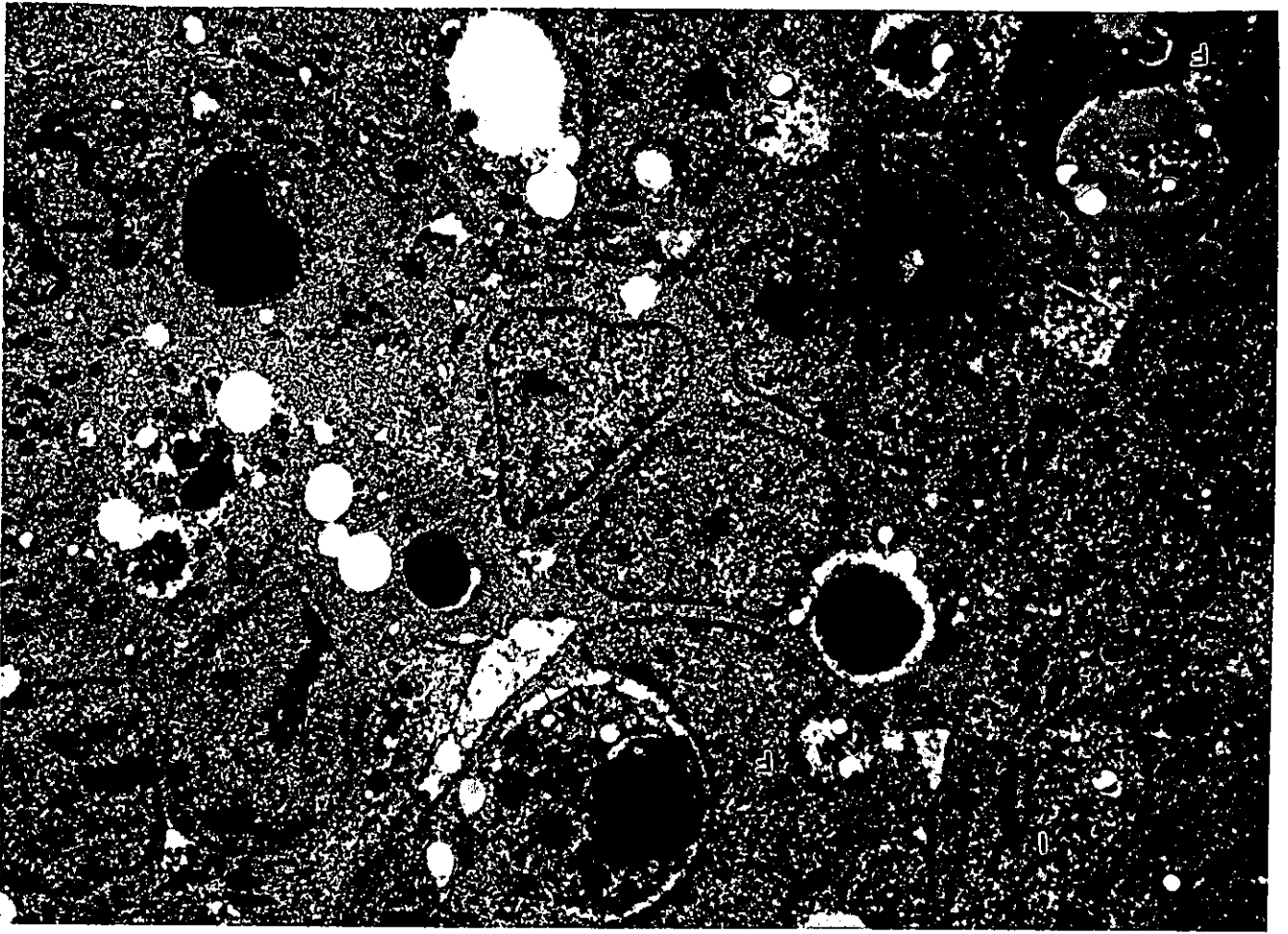


Fig. 12. Fotomicrografía de un corte de ovario de rata de 23 días posparto. Se observa una gran cantidad de cuerpos laminares (L), una gran deformación del ovocito (OV) y existe muy poca vacuolización (V), las células foliculares aún se encuentra en contacto con el ovocito (F), pero se esta perdiendo el contacto entre ellas. Contraste Uranilo- plomo 6500X.

Fig. 13. Fotomicrografía de un corte de ovario de rata de 23 días posparto. Se observa una gran cantidad de cuerpos apoptóticos en diferentes fases. Apoptosis inicial (I), apoptosis intermedia (L), apoptosis avanzada (A) y células foliculares fagocitando células apoptoticas (F). Contraste Uranilo- plomo 7500X.



DISCUSIÓN

En el presente trabajo se estudió el proceso de atresia, basándonos en cambios en la forma de los ovocitos y en la morfología y arreglo de las células foliculares, así como por la aparición ocasional de tipos celulares como macrófagos. El proceso atrésico que se caracterizó en las diferentes edades no es pleno, o sea no corresponde a la atresia terminal descrita en otros trabajos (Vázquez Nin G. y Sotelo. et al. 1967).

Dado que la pubertad representa el inicio de ciclos sexuales desencadenados por la secreción cíclica de LH y FSH, consideramos que el incremento en las concentraciones de estas hormonas es un factor importante en la elección de atresia vía apoptosis

Sobre la base de algunas observaciones previas realizadas por Vázquez Nin. y Sotelo J. (1967) y a las que se reportan en el presente trabajo, podemos señalar que en los días 11, 12, 14, 15 y 16 en el ovario se encuentran tanto folículos sanos como atrésicos, los cuales aunque coexisten no están mezclados, esto permite sugerir que el órgano podría estar regionalizado en áreas de atresia y de folículos sanos.

La atresia tal y como se ha reconocido en todas las edades prepúberes, es un proceso que transcurre desde etapas tempranas y que progresa aparentemente de manera lenta ya que en etapas prepúberes no es frecuente encontrar las imágenes clásicas de atresia que se han descrito (Vázquez Nin y Sotelo J. 1967) las cuales corresponden a eventos tardíos, en cambio sí son frecuentes las etapas tempranas, las cuales son difíciles de valorar como de atresia.

El dato que a nuestro juicio resulta más importante después de haber estudiado prácticamente todas las edades prepuberales y algunas de la madurez sexual temprana (22, 28, 32, 35 días) es que en ninguna de las primeras se identifican cuerpos apoptóticos abundantes. Mientras que en grandes folículos antrales de ratas sexualmente maduras, estos cuerpos son bien reconocibles. En relación con este hecho es interesante señalar que en ovarios prepuberales no se localizan grandes folículos

(1997), quienes señalan además que la laminina y otros componentes de la membrana basal juegan un papel importante en la diferenciación y en la prevención de la apoptosis. Con relación a este punto una alternativa de trabajo podría ser la de evaluar las RNPs de células foliculares adyacentes a la membrana basal y las alejadas. Eppig y colaboradores (1997), han mostrado que las células granulosas de folículos preovulatorios son heterogéneas en organización, en expresión genética y en función. Señalan además que las células foliculares murales y del cúmulo se distinguen por la distribución de receptores a LH, en el RNAm que codifica para el receptor, en capacidades esteroidogénicas, en lo referente a RNAm que traduce para el citocromo Hp 450 que participa en la fragmentación de la cadena lateral del colesterol, en su afinidad a lectinas y otras moléculas no caracterizadas.

La presencia de macrófagos entre las células granulosas de folículos atrésicos de 18 días es compatible con algunas observaciones hechas con anterioridad. Se describe en el ovario de ratón cambios cuantitativos en la distribución de los macrófagos y señala que son más abundantes en la capa granulosa y tecal de folículos atrésicos, así como en el cuerpo lúteo.

CONCLUSIÓN

- ✓ En ovarios prepúberes es posible reconocer que la mayoría de los folículos están en etapas tempranas de desarrollo (Primordiales) y los folículos atrésicos se presentan en una etapa intermedia y muy pocos tienen las características de las etapas de atresia tardías.
- ✓ La atresia, tal y como se determinó en todas las edades prepúberes, es un proceso que transcurre desde etapas tempranas y que progresa, aparentemente, de manera lenta ya que en etapas prepúberes no es frecuente encontrar las imágenes clásicas de atresia.
- ✓ Con respecto a las células foliculares atrésicas, suponemos que existen varios tipos de atresia, debido a que las características degenerativas varían en diferentes ovocitos.

(1997), quienes señalan además que la laminina y otros componentes de la membrana basal juegan un papel importante en la diferenciación y en la prevención de la apoptosis. Con relación a este punto una alternativa de trabajo podría ser la de evaluar las RNPs de células foliculares adyacentes a la membrana basal y las alejadas. Eppig y colaboradores (1997), han mostrado que las células granulosas de folículos preovulatorios son heterogéneas en organización, en expresión genética y en función. Señalan además que las células foliculares murales y del cúmulo se distinguen por la distribución de receptores a LH, en el RNAm que codifica para el receptor, en capacidades esteroideogénicas, en lo referente a RNAm que traduce para el citocromo Hp 450 que participa en la fragmentación de la cadena lateral del colesterol, en su afinidad a lectinas y otras moléculas no caracterizadas.

La presencia de macrófagos entre las células granulosas de folículos atrésicos de 18 días es compatible con algunas observaciones hechas con anterioridad. Se describe en el ovario de ratón cambios cuantitativos en la distribución de los macrófagos y señala que son más abundantes en la capa granulosa y tecal de folículos atrésicos, así como en el cuerpo lúteo.

CONCLUSIÓN

- ✓ En ovarios prepúberes es posible reconocer que la mayoría de los folículos están en etapas tempranas de desarrollo (Primordiales) y los folículos atrésicos se presentan en una etapa intermedia y muy pocos tienen las características de las etapas de atresia tardías.
- ✓ La atresia, tal y como se determinó en todas las edades prepúberes, es un proceso que transcurre desde etapas tempranas y que progresa, aparentemente, de manera lenta ya que en etapas prepúberes no es frecuente encontrar las imágenes clásicas de atresia.
- ✓ Con respecto a las células foliculares atrésicas, suponemos que existen varios tipos de atresia, debido a que las características degenerativas varían en diferentes ovocitos.

- ✓ En los ovarios de rata de edades prepuberales no se identifican cuerpos apoptóticos abundantes, en cambio en ovarios jóvenes (22, 28, 32, 35 días) estos cuerpos son bien reconocibles. En relación con este hecho es interesante señalar que en ovarios prepuberales no se localizan grandes folículos antrales, sólo antrales jóvenes. Por tanto podemos pensar que estos cuerpos sólo se forman en etapas avanzadas de desarrollo folicular.

BIBLIOGRAFÍA

1. Aarón J W. Hsueh and Hakan B. Ovarian Follicle Atresia: 1994 A Hormonally Controlled Apoptotic Process. *Endocrine Reviews* Vol. 15 N.6.
2. Adams, C.C. y Workman J. L., 1993. Nucleosome displacement in transcription. *Cell* 72, 3055-308.
3. Aharoni, D; Meiri I; Atzmon R; Vlodaysky y Amsterdam A. (1997). Differential effect of components of the extracellular matrix on differentiation and apoptosis. *Current Biology* 7(1): 43-51.
4. Alberts B; Bray D; Lewis J; Raff M; Roberts K. and Watson J. (1989). *Molecular Biology of the Cell*. Third edition. Garland publishing, Inc. New York and London .
5. Alberts B; Bray D; Lewis J; Raff M; Roberts K. and Watson J. (1995). *Molecular Biology of the Cell*. Third edition. Garland publishing, Inc. New York and London.
6. Andrew W y Hickman P. (1984). *Histology of the vertebrate a comparative text*. The C.V. Mosby company. Saint-Louis.
7. Angus I. y Earnshaw W. (1998). Structure and function in the nucleus. *Science*, 280, 547-553
8. Austin C. y Short R. (1982). *Hormonas en la reproducción*. Edit. La prensa medica mexicana. México.
9. Beato M. (1989). Gene regulation by steroid hormones. *Cell* 56, 335- 344.
10. Bernhard W. (1969). A new is staining procedure for electron microscopical cytology. *J. Ultrastructure Res.* 27, 250- 265.

11. Besnard N. (1992) Proteolytic activity is involved in changes of intrafollicular insulin-like growth factor binding protein levels during growth and atresia of ovine ovarian follicles. *Endocrinology* 137(5): 1599- 1607.
12. Besnard N. y Pisselet C. (1996) Expression of messenger ribonucleic- acids of insulin-like growth factor binding proteins 2,4 and 5 in the ovine ovary. Localization and changes during growth and atresia of antral follicles. *Biology of Reproduction* 55 (6): 1356- 1367.
13. Borysenko M. (1985) *Histología funcional*. Editorial limusa, México, pp.227-232
14. Busch H. (1977). *Receptors and hormone action*. Edit. O Malley B; Birnbaumer L. Academic Press. N. Y. 1, 32-97.
15. Byskov G. (1978). *Follicular atresia. The vertebrate ovary: comparative Biology and Evolution*. Richard E. Jones. PLENUM. New York.
16. Cohen J. (1994). *Apoptosis: el proceso fisiológico de muerte celular*. Fisiopatología.
17. Delgado M; Morais C; Neves N. y Jones R; (1995). The influence of B Chromosomes on rDNA organization in rye interphase nuclei. *Chromosome Research* 3, 487-491.
18. De Robertis D. (1991). *Molecular Biology of the Cell*. Second edition. Garland publishing, Inc. New York.
19. Earnshaw W. (1995). Nuclear changes in apoptosis. *Current opinion in cell biology*. 7 : 337-343.
20. Echeverría M. y Vázquez Nin G. (1995). *El núcleo celular interfásico*. Coordinación de servicios editoriales. Facultad de Ciencias U.N.A.M.

ESTA TESIS NO SALE
DE LA BIBLIOTECA

21. Echeverría M; Zavala G; Benitez A. y Vázquez Nin G. (1980). Changes during estral cycle in de nucleus of endometrial cells of the rat. *Biol. Cellulaire* 39, 139-142.
22. Eisenhauer K; Chun S; Minami S; Billing H. Y Hsueh A. (1996) Mechanisms of Atresia: The Hormonal control of Apoptosis. En *Regulation, Dysfunction and Treatment*. (Series: International Congress. Series 1106 Elsevier Sciences Publ. B:V: Amsterdam Netherlands. pp 103- 112.
23. Eppig J; Wigglesworth K; Pendola F. y Hirao Y. (1997) Murine oocytes supress Expression of Luteinizing Hormone Receptor Messenger Ribonucleic Acid by Granulosa Cells. *Biology of Reproduction* 56: 976- 984.
24. Fakan S; Puvion E. y Spohr G. (1976). Localization and characterization of newly synthesized nuclear RNA in isolated rat hepatocytes. *Exp. Cell Res.* 99, 155-164.
25. Feulgen, R. And Rossenberck, H. Mikroskopisch-chemischer nachweis ainer neclensaure. *Zts . physiol. Chem.*, 135: 203-207, 1924.
26. Finch, J. T. Y Klug, 1976. Solenoidal model for superstructure in chromatin. *Proc. Nat. Acad. Sci.* 73, 1897-1901.
27. Fournel S; Genestier L; Roualt J; Lizard G; Flacher M; Assossou O. (1995). Apoptosis without decrease of cell DNA content. *FEBS letters* 367; 188-192.
28. Frederick L. and Xinbo Z. (1998). Apoptosis: A brief reviews. *Journal of Clinical ligand assay.* 21 (1): 58-61.
29. Garret W. y Guthrie H. (1996) Expression of androgen receptors and steroidogenic enzymes in relation to follicular growth and atresia following ovulation in pigs. *Biology of Reproduction.* 55(5): 949-955.

30. Getzenberg, R. H., Pienta, K.J., Ward, W.S. y Coffey D.S., 1991. Nuclear structure and the tree-dimensional organization of DNA. *J. Cellular Bioch.* 47, 289-299.
31. Gilbert S. (1994). *Developmental Biology*. Fourth Edition. Sinauer Associates, Inc. Publishers. Sunderland Massachusetts.
32. Greep O. y Weiss L. (1975). *Histología*. Ateneo. España.
33. Greenwald G. y Terranova P. (1988). Follicular Selection and its control . En *Physiology of Reproduction* . E. Knibill And J. Neil (et al) (Eds) Raven Press, Ltd. New York . PP 387- 445.
34. Gregori C. (1995). apoptosis and the immune response, Editorial Wiley - liss, E. U. A. , p.p.416.
35. Grete A. (1978) Follicular Atresia. En *The Vertebrate Ovary. Comparative Biology and Evolution* R:E: Jones(Editor). Plenum Press. New York and London . pp 533-554.
36. Grunstein, M., 1992. Histones as regulaators a genes. *Sci. Am.* (October) pp.40-47.
37. Guo M; Mori E; Xu J. y Mori, T. (1994) Identification of FAS antigen associated with apoptotic cell death in murine ovary. *Communications* 203(3) 1438-1446.
38. Hakuno N. (1996) FAS/ APO-1/ CD95 System as a mediator of granulosa cell apoptosis in ovarian follicle atresia. *Biochemical and Biophysical Research.* 250 (2) 753-762.
39. Harvey H. (1979). *Hormones and reproductive behavior*. Scientific American, ed. Freeman W. H. and company San Francisco cap. 7, 9. pag. 84-92.

40. Hernández-Verdún P. Russel P. y Junera R. (1993). Proteínas asociadas con las regiones organizadoras nucleolares (NORs) durante la interfase y mitosis. *Progresos en biología celular*, pags. 139-141, Becerra J., Figares J. M., Fernández- Llebraz P. Eds. Universidad de Málaga.
41. Hirsfeld A. and Midgley R. Jr. (1978). The role of FSH in the selection of large ovarian follicles in rat. *Biology of reproduction*. 19, 606-611.
42. Hughes F. y Gorospe W. (1991) Biochemical identification of Apoptosis (Programmed Cell Death) in granulosa cells: Evidence for a potential mechanism underlying follicular Atresia. *Biochem J*. 28, 325-329.
43. Inaga, S., Osatake, H. y Tanaka K., 1991. SEM images of DNA double helix and nucleosomes observed by ultrahigh-resolution scanning electron microscopy. *J. Electron Microsc.* 40, 181-186.
44. Jiménez García L. (1985). Tesis de Maestría: Evolución nuclear en animales. (Enfoque ultraestructural de las partículas ribonucleoproteicas intranucleares del período interfásico).
45. Jiménez García L.F; Elizundia, J. M; Lopez Zamorano, B., Maciel, A., Zavala, G., Echeverría O. M. y Vazquez Nin G. H., 1988. Implications for evolution of nuclear structures of animals, plants, fungi and protoctis . *BioSystems* 22, 103-116.
46. Jiménez García L; Segura - Valdez M; Ochs R; Echeverría O; Vázquez Nin G. y Busch H. (1993). Electron microscopic localization of ribosomal DNA in rat liver nucleoli by non-isotopic in situ hybridization. *Exp. Cell Res.* 207, 220-225.
47. Jiménez García L; y Spector D. (1993). In vivo evidence that transcription and splicing are coordinated by a recruiting mechanism. *Cell* 73, 47-59.

48. Kaipia A; Chung S; Eisenhauer K. y Hsueh A. (1996). Tumor-Necrosis factor alpha and its second messenger ceramide, stimulate apoptosis in cultured ovarian follicles. *Endocrinology* 137(11): 4864- 4870.
49. Kass G; Eriksson E; Weis M; Orrenius S. y Chow S. (1996). Chromatin Condensation during apoptosis requires ATP. *Biochem J.* 31, 749-752.
50. Kayne, P.S. Kim, U.J., Han, M., Muller, J.R., Yoshizaki, F. Y Grunstein, M. 1988. Extremely conserved histone H4 N terminus is dispensible for growth but essential for repressing the silent mating loci in yeast. *Cell* 55, 27-39.
51. Karp G. 1987. *Biología Celular*. Edit . Mc Graw-Hill. México.
52. King K. y Cidlowski J. (1995). Cell cycle and apoptosis: Common pathways to life and death *journal of cellular biochemistry* 58: 175-180.
53. Kornberg, R. D. y Klug A., 1981. The nucleosome . *Sci. Am.* 244, 52-64.
54. Lunenfeld B; Kraiem Z. y Eshkol A. (1975). The Function of the Growing Follicule. *J. Reprod. Fert.* 45, 567-574.
55. Malkinson A. (1980). *Acción hormonal cuadernos de biología*, Edit. Omega Barcelona.
56. Medina F. J; Moreno S; Martín M. y Fernández G. (1989). Intercromatin granules in plant nuclei *Biology of the cell*, 67, 331-339.
57. Melcak I., Raska I. (1996). Structural organization of the pre-mRNA splicing commitment: a hypothesis. *Journal of Structural Biology* 117,189-194

58. Méndez U. (1981). Tesis profesional. Estudio Histológico comparado de la retina de cinco vertebrados. UNAM. México.
59. Milan K; Bagchi; Ming-Jer T; Bert W. y Siphia Y. (1992). Analysis of the mechanism of steroid hormone receptor- dependent gene activation in cell-free systems. *The Endocrine Society* 13, 3, 525-535.
60. Monneron A. y Bernhard W. (1969). Fine structural organization of the interphase nucleus in some mammalian cell. *J.Ultrastructure Research* 27, 266-288.
61. Morales Alcántara Ma. De la Salud, 1983, Estudio histológico del ovario de cuatro vertebrados, Tesis de licenciatura en la facultad de ciencias, México D.F.
62. Nahum R; Beyth Y; Chun S; Hsueh, A. y Tsafiriri A.(1996) Early onset of desoxyribonucleic acid fragmentation during atresia of preovulatory ovarian follicles in rats. *Biology of Reproduction* 55(5): 1075- 1080.
63. Nakano R; Mizano T; Katayama K. y Tojo S. (1975). Growth of ovarian Follicles in rats in absence of gonadotrophins. *J. Reprod. Fert.* 45, 545-546.
64. Patt I. y Patt R..(1979). *Comparative Vertebrate Histology*. Harper and Row Publishers. New York.
65. Philips B. (1975). *Development of vertebrate anatomy*. The C.V. Mosby Company. Sait Louis.
66. Pombo A. y Cook P. (1996). The localization of sites containing nascent RNA and splicing factors. *Exp. Cell Res.* 229, 201-203.
67. Puvion E; Viron A. y Xu X. (1984). High resolution autorradiographical detection of RNA in the interchromating granules of DRB treated cells. *Exp. Cell* 43, 147-150

68. Puvion E. y Puvion-Dutilleul F. (1996). Ultrastructure of the nucleus in relation to transcription and splicing: roles of perichromatin fibrils and interchromatin granules. *Exp. Cell Res.* 229, 217-225.
69. Puvion E. y Moyne G. (1978). Intranuclear migración of newly synthesized extranucleolar ribonucleoproteins. *Exp. Cell Res.* 115, 79-88.
70. Richards Joanne and Midgey R. Jr. (1976). Protein Hormone Action: A key to Understanding Ovarian Follicular and Luteal Cell Development. *Biology of Reproduction* 14, 82-94.
71. Romer A. (1981). *Anatomía Comparada*. Interamericana. México.
72. Ross M; Romrell L. y Kaye G. (1998). *Histología; texto y atlas color*, Editorial Panamericana, Tercera edición, México D.F., p.p. 817.
73. Shaw P. (1995). The Nucleolus. *Ann. Rev. Cell Dev. Biol.* 11, 93-121.
74. Spector D. (1993). Macromolecular domains within the cell nucleus. *Cell Biol.* 9, 265-315
75. Swift H. (1959). Studies on nuclear fine structure. *Brookhaven Symp. Biol.* 12, 134 –
76. Tounekti O. Belehradek J. y Mir L. (1995). Relationships between DNA fragmentation, chromatin condensation and changes in flow cytometry profiles detected during apoptosis. *Current opinion in cell biology.* 8: 506-516.
77. Vázquez Nin G; Echeverría O; Molina E. y Fragoso J. (1978). Effects of ovariectomy and estradiol injection on nuclear structures of endometrial epithelial cells. *Acta Anat* 102, 308-318.

78. Vázquez Nin G. y Bernhard W. (1971). Comparative ultrastructural study of perichromatin and Balbiani ring granules. *J. Ultrastruct. Res.* 36, 842-859.
79. Vázquez Nin G. y Echeverría O. (1996). The polytene in nucleus in morphological, cytochemical, and functional studies of messenger RNA transcription, processing, and transportation. *Eur. J. Histochem.* 40, 7-16.
80. Vázquez Nin G; Echeverría O. y Pedron J. (1979). Effects of estradiol on the ribonucleoprotein constituents of the nucleus of cultured endometrial epithelial. *Cells. Biol. Cell.* 35, 221-228
81. Vázquez Nin G. Jiménez García L. y Echeverría O. (1993). Relaciones entre morfología y funciones nucleolares. Estudio de hibridación in situ y morfometría. *Progresos en biología celular*, págs. 135 - 138 eds. Becerra J., Pérez J. M., Figares, Fernández P., Lebrez L. Universidad de Málaga.
82. Vazquez Nin G. y Sotelo J. (1967) *Electron Microscopy of the Atretic Oocytes of the rat.*
83. Wyllie A; Kerr J. y Currie A. (1980). *Cell Death: The Significance of Apoptosis.* *International Reviews of cytology.* Vol 68: 251-306.
84. Zackrisson U; Mikuni M; Wallin A; Delbro D; Hedin L y Brannstrom. (1996) Cell specific localization of nitric oxide synthetases in the rat ovary during follicular development and ovulation. *Human Reproduction (Oxford)* 11(12): 2667-2673.
85. Zachow K; Weitsman S. y Magoffin D. (1997) Hepatocyte growth factor regulates ovarian thecal- interstitial cell differentiation and androgen production. *Endocrinology* 138(2): 691-697.