



**UNIVERSIDAD NACIONAL AUTÓNOMA
DE MÉXICO**

FACULTAD DE CIENCIAS

**MORFOLOGÍA NUCLEAR DE LAS CÉLULAS
GRANULOSAS Y SU RELACIÓN CON LA ACTIVIDAD
TRANSCRIPCIONAL DURANTE LA APOPTOSIS**

T E S I S

QUE PARA OBTENER EL TÍTULO DE:

BIÓLOGO

PRESENTA:

ABRAHAM CASTRO CRUZ



DIRECTORA DE TESIS:

DRA. OLGA MARGARITA ECHEVERRÍA MARTÍNEZ

2018

CIUDAD UNIVERSITARIA, CDMX 2018



Universidad Nacional
Autónoma de México



UNAM – Dirección General de Bibliotecas
Tesis Digitales
Restricciones de uso

DERECHOS RESERVADOS ©
PROHIBIDA SU REPRODUCCIÓN TOTAL O PARCIAL

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

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



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.

Hoja de Datos del Jurado

1. Datos del alumno

Apellido paterno	Castro
Apellido materno	Cruz
Nombre	Abraham
Teléfono	55-33-50-15-94
Universidad Nacional Autónoma de México	
Facultad de Ciencias	Facultad de Ciencias
Carrera	Biología
Número de cuenta	41400173-0

2. Datos de la tutora

Grado	Dra.
Nombres(s)	Olga Margarita
Apellido paterno	Echeverría
Apellido materno	Martínez

3. Datos del sinodal 1

Grado	Dr.
Nombres(s)	Luis Felipe
Apellido paterno	Jiménez
Apellido materno	García

4. Datos del sinodal 2

Grado	Dr.
Nombres(s)	Horacio
Apellido paterno	Merchant
Apellido materno	Larios

5. Datos del sinodal 3

Grado	Dra.
Nombres(s)	Patricia
Apellido paterno	Rivas
Apellido materno	Manzano

6. Datos del sinodal 4

Grado	Dra.
Nombres(s)	María del Carmen
Apellido paterno	Méndez
Apellido materno	Herrera

7. Datos de escrito

Título	Morfología nuclear de las células granulosas y su relación con la actividad transcripcional durante la apoptosis.
Número de páginas	73 pp
Año	2018

Agradecimientos

A mi *alma mater*, la Universidad Nacional Autónoma de México por abrirme las puertas de este maravilloso lugar. Me enorgullece pertenecer a esta institución académica.

A CONACYT por el apoyo económico durante un año como ayudante de investigador emérito del Dr. Gerardo Hebert Vázquez Nin.

Al programa PAPIIT IN225117, por el apoyo financiero de la UNAM-DGAPA.

A la Dra. María Luisa Escobar Sánchez, por la vocación que le caracteriza en el quehacer de la ciencia. Gracias por su tutela en el desarrollo de este proyecto y su apoyo incondicional.

A la Dra. Olga Margarita Echeverría Martínez, muchas gracias por ofrecerme más que su dirección académica, gracias por su amistad y todo el apoyo que recibí de su parte en todos los sentidos. Gracias por apoyarme en todas mis decisiones e impulsarme siempre a seguir adelante. Sobre todo, muchas gracias porque hizo que el camino fuera menos pesado. No terminaré de agradecerle.

Al Dr. Gerardo Hebert Vázquez Nin. Gracias por todo tu apoyo, por compartir conmigo tus conocimientos pero principalmente gracias porque a través de tu amistad he logrado crecer y madurar como persona.

A la Dra. Nayeli Torres Ramírez y el Dr. Abrahan Hernández Hernández quienes me compartieron sus conocimientos y profesionalismo.

A la Dra. Rosario Ortiz Hernández y a la M. en C. Silvia Juárez Chavero por su asesoría en las técnicas de procesamiento del material biológico.

A mi jurado de tesis: al Dr. Luis Felipe Jiménez García, Dr. Horacio Merchant Larios, Dra. Patricia Rivas Manzano y a la Dra. María del Carmen Méndez Herrera, quienes me apoyaron muchísimo en la revisión de esta tesis.

A mis amigos del laboratorio, Mariana, Lupita, Alejandra, Teresita, Laura, Giselle, Jesús, Diego, Max, Sebastián, Ulises por su compañía, amistad, consejos y por tantos agradables momentos que pasamos juntos.

A mis amigos de la prepa con quienes compartí grandes aventuras, Marisol, Gaby, Alexia, Nallely, Jairo, Irán. César, Ulises, Gerardo,

A Octavio, por gran su apoyo, su paciencia y ayuda.

A Las flores 122: Ulrich, Alí, David, Carlos, Janine, Erick, Diego por tantas y tantas experiencias juntos, porque el día a día al lado de ustedes ha sido la experiencia más importante en mi vida.

A mis hermanos Hiram, Lourdes, Jessica, Camila y Emiliano, por todo el cariño, apoyo y sobre todo por estar siempre a mi lado.

A mis padres, por el constante apoyo, los grandes consejos y las mejores pláticas, por creer en mí y por promover mi superación. Los quiero mucho.

A todos los antes mencionados, porque todo lo bueno en mi vida, incluso los éxitos, proviene de o ha sido gracias a ustedes.

“Aquí yace el proyecto de una utopía”.
Alfredo Jalife-Rahme

“Una de las libertades más sagradas en el mundo científico es la libertad de desafiar:
probar nuevas ideas contra las antiguas e intentar explicar hechos y resultados por
medio de nuevas interpretaciones, a veces hasta creer en lo increíble”.
Marco Biggiogera

ÍNDICE

Abreviaturas.....	1
Índice de tablas.....	2
Índice figuras.....	3
Resumen.....	4
<i>Abstract</i>	5
I. Introducción.....	6
1.1 Ovario.....	6
1.2 Foliculogénesis.....	7
1.3 Atresia y selección folicular.....	8
1.4 Muerte celular.....	10
1.5 Apoptosis.....	10
1.5.1 Vía extrínseca	12
1.5.2 Vía intrínseca	12
1.5.3 Vía común.....	14
1.6 Núcleo celular.....	15
1.7 Cromatina.....	15
1.8 Nucléolo.....	17
1.8.1 Estructura.....	17
1.8.2 Fisiología.....	18
1.8.3 Proteínas nucleolares.....	19
1.9 Partículas ribonucleoproteicas intranucleares.....	20
1.9.1 Fibras pericromatinianas.....	20
1.9.2 Gránulos pericromatinianos.....	20
1.9.3 Gránulos intercromatinianos.....	20
1.10 <i>Splicing</i> o empalme.....	20
1.10.1 Factores de <i>splicing</i>	21
1.11 Inmunolocalización.....	21
1.11.1 Generalidades.....	21
II. Antecedentes.....	23
III. Hipótesis.....	23

IV. Objetivos	23
4.1 Generales.....	23
4.2 Particulares.....	23
V. Material y Métodos	24
5.1 Material biológico.....	24
5.2 Procesamiento para microscopía óptica.....	24
5.2.1 Corte de los bloques de parafina.....	24
5.2.2 Tinción de hematoxilina-eosina.....	24
5.2.3 TUNEL.....	25
5.2.4 Inmunolocalización óptica.....	25
5.2.4.1 Caspasa-3 activa.....	25
5.2.4.2 Nucleolina (NCL) y casp-3 activa.....	26
5.2.4.3 Nucleofosmina (NPM1) y casp-3 activa.....	26
5.2.4.4 RNA pol II.....	27
5.2.4.5 H3ac.....	27
5.2.4.6 SC35.....	28
5.2.5 Análisis de intensidad de fluorescencia.....	28
5.2.6 Observación de las preparaciones.....	29
5.3 Procesamiento para microscopía electrónica.....	29
5.3.1 Fijación e inclusión en EPON.....	29
5.3.2 Corte del material biológico.....	29
5.3.3 Fijación e inclusión en <i>Lowicryl</i> K4M.....	29
5.3.4 Contraste general Ur/Pb.....	30
5.3.5 Contraste preferencial para ribonucleoproteínas Ur/EDTA/Pb.....	30
5.3.6 Inmunolocalización.....	30
5.3.6.1 Nucleolina (NCL).....	30
5.3.6.2 Nucleofosmina (NPM1).....	31
5.3.7 Observación de las preparaciones.....	31
VI. Resultados	32
6.1 Características morfológicas de la atresia folicular.....	32
6.2 TUNEL y Casp-3 activa son positivos en células apoptóticas.....	32
6.3 Distribución de las proteínas nucleolares durante la apoptosis.....	36
6.4 Comportamiento de las proteínas RNA pol II, H3ac y SC35 durante la apoptosis.....	39

6.5 Ultraestructura de los cambios morfológicos en células apoptóticas.....	44
6.6 Reorganización de las partículas ribonucleoproteicas intranucleares en células apoptóticas.....	44
6.7 Ultraestructura del nucléolo y la distribución de las proteínas nucleolares durante la apoptosis.....	48
VII. Discusión.....	56
7.1 Cambios morfológicos de las células granulosas en la atresia folicular.....	56
7.2 Identificación de apoptosis en células granulosas.....	57
7.3 Localización y dinámica de las RNP´s intranucleares en células granulosas.....	58
7.4 Distribución de las partículas ribonucleoproteicas intranucleares en células granulosas apoptóticas.....	58
7.5 El nucléolo y la distribución de las proteínas nucleolares en células granulares durante la apoptosis.....	59
7.6 Regulación epigenética durante la apoptosis.....	60
7.7 Actividad transcripcional y postranscripcional durante la apoptosis.....	61
7.8 Importancia de estudiar la atresia folicular.....	63
VIII. Conclusiones.....	63
IX. Perspectivas.....	65
X. Literatura citada.....	65

Abreviaturas

Abreviaturas	Nombre
ADN	Ácido de desoxirribonucleico
ARN	Ácido ribonucleico
ADNr	Ácido de desoxirribonucleico ribosómico
ARNm	Ácido ribonucleico mensajero
ARNr	Ácido ribonucleico ribosómico
ARN Pol I	Ácido ribonucleico polimerasa I
ARN Pol II	Ácido ribonucleico polimerasa II
ATP	Adenil trifosfato
CFD	Componente fibrilar denso del nucléolo
CF	Centro fibrilar del nucléolo
CG	Componente granular del nucléolo
Cyt-c	Citocromo-C
CYP19	Citocromo P450 aromatasa
DAPI	4', 6-diamidino-2-fenilindol diclorhidrato
DISC	Complejo de señalización de inducción de muerte
FADD	Fas asociado con dominio de muerte
FPC	Fibras pericromatinianas
FSH	Hormona folículo estimulante
GnRH	Hormona liberadora de gonadotropinas
GIC	Gránulos intercromatinianos
GPC	Gránulos pericromatinianos
HERDS	Estructuras heterogéneas ectópicas derivadas de RNPs
hnRNPs	Ribonucleoproteínas nucleares heterogéneas
H3AC	Histona 3 acetilada
IGFI	Factor de crecimiento insulínico tipo I
IGFII	Factor de crecimiento insulínico tipo II
LH	Hormona luteinizante
MicroARNs	Micro- Ácidos ribonucleicos
NGS	Suero normal de cabra
NCL/C23	Nucleolina
NPM1/B23	Nucleofosmina
NORs	Regiones organizadoras del nucléolo
PBS	Solución salina amortiguadora con fosfatos
PBS-TWEEN	Solución salina amortiguadora con fosfatos más detergente tween
PBS-BSA-TWEEN	Solución salina amortiguadora con fosfatos más albúmina de suero bovino más detergente tween
Pre-ARNm	Pre-ARN mensajero
RNP's	Ribonucleoproteínas
ROS	Especies reactivas de oxígeno
SC35	Componente de 35kD del spliceosoma

SnRNPs	Ribonucleoproteínas pequeñas nucleares
SnoRNPs	Ribonucleoproteínas pequeñas nucleolares
SR	Repeticiones largas de aminoácidos de serina y arginina
TNFR1	Factor de necrosis tumoral del receptor I
TRADD	Dominio de muerte asociado al receptor del factor de necrosis tumoral del receptor I
TUNEL	Marcado del corte de dUTP de Terminal deoxinucleotidil transferasa
UBF	Factor de unión <i>upstream</i>
Ur/Pb	Acetato de uranilo/Citrato de plomo
Ur/EDTA/Pb	acetato de uranilo 4% - ácido etilendiaminotetracético - citrato de plomo 3%
17 β -HSD	17 β -hidroxiesteroide deshidrogenasa

Índice de tablas

No. de tabla	Pie de figura
Tabla 1	Clasificación de las caspasas en la apoptosis.
Tabla 2	Clasificación de la familia Bcl-2 en la apoptosis.

Índice de figuras

No. de Figura	Pie de figura
Figura 1	Esquema del ovario en mamíferos.
Figura 2	Proceso de foliculogénesis.
Figura 3	Reclutamiento inicial y cíclico en el desarrollo folicular.
Figura 4	Muerte celular por apoptosis.
Figura 5	Esquema de las vías de la apoptosis.
Figura 6	Niveles de organización de la cromatina.
Figura 7	Representación de los tres compartimentos del nucléolo y sus marcadores específicos.
Figura 8	Biogénesis de partículas ribosómicas en el nucléolo.
Figura 9	Esquema de las posiciones de los dominios y residuos modificados postraduccionalmente en las proteínas NCL y NPM1.
Figura 10	Representación esquemática de los mecanismos de inmunolocalización.
Figura 11	Folículos atrésicos antrales teñidos con hematoxilina-eosina.
Figura 12	Técnica de TUNEL para identificar el ADN internucleosómico.
Figura 13	Inmunolocalización de Casp-3 activa en células normales y apoptóticas.
Figura 14	Inmunolocalización de Casp-3 activa y NCL/nucleolina en células normales y con apoptosis temprana, media y avanzada.
Figura 15	Inmunolocalización de Casp-3 activa y NPM1/nucleofosmina en células normales y con apoptosis temprana, media y avanzada.
Figura 16	Inmunolocalización de RNA pol II.
Figura 17	Inmunolocalización de H3ac.
Figura 18	Inmunolocalización de SC35.
Figura 19	Decremento de las proteínas RNA pol II, H3ac y SC35 con la progresión de la apoptosis.
Figura 20	Microfotografía electrónica de células granulosas normales y apoptóticas.
Figura 21	Microfotografía electrónica de cortes contiguos de una célula granulosa en proceso apoptótico.
Figura 22	Microfotografía electrónica de cortes contiguos de cuerpos apoptóticos.
Figura 23	Inmunolocalización de NCL/nucleolina en una célula granulosa normal.
Figura 24	Inmunolocalización de NCL/nucleolina en células granulosas en proceso de apoptosis.
Figura 25	Inmunolocalización de NCL/nucleolina en una célula con apoptosis avanzada.
Figura 26	Inmunolocalización de NPM1/nucleofosmina en una célula granulosa normal.
Figura 27	Inmunolocalización de NPM1/nucleofosmina en células granulosas en proceso de apoptosis.
Figura 28	Inmunolocalización de NPM1/nucleofosmina en un cuerpo apoptótico.
Figura 29	Inmunolocalización de NPM1/nucleofosmina en un cuerpo apoptótico.
Figura 30	Modelo del comportamiento morfológico de las proteínas nucleolares y transcripcionales durante el curso de la apoptosis.

RESUMEN

En el presente trabajo, se analizaron los cambios morfológicos de las estructuras ribonucleoproteicas nucleolares y no nucleolares como indicadores de la actividad transcripcional; así como la presencia de las proteínas indicadoras del índice de transcripción RNA Pol II y H3ac en células granulosas apoptóticas de folículos antrales.

Se utilizaron muestras de ovarios de 10 ratas adultas jóvenes Wistar (*Rattus norvegicus*). Se usaron los lineamientos de la Norma Oficial Mexicana (NOM 062-ZOO-1999). Se siguieron los protocolos específicos de inclusión en parafina para microscopía óptica y resina epóxica y acrílica para microscopía electrónica. Se tiñeron con la tinción general hematoxilina-eosina para observar núcleos y morfología celular. Así mismo, se aplicaron técnicas para microscopía de fluorescencia para identificar ADN con DAPI, proteínas asociadas al nucléolo con los anticuerpos anti-nucleolina y anti-nucleofosmina, actividad transcripcional con los anticuerpos anti-RNA pol II, anti-H3ac y anti-SC35 y a la actividad apoptótica con el anticuerpo anti-caspasa 3 activa y TUNEL. Para el estudio ultraestructural, los ovarios se fijaron con paraformaldehído al 4% y glutaraldehído al 2.5% y se incluyeron en resina de epón y *lowicryl* K4M. Se realizó el contraste general Ur/Pb, el contraste preferencial para RNP's (Ur/EDTA/Pb) y se inmunolocalizaron los componentes fibrilar denso y granular del nucléolo con los anticuerpos anti-nucleolina y anti-nucleofosmina.

Los resultados evidenciaron que durante la apoptosis, las proteínas nucleolares nucleolina y nucleofosmina se encuentran en todas las fases del proceso y que en los cuerpos apoptóticos ya no se encuentran distribuidos en una forma nucleolar definida sino desintegrados en la periferia de la cromatina compacta. Las proteínas indicadoras del índice de transcripción RNA Pol II y H3ac y del *splicing* SC35, disminuyen su presencia a lo largo del proceso de apoptosis hasta la formación de los cuerpos apoptóticos.

Por lo que en este trabajo reportamos la dinámica del nucléolo durante la apoptosis en células granulosas de folículos antrales atrésicos de ovarios de rata adulta. El nucléolo sufre segregación de sus componentes fibrilar denso (CFD) y granular (CG). En la apoptosis media, logramos observar el componente fibrilar denso y componente granular. Al final del proceso apoptótico, solamente observamos presencia del CG. Adicionalmente, la acetilación de histonas permite ver la presencia de los complejos asociados a la transcripción como RNA Pol II y SC35 lo que nos sugiere que elementos de la transcripción se encuentran presentes durante la apoptosis.

ABSTRACT

In this work the transcriptional activity of apoptotic granulosa cells was evaluated in relation with the apoptotic process progression. The morphological modification of nucleolar and non-nucleolar ribonucleoproteins as well as the presence and distribution of the RNA Pol II, H3Ac, and SC35 proteins were evaluated in apoptotic granulosa cells from atretic antral follicles. The ovaries from ten Wistar adult rats were evaluated following the NOM 062-ZOO-1999. The samples were embedded into paraffin to optical microscopy evaluations. To transmission electron microscopy, the ovaries were embedded in both epoxy resin and Lowicryl K4M hydrophilic resin. The general Hematoxylin-Eosin staining was used to the morphological observations. The nucleolar proteins nucleolin and nucleophosmin were identified by using the immunodetection technique. Similarly, the transcriptional activity was evaluated by means of the RNA, H3Ac, and SC35 proteins identification. The apoptotic cells were recognized by the presence of active caspase-3 and the DNA fragmentation (TUNEL technique). The ultrastructural analysis of the nuclear components was made by using the regressive technique staining Ur-EDTA-Pb and the immunogold detection of nucleolin and nucleophosmin. Our results evidenced that during apoptosis in granulosa cells, the nucleolar proteins nucleolin and nucleophosmin are present along the cell death process, however in the apoptotic bodies, the nucleolar components are associated to the peripheral compact chromatin. The proteins related to the transcriptional activity RNA Pol II, H3Ac, and SC35 show a dismissing along the progression of the apoptotic process, these are present in a small amount in apoptotic bodies.

The ultrastructural observations allowed to identify that the nucleolar components are taken to pieces with the progression of the apoptosis. The nucleolar granular component is well-preserved until the formation of apoptotic bodies.

The results evidence in granulosa cells undergoing apoptosis, the transcriptional proteins are present during the apoptotic progression, moreover, these factors are conserved into apoptotic bodies until the last phase of the cell elimination.

INTRODUCCIÓN

OVARIO

El ovario es el órgano reproductor femenino en los vertebrados, está formado por cuatro estructuras: corteza, médula, epitelio superficial y una túnica albugínea (Figura 1). El epitelio superficial es cúbico simple, recubre a los ovarios y por debajo de este se encuentra la túnica albugínea formada por tejido colagenoso denso e irregular. El epitelio superficial participa en la liberación del ovocito y de su *corona radiata* durante la ovulación. En un corte transversal, se reconocen la corteza y la médula sin separación definida. En la amplia corteza existe tejido conjuntivo y folículos en distintos estadios de desarrollo. La médula es altamente vascularizada formada por tejido conjuntivo, células intersticiales, nervios y vasos linfáticos y sanguíneos (Gartner, 2015; Escobar *et al.*, 2011, Ross, 2006).

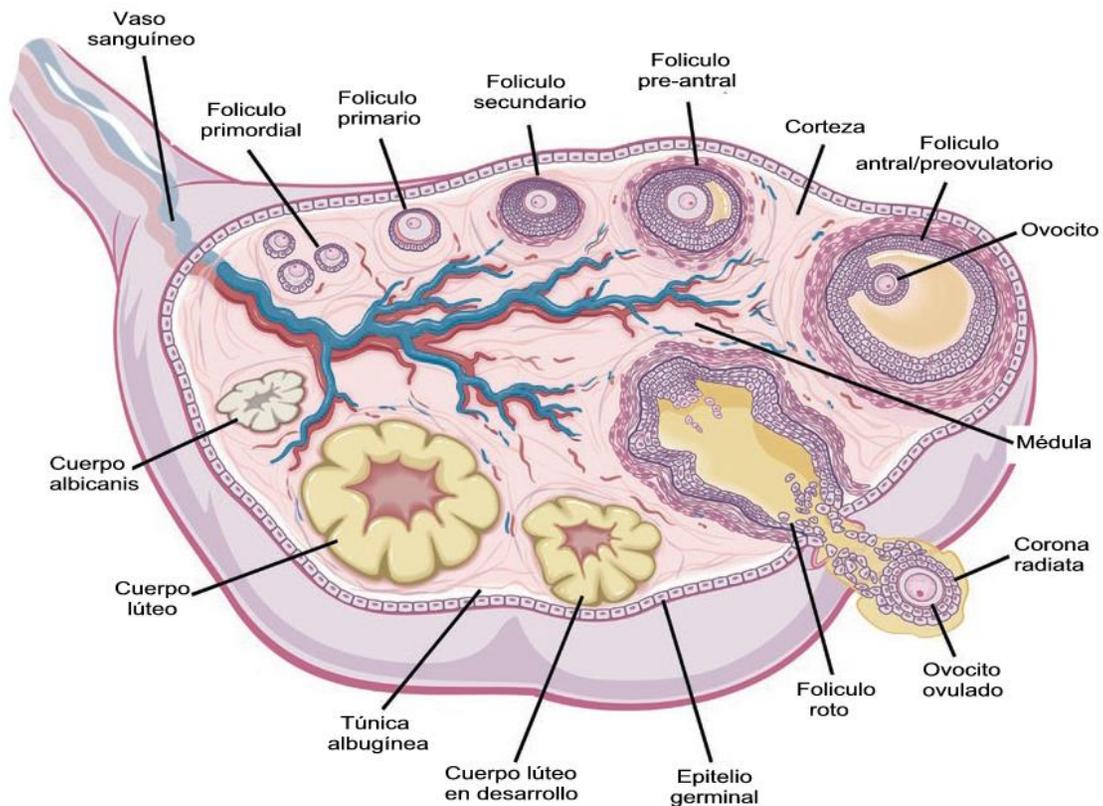


Figura 1. Esquema del ovario en mamíferos. Tomado y modificado de Desai *et al.*, 2017.

FOLICULOGÉNESIS

La foliculogénesis es el proceso de desarrollo del folículo ovárico regulada de manera coordinada por factores endocrinos e intraováricos. La actividad endocrina se medía por el sistema hipotálamo-hipófisis-ovario que secreta la hormona liberadora de gonadotropinas (GnRH) por el hipotálamo y la hipófisis produce las hormonas luteinizante (LH) y folículo estimulante (FSH) que actuarán sobre el ovario. La actividad intraovárica produce esteroides es como estrógenos, andrógenos, progesterona y péptidos entre ellos inhibina, activina, factor de crecimiento insulínico tipo I y II (IGF-I y II), entre otros (Knobil, 2006).

Para alcanzar la etapa ovulatoria, un folículo ovárico pasará por las siguientes etapas: primordial, primaria, secundaria, antral y la etapa del folículo pre-ovulatorio (Figura 2). En todas las especies de mamíferos estudiadas, se produce una marcada pérdida de ovocitos durante la vida fetal antes de confinamiento en un folículo primordial formado por una sola capa de células foliculares planas (Klinger & De Felici, 2011). Después de que la hembra empieza la madurez reproductiva, las células somáticas que encierran a cada folículo primordial se vuelven cuboidales y se denominan células granulosa, esto marca la transformación a un folículo primario. A medida que se desarrolla se transforma en folículo secundario, el cual se caracteriza porque el ovocito primario aumenta de tamaño y secreta una capa no celular de glucoproteínas conocida como la zona pelúcida. Además, las células granulosa aumentan en número y forman múltiples capas y por otro lado el tejido conectivo en el margen externo de las células granulosa se diferencia en una capa de células teca (Knobil, 2006; Li *et al.*, 2008).

Posteriormente, se forma una cavidad llena de líquido llamada antrum, entre las capas de células granulosa, este folículo es llamado folículo antral. Además, el ovocito deja de crecer, las capas de las células granulosa tienen un grosor regular, menos en las que se encuentran asociadas al ovocito donde forman un montículo denominado *cumulus ooforus*. Cuando el folículo está completamente desarrollado, se lo conoce como folículo maduro, de Graaf o preovulatorio. Durante la etapa antral y preovulatoria hay un control intraovárico, ya que las células de la teca interna expresan receptores para la hormona luteinizante (LH), la cual produce andrógenos y las células granulosa expresan receptores a la hormona folículo estimulante (FSH). Ambas hormonas son esenciales en la proliferación y supervivencia de las células somáticas durante la etapa preovulatoria (Escobar *et al.*, 2011; Li *et al.*, 2008).

Los folículos preovulatorios liberan al ovocito maduro junto con las células granulosa que los rodean, el resto de las células somáticas que cubrían al folículo antral se transforman

en el cuerpo lúteo a través del proceso de luteogénesis. El cuerpo lúteo produce estrógenos y progesterona, que son hormonas que regulan el ciclo estral y su función es arrear el crecimiento de nuevos folículos en caso de la fertilización del ovocito y si no es esto así, se degrada el cuerpo lúteo (Knobil, 2006; Vázquez-Nin *et al.*, 2011).

La interacción de las células granulosas-tecales también tienen un papel en la producción de estrógenos y progesterona. Las células tecales sintetizan andrógenos (androstenediona) desde el metabolismo del colesterol. Las células granulosas, a partir de la etapa folicular antral temprana, tienen la capacidad de convertir los andrógenos a estrógenos mediante la enzima citocromo P450 aromatasa (CYP19) y 17 β -hidroxiesteroide deshidrogenasa (17 β -HSD), las cuales están reguladas por las hormonas LH y FSH (Brodowska *et al.*, 2014).

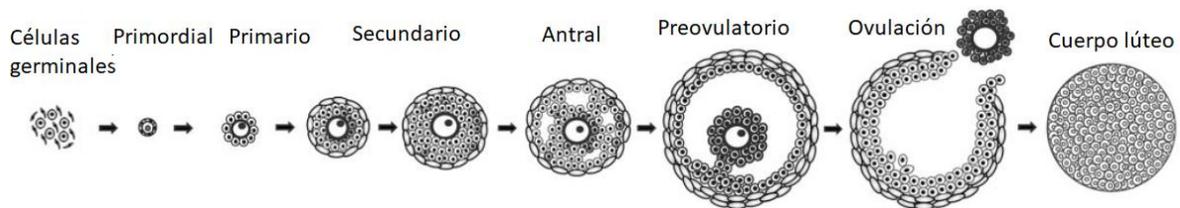


Figura 2. Proceso de foliculogénesis. Tomado y modificado de Edson *et al.*, 2009

ATRESIA Y SELECCIÓN FOLICULAR

Durante el desarrollo folicular ovárico de los mamíferos, sólo se seleccionan una cantidad límite de folículos para la ovulación, mientras que el resto sufre atresia en diversas etapas de desarrollo. Se estima que el 99% de los ovocitos se eliminan desde la etapa embrionaria, después del nacimiento y la etapa reproductiva como resultado de la atresia folicular (Zhang *et al.*, 2018). La atresia es un proceso degenerativo, paulatino e irreversible de los folículos ováricos que comienzan su desarrollo en el ciclo estral y no son ovulados; del mismo modo, la atresia se presentan en cualquier estadio del desarrollo folicular aunque es más frecuente en folículos antrales y su incidencia está directamente relacionada con el tamaño de los folículos, los más grandes presentan un índice proliferativo mayor que hace a sus células más susceptibles a la muerte por apoptosis (Ireland *et al.*, 2008; Quirk *et al.*, 2004). La atresia sucede principalmente por la ausencia de factores tróficos esenciales en los momentos críticos de la formación o maduración folicular (por ejemplo, FSH, IGF y otros factores de crecimiento). Desde etapas fetales se selecciona un número definido de folículos para la ovulación, mientras que el resto sufre atresia en diversas etapas de

desarrollo. La atresia folicular, antes de la pubertad, es el proceso común por el cual pasan los folículos en crecimiento (Escobar *et al.*, 2011). Sin embargo, en adultos, las gonadotropinas juegan un papel importante en la selección de los folículos, en donde uno o unos llegarán a la etapa preovulatoria, mientras que otros serán conducidos a la atresia folicular. En los folículos adultos inactivos, el ovocito y las células granulosas están involucradas en la muerte apoptótica, mientras que en los folículos en crecimiento son las células granulosas las que primero experimentan cambios que conducen a atresia (Strauss & Williams, 2013).

Se han propuesto dos formas de selección de folículos que continuarán el desarrollo (Figura 3). El reclutamiento inicial, en donde de forma continua se seleccionan ciertos folículos del acervo de folículos primordiales para continuar el crecimiento y el reclutamiento cíclico, en donde algunos folículos antrales son seleccionados por un incremento de FSH de forma cíclica (McGee & Hsueh, 2000).

Las células granulosas en atresia presentan cambios morfológicos y bioquímicos. Las características morfológicas son la compactación y fragmentación celular, organelos contraídos, citoplasma denso, núcleo picnótico y presencia de cuerpos apoptóticos. Las características bioquímicas consisten en la actividad de caspasas, degradación de ADN por endonucleasas, liberación de citocromo-C (cyt-C) y disminución en la síntesis de ARNm para CYP19 (Hussein, 2005; Ortiz, 2016; Tilly *et al.*, 1992).

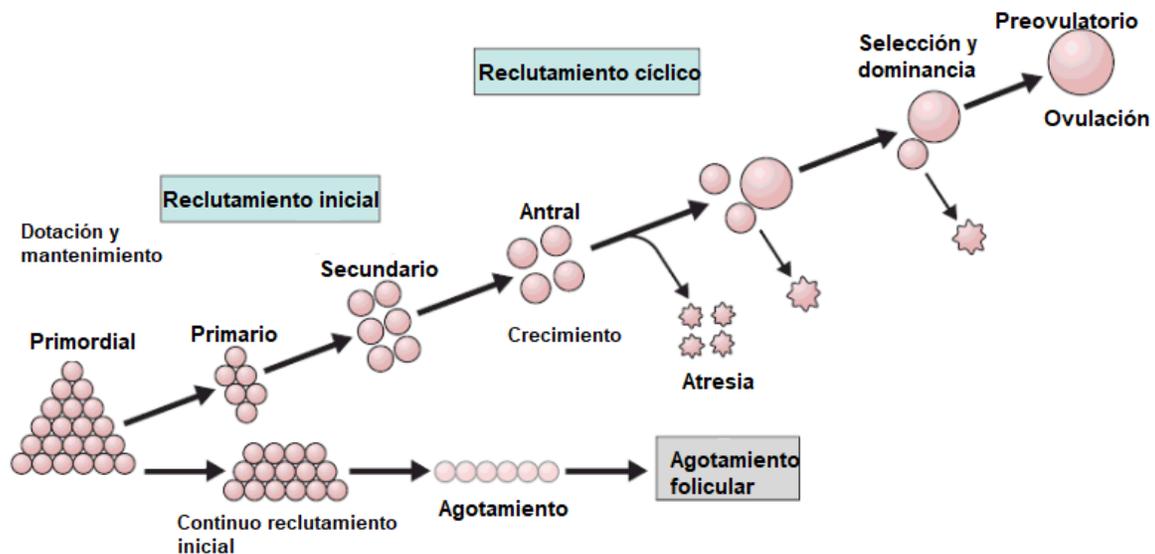


Figura 3. Reclutamiento inicial y cíclico en el desarrollo folicular. Tomado y modificado de Falcone *et al.*, 2007.

Existen 3 teorías que explican el proceso de selección de los folículos (revisado en Tilly, 2001): muerte por no competencia, muerte por defecto, muerte por autosacrificio. La primera teoría propone que existe competencia entre los folículos por una cantidad limitada de factores de crecimiento como un componente clave para la organogénesis. La segunda teoría propone que se eliminan a aquellos folículos con ovocitos que presentan anomalías de recombinación meiótica, es decir, existe un mecanismo de vigilancia (o control de calidad) que detecta y elimina a los ovocitos defectuosos. La tercera teoría menciona que cuando las células germinales forman cistos durante la ovogénesis (grupos pequeños de células germinales interconectadas y sincronizadas), solo algunas células germinales sobreviven debido a que las demás células ayudan a controlar la meiosis. Las células se “autosacrifican” para actuar como células nodrizas con el fin de que otras sobrevivan.

MUERTE CELULAR

La muerte programada es un proceso fisiológico de eliminación de células involucradas en el desarrollo embrionario y la regulación de la homeostasis en diferentes tejidos en la fase adulta (Kerr *et al.*, 1972; Escobar *et al.*, 2011).

Se han descrito 3 tipos principales de muerte celular: Apoptosis o muerte celular tipo I, autofagia o muerte celular tipo II y necrosis o muerte celular tipo III. Muchos estudios han demostrado que estos tres tipos diferentes de muerte celular están bioquímicamente interconectados y que la activación o inhibición de uno de ellos, puede conducir a una activación sinérgica o diferencial (Kroemer *et al.*, 2009). Últimamente se describió la participación de un tipo de muerte celular independiente de las caspasas conocido como paraptosis (Torres-Ramírez *et al.*, 2016).

APOPTOSIS

La apoptosis es un mecanismo de control y reparación mediante la eliminación de células no deseadas, dañadas o senescentes; es de importancia crítica para el desarrollo de los organismos. Las características morfológicas son la compactación y fragmentación celular, organelos contraídos, citoplasma denso, núcleo picnótico y presencia de cuerpos apoptóticos (figura 3). A nivel ultraestructural, se observa la redistribución de las estructuras que contienen ribonucleoproteínas (RNP's) nucleolares y no nucleolares que participan en la síntesis y procesamiento transcripcional (Biggiogera *et al.*, 2007; Scovassi *et al.*, 2008).

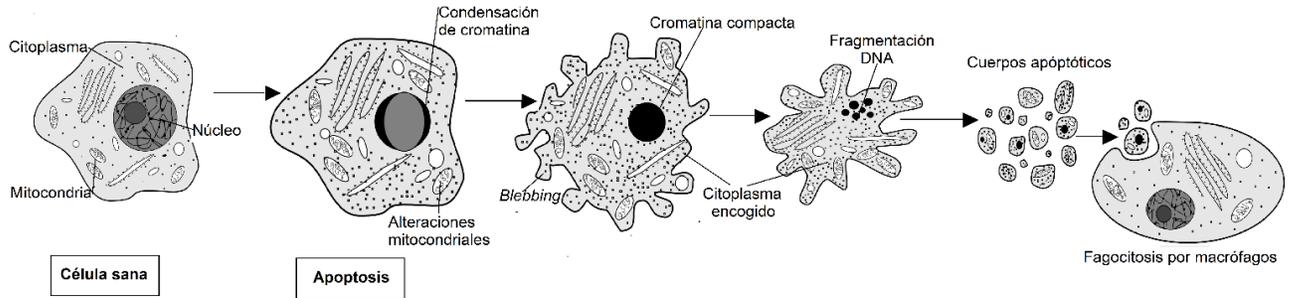


Figura 4. Muerte celular por apoptosis. Tomada y modificada de Mastrangelo & Betenbaugh, 1998.

Las características bioquímicas consisten en la actividad de caspasas, degradación de ADN por la acción de la topoisomerasa II y por endonucleasas (DNasa I y DNasa II) y la liberación de cyt-C (Hussein, 2005; Vázquez-Nin *et al.*, 2011). Las caspasas son proteasas que poseen una cisteína en su sitio activo y ácido aspártico en sus proteínas blanco; además se sintetizan como precursores inactivos (procaspasas) y se activan por el rompimiento proteolítico (Alberts *et al.*, 2015). Las caspasas se clasifican en iniciadoras o ejecutoras (Tabla 1).

Clasificación	Estructura del dominio
Iniciadoras	
Caspasa-2	1- CARD - L - S 452
Caspasa-9	1- CARD - L - S 416
Caspasa-8	1- DED - DED - L - S 479
Caspasa-10	1- DED - DED - L - S 521
Ejecutoras	
Caspasa-3	1- L - S 277
Caspasa-6	1- L - S 293
Caspasa-7	1- L - S 303

Tabla 1. Clasificación de las caspasas en la apoptosis. Tomado y modificado de Shalini *et al.*, 2015

Hay dos vías por la cual las caspasas pueden ser activadas: la vía extrínseca (receptor de muerte) y la vía intrínseca (mitocondrial) (figura 4). Ambas vías finalmente llevan a una vía común o fase de ejecución de la apoptosis.

Vía extrínseca

La vía extrínseca empieza cuando los ligandos de muerte se unen a un receptor. Aunque se han descrito varios receptores de muerte, los más conocidos el receptor de TNF tipo 1 (TNFR1) y una proteína relacionada llamada Fas y sus ligandos, TNF y Fas ligando (FasL), respectivamente. Estos receptores de muerte tienen un dominio intracelular que recluta a proteínas adaptadoras tales como el dominio asociado al receptor TNF (TRADD) y al dominio asociado a Fas (FADD), así como a cisteína-proteasas como las caspasas. La unión de un ligando de muerte a un receptor, resulta en la formación de un sitio de unión para una proteína adaptadora y el complejo ligando-receptor-adaptador se conoce como DISC (complejo de señalización que induce muerte). DISC inicia el ensamblaje y activación de la pro-caspasa 8. La forma activada de la caspasa 8 inicia la apoptosis activando a otras caspasas (Budihardjo *et al.*, 1999).

Vía intrínseca

La vía intrínseca se inicia dentro de la célula producida por algunos estímulos internos como un daño genético irreparable, la hipoxia, concentraciones extremadamente altas de Ca^{2+} citosólico y un estrés oxidativo severo. Esta vía es resultado de una permeabilidad mitocondrial aumentada y de la liberación de moléculas pro-apoptóticas como la citocromo-C hacia el citoplasma. Esta vía está estrechamente regulada por un grupo de proteínas que pertenecen a la familia Bcl-2. Hay dos grupos principales de proteínas Bcl-2 (tabla 2), las proteínas pro-apoptóticas (Bax, Bak, Bad, Bcl-Xs, Bid, Bik, Bim y Hrk) y las anti-apoptóticas (Bcl-2, Bcl-XL, Bcl-W, Bfl-1 y Mcl-1). Mientras que las proteínas anti-apoptóticas frenan la apoptosis bloqueando la liberación mitocondrial de citocromo-c, las proteínas pro-apoptóticas actúan promoviendo la liberación de citocromo-c desde la mitocondria hacia el citoplasma. Existe un balance entre las proteínas pro- y anti-apoptóticas lo que determina si se inicia o no la apoptosis (Tilly *et al.*, 2004; Brunelle & Letai, 2009).

Clasificación		Estructura del dominio
Anti-apoptóticas	BCL-2 BCL-XL BCL-W A1 MCL1 BOO	
Pro-apoptóticas	BAX BOK BCL-Xs BAK BAD BIK BID HRK BIM NOXA PUMA BMF	

■ BH1 ■ BH2 ■ BH3 ■ BH4
 TM: Dominio transmembranal

Tabla 2. Clasificación de la familia Bcl-2 en la apoptosis. Tomado y modificado de Strasser, 2005

Otros factores apoptóticos que se liberan desde el espacio intermembranoso mitocondrial hacia el citoplasma incluyen al factor inductor de apoptosis (AIF), al segundo activador de caspasa derivado de mitocondria (Smac), a la proteína de unión al IAP directo con bajo ph (DIABLO) y la proteína A de requerimiento de alta temperatura Omi/HtrA2. La liberación citoplasmática de citocromo-c activa a la caspasa 3 por medio de la formación de complejo conocido como apoptosoma, que está formado por el citocromo-c, Apaf-1 y caspasa 9. Por otro lado, el Smac/DIABLO o la Omi/HtrA2, promueven la activación de la caspasa uniéndose al inhibidor de las proteínas de apoptosis (IAPs) que posteriormente lleva a la disrupción en la interacción de los IAPs con la caspasa 3 o 9 (Budihardjo *et al.*, 1999; Tilly *et al.*, 2004; Hongmei, 2012).

Vía común

Las vías intrínseca y extrínseca convergen en la activación de la caspasa 3. La caspasa 3 activa se une al inhibidor de la desoxiribonucleasa activada por caspasa, que es responsable de la apoptosis nuclear (Porter & Jänicke, 1999; Tilly *et al.*, 2004).

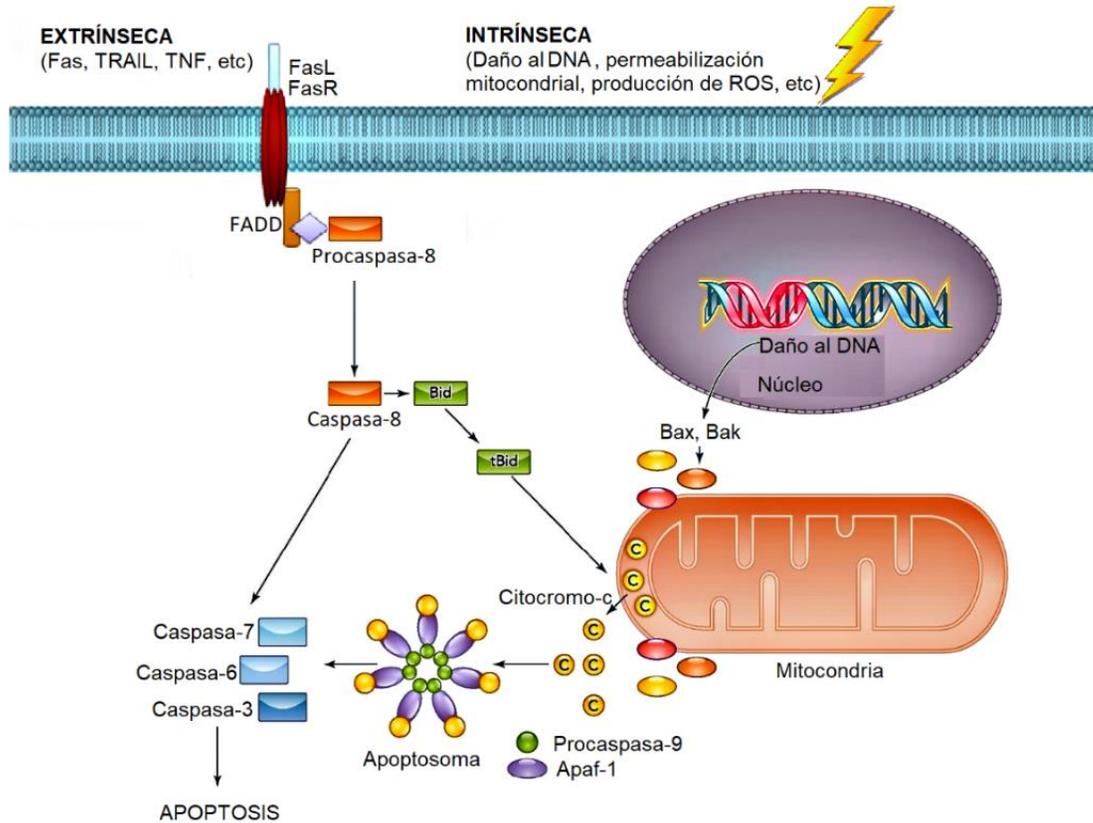


Figura 5. Esquema de las vías de la apoptosis. Tomado y modificado de Sandoel & Hengartner, 2014.

NÚCLEO CELULAR

El núcleo contiene el material genético constituido por el ácido desoxirribonucleico (ADN) y el ácido ribonucleico (ARN). Las funciones de los ácidos nucleicos consisten en el almacenamiento, transmisión y expresión de la información genética, estos tres procesos se resumen en un principio que se conoce como el Dogma Central de la Biología, propuesto por Francis Crick en 1957. Este principio establece que en los seres vivos la información genética siempre fluye del ADN al ARN a las proteínas; es decir, este flujo de información se puede dividir en tres pasos, primero la replicación que consiste en la síntesis de ADN, copiando la información de sí mismo, después la transcripción que consiste en transferir la información del ADN sintetizando ARN y por último la traducción en la que es posible la fabricación de una proteína en los ribosomas a partir del mensaje transcrito en el ARNm (Watson, 2006).

En una célula interfásica el ADN se encuentra en diferentes niveles de plegamiento denominado cromatina compacta y laxa; por otro lado, el ARN también se encuentra en dominios nucleares que incluyen el nucléolo, gránulos pericromatinianos, gránulos intercromatinianos, fibras pericromatinianas, cuerpos de Cajal, entre otros (Jiménez-García *et al.*, 2003; Alberts *et al.*, 2015).

CROMATINA

La cromatina se compone de un complejo de ADN, histonas y proteínas no histónicas. La unidad básica de la cromatina es el nucleosoma, el cual se encuentra asociado a un octámero de histonas que contiene dos copias de cada una de las cuatro histonas H2A, H2B, H3 y H4. Este octámero se forma alrededor de la hélice de ADN lo que permite un primer paso de la compactación del material genético. Posteriormente, un segundo nivel lo constituye la "fibra de 30nm" compuesta por grupos de nucleosomas empaquetados uno sobre otros adoptando disposiciones regulares por la histona H1. Finalmente continúa el incremento del empaquetamiento del ADN hasta obtener los cromosomas (figura 5) (Felsenfeld & Groudine, 2003).

Dependiendo del nivel de plegamiento del ADN, la cromatina se puede encontrar de 2 formas: heterocromatina y eucromatina. La heterocromatina es la cromatina condensada transcripcionalmente inactiva localizada sobre todo en la periferia del núcleo. La eucromatina es la cromatina descondensada y su ADN puede ser activo o inducible para la transcripción. Además, la relación eucromatina/heterocromatina es un índice de actividad transcripcional (Voss & Hager, 2014).

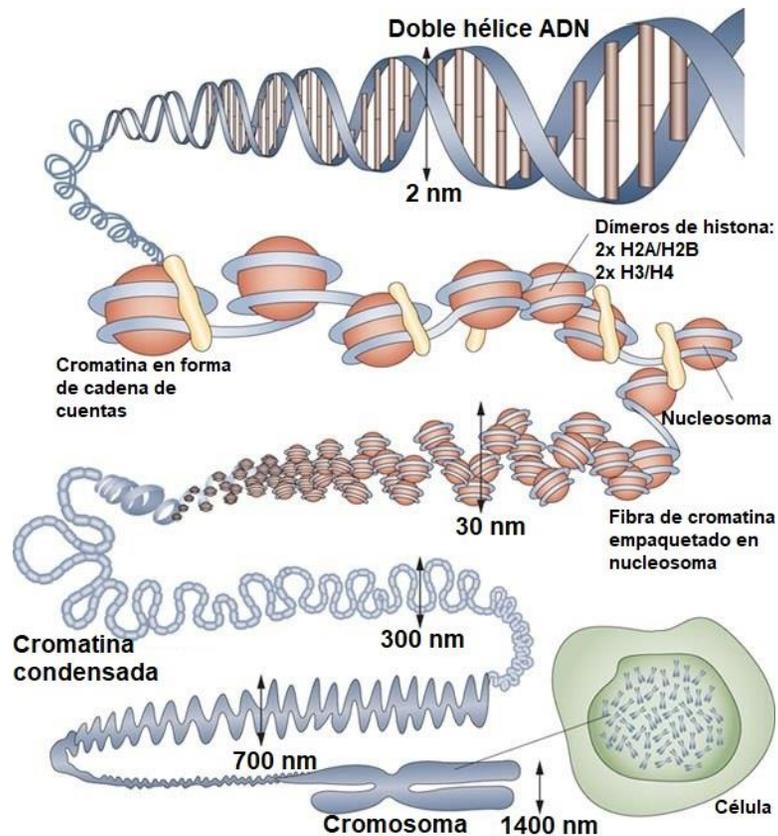


Figura 6. Niveles de organización de la cromatina. Tomado y modificado de Pierce, 2012.

La cromatina tiene un rol regulatorio fundamental en la expresión génica. Los distintos estados de compactación pueden asociarse al grado de transcripción que exhiben los genes que se encuentran en esas zonas. Principalmente, la cromatina es muy represiva para la transcripción, ya que la asociación del ADN con las distintas proteínas dificulta la acción de las distintas ARN polimerasas (Portela & Esteller, 2010). Por lo tanto, existe una variada cantidad de mecanismos remodeladores de la cromatina y modificadores de histonas. Las distintas histonas pueden sufrir modificaciones postraduccionales, como la metilación, acetilación, fosforilación, entre otras. La acetilación está asociada con activación de la transcripción, ya que al acetilarse una lisina, disminuye la carga positiva global de la histona por lo cual tiene una menor afinidad por el ADN. En consecuencia, el ADN se encuentra unido menos fuertemente lo que permite el acceso de la maquinaria transcripcional. Por el contrario, la metilación está asociada con la represión transcripcional y una unión ADN-histona más fuerte (Roth *et al.*, 2001; Allis *et al.*, 2001).

NUCLÉOLO

El nucléolo es el dominio subnuclear más visible en el núcleo de todas las células eucariotas. Sus funciones principales son la síntesis del ARN ribosomal (ARNr) y la biogénesis de las subunidades ribosomales. Al nucléolo también se le ha implicado en la reparación y replicación del ADN, el ciclo celular y la apoptosis (Hernandez-Verdun, 2011; Scott & Oeffinger, 2016).

Estructura

La estructura del nucléolo en mamíferos se forma alrededor de dominios de ADNr llamados regiones organizadoras de nucléolos (NOR -*nucleolar organizer regions*-). La organización básica del nucléolo resulta de la síntesis progresiva de subunidades pre-ribosómicas que inician la transcripción del ARNr, su procesamiento para formar subunidades más pequeñas asociadas a partículas de ribonucleoproteínas y que finalmente salen del núcleo para unirse a ribosomas con la finalidad de sintetizar proteínas. Se estructura por tres compartimentos progresivos para la producción de pre-ribosomas: centro fibrilar (CF), componente fibrilar denso (CFD) y componente granular (CG) (figura 6). El CF se encuentra representado por la subunidad RPA194 y Nopp140 que se produce en el borde de CF/CFD. La fibrilarina se encuentra en CFD y la proteína nucleolina se detecta tanto en CFD como en CG. La nucleofosmina se encuentra en el CG (O'Day & Catalano, 2014).

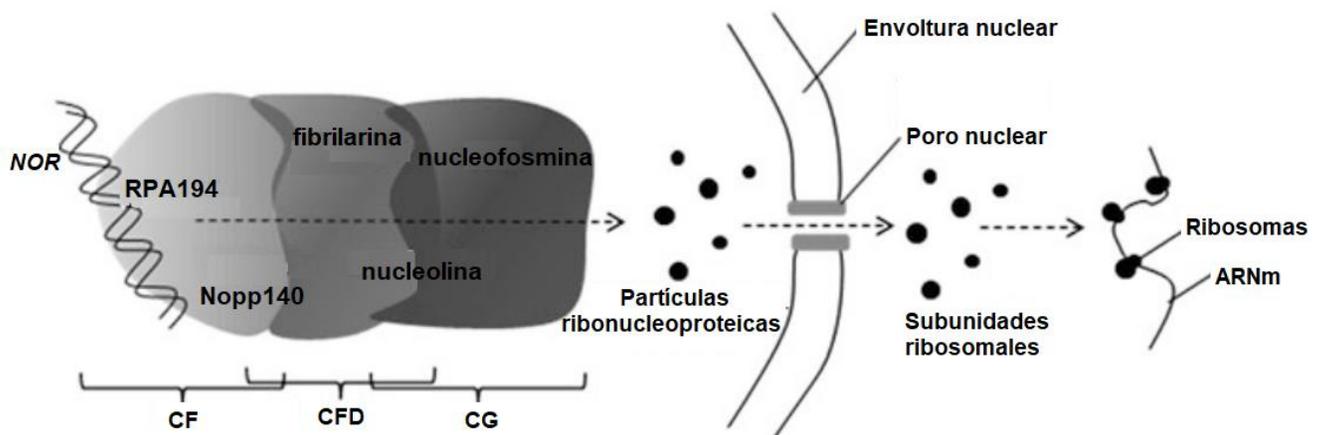


Figura 7. Representación de los tres compartimentos del nucléolo y sus marcadores específicos. Tomado y modificado de O'Day & Catalano, 2014.

Proteínas nucleolares

Nucleofosmina

La nucleofosmina (NPM1), también conocida como B23, NO38 o Numatrina, es una fosfoproteína ácida nucleolar abundante que se encuentra en los núcleos de células en proliferación; participa en la biogénesis de los ribosomas, el procesamiento del ARNm, la remodelación de la cromatina, la embriogénesis y la regulación crítica de la apoptosis (Box *et al.*, 2016). Se localiza predominantemente en el CG del nucléolo (Spector *et al.*, 1984), donde contiene partículas RNP preribosómicas (figura 8). La oligomerización de NPM1 se ha relacionado con su localización nucleolar y el papel en la proliferación celular, mientras que la forma monomérica de NPM1 se asocia con su papel en la respuesta al daño del ADN y la inducción de la apoptosis (Box *et al.*, 2016).

Nucleolina

La nucleolina (NCL), también conocida como C23 es una fosfoproteína ácida multifuncional localizada principalmente en el nucléolo, pero también se encuentra en el nucleoplasma, el citoplasma y la membrana celular. Está involucrada en varios aspectos del metabolismo del ADN y participa ampliamente en los mecanismos reguladores del ARN, incluida la transcripción de ARN Polimerasa I (Pol I), el ensamblaje de ribosomas, la estabilidad y traducción del ARNm (Mongelard & Bouvet, 2007; Abdelmohsen & Gorospe, 2012). Se localiza predominantemente en el CFD del nucléolo.

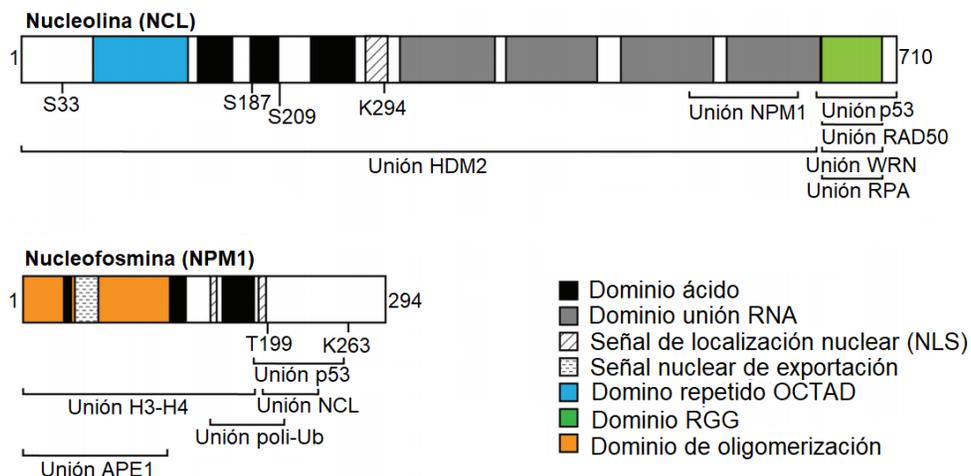


Figura 9. Esquema de las posiciones de los dominios y residuos modificados postraduccionalmente en las proteínas NCL y NPM1. Tomado y modificado de Scott & Oeffinger 2016.

PARTÍCULAS RIBONUCLEOPROTEÍCAS INTRANUCLEARES

Fibras pericromatinianas

Las fibras pericromatinianas son los sitios donde se lleva a cabo la transcripción y el *splicing* de los pre-ARNm. A nivel ultraestructural, se observan como fibras de 3 a 5 nm de diámetro situados en la periferia de grumos de cromatina y además, contienen ARN asociado con hnRNPs y snRNPs (Jiménez-García *et al.*, 2003; Fakan *et al.*, 1984).

Gránulos pericromatinianos

Los gránulos pericromatinianos son cuerpos esféricos de 30 a 50 nm de diámetro y están involucrados en el almacenamiento y el transporte de ARNm del núcleo al citoplasma (Biggiogera *et al.*, 2007).

Gránulos intercromatinianos

Los gránulos intercromatinianos son sitios de almacén de los factores de *splicing* y transporte del pre-ARNm (Biggiogera *et al.*, 2004; Fakan, 2004). También son conocidos como motas o *speckles* y cada mota se compone por gránulos de 20-25 nm interconectados por una delgada fibra con apariencia de cadena de cuentas (Spector & Lamond, 2011). Son un posible sitio para el ensamblaje de *spliceosoma* (Misteli & Spector, 1998).

SPLICING O EMPALME

El *splicing* es un proceso que consiste en la modificación postranscripcional del pre-ARNm que consiste en quitar intrones y unir exones para que se forme el ARN mensajero maduro traducible por los ribosomas en una secuencia de aminoácidos (Spector & Lamond, 2011). En ésta modificación, los intrones (regiones no codificantes) se suprimen, los exones se unen (regiones codificantes), además es catalizado por un gran complejo de ribonucleoproteínas llamado *spliceosoma* que consiste en cinco ARN's nucleares pequeños y numerosos factores proteicos. El *spliceosoma* es una estructura altamente dinámica, ensamblada por la unión secuencial y liberación de los ARN's nucleares pequeños y factores proteicos.

Factores de *splicing*

Se trata de proteínas implicadas en la eliminación de intrones de cadenas de ARNm, de modo que los exones se unan. Las proteínas SR (serina y arginina) son una familia de proteínas involucradas en el empalme alternativo del pre-ARN. SC35 pertenece a esta familia, es un factor de empalme que afecta el alargamiento transcripcional de manera específica y regula la acumulación de ARN Pol II para la transcripción durante la expresión génica (Lin, 2008; Xiang *et al.*, 1992).

Los factores de *splicing* SR y hnRNP (Ribonucleoproteínas nucleares heterogéneas) regulan todos los niveles de expresión de los genes apoptóticos, incluidos la iniciación y elongación de la transcripción, el corte y empalme alternativo, la estabilidad del ARNm, la traducción y la degradación de proteínas. En cánceres, la perturbación de la expresión de las proteínas SR y hnRNP conducen a un deterioro del funcionamiento de los genes apoptóticos, incluidos los reguladores de la vía extrínseca (Fas, caspasa-8, caspasa-2, c-FLIP) y la vía intrínseca (Apaf-1, caspasa -9, ICAD), genes que codifican proteínas Bcl-2, IAP y supresor tumoral p53 (Kędzińska *et al.*, 2017).

INMUNOLocalización

Generalidades

La inmunolocalización es una técnica para localizar componentes celulares específicos *in situ*. Existen varios procedimientos para localizar epítomos de antígenos utilizando la microscopía óptica y electrónica. Se pueden emplear técnicas directas o indirectas. En las primeras se usan un único anticuerpo que es específico para el antígeno y se encuentra unido a una etiqueta. La etiqueta es un marcador que proporciona una señal mediante la cual se observa el complejo antígeno-anticuerpo y puede ser un compuesto fluorescente o granos de oro (Vázquez-Nin & Echeverría, 2000; Hyatt & Wise, 2001).

En las técnicas indirectas se emplean dos anticuerpos sucesivamente, el primer anticuerpo reconoce el antígeno deseado, pero no está marcado y por lo tanto no es visible; el segundo reconoce al primero por una elevada cantidad de gammaglobulinas de la especie primaria y es portador de la etiqueta (Pang *et al.*, 2009; Kumagai & Tsumoto, 2002).

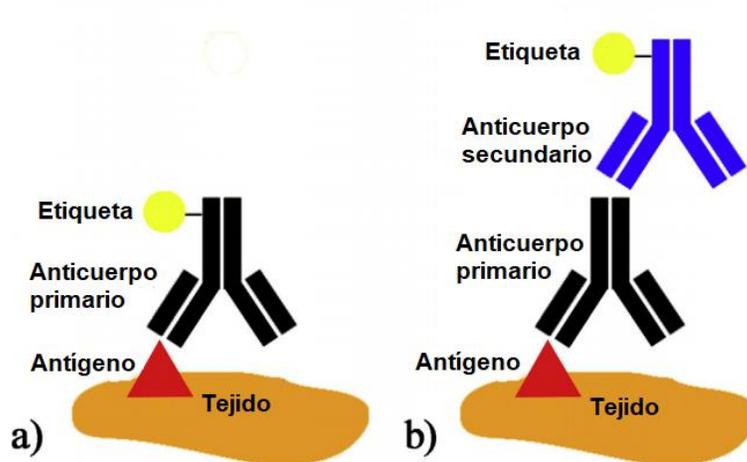


Figura 10. Representación esquemática de los mecanismos de inmunolocalización.
 a) etiquetado directo. b) etiquetado indirecto. Tomado y modificado de Vázquez-Gutiérrez & Langton, 2015.

ANTECEDENTES

Se han descrito las características morfológicas durante la muerte celular programada de las células granulosas en folículos antrales atrésicos, así como la presencia de caspasa-3 activa y TUNEL (ADN fragmentado) como marcadores típicos del proceso de apoptosis. Sin embargo, no se han realizado estudios con respecto a la distribución de los componentes nucleolares y la actividad transcripcional de estas células con respecto a la progresión de la apoptosis (Vázquez-Nin *et al.*, 2011).

En el presente trabajo, se evaluaron los cambios morfológicos de las estructuras nucleares de células granulosas durante la progresión de la apoptosis en folículos atrésicos antrales de ratas adultas jóvenes Wistar como modelo fisiológico.

HIPÓTESIS

Durante la atresia las células foliculares sufren cambios morfológicos nucleares, por lo que en la apoptosis esperaríamos observar una alta compactación de la cromatina, una reorganización de las estructuras ribonucleoproteicas y de los componentes del nucleolares y además la presencia de las proteínas de la actividad transcripcional en etapas iniciales del proceso de muerte celular.

OBJETIVOS

Objetivos generales

- ✓ Analizar los cambios morfológicos y fisiológicos del núcleo de células granulosas durante la progresión de la apoptosis.

Objetivos particulares

- ✓ Identificar a las células granulosas en apoptosis por medio de la presencia de caspasa-3 activa y TUNEL (ADN fragmentado).
- ✓ Describir la distribución de las proteínas nucleolares nucleolina y nucleofosmina con respecto a la progresión de la compactación nuclear durante la apoptosis.
- ✓ Describir la presencia del factor de *splicing* SC35 en células con diferente grado de compactación nuclear.
- ✓ Describir la presencia del factor transcripcional RNA Pol II durante la apoptosis.
- ✓ Describir un aspecto de la fisiología epigenética de la cromatina laxa con el marcador H3AC en células apoptóticas.

- ✓ Describir la morfología ultraestructural del nucléolo y la distribución de las proteínas nucleolina y nucleofosmina con el fin de corroborar lo observado en microscopía óptica.

MATERIAL Y MÉTODOS

Material biológico

Se utilizaron muestras de ovarios de 10 ratas adultas Wistar (*Rattus norvegicus*) de 90 días de edad. La manipulación de las ratas se realizó siguiendo los lineamientos bioéticos de acuerdo con la Norma Oficial Mexicana NOM 062-ZOO-1999 “Especificaciones técnicas para la producción, cuidado y uso de animales de laboratorio” (SAGARPA, 2015).

Procesamiento para microscopía óptica

Se fijaron los ovarios con paraformaldehído al 4% preparado en *buffer* de fosfatos (PBS) durante 24 hrs. Se lavaron tres veces con PBS durante 10 minutos cada uno. Luego se deshidrataron con alcoholes graduales (etanol 30%, 50%, 60%, 70%, 80%, 90%, 100%, 100%) durante 1 hr. cada uno. Después, se colocaron en etanol-xilol (1:1) durante 30 minutos, xilol-aceite de cedro (1:1) durante 30 minutos. Posteriormente, se preincluyeron en parafina-xilol, parafina 1 y parafina 2 durante una hora cada uno; por último se incluyeron con parafina en moldes para formar los bloques.

Corte de los bloques de parafina

Se cortaron con ayuda de un micrótopo y se obtuvieron cortes de 5-7 micrómetros de espesor. Los cortes se colocaron en portaobjetos cubiertos con poli-L-lisina.

Tinción con Hematoxilina-Eosina

Una vez desparafinados e hidratados los cortes, se tiñeron con hematoxilina durante 10 minutos, se enjuagaron en agua corriente durante 10 minutos; posteriormente se deshidrataron en etanol ácido y agua amoniacal y luego se deshidrataron en etanol. Se tiñeron las muestras con eosina alcohólica durante 3 minutos. Nuevamente se deshidrataron con etanol 80%, 90%, 100%, etanol absoluto-xilol 1:1 y xilol. Finalmente las muestras se montaron con resina sintética y un cubreobjetos.

TUNEL (*TDT-mediated dUTP-biotin Nick end-labeling*)

Ya desparafinados e hidratados los cortes, se lavaron con PBS durante 10 minutos. Se realizó la recuperación antigénica con proteinasa K durante 15 minutos a temperatura ambiente y se lavaron tres veces con PBS durante 3 minutos.

La técnica TUNEL se realizó con el kit de detección de apoptosis *in situ* ApopTag Red (Millipore, No cat S7165, Lote 2026186), el cual consiste en el tratamiento de las muestras con diferentes soluciones. Las muestras se colocaron en *buffer* de equilibrio durante 10 minutos a temperatura ambiente. Se incubaron con la solución de 11 μ L de la enzima TdT (*Terminal Deoxynucleotidyl Transferase*) más 25.6 μ L del *buffer* de reacción, durante una hora en una cámara húmeda dentro de la estufa de 37 °C. Posteriormente, se les agregó una solución de 1 mL del *buffer* de paro más 34 mL de agua destilada durante 10 minutos. Se lavaron tres veces con PBS durante 1 minuto cada uno. Se les colocó una solución constituida de 34 μ L de *Buffer* de bloqueo y 32 μ L de anti-digoxigenina rodamina durante 45 minutos a temperatura ambiente y protegido de la luz. Se lavaron tres veces con PBS durante 3 minutos. Se les colocó DAPI durante un minuto. Se lavaron tres veces con PBS durante 1 minuto. Por último, se montaron con 20 μ L de Vectashield (Vector, No. Catálogo C0563, Lot.122139) y se sellaron con el cubreobjetos y barniz.

Inmunolocalización óptica

Caspasa-3 activa

Ya desparafinados e hidratados los cortes, se lavaron con PBS durante 10 minutos. Se realizó la recuperación antigénica con *buffer* de citratos en el horno de microondas durante 3 minutos en potencia 10 y 6 minutos en potencia 3, se dejaron enfriar 30 minutos y se lavaron tres veces con PBS durante 3 minutos. Se bloquearon con glicina 100 mM en PBS (0.375 g/50 mL PBS) durante una hora a temperatura ambiente. Se incubaron con el anticuerpo primario anti-caspasa 3 activa policlonal hecho en conejo (Sigma-Aldrich, No. Cat C8487) diluido en PBS a una concentración [1:100] durante 24 hrs. a 4°C. Se lavaron tres veces con PBS durante 3 minutos y luego se agregaron dos gotas de Multilink (Biogenex) durante 20 minutos a temperatura ambiente. Se lavaron 3 veces con PBS durante un minuto cada uno. Se incubó con estreptavidina acoplada con rojo Texas (SIGMA No. Cat S-7261) diluido en PBS a una concentración de [1:100] durante una hora, a temperatura ambiente y protegido de la luz. Una vez transcurrido el tiempo, se lavaron tres veces con PBS durante 3 minutos. Se les colocó DAPI durante un minuto. Se lavaron tres

veces con PBS durante 3 minutos. Por último, se montaron con 20 µL de Vectashield (Vector, No. Catálogo C0563, Lot.122139) y se sellaron con el cubreobjetos y barniz.

Doble inmunolocalización de nucleolina (NCL) y caspasa 3 activa

Ya desparafinados e hidratados los cortes, se lavaron con PBS durante 10 minutos. Se realizó la recuperación antigénica con *buffer* de citratos en el horno de microondas durante 3 minutos en potencia 10 y 6 minutos en potencia 3, se dejaron enfriar 30 minutos y se lavaron tres veces con PBS durante 3 minutos. Se bloquearon con glicina 100 mM en PBS (0.375 g/50 mL PBS) durante una hora a temperatura ambiente. Se incubaron con el anticuerpo primario anti- nucleolina contra conejo (Bethyl, No. Cat IHC-00083, Lote IHC-00083-1) diluido en PBS a una concentración [1:100] durante 24 hrs. a 4°C. Se lavaron tres veces con PBS durante 3 minutos y luego se agregaron dos gotas de Multilink (Biogenex) durante 20 minutos a temperatura ambiente. Se lavaron 3 veces con PBS durante un minuto cada uno. Se incubó con el segundo anticuerpo primario anti-caspasa 3 activa hecho en conejo (Sigma-Aldrich, No. Cat C8487) diluido en PBS a una concentración [1:100] durante 24 hrs. a 4°C. Se lavaron 3 veces con PBS durante un minuto cada uno. Se incubaron en una solución que contenía 1 µL de estreptavidina acoplada con rojo Texas (SIGMA No. Cat S-7261), 1 µL de del anticuerpo secundario hecho en cabra contra conejo acoplado a Alexa 488 (Invitrogen, No. Cat A-11034, Lote 1386400) y PBS a una concentración de [2:100] durante 2 horas a temperatura ambiental y protegido de la luz. Luego, se lavaron 3 veces con PBS durante 3 minutos. Se les colocó DAPI durante un minuto. Se lavaron tres veces con PBS durante 1 minuto. Por último, se montaron con 20 µL de Vectashield (Vector, No. Catálogo C0563, Lot.122139) y se sellaron con el cubreobjetos y barniz.

Doble inmunolocalización de nucleofosmina (NPM1) y caspasa 3 activa

Una vez desparafinados e hidratados los cortes, se lavaron con PBS durante 10 minutos. Se realizó la recuperación antigénica con *buffer* de citratos en el horno de microondas durante 3 minutos en potencia 10 y 6 minutos en potencia 3, se dejaron enfriar 30 minutos y se lavaron tres veces con PBS durante 3 minutos. Se bloquearon con glicina 100 mM en PBS (0.375 g/50 mL PBS) durante una hora a temperatura ambiente. Se incubaron con el anticuerpo primaria anti- nucleofosmina contra conejo (Bethyl, No. Cat A302-404A-T, Lote A302-404A-T-1) diluido en PBS a una concentración [1:100] durante 24 hrs. a 4°C. Se lavaron tres veces con PBS durante 3 minutos y luego se agregaron dos gotas de Multilink (Biogenex) durante 20 minutos a temperatura ambiente. Se lavaron 3 veces con PBS

durante un minuto cada uno. Se incubó con el segundo anticuerpo primario anti-caspasa 3 activa (Sigma-Aldrich, No. Cat C8487) diluido en PBS a una concentración [1:100] durante 24 hrs. a 4°C. Se lavaron 3 veces con PBS durante un minuto cada uno. Se incubaron en una solución que contenía 1 µL de estreptavidina acoplada con rojo Texas (SIGMA No. Cat S-7261), 1 µL de del anticuerpo secundario hecho en cabra contra conejo acoplado a Alexa 488 (Invitrogen, No. Cat A-11034, Lote 1386400) y PBS a una concentración de [2:100] durante 2 horas a temperatura ambiental y protegido de la luz. Luego, se lavaron 3 veces con PBS durante 3 minutos. Se les colocó DAPI durante un minuto. Se lavaron tres veces con PBS durante 1 minuto. Por último, se montaron con 20 µL de Vectashield (Vector, No. Catálogo C0563, Lot.122139) y se sellaron con el cubreobjetos y barniz.

RNA Pol II

Ya desparafinados e hidratados los cortes, se lavaron con PBS durante 10 minutos. Se realizó la recuperación antigénica con proteinasa K durante 12 minutos a temperatura ambiente y se lavaron tres veces con PBS durante 3 minutos. Después, se bloquearon con PBS-BSA-TWEEN durante 5 minutos a temperatura ambiente. Se incubaron con el anticuerpo primario anti-RNA Pol II monoclonal contra ratón (Covance, No. Cat MMS-126R, Lote 14811282) diluido en PBS-BSA-TWEEN en una concentración [1:20] durante 24 hrs. a 4°C. Se lavaron tres veces con PBS durante 3 minutos y luego se incubaron con el anticuerpo secundario hecho en cabra contra ratón acoplado a Alexa 488 (Invitrogen, No. Cat A-11029, Lote 40339A) diluido en PBS a una concentración de [1:100] durante una hora, a temperatura ambiente y protegido de la luz. Una vez transcurrido el tiempo, se lavaron tres veces con PBS durante 3 minutos. Se les colocó DAPI durante un minuto. Se lavaron tres veces con PBS durante 3 minutos. Por último, se montaron con 20 µL de Vectashield (Vector, No. Catálogo C0563, Lot.122139) y se sellaron con el cubreobjetos y barniz.

H3AC

Ya desparafinados e hidratados los cortes, se lavaron con PBS durante 10 minutos. Se realizó la recuperación antigénica con proteinasa K durante 13 minutos a temperatura ambiente y se lavaron tres veces con PBS durante 3 minutos. Después, se bloquearon con PBS-BSA-TWEEN durante 5 minutos a temperatura ambiente. Se incubaron con el anticuerpo primario anti-H3AC contra conejo (Upstate, No. Cat 06-599, Lote DAM1422332) diluido en PBS-BSA-TWEEN en una concentración [1:20] durante 24 hrs. a 4°C. Se lavaron

tres veces con PBS durante 3 minutos y luego se incubaron con el anticuerpo secundario hecho en cabra contra conejo acoplado a Alexa 488 (Invitrogen, No. Cat A-11034, Lote 1386400) diluido en PBS a una concentración de [1:100] durante una hora, a temperatura ambiente y protegido de la luz. Una vez transcurrido el tiempo, se lavaron tres veces con PBS durante 3 minutos. Se les colocó DAPI durante un minuto. Se lavaron tres veces con PBS durante 3 minutos. Por último, se montaron con 20 µL de Vectashield (Vector, No. Catálogo C0563, Lot.122139) y se sellaron con el cubreobjetos y barniz.

SC35

Ya desparafinados e hidratados los cortes, se lavaron con PBS durante 10 minutos. Se realizó la recuperación antigénica con proteinasa K durante 13 minutos a temperatura ambiente y se lavaron tres veces con PBS durante 3 minutos. Después, se bloquearon con PBS-BSA-TWEEN durante 5 minutos a temperatura ambiente. Se incubaron con el anticuerpo primario anti-SC35 contra ratón (SIGMA, No. Cat S4045 Lote 115K4826) diluido en PBS-BSA-TWEEN en una concentración [1:20] durante 24 hrs. a 4°C. Se lavaron tres veces con PBS durante 3 minutos y luego se incubaron con el anticuerpo secundario hecho en cabra contra ratón acoplado a Alexa 488 (Invitrogen, No. Cat A-11029, Lote 40339A) diluido en PBS a una concentración de [1:100] durante una hora, a temperatura ambiente y protegido de la luz. Una vez transcurrido el tiempo, se lavaron tres veces con PBS durante 3 minutos. Se les colocó DAPI durante un minuto. Se lavaron tres veces con PBS durante 3 minutos. Por último, se montaron con 20 µL de Vectashield (Vector, No. Catálogo C0563, Lot.122139) y se sellaron con el cubreobjetos y barniz.

Análisis de intensidad de fluorescencia

Se cuantificaron las células granulosas de las inmunolocalizaciones de RNA pol II, H3ac y SC35 y se categorizaron en 4 grupos diferentes de acuerdo con el grado de compactación de la cromatina: células sanas, las cuales no tenían indicio de cromatina compacta; células con apoptosis temprana, presentaron un grado menor de compactación de cromatina; células con apoptosis media, presentaron un grado mayor de compactación de cromatina y; células con apoptosis muy avanzada, presentaron cuerpos apoptóticos fragmentados. Se usaron las células granulosas sanas como control. La intensidad de la fluorescencia se midió con el software *ImageJ*. En total se contaron 52 células por cada una de las proteínas que se analizaron de las que se tomaron 13 células por cada estado de compactación de la cromatina. Se cuantificaron 10 folículos antrales atrésicos de 5 ovarios de diferentes

organismos. Se realizó la prueba estadística ANOVA de una vía y la prueba de comparación múltiple de Tukey en el software GraphPad Prism 5.

Observación de las preparaciones

La observación de las preparaciones se llevó a cabo con un microscopio de epifluorescencia Nikon modelo Eclipse E600 con cámara Digital DXM1200F y un microscopio Confocal Zeiss LMS 5 Pascal. Las imágenes obtenidas fueron procesadas en un *software* Nikon ACT-1 e *ImageJ/Fiji*. Finalmente, la edición de las imágenes se realizó con el *software* *Adobe Photoshop CS6* y *Microsoft PhotoDraw*.

Procesamiento del material biológico para microscopía electrónica

Fijación e inclusión en EPON

Los ovarios se fijaron con paraformaldehído al 4% y glutaraldehído al 2.5% preparado en PBS durante 1.5 hrs. Se lavaron tres veces con PBS durante 10 min cada uno. Posteriormente, se deshidrataron con alcoholes graduales (etanol 30%, 50%, 60%, 70%, 80%, 96%) durante 10 minutos cada uno. Se deshidrataron dos veces con etanol absoluto durante 20 minutos cada uno y dos veces con óxido de propileno durante 10 min cada uno. Después, se preincluyeron con EPON-óxido de propileno (1:2), EPON-óxido de propileno (1:1), EPON-óxido de propileno (2:1), durante 12 hrs. cada cambio. Se incluyeron en moldes de gelatina con resina EPON pura durante 24 hrs en una estufa de 60°C.

Corte del material biológico

Cortes semifinos

Se cortaron los bloques de resina epón y *lowicryl* en un ultramicrotomo con un espesor de 400 nm.

Cortes ultrafinos

Se realizaron cortes ultrafinos de entre 60-100 nm de espesor y se montaron en rejillas.

Fijación e inclusión en *Lowicryl* K4M

Los ovarios se fijaron con paraformaldehído al 4% y glutaraldehído al 2.5% preparado en PBS durante 1.5 hrs. Se lavaron tres veces con PBS durante 10 min cada uno. Posteriormente, se deshidrataron con alcoholes graduales (metanol 30%, 50%, 60%, 70%, 80%) durante 10 min cada uno a -20°C. Se colocaron en etanol 90% por 30 minutos a

-20°C. Después, se preincluyeron con metanol-*lowicryl* (1:1), metanol-*lowicryl* (1:2), durante 1 hora cada uno a -20°C; *lowicryl* durante una hora a -20°C y *lowicryl* durante toda la noche a -20°C. Se incluyeron en cápsulas de gelatina con *lowicryl* durante 48 hrs a -20°C y 24 hrs a temperatura ambiente dentro de una cámara de luz UV.

Contraste general Ur/Pb

Los cortes de la resina de epon se colocaron durante 20 minutos en acetato de uranilo y luego se enjuagaron con agua mili Q. Luego, se colocaron en una gota de citrato de plomo durante 10 minutos y nuevamente se enjuagaron con agua mili Q.

Contraste preferencial para ribonucleoproteínas Ur/EDTA/Pb

Los cortes de la resina de epon se colocaron durante un minuto en acetato de uranilo y luego se enjuagaron con agua mili Q. Luego, se colocaron en una gota del compuesto quelante EDTA durante 18 minutos y después se enjuagaron con agua milli Q. Por último, se colocaron en una gota de citrato de plomo durante 2 minutos y nuevamente se enjuagaron con agua mili Q.

Inmunolocalización

Nucleolina (NCL)

Los cortes de la resina *Lowicryl* K4M se colocaron en PBS durante 10 minutos y luego se bloquearon con una solución de NGS (suero normal de cabra) diluido en PBS a una concentración [1:100] durante 3 minutos. Se incubaron con el anticuerpo primario anti-nucleolina contra conejo (Bethyl, No. Cat IHC-00083, Lote IHC-00083-1) diluido en PBS-BSA-TWEEN a una concentración [1:100] durante 24 hrs. a 4°C. Posteriormente, se lavaron con PBS-TWEEN por goteo, PBS por goteo y PBS por flotación 3 veces por 3 minutos. Se incubaron con el anticuerpo secundario IgG hecho en cabra contra conejo acoplado con oro coloidal de 10 nm (SIGMA, No. Cat G-1021, Lote 54035), diluido en PBS a una concentración de [1:50] durante una hora, a temperatura ambiente. Se lavaron con PBS por goteo, PBS por flotación 3 veces por 3 minutos, agua por goteo, agua por flotación 3 veces por 3 minutos y se dejaron secar 16 horas. Se contrastaron las muestras con acetato de uranilo durante un segundo y citrato de plomo durante un segundo.

Nucleofosmina (NPM1)

Los cortes de la resina *Lowicryl* K4M se colocaron en PBS durante 10 minutos y luego se bloquearon con una solución de NGS (suero normal de cabra) diluido en PBS a una concentración [1:100] durante 10 minutos. Se incubaron con el anticuerpo primario anti-nucleofosmina contra conejo (Bethyl, No. Cat A302-404A-T, Lote A302-404A-T-1) diluido en PBS-BSA-TWEEN a una concentración [1:400] durante 24 hrs. a 4°C. Posteriormente, se lavaron con PBS-TWEEN por goteo, PBS por goteo y PBS por flotación 3 veces por 3 minutos. Se incubaron con el anticuerpo secundario IgG hecho en cabra contra conejo acoplado con oro coloidal de 10 nm (SIGMA, No. Cat G-1021, Lote 54035), diluido en PBS a una concentración de [1:50] durante una hora, a temperatura ambiente. Se lavaron con PBS por goteo, PBS por flotación 3 veces por 3 minutos, agua por goteo, agua por flotación 3 veces por 3 minutos y se dejaron secar 16 horas. Se contrastaron las muestras con acetato de uranilo durante un segundo y citrato de plomo durante un segundo.

Observación de las preparaciones

La observación de las preparaciones se llevó a cabo con un microscopio electrónico de transmisión Jeol1010 con cámara digital Hamamatsu (CCD-300-RC, MT 1) operado a 60 kV. Se usaron las células granulosa sanas como control. Las imágenes obtenidas fueron procesadas en un *software Scion Image*. Finalmente, la edición de las imágenes se realizó con el *software Adobe Photoshop CS6* y *Microsoft PhotoDraw*.

RESULTADOS

Microscopía óptica

Características morfológicas de la atresia folicular.

En los ovarios de ratas adultas se observaron folículos antrales atrésicos compuestos por un ovocito rodeado de células somáticas conocidas como granulosa, entre éstas y el ovocito existe una cavidad llamada antra. A sí mismo, las células granulosa se encuentran rodeadas por la capa tecal interna y ésta a su vez se encuentra rodeada por la capa tecal externa (Figura 10).

En los folículos antrales se encuentran células granulosa tanto normales como apoptóticas. Las células granulosa normales presentan unión con otras células; se observan con un citoplasma y núcleo bien definido y no tienen indicio de cromatina compacta (Figura 10B). Las células apoptóticas se encontraron separadas de otras células de apariencia normal. Dichas células contienen cromatina compacta, núcleos picnóticos, múltiples fragmentos nucleares y citoplasmáticos (Figuras 10B, 10D).

TUNEL y Caspasa-3 activa son positivos en células apoptóticas.

Para analizar la bioquímica de la muerte celular programada por apoptosis, se realizaron las pruebas de TUNEL y caspasa-3 en su forma activa. La técnica de TUNEL reveló claramente que las células y las estructuras subcelulares con las características morfológicas mencionadas anteriormente, contenían ADN internucleosomal fragmentado (Figura 11D).

La fluorescencia de la inmunolocalización de caspasa-3 activa fue más intensa en las células granulosa apoptóticas, donde se localizó en el citoplasma y en el núcleo (Figura 12). Se observó en diferentes etapas del proceso de la apoptosis, sin embargo se encontró predominantemente en etapas avanzadas (Figura 12D).

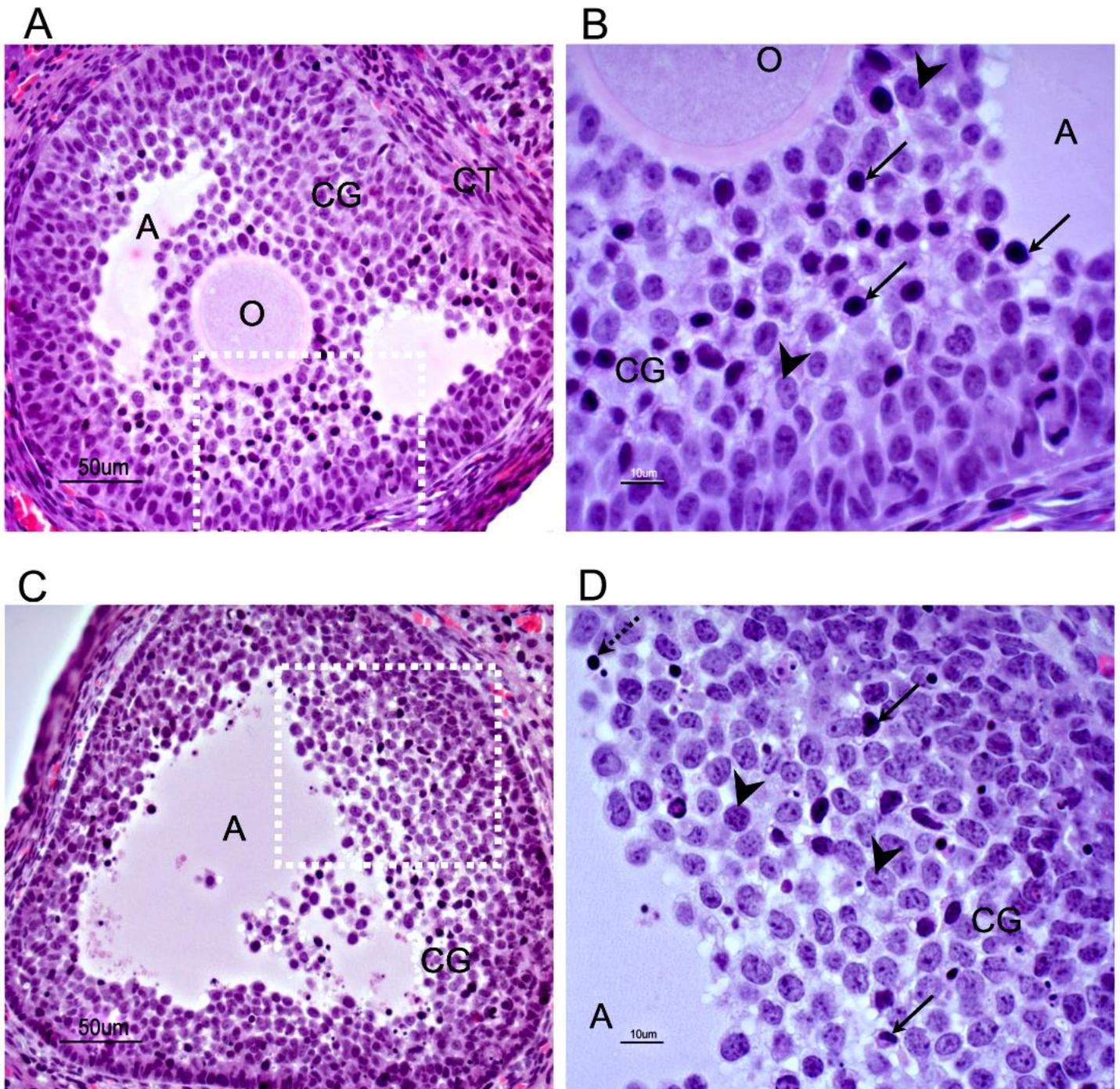


Figura 11. Folículos antrales atrécicos teñidos con hematoxilina-eosina. Las imágenes A, C representan folículos antrales atrécicos, donde se observa el ovocito (o), células granulosas (CG), células tecales (CT) y un antro (A); son panorámicas de las imágenes B, D, en las cuales se observan amplificadas las células granulosas con núcleo picnótico (flechas), cuerpo apoptótico (flecha punteada) y células normales (cabeza de flecha).

Contraste de fases

DAPI TUNEL

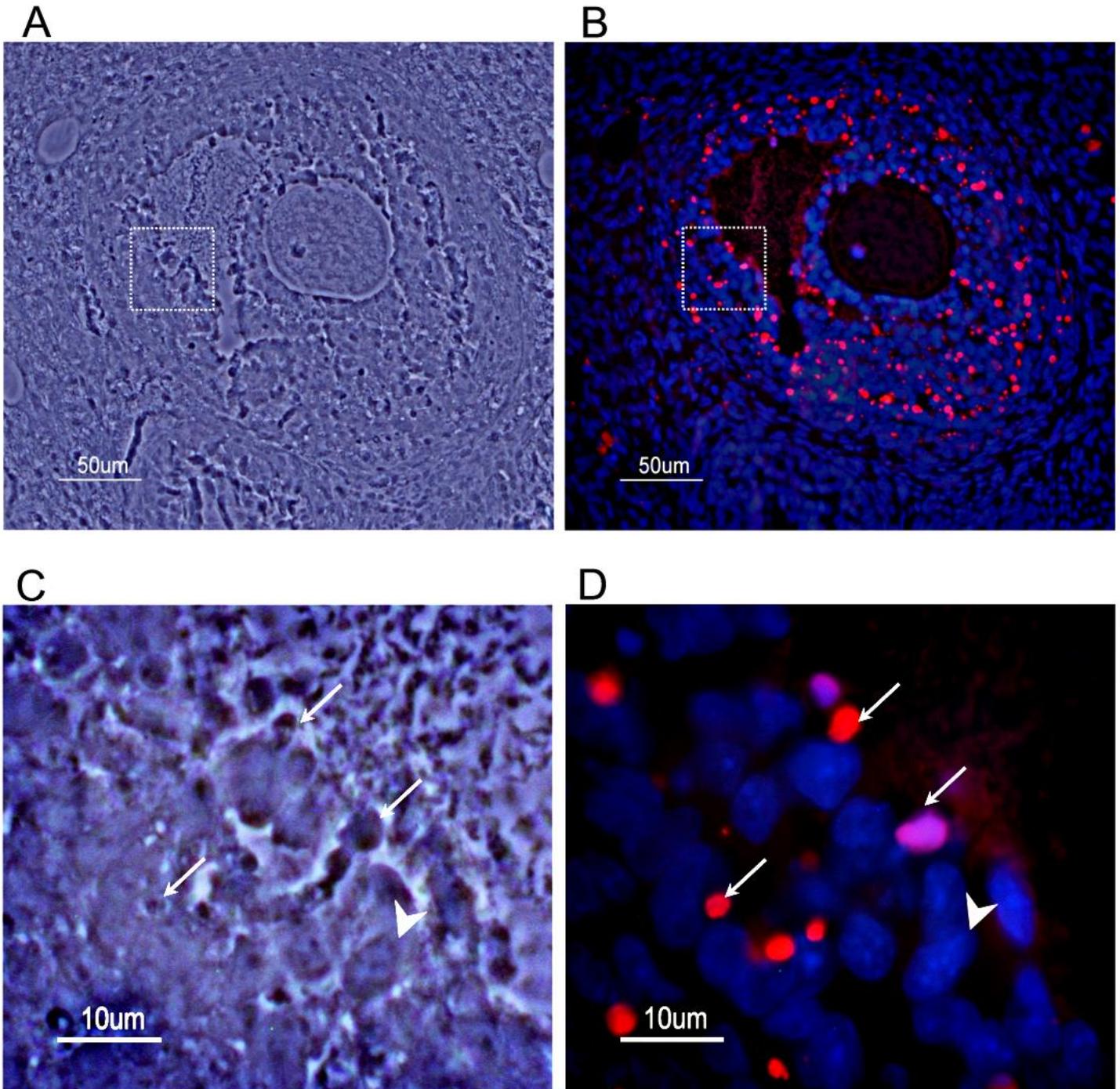


Figura 12. Técnica de TUNEL para identificar el ADN internucleosómico. Las imágenes A, B son fotografías panorámicas de las imágenes C, D en donde se observan numerosas células granulosas positivas en rojo (flechas) y célula sana (cabeza de flecha) presentes en el folículo atrésico. La tinción nuclear DAPI en azul.

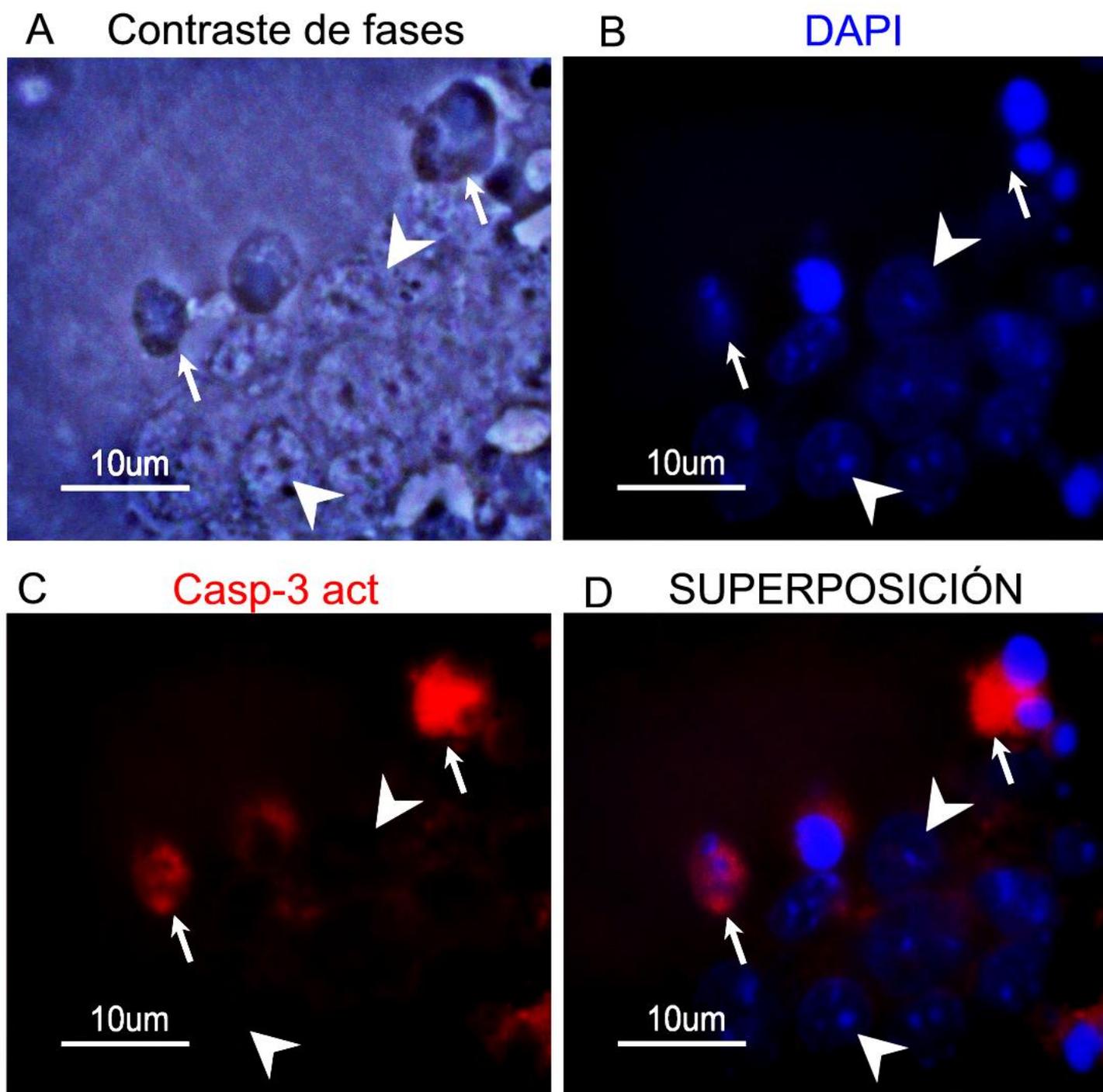


Figura 13. Inmunolocalización de Casp-3 activa en células normales y apoptóticas. Se observan células positivas a caspasa-3 activa (flecha) y células sanas (cabeza de flecha). DAPI en azul, Casp-3 activa en rojo y superposición.

Distribución de las proteínas nucleolares durante la apoptosis.

Las inmunolocalizaciones de las proteínas nucleolares nucleolina y nucleofosmina se estudiaron de acuerdo a la presencia de caspasa-3 activa y DAPI con el fin de confirmar la morfología apoptótica. Se analizaron a aquellas células normales que presentaron caspasa-3 activa pero que no tuviesen cromatina compacta, y células apoptóticas con presencia de caspasa-3 activa, con tres diferentes grados de compactación de la cromatina: en apoptosis temprana, presentaron un grado menor de compactación; en apoptosis media, presentaron un grado mayor de compactación y en apoptosis avanzada, presentaron cuerpos apoptóticos fragmentados.

El patrón de la localización nucleolar del anticuerpo contra la proteína NCL/nucleolina fue homogénea en las células normales donde se observaron dos nucléolos (Figura 13, primera línea horizontal). Este patrón también se mantuvo aparentemente a lo largo de las diversas fases de la destrucción nuclear apoptótica verificada con los diferentes grados de compactación de la cromatina con DAPI y la presencia de la caspasa-3 activa. En células con apoptosis temprana y en apoptosis media se logró observar sólo un nucléolo en cada una (Figura 13, segunda y tercera línea horizontal respectivamente). Sin embargo, en las últimas etapas de la apoptosis la inmunolocalización se concentró particularmente en la periferia de los cuerpos apoptóticos (Figura 13, cuarta línea horizontal).

El patrón de la localización nucleolar del anticuerpo contra la proteína NPM1/nucleofosmina fue homogénea en las células normales donde se observaron dos nucléolos (Figura 14, primera línea horizontal). Este patrón también se mantuvo aparentemente a lo largo de las diversas fases de la destrucción nuclear apoptótica verificada con los diferentes grados de compactación de la cromatina con DAPI y la presencia de la caspasa-3 activa. En células con apoptosis temprana, se observaron dos nucléolos y en apoptosis media se logró observar sólo un nucléolo (Figura 14, segunda y tercera línea horizontal respectivamente). Sin embargo, en las últimas etapas de la apoptosis la inmunolocalización se concentró particularmente en la periferia de los cuerpos apoptóticos (Figura 14, cuarta línea horizontal).

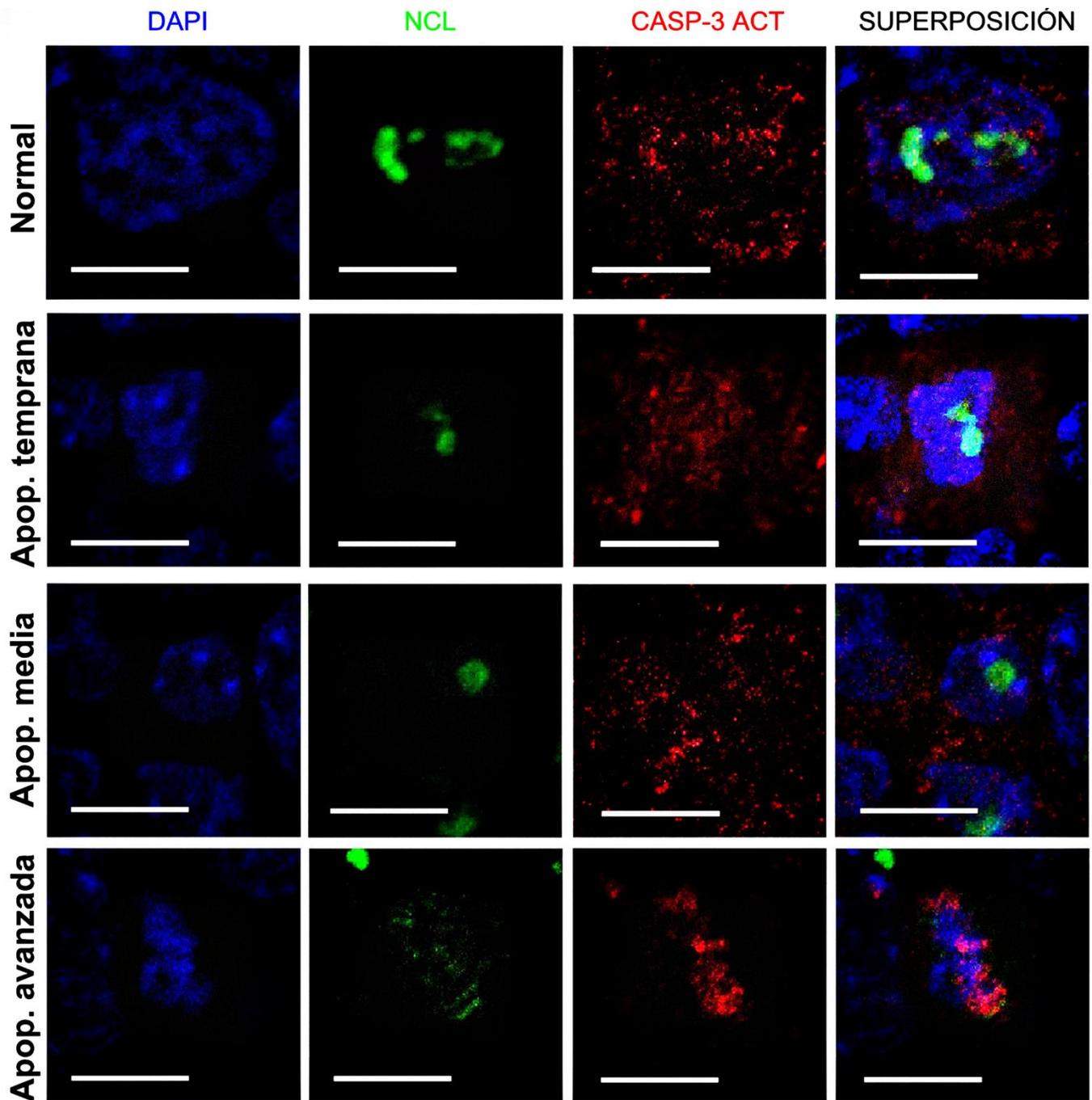


Figura 14. Inmunolocalización de Casp-3 activa y NCL/nucleolina en células normales y con apoptosis temprana, media y avanzada. Una célula normal (primera línea horizontal), células con apoptosis temprana (segunda línea horizontal), células con apoptosis media (tercera línea horizontal) y células con apoptosis avanzada (cuarta línea horizontal). Se observa DAPI en azul, NCL en verde, Caspasa-3 activa en rojo y la superposición. Barra de escala 5 μ m.

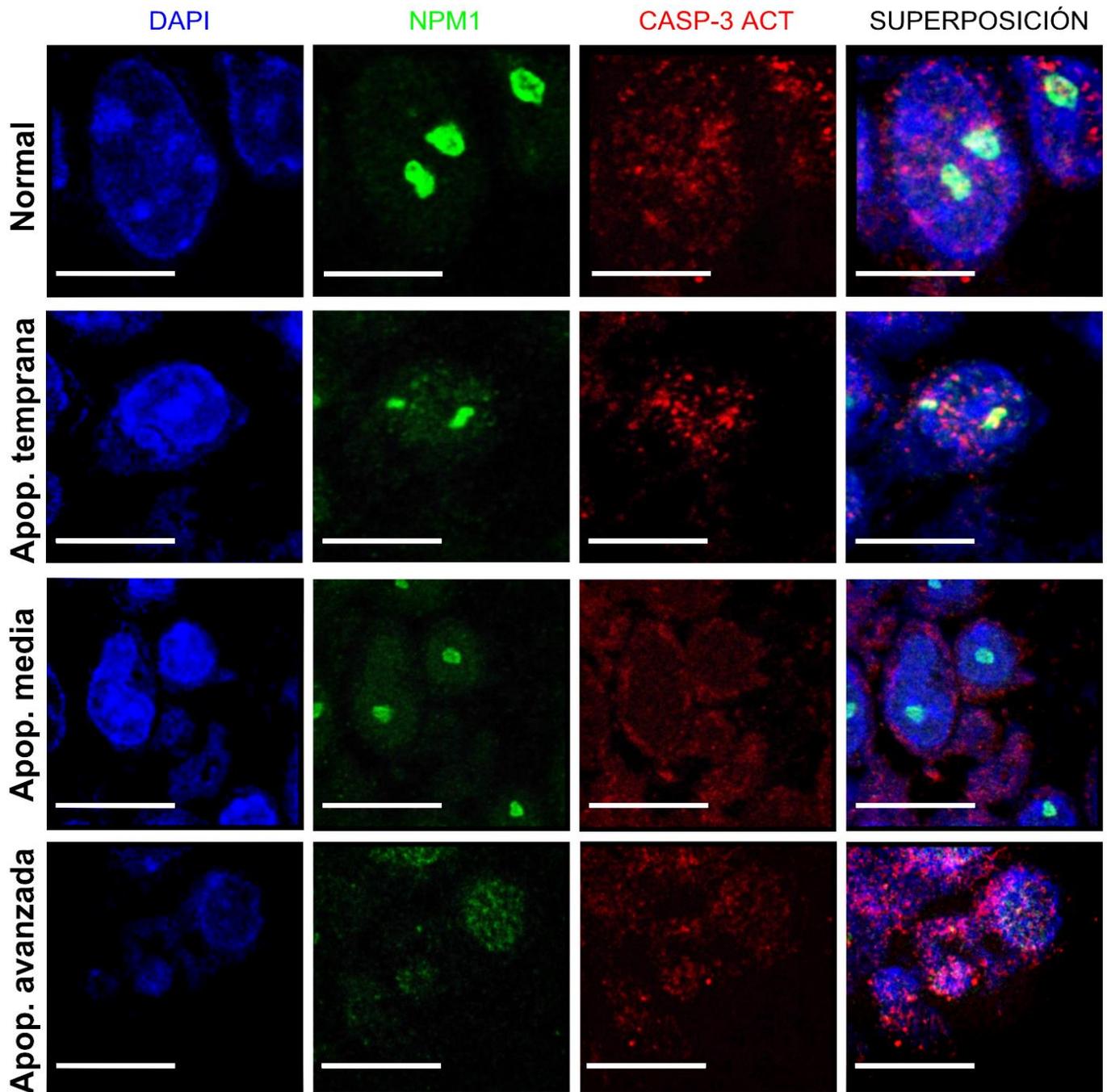


Figura 15. Inmunolocalización de Casp-3 activa y NPM1/nucleofosmina en células normales y con apoptosis temprana, media y avanzada. Una célula normal (primera línea horizontal), células con apoptosis temprana (segunda línea horizontal), células con apoptosis media (tercera línea horizontal) y células con apoptosis avanzada (cuarta línea horizontal). Se observa DAPI en azul, NPM1 en verde, Caspasa-3 activa en rojo y la superposición. Barra de escala 5 μ m.

Comportamiento de las proteínas RNA pol II, H3ac y SC35 durante la apoptosis.

Se estudiaron las proteínas RNA pol II, H3ac y SC35 en 4 grupos diferentes de acuerdo con el grado de compactación de la cromatina: células sanas, las cuales no tenían indicio de cromatina compacta atípica; células con apoptosis temprana, presentaron ya un grado de compactación de cromatina; células con apoptosis media, presentaron un grado mayor de compactación de cromatina y células con apoptosis muy avanzada, presentaron cuerpos apoptóticos fragmentados.

La localización de la proteína transcripcional RNA pol II en células normales se encontró en el área intercromatiniana (Figura 15, primera línea horizontal). A medida que fue progresando la apoptosis temprana y media, la RNA pol II fue disminuyendo en cantidad hasta la formación de cuerpos apoptóticos donde se acumuló en la periferia del ADN compacto (Figura 15, cuarta línea horizontal).

La localización del marcador epigenético H3 acetilada nos mostró que en células normales se presenta sobre la eucromatina (Figura 16, primera línea horizontal). A medida que incrementa la cromatina compacta por la apoptosis temprana, media y avanzada, disminuye la distribución de la histona 3 acetilada (Figura 16, segunda, tercera y cuarta línea horizontal).

En las células normales, se observó que el factor de *splicing* SC35 se encuentra como un patrón moteado (*speckles*) en un material difuso sobre el área intercromatiniana y pericromatiniana (Figura 17, primera línea horizontal). En la apoptosis temprana se sigue observando SC35 como un patrón moteado en menor cantidad y difuso (Figura 17, segunda línea horizontal). En la apoptosis media SC35 se observa como motas muy redondas con muy poco material difuso (Figura 17, tercera línea horizontal); sin embargo en la apoptosis avanzada prácticamente se observa solo un patrón moteado en menor cantidad en la periferia de los cuerpos apoptóticos (Figura 17, cuarta línea horizontal).

Se analizó la intensidad de fluorescencia en las proteínas RNA pol II, H3ac y SC35 comparado con diferentes grados de compactación de la cromatina. Las gráficas (Figura 18) nos muestran que a través de la progresión apoptótica, las proteínas transcripcionales disminuyen en cantidad y en el área de su distribución. Se comparó con células granulosa normales como control. Con el fin de confirmar la diferencia significativa presente entre los cuatro grupos de células de una de las tres proteínas, se realizó un ANOVA de una vía y una Prueba *Post-Hoc* Tukey con un total de 52 células, lo que evidenció que el decremento

de las proteínas es significativamente mayor cuando incrementa la compactación de la cromatina.

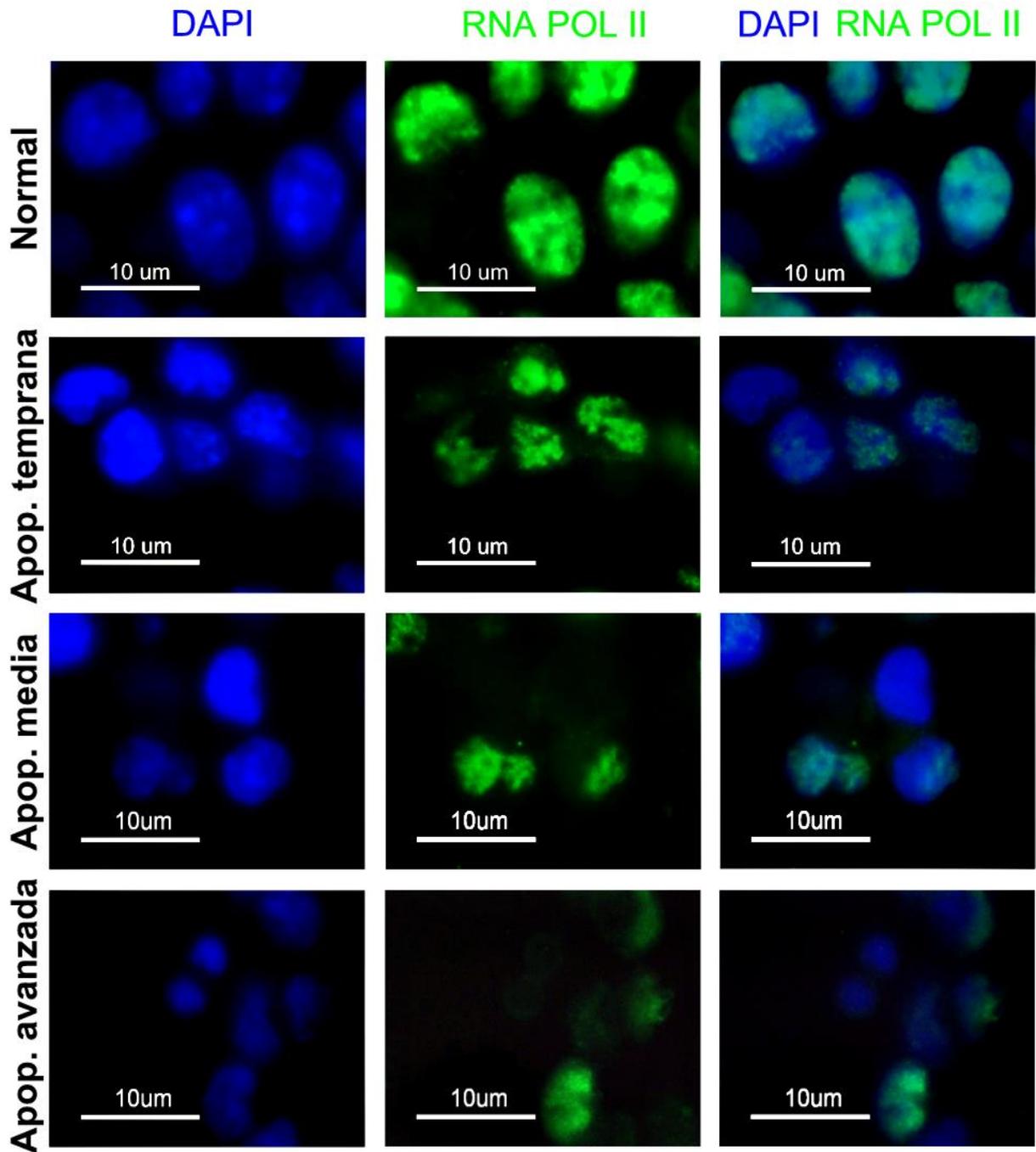


Figura 16. Inmunolocalización de RNA pol II. Células normales (primera línea horizontal), células con apoptosis temprana (segunda línea horizontal), células con apoptosis media (tercera línea horizontal) y células con apoptosis avanzada (cuarta línea horizontal). DAPI en azul, RNA pol II en verde y la superposición.

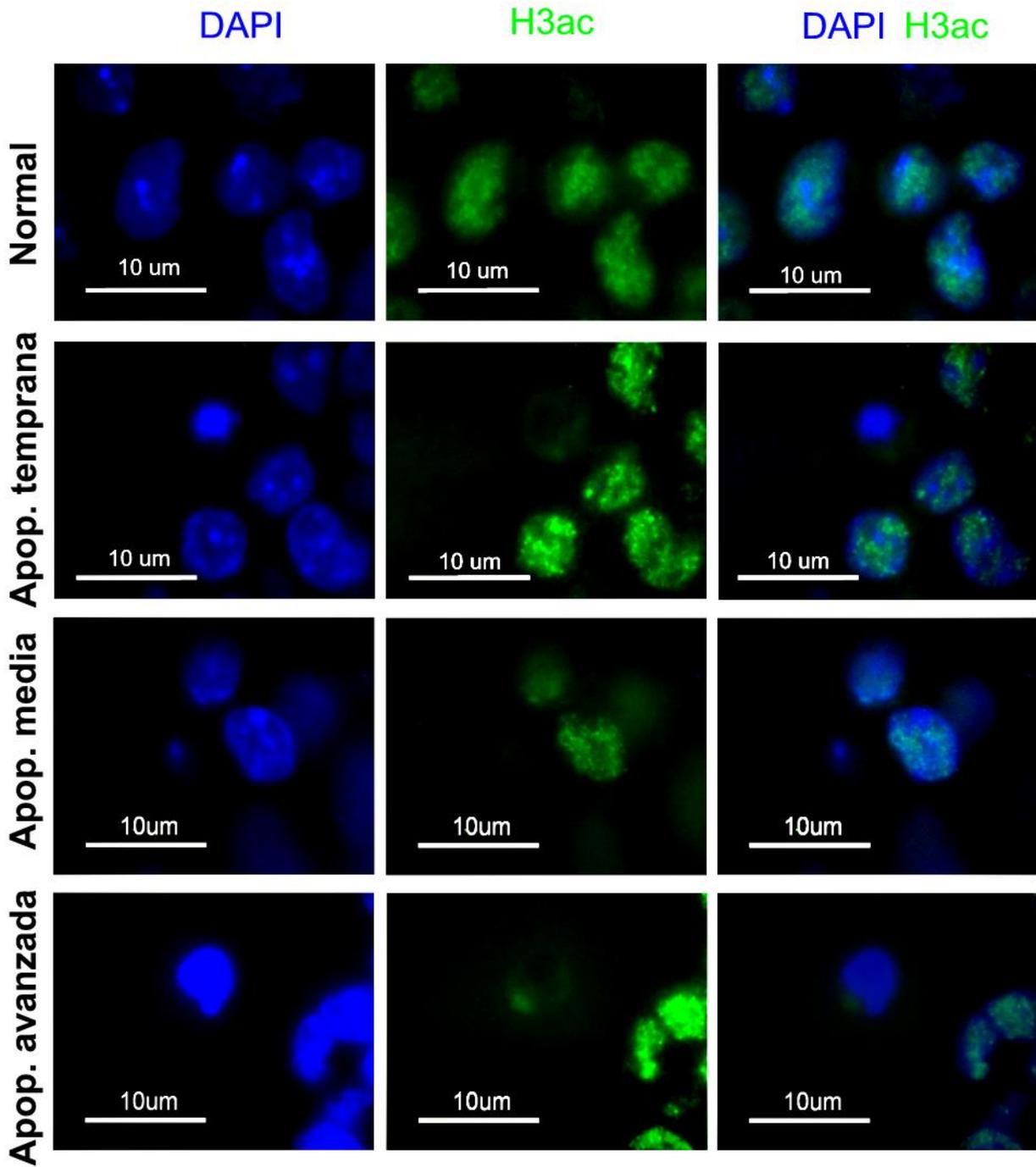


Figura 17. Inmunolocalización de H3ac. Células normales (primera línea horizontal), células con apoptosis temprana (segunda línea horizontal), células con apoptosis media (tercera línea horizontal) y células con apoptosis avanzada (cuarta línea horizontal). DAPI en azul, H3ac en verde y la superposición.

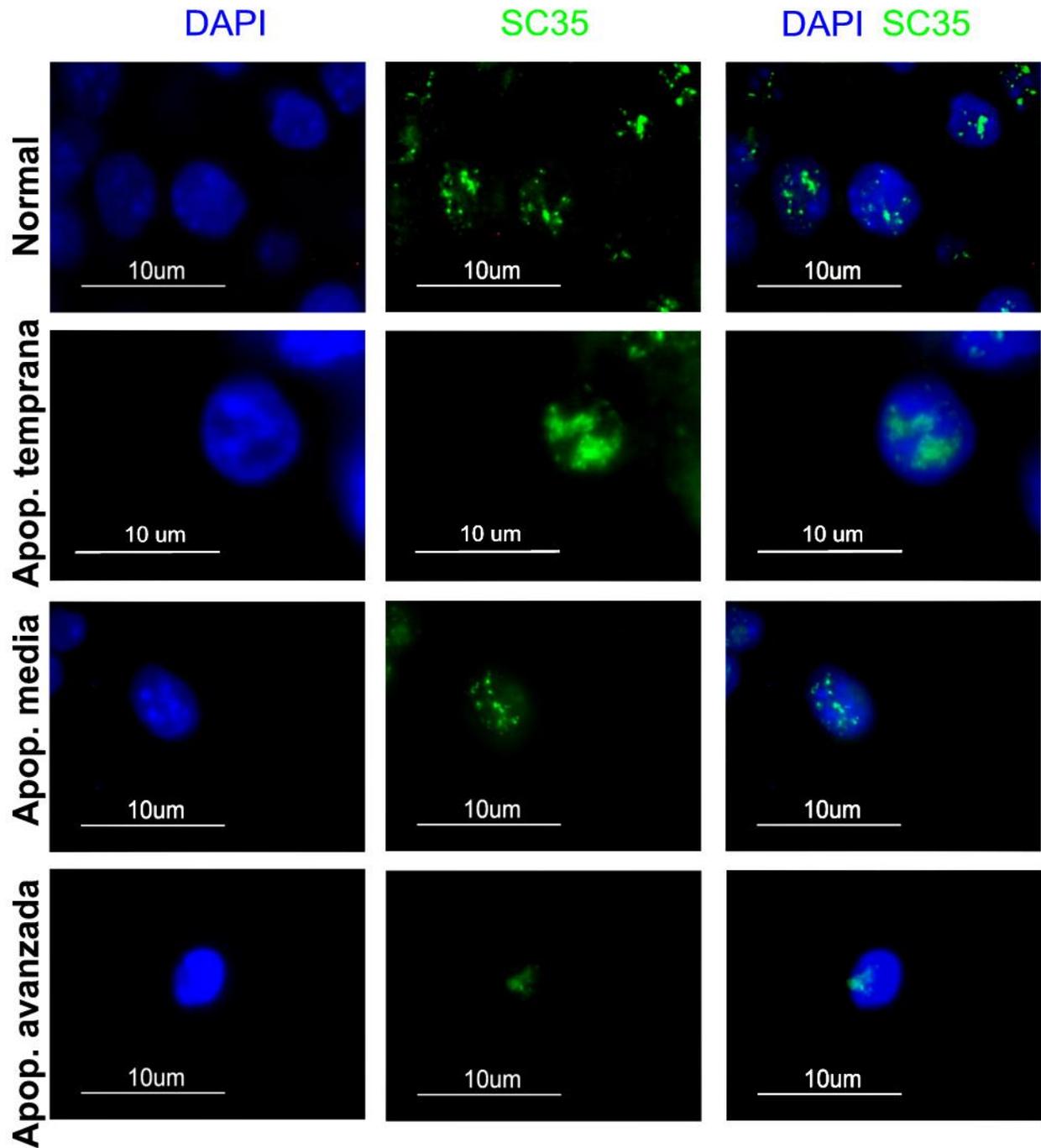


Figura 18. Inmunolocalización de SC35. Células normales (primera línea horizontal), células con apoptosis temprana (segunda línea horizontal), células con apoptosis media (tercera línea horizontal) y células con apoptosis avanzada (cuarta línea horizontal). DAPI en azul, SC35 en verde y la superposición.

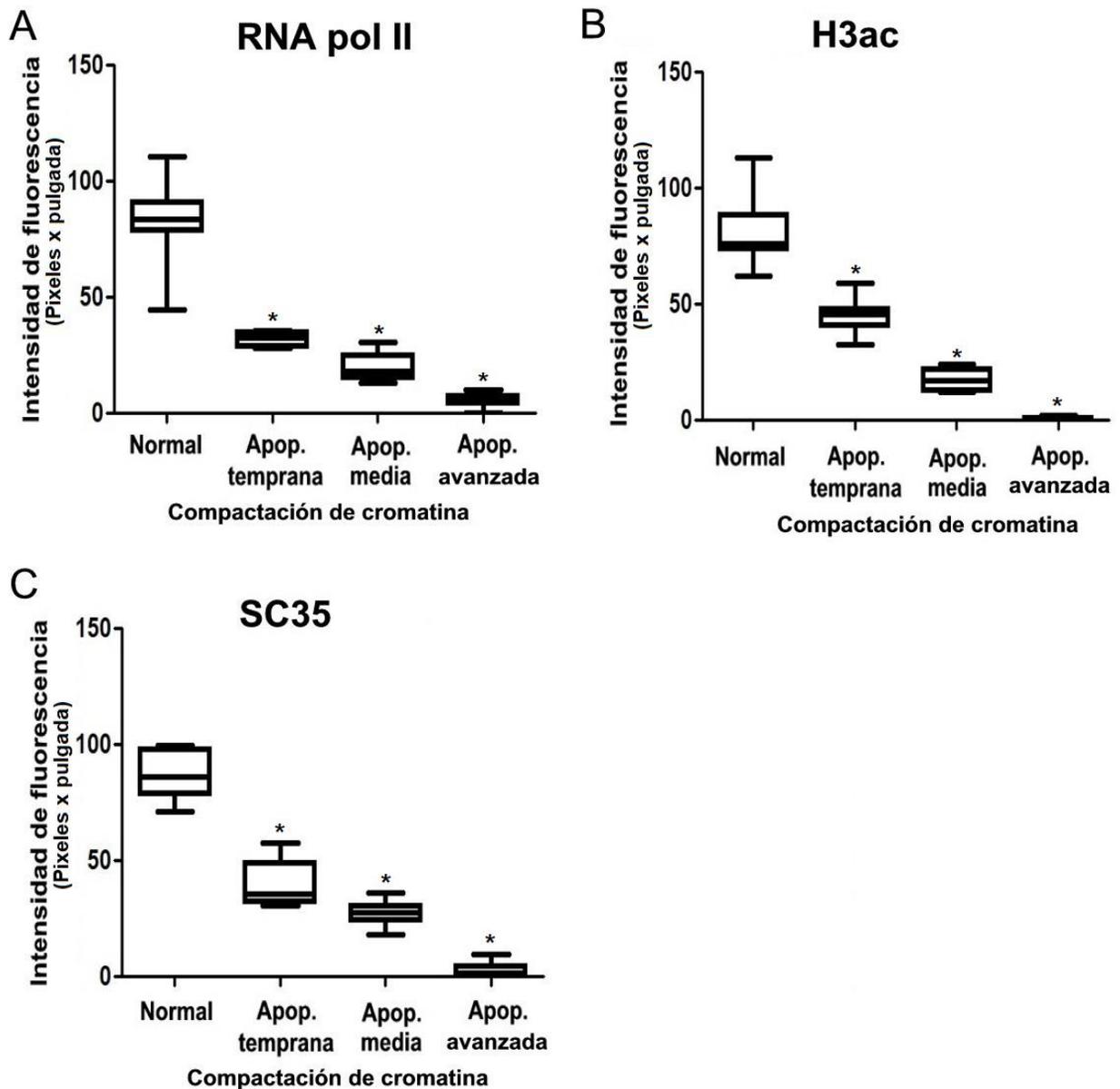


Figura 19. Decremento de las proteínas RNA pol II, H3ac y SC35 con la progresión de la apoptosis. Se observa una disminución significativa de la intensidad de fluorescencia de las proteínas RNA pol II (gráfica A), H3ac (gráfica B) y SC35 (gráfica C) con respecto a tres diferentes grados de compactación de la cromatina a través de la apoptosis. Células normales como control positivo. Prueba estadística ANOVA de una vía y la prueba *post hoc* de Tukey ($P < 0.05$).

Microscopía electrónica

Ultraestructura de los cambios morfológicos en células apoptóticas.

A nivel ultraestructural se evidenciaron los cambios morfológicos del citoplasma pero principalmente del núcleo en células apoptóticas. Observamos que el citoplasma presentó fragmentación y acumulaciones de los organelos celulares. Se observó que las mitocondrias tenían el tamaño aumentado y que se encontraban altamente vacuolizadas. En el núcleo, se observó irregularidad de la membrana nuclear, diferentes etapas de condensación y alteración de la cromatina, formación de cuerpos compactos de heterocromatina y fragmentación nuclear (Figura 19C, D), mientras que en células granulosas normales se observó un núcleo intacto y membrana nuclear bien definida (Figura 19B).

Reorganización de las partículas ribonucleoproteicas intranucleares en células apoptóticas.

Como resultado de la técnica ultraestructural basada en el tratamiento con EDTA, la cromatina condensada pudo blanquearse de forma bastante eficiente, mientras que el espacio de la intercromatina se volvió más contrastado. Bajo estas condiciones, fue posible detectar y describir la organización de las RNP's intranucleares.

Encontramos que independientemente de la degradación y compactación del ADN, siempre se encuentra una clara separación de los componentes de la cromatina y las estructuras nucleares que contienen RNP's durante la apoptosis. En una célula que está en proceso de apoptosis (Figura 20), se vio que a través de la compactación de la cromatina, las RNP's nucleares se conservan y se someten a una reorganización severa (Figura 20D). En la Figura 21D, se observó que las RNP's se reorganizaron al centro del núcleo, mientras que la cromatina se localizó principalmente en la periferia.

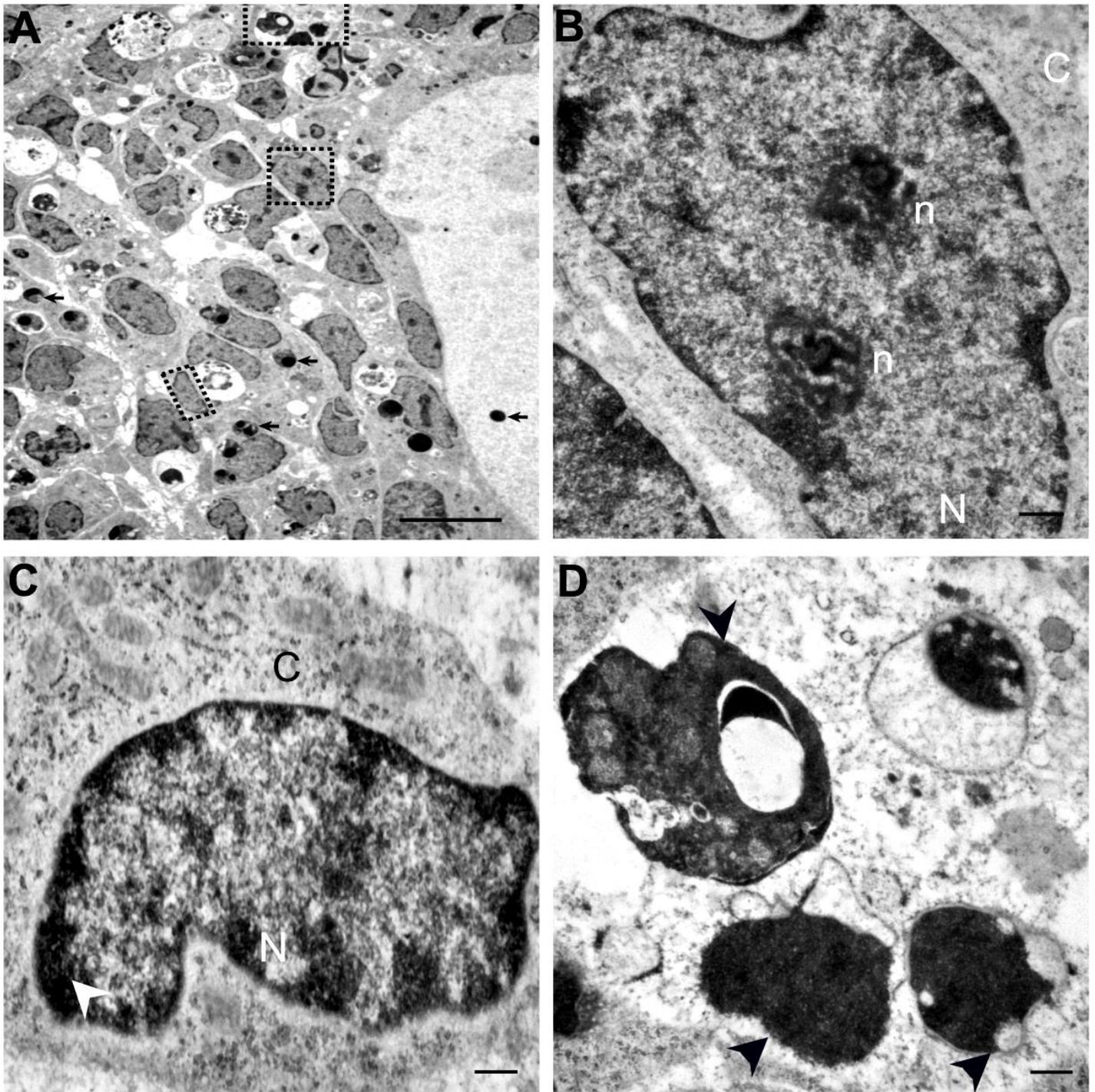


Figura 20. Microfotografía electrónica de células granulosa normales y apoptóticas.

En la imagen panorámica A, se observan algunas células que se encuentran en alguna fase de apoptosis (flecha). Las imágenes B, C, D son vistas ampliadas de las celdas en el cuadrado punteado de la imagen A. La imagen B es una célula granulosa normal; la imagen C es una célula granulosa en proceso de apoptosis, presenta compactación nuclear; la imagen D muestra cuerpos apoptóticos con cromatina altamente compactada (cabeza de flecha). C: citoplasma; N: núcleo, n: nucléolo, CC Contraste Ur/Pb. Barras de escala (a) 10 μ m; (b) 500 nm; (c) 500 nm; (d) 500 nm.

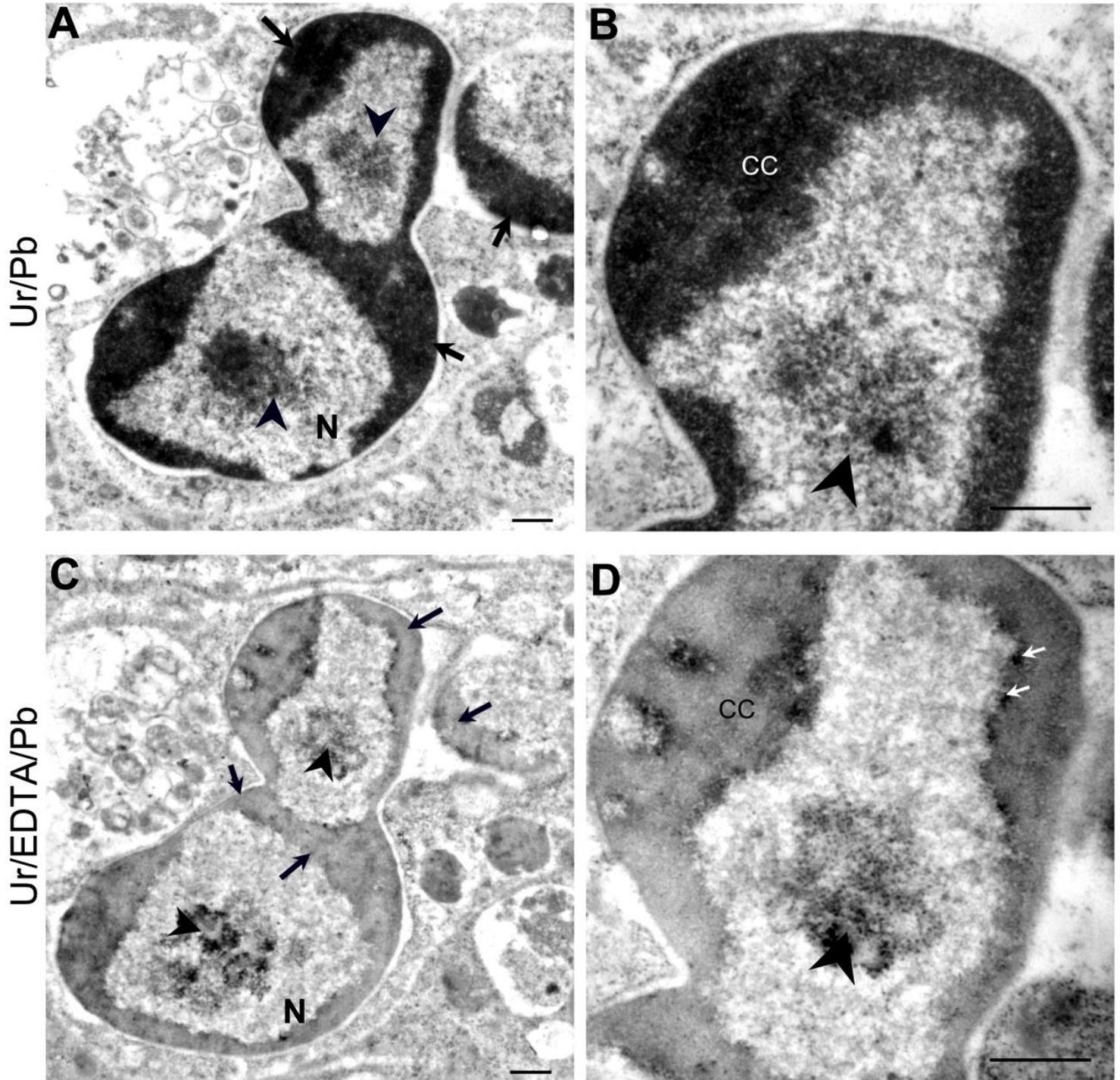


Figura 21. Microfotografía electrónica de cortes contiguos de una célula granulosa en proceso apoptótico. Las imágenes B, D son aumentos de las imágenes A, C, respectivamente. En la imagen B, se muestra una célula granulosa con contraste Ur/Pb con cromatina compacta (CC) y un nucléolo (cabeza de flecha). En la imagen D, se muestra una célula granulosa con contraste preferencial para ribonucleoproteínas Ur/EDTA/Pb, posee cromatina compacta (CC), nucléolo (cabeza de flecha) y algunas estructuras ribonucleoproteicas como las fibras pericromatinianas (flechas blancas). Barras de escala (a) 500 nm; (b) 500 nm; (c) 500 nm; (d) 500 nm.

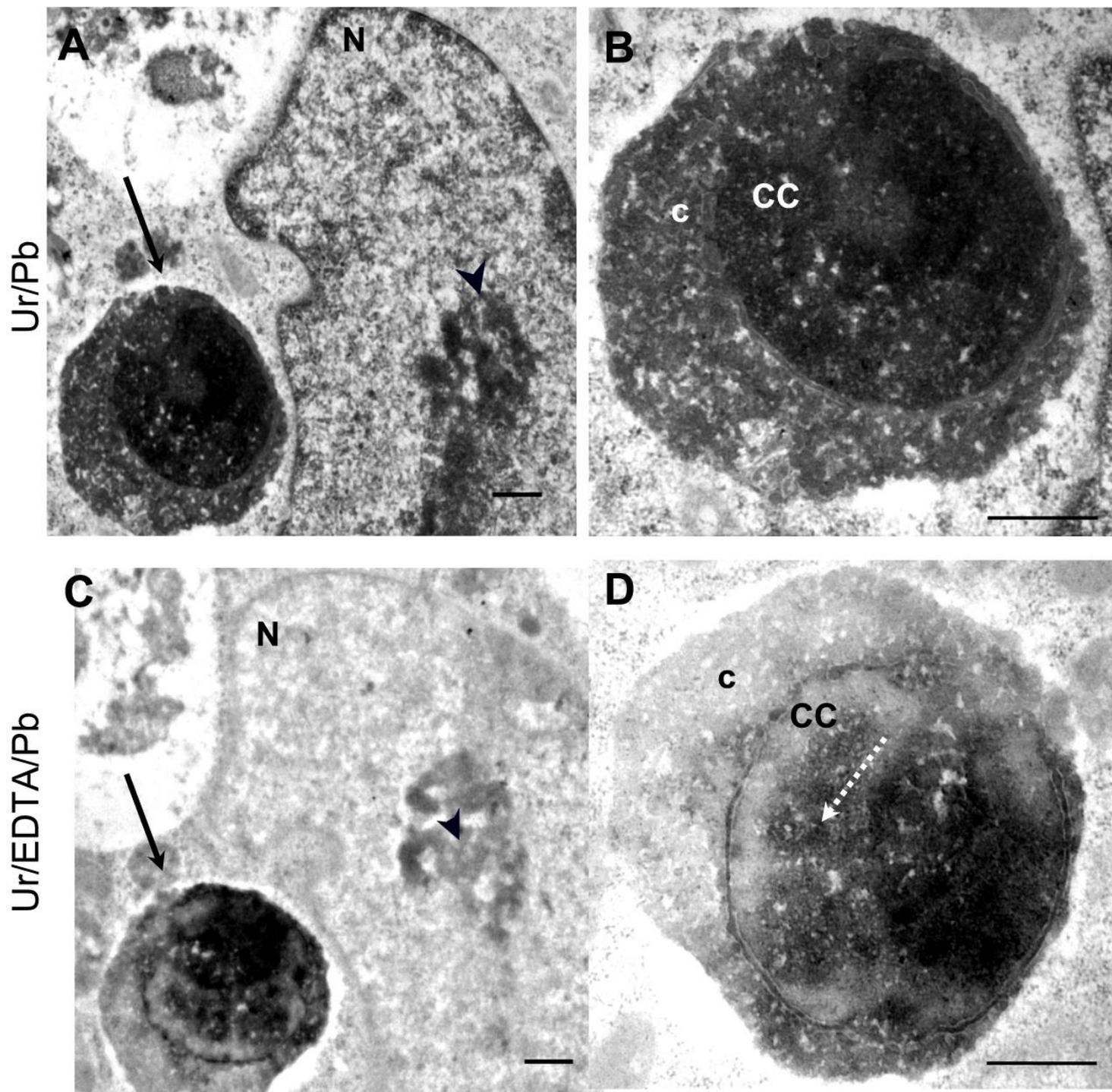


Figura 22. Microfotografía electrónica de cortes contiguos de cuerpos apoptóticos. Las imágenes B, D son aumentos de las imágenes A, C, respectivamente. En la imagen B, se muestra un cuerpo apoptótico con contraste Ur/Pb con cromatina compacta (CC) y un citoplasma degradado. En la imagen D, se muestra un cuerpo apoptótico con contraste preferencial para ribonucleoproteínas Ur/EDTA/Pb, con cromatina compacta (CC), algunos agregados de composición ribonucleoproteica (flecha punteada) y un citoplasma degradado (c). Barras de escala (a) 500 nm; (b) 500 nm; (c) 500 nm; (d) 500 nm.

Ultraestructura del nucléolo y la distribución de las proteínas nucleolares durante la apoptosis.

Con el análisis del contraste preferencial para RNP's, se visualizó la compleja estructura del nucléolo que exhibió cambios notables durante la apoptosis: ocurrió una alteración y segregación de su componente fibrilar denso (CFD) y componente granular (CG).

Con respecto a las inmunolocalizaciones de las proteínas nucleolares, la nucleolina y nucleofosmina. Los nucléolos no apoptóticos, el anticuerpo policlonal para la nucleolina se evidenció principalmente en el componente granular pero también se presentó en el componente fibrilar denso, mientras que los centros fibrilares fueron negativos (Figura 22). La marca de nucleolina en los nucléolos se mantuvieron positivos a lo largo del proceso apoptótico (Figuras 23-24). Los nucléolos apoptóticos muestran la segregación de los componentes fibrilares y granulares (Figuras 23D). En los cuerpos apoptóticos, se encontró un etiquetado específico de las inmunoglobulinas en la cromatina compacta, así como en el material granular citoplasmático (Figura 24).

Los nucléolos no apoptóticos, el anticuerpo policlonal contra la proteína nucleofosmina fue positivo para el componente granular (Figura 25), mientras que los centros fibrilares fueron negativos. En las células apoptóticas, la inmunolocalización de nucleofosmina aún es selectiva para los nucléolos (Figuras 26-27). Los nucléolos apoptóticos muestran la segregación de los componentes fibrilares y granulares (Figuras 27B, 28D). En los cuerpos apoptóticos, se observó un etiquetado específico de las inmunoglobulinas en la cromatina compacta, así como el material granular citoplasmático y agregados con RNP's nucleoplásmicas (HERDS) (Figuras 27-28).

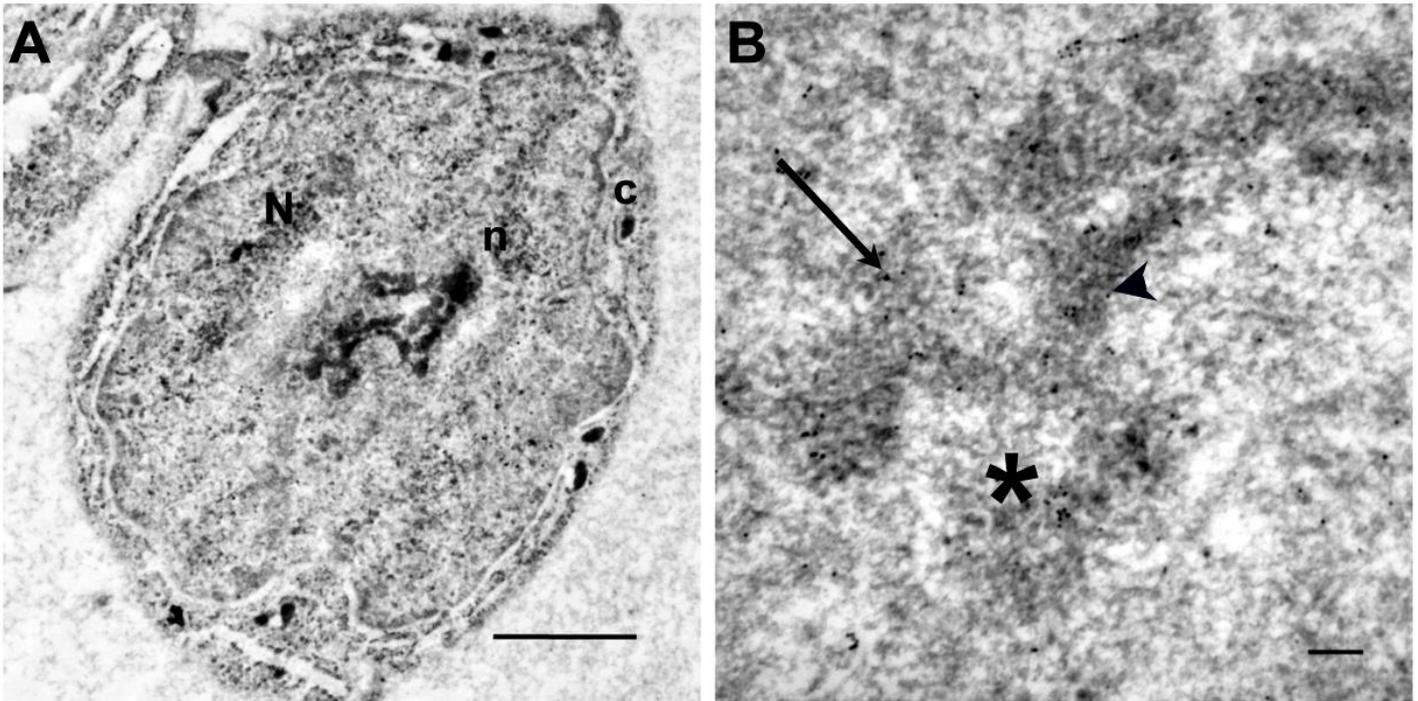


Figura 23. Inmunolocalización de NCL/nucleolina en una célula granulosa normal.

La imagen A es una micrografía panorámica de la imagen B, donde se observa la ultraestructura, N: núcleo, n: nucléolo; c: citoplasma. En la imagen B se observa una inmunolocalización de nucleolina positiva en el componente fibrilar denso (cabeza de flecha) y granular (flecha). El centro fibrilar es negativo (asterisco). Barras de escala (a) 2 μ m; (b) 100 nm.

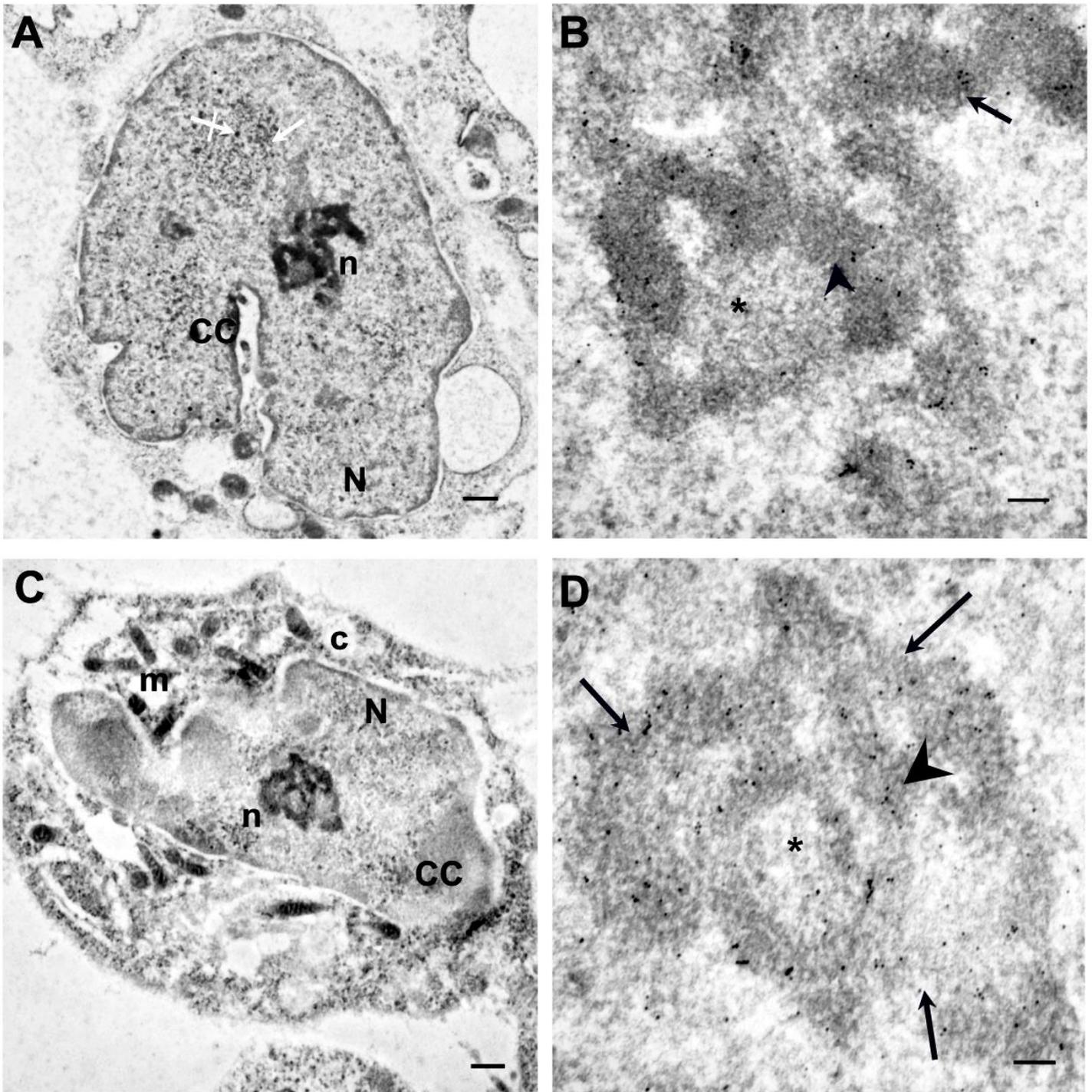


Figura 24. Inmunolocalización de NCL/nucleolina en células granulosas en proceso de apoptosis. Las imágenes B, D, son aumentos de la imagen A, C respectivamente. En la imagen A se observa un cúmulo de gránulos intercromatinianos (flecha); gránulos pericromatinianos (flecha cruz); cromatina compacta (CC); N: núcleo; n: nucléolo. En la imagen C, se observa una célula granulosa con mayor cromatina compacta (CC), mitocondrias alteradas (m). En las imágenes B, D se observa nucléolos apoptóticos con inmunolocalización de nucleolina positiva en el componente fibrilar denso (cabeza de flecha) y granular (flecha). Centro fibrilar (asterisco). Escala: (a) 500 nm; (b) 100 nm; (c) 500 nm; (d) 100 nm.

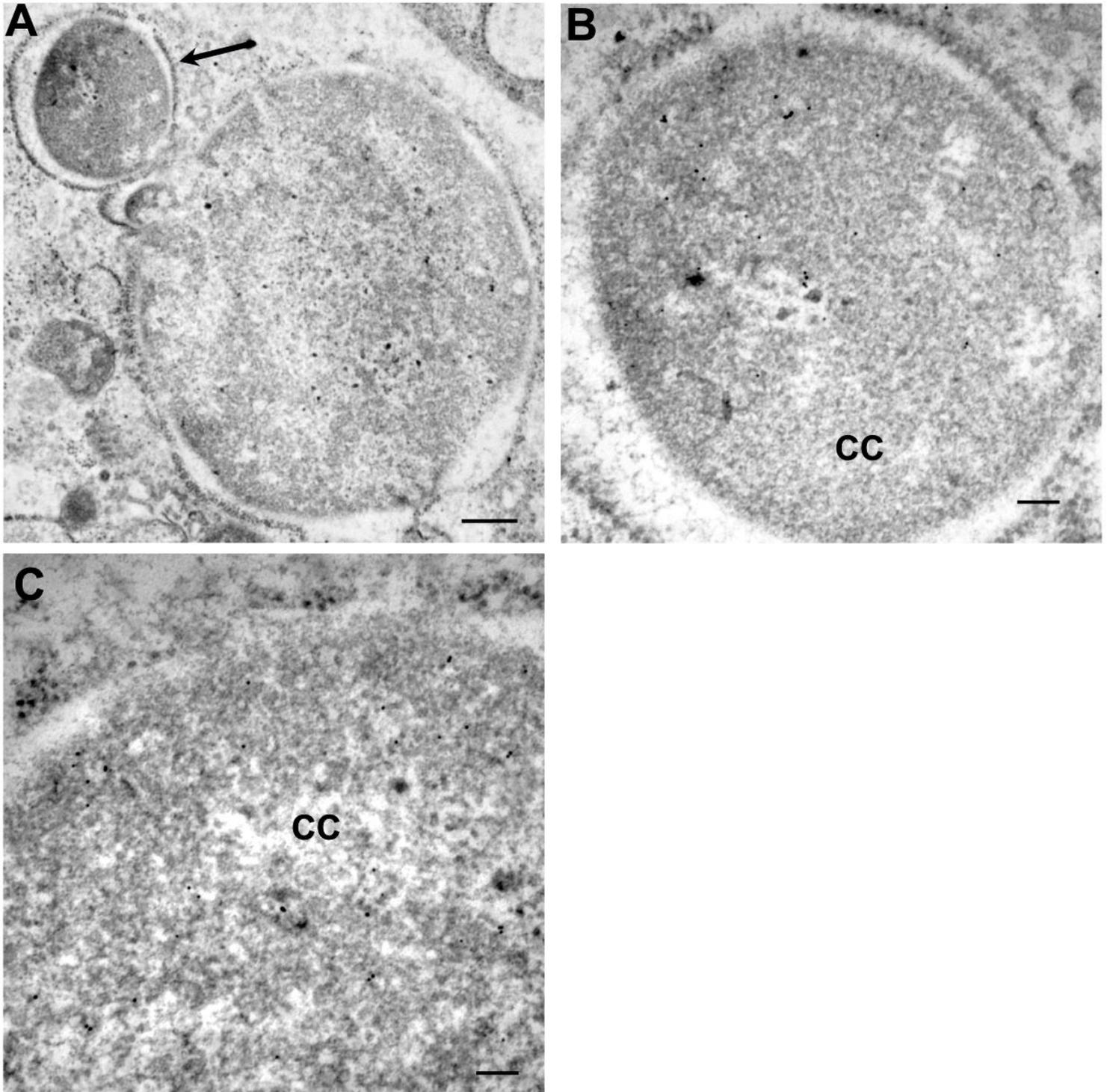


Figura 25. Inmunolocalización de NCL/nucleolina en una célula con apoptosis avanzada. Las imágenes A, C son panorámicas de las imágenes B, D, donde se observan cuerpos apoptóticos con cromatina compacta (CC) y un citoplasma degradado (c). En las imágenes B, D, se observa la distribución de la nucleolina en la cromatina compacta (CC). Barras de escala (a) 2 μ m; (b) 500 nm; (c) 500 nm; (d) 100 nm.

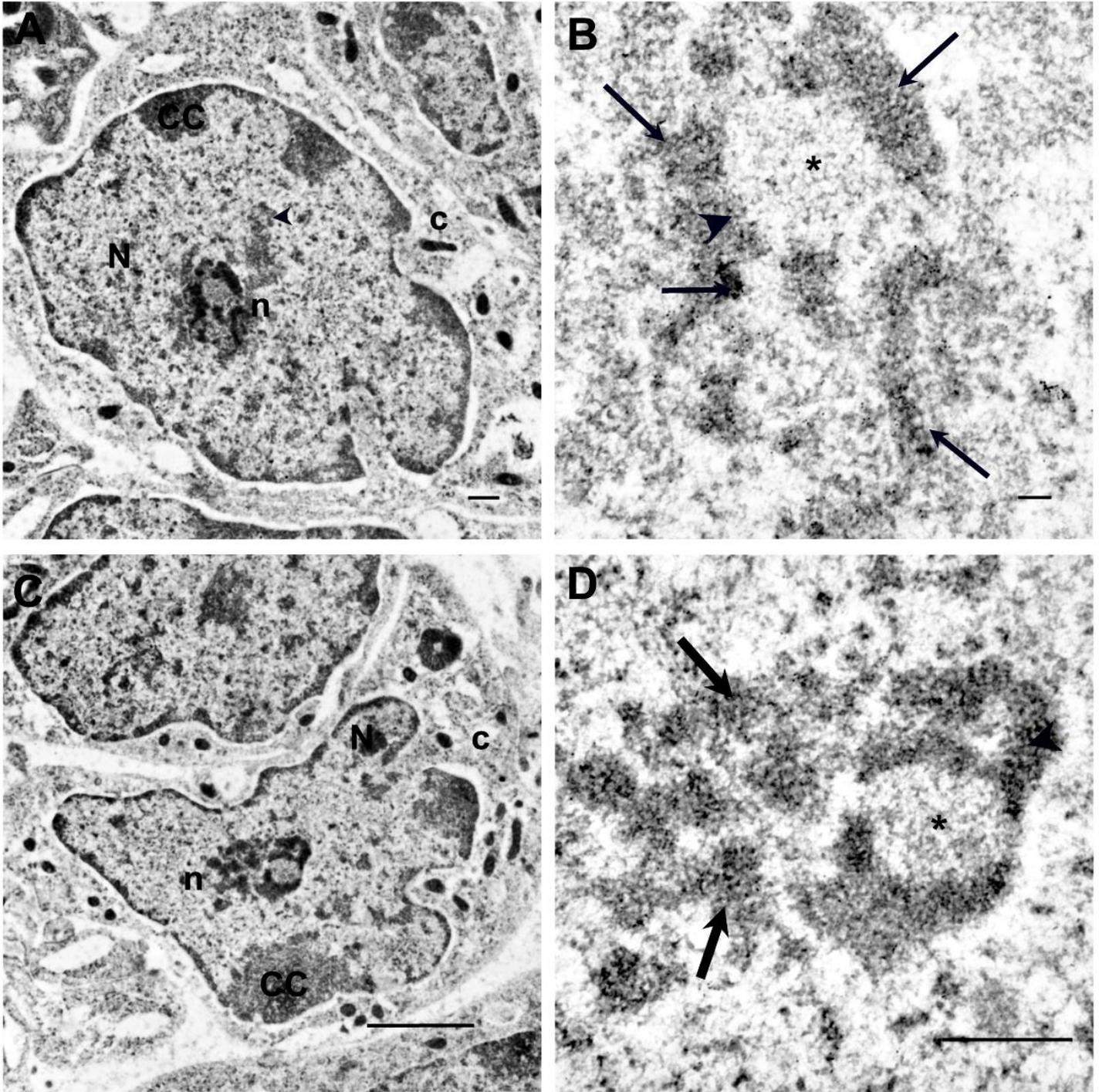


Figura 26. Inmunolocalización de NPM1/nucleofosmina en una célula granulosa normal. Las imágenes A, C son panorámicas de las imágenes B, D, donde se observan células normales con un núcleo (N), nucléolo (n), c (citoplasma) y cromatina compacta basal (CC). En las imágenes B, D, se observan nucléolos no apoptóticos donde se encuentra distribuida en el componente granular (flechas) y es negativo al componente fibrilar denso (cabeza de flecha) y centro fibrilar (asterisco). Barras de escala (a) 500 nm; (b) 100 nm; (c) 2 μ m; (D) 500 nm.

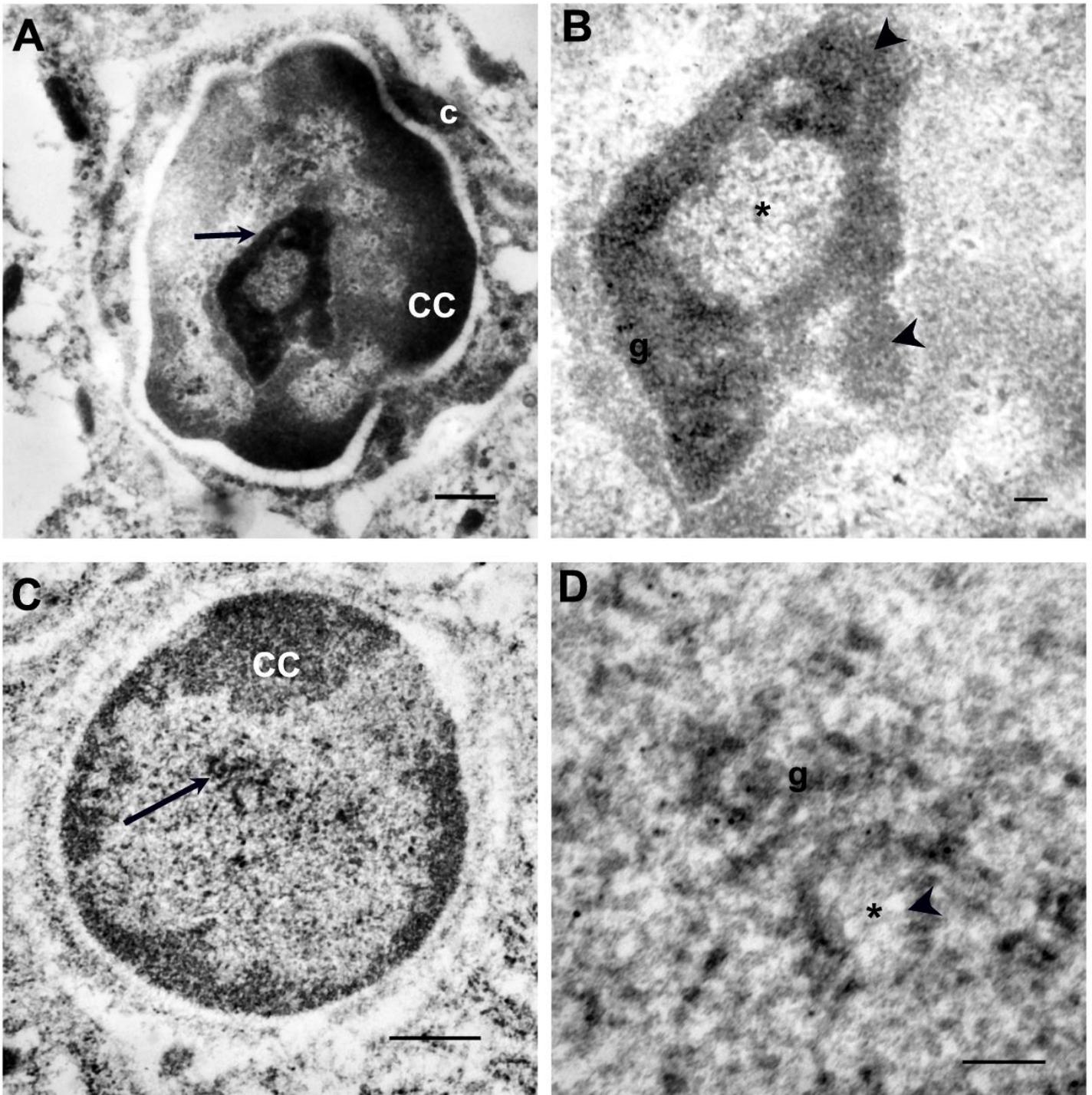


Figura 27. Inmunolocalización de NPM1/nucleofosmina en células granulosas en proceso de apoptosis. Las imágenes A, C son panorámicas de las imágenes B, D; donde se observan células granulosas con algún grado de compactación de cromatina (CC), un nucléolo (flecha). Las imágenes B y D muestran dos nucléolos alterados que son positivos para nucleofosmina específicamente en el componente granular (g) y negativos en el componente fibrilar denso (cabeza de flecha) y centros fibrilares (asteriscos). Barras de escala (a) 500 nm; (b) 100 nm; (c) 500 nm; (d) 100 nm.

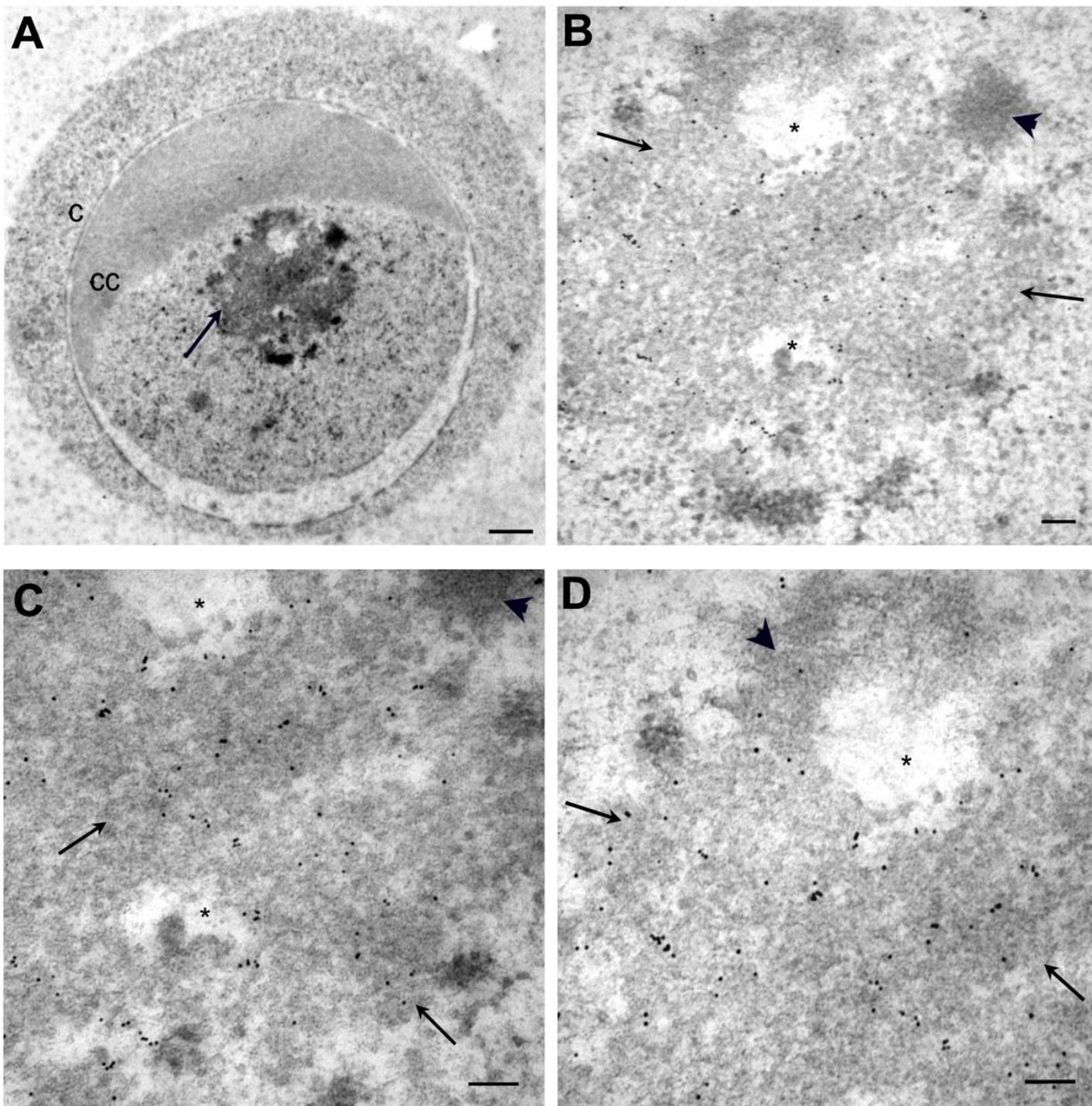


Figura 28. Inmunolocalización de NPM1/nucleofosmina en un cuerpo apoptótico. La imagen A es una panorámica de las imágenes B-D; donde se muestra un cuerpo apoptótico con cromatina compacta (CC), citoplasma (c), nucléolo (flecha). En la imágenes B-D la distribución de la nucleofosmina es específica al componente granular (flechas) y es negativa al componente fibrilar denso (cabeza de flecha) y al centro fibrilar (asteriscos). Barras de escala (a) 500 nm; (b) 100 nm; (c) 100 nm; (d) 100 nm.

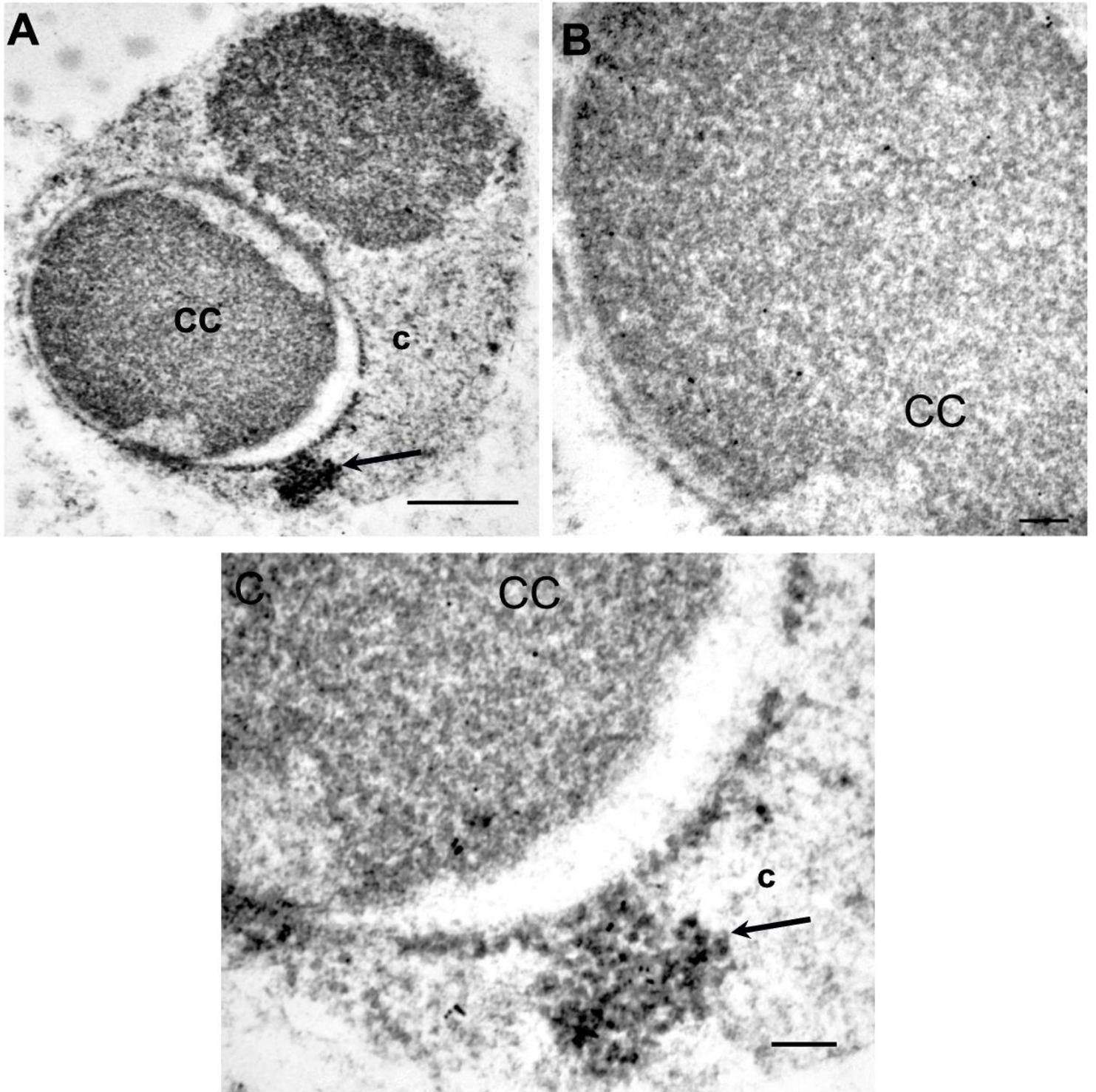


Figura 29. Inmunolocalización de NPM1/nucleofosmina en un cuerpo apoptótico. La imagen A es una panorámica de las imágenes B-C; se muestra un cuerpo apoptótico con cromatina compacta (CC) y citoplasma degradado (c). En la imagen B, se muestra la inmunolocalización de NPM1 distribuida en la cromatina compacta. En la imagen C, se muestra la NPM1 tanto en la cromatina compacta (CC) como en la estructuras citoplasmáticas HERDS (flecha). Barras de escala (a) 500 nm; (b) 100 nm; (c) 100 nm.

DISCUSIÓN

Cambios morfológicos de las células granulosas en la atresia folicular.

Los ovarios sufren atresia desde el periodo fetal, después del nacimiento y la etapa reproductiva (Hughes & Gorospe, 1991; Townson & Combelles, 2012). En este trabajo se estudió los cambios morfológicos de las células granulosas a través de la apoptosis, como la separación entre ellas que indican una compactación celular, la contracción nuclear o la formación de cuerpos muy picnóticos. Características similares han sido descritas en diferentes estudios en ovarios de rata, de aves y cerdos (Tilly *et al.*, 1991; Petculescu-Ciochină *et al.*, 2012; Sugimoto *et al.*, 2001; Escobar *et al.*, 2015).

En los folículos ováricos antrales atrésicos de ratas adultas que se analizaron durante el presente trabajo, nos permitieron observar a las células apoptóticas que perdieron contacto entre ellas, así como núcleos cuya cromatina condensada está adosada a la membrana nuclear; en otras células la cromatina se reduce a una única masa de forma irregular, homogéneamente teñida, así mismo, se observaron otras células en donde el contenido nuclear se fragmenta en múltiples masas densamente teñidas, conformando cuerpos apoptóticos, estos son restos de células y se definen como estructuras rodeadas de membrana con una forma aproximadamente esférica u ovoide que contiene cantidades variables de cromatina condensada y/o citoplasma disperso en los espacios intercelulares (Pivko *et al.*, 2012; Kerr *et al.*, 1972) y finalmente son fagocitados por macrófagos (Duvall *et al.*, 1985; Williams & Smith, 1993).

A nivel ultraestructural corroboramos la morfología en todas las etapas características de la muerte celular y coincidimos con la descripción ultraestructural clásica de la degeneración de células granulosas durante la atresia folicular en ratas (Björkman, 1962; Vázquez-Nin & Sotelo, 1967; Peluso *et al.*, 1977) al relacionar las características morfológicas específicas de la muerte de células granulosas con el proceso de apoptosis.

Identificación de apoptosis en células granulosas

Las observaciones realizadas en el presente estudio permitieron definir que las células granulosas no sólo presentan la morfología propia de la apoptosis, también muestran marca positiva que indican la presencia de la proteasa caspasa-3 en su forma activa y algunas se encuentran en etapas avanzadas del proceso con ADN fragmentado, ya que son positivas a la técnica de TUNEL (Yuan & Giudice, 1997; Glamočlija *et al.*, 2005; Hill *et al.*, 2004).

Los folículos antrales se desarrollan bajo la estimulación con gonadotropinas, ya que las células tecales activan los receptores de LH para producir andrógenos (androstenediona y testosterona) y a su vez las células granulosas activan los receptores de FSH para convertir los andrógenos a estrógenos. La hipótesis central sobre la formación de líquido folicular sugiere que la producción por parte de células granulosas de hialuronano y de condroitin sulfato proteoglicano que generan un gradiente osmótico, el cual atrae el fluido derivado de la vasculatura tecal hacia la formación de la cavidad antral (Hussein, 2005; Tilly, 1993; Rodgers & Irving-Rodgers, 2010).

Se sabe que las gonadotropinas mantienen una regulación de la apoptosis en las células granulosas de los folículos antrales (Hunzicker-Dunn & Mayo, 2006). Se ha reportado que la expresión de la caspasa-3 activa está regulada por las gonadotropinas como parte del proceso apoptótico (Boone & Tsang, 1998; Escobar *et al.*, 2013), por lo que es esperado observar una gran cantidad de células somáticas con marca positiva para apoptosis en los folículos antrales atrésicos.

En este estudio encontramos que solo en los cuerpos apoptóticos de las células foliculares fueron positivos a la marca de TUNEL; sin embargo la caspasa-3 activa se presenta uniformemente en el citoplasma de la mayoría de las células granulosas apoptóticas. Por lo tanto, deducimos que la caspasa-3 se activa en el citoplasma muy temprano y posteriormente es transportada al núcleo durante la apoptosis para obtener acceso a los sustratos nucleares (Krajewska *et al.*, 1997, Manabe *et al.*, 2002). Entonces, la caspasa-3 activa participa en el proceso apoptótico antes de que ocurra la fragmentación del ADN y en consecuencia la fragmentación sería una consecuencia secundaria, más que una causa primaria de la apoptosis.

Localización y dinámica de las RNP's intranucleares en células granulosas.

Usando la técnica preferencial para ribonucleoproteínas acetato de uranilo-EDTA-citrato de plomo (Monneron & Bernhard, 1969), logramos identificar que en células normales, los componentes estructurales de las RNP's intranucleares tienen una ubicación específica: en la periferia de la cromatina compacta (fibras pericromatinianas y gránulos pericromatinianos) y en el área de la intercromatina (gránulos intercromatinianos). La ubicación intranuclear normal de estas partículas que contienen RNP's es un requisito previo necesario para la maduración de los ARN nucleares (Puvion & Puvion-Dutilleul, 1996). La zona de 100 nm de espesor cerca de la cromatina compactada se denomina el área pericromatiniana y corresponde al espacio donde se transcriben los genes activos y tiene lugar la replicación del ADN (Cmarko *et al.*, 1999; Fakan, 2004).

Distribución de las partículas ribonucleoproteicas intranucleares en células granulosas apoptóticas

Nuestros resultados en células apoptóticas muestran que a medida que se compacta la cromatina, las estructuras que contienen RNP's nucleolares y no nucleolares también exhiben una reorganización dramática, hasta el punto que se separan las estructuras que contienen ADN de las que contienen ARN. Logramos identificar que en las etapas apoptóticas tempranas, las RNP's nucleoplásmicas (fibras pericromatinianas, gránulos pericromatinianos y gránulos intercromatinianos) se acumulan en el espacio intercromatiniano y en etapas apoptóticas tardías se distribuyen en el centro del núcleo compacto.

Nuestros datos son obtenidos de células provenientes de organismos normales no sometidos a procesos experimentales cuya eliminación corresponde a un fenómeno fisiológico. Sin embargo, en otros estudios experimentales *in vivo* (Biggiogera *et al.*, 1990, 1997a) e *in vitro* (Biggiogera *et al.*, 1997b, 1998; Pellicciari *et al.*, 2000; Lafarga *et al.*, 1997; Biggiogera *et al.*, 2004) han empleado células de mamíferos (células de cerebelo de rata, timocitos, células de glioma C6, fibroblastos de ratón 3T3, células humanas EUE y HeLa) bajo estímulos pro-apoptóticos (estrés hipertónico o choque térmico, privación de suero, exposición a fármacos que inducen daño en el ADN o detención de la transcripción), se han descrito hallazgos similares.

Encontramos algunas estructuras en el citoplasma (Figura 28C) denominadas por Biggiogera *et al.*, 1998 como HERDS, las cuales son estructuras heterogéneas derivadas de RNP's, podrían ser un rasgo nuclear de la apoptosis tanto espontánea como inducida (Biggiogera & Pellicciari 2000; Biggiogera *et al.*, 2004). Bernhard, 1969 ya había observado que los GI son estructuras extremadamente resistentes de las cuales no se podía eliminar el ARN a menos que se hubiera realizado un tratamiento previo con proteasas. Tal característica hace que los GI sean el candidato más obvio para el papel en la formación de HERDS durante la apoptosis y el arresto transcripcional.

El nucléolo y la distribución de las proteínas nucleolares en células granulares durante la apoptosis.

Las inmunolocalizaciones de las proteínas nucleolina y nucleofosmina nos permitieron confirmar la presencia de ambas proteínas en todas las fases de la apoptosis. Encontramos que en los cuerpos apoptóticos aún se encuentran estas proteínas pero ya no de una forma nucleolar definida sino disgregados en la periferia de la cromatina compacta y fue confirmado mediante la inmunolocalización ultraestructural.

En nuestro estudio ultraestructural del nucléolo observamos que durante el curso de la apoptosis, el nucléolo sufre alteraciones como la segregación nucleolar que es la separación y condensación de los componentes nucleolares fibrilar denso y granular. En la apoptosis media, logramos observar el CFD y CG. Al final del proceso apoptótico, solamente observamos presencia del CG.

Coincidimos con algunos modelos apoptóticos, como timocitos u otras células linfoides, donde los componentes CFD y CG pudieron reconocerse durante un largo tiempo en el curso de la apoptosis (Falini *et al.*, 2007a, 2007b; Soldani *et al.*, 2009). En otros linajes celulares sometidos a apoptosis, los nucléolos parecen desaparecer progresivamente y las estructuras nucleolares deficientes pueden identificarse en etapas apoptóticas tardías (Columbaro *et al.*, 1998). Sin embargo, las técnicas de inmunofluorescencia empleadas en nuestro estudio demostraron que el material granular frecuentemente observado en la proximidad de los cuerpos compactos es de origen nucleolar, ya que contiene las proteínas NCL y NPM1. Coincidimos con el estudio de Martelli *et al.*, 2000, donde observaron la redistribución de las proteínas NCL, NPM1 y fibrilarina en células HL-60 tratadas con camptotecina para la inducción de apoptosis y encontraron que dichas proteínas se

encuentran en el material granular presente en los cuerpos apoptóticos. Según Chan & Chan, 1999 han observado que NPM1 cambia su ubicación del nucléolo al nucleoplasma en las células apoptóticas K562 y HeLa.

Según la hipótesis sobre los anticuerpos antinucleolares (Van Venrooij & Pruijn, 1995; Rosen & Casciola-Rosen, 1999), es probable que los residuos del componente granular estimulen el sistema inmunitario para producir anticuerpos contra ellos ya que mantienen su inmunorreactividad hasta el final del proceso apoptótico (Casiano & Tan, 1996; Miranda *et al.*, 1998). Nucleofosmina y nucleolina son las dos principales proteínas argirófilas del nucléolo con múltiples funciones (Hozak *et al.*, 1992). Se sabe que la NPM1 actúa como moduladora de la apoptosis ya que es una chaperona para Bax, es decir, induce los cambios conformacionales de Bax que preceden a la translocación de esta molécula hacia la mitocondria, como evento control de la vía apoptótica (Kerr *et al.*, 2007). A pesar de ello, se ha informado sobre la existencia de autoanticuerpos contra NPM1 (Ochs, 1997).

Hemos encontrado que las estructuras de RNP's HERDS también contienen componentes del nucléolo, al menos la proteína NPM1. Otros estudios han demostrado que los HERDS contienen la proteína NOR-90/UBF, el principal elemento regulador de la transcripción del ADNr en los centros fibrilares (Kuhn y Grummt, 1992). Sin embargo, UBF se corta durante la apoptosis temprana y por lo tanto los centros fibrilares son inactivados (Martelli *et al.*, 1999; Torres-Montaner *et al.*, 2000).

Regulación epigenética durante la apoptosis.

Demostramos que la acetilación de la histona 3 (H3ac) en células granulosas apoptóticas se distribuye en el área intercromatiniana y que disminuye su presencia a través del proceso de apoptosis, por lo que podemos deducir que el ADN de la cromatina laxa se encuentra activa y por lo tanto es accesible para los factores de transcripción y el aumento de la expresión génica (Roth *et al.*, 2001; Nowak & Corces, 2004).

Se sabe que en la atresia folicular ocurren diferentes modificaciones epigenéticas, nuestros resultados se relacionan con los de Pan *et al.*, 2012 quienes concluyen que la disminución de los niveles de acetilación es necesaria en la atresia folicular y que se correlaciona con la actividad transcripcional para la activación y desactivación de los genes que están bajo el control sinérgico de eventos genéticos y epigenéticos.

Nuestros resultados coinciden con Allera *et al.*, 1997 y con Hendzel *et al.*, 1998 ya que también observaron la reducción sustancial de la acetilación de histonas en poblaciones de timocitos apoptóticos, por lo que la acetilación de histonas es importante en la apoptosis al modular la compactación de la cromatina y de las enzimas asociadas. De hecho, en estudios *in vivo* de líneas celulares malignas, la acetilación de histonas promovió la activación de caspasas y por lo tanto la apoptosis (Aron *et al.*, 2003; Lindemann *et al.*, 2004; Xingang *et al.*, 2004).

Según Hajji & Joseph, 2010, la compactación de cromatina y la fragmentación del ADN son eventos nucleares necesarios cuando ocurre la apoptosis, por lo que es necesario la modificación de histonas y en particular la fosforilación y la acetilación ya que afectan la función y la estructura de la cromatina durante la apoptosis (Hajji & Joseph, 2010). Estudiar la histona 3 tiene gran importancia ya que es la histona que presenta más modificaciones (Bartsch *et al.*, 1996) y es necesaria para la regulación de la apoptosis.

Actividad transcripcional y postranscripcional durante la apoptosis.

Demostramos la presencia de la ARN polimerasa II en el área intercromatiniana durante la apoptosis y se pudo localizar hasta en los cuerpos apoptóticos. Coincidimos con estudios *in vivo* donde se indujo la apoptosis; la ARN pol II se encontró hasta la última etapa apoptótica (Padmanabhan *et al.*, 2015), en otros estudios concluyen que se necesita la ARN pol II para que se pueda llevar a cabo la apoptosis de manera correcta (Leuenroth & Crews, 2008). Sin embargo, otros estudios con células cancerosas indican que la inhibición de ARN pol II induce de manera eficaz la apoptosis (Poele *et al.*, 1999; Koumenis *et al.*, 1997; Derheimer *et al.*, 2005).

Estudios *in vitro* e *in vivo* de células de la granulosa han esclarecido el papel funcional de algunos microRNAs junto con sus vías de señalización de apoptosis, por ejemplo que miR-23a promueve la activación de la caspasa-3 a través del gen XIAP promoviendo la apoptosis de células granulosas; miR-26b promueve la apoptosis al inhibir la proteína antiapoptótica BCL-2. Se sabe que la expresión de miR-23a y miR-26b aumenta durante la atresia folicular, por lo que asumimos en nuestros resultados se observa la actividad transcripcional para la producción de los microRNAs que regulan a los factores apoptóticos (Worku *et al.*, 2018).

Según, Weipoltshammer & Schöfer, 2016 la presencia de ARN pol II está implicada en la transcripción por lo que nos sugiere que la maquinaria transcripcional se encuentra activa. Sin embargo, la ARN polimerasa II no se estudió en su forma hiperfosforilada en el dominio de repetición C-terminal (CTD), la cual nos aseguraría saber si realmente se encuentra activa la transcripción ya que se vincula físicamente a la transcripción: procesamiento del pre-ARNm y a los factores implicados en las modificaciones postranscripcionales: formación de la caperuza en el extremo 5', *splicing* y el procesamiento en el extremo 3' (Bartkowiak & Greenleaf, 2011; Hsin *et al.*, 2014).

En nuestros resultados, observamos que el factor de *splicing* SC35 se encuentra en forma de motas que corresponde a los gránulos intercromatinianos y a las fibras pericromatinianas (ambiente difuso de tinción). Encontramos que a través del proceso de apoptosis disminuye la cantidad de motas distribuidas en el área intercromatiniana, sobre todo en la etapa media de la apoptosis donde se observaron las motas más redondas. La importancia de las motas nucleares o *speckles* es que son estructuras muy dinámicas ya que los factores de *splicing* están continuamente yendo a los sitios de transcripción activa. Algunas investigaciones describen la inactivación de SC35 cuando se observan motas redondas, pérdida del material difuso que las rodea y disminución en cantidad de la misma (Jiménez-García, 2007; Álvarez *et al.*, 2003)

Se sabe que SC35 se localiza en la periferia de los complejos transcripcionales de ARN Pol II activos y en los componentes de *splicing*. Por tanto, la relación de la cinética de SC35 y ARN pol II que encontramos a través del proceso apoptótico coincide con Fraschin *et al.*, 2005; Lallena & Correas 1997 en donde indujeron la apoptosis con actinomicina D (AMD) para inhibir la ARN pol II y a su vez observaron que disminuye SC35. Por lo tanto, asumimos que aún existe la actividad postranscripcional en las primeras etapas apoptóticas, posiblemente para llevar a cabo la traducción inmediata de proteínas como caspasas y nucleasas, entre otras. Se ha demostrado que durante la apoptosis las células granulosas *in vitro* dependen de la transcripción y la traducción con el fin de hacer eficiente el proceso de muerte (Svanberg, 1999; Fu *et al.*, 2013).

Importancia de estudiar la atresia folicular.

Nuestro estudio se basó en la muerte celular apoptótica como un proceso fisiológico normal, desencadenado principalmente por factores epigenéticos, genéticos y citoplasmáticos de los folículos ováricos. Por lo tanto, es relevante estudiar la atresia folicular ya que tiene implicaciones biológicas y clínicas. En los organismos adultos, la atresia influye en la selección del folículo para la ovulación. Además, también se encuentran las funciones endocrinas debido a la gran cantidad de folículos atrésicos que retienen la actividad esteroidogénica (Hsueh *et al.*, 1994). Clínicamente, existen correlaciones entre la atresia folicular y las condiciones patológicas que conducen a la infertilidad y una insuficiencia ovárica prematura, donde hay un desequilibrio con los factores apoptóticos y sobrevivencia por lo que los folículos no se desarrollan adecuadamente (Conway, 2000; Matalliotakis *et al.*, 2006; Homburg & Amsterdam, 1998).

CONCLUSIONES

- En los folículos antrales atrésicos de ratas adultas Wistar, las células granulosas apoptóticas presentan diferentes grados de destrucción nuclear.
- A nivel óptico y ultraestructural la morfología apoptótica secuencial de las células granulosas se caracteriza por la presencia de un núcleo picnótico debido a la compactación de la cromatina, degradación citoplasmática y nuclear y formación de cuerpos apoptóticos.
- Las estructuras RNP's se conservan hasta el final del proceso apoptótico donde se distribuyen principalmente en el centro del núcleo.
- Las RNP's se almacenan en las estructuras citoplasmáticas HERDS.
- El nucléolo sufre segregación nucleolar del componente fibrilar denso y granular en las células apoptóticas avanzadas.
- Las proteínas nucleolina y nucleofosmina se distribuyen en el componente granular presente en la cromatina compacta de las células apoptóticas tardías.
- La regulación epigenética de la acetilación de la histona 3 decrece en la eucromatina a medida que avanza la apoptosis.
- La ARN pol II y el factor de *splicing* SC35 se presentan en el área intercromatiniana a lo largo de la apoptosis por lo que podrían modular la actividad transcripcional y postranscripcional en las células apoptóticas.

- En la apoptosis media SC35 se observa como un patrón moteado redondeado que perdió su parte difusa, por lo que sugerimos son células con actividad transcripcional y de *splicing* inactiva.
- Las proteínas NCL, NPM1, H3ac, ARN pol II y SC35 se observan en la periferia de los cuerpos apoptóticos.

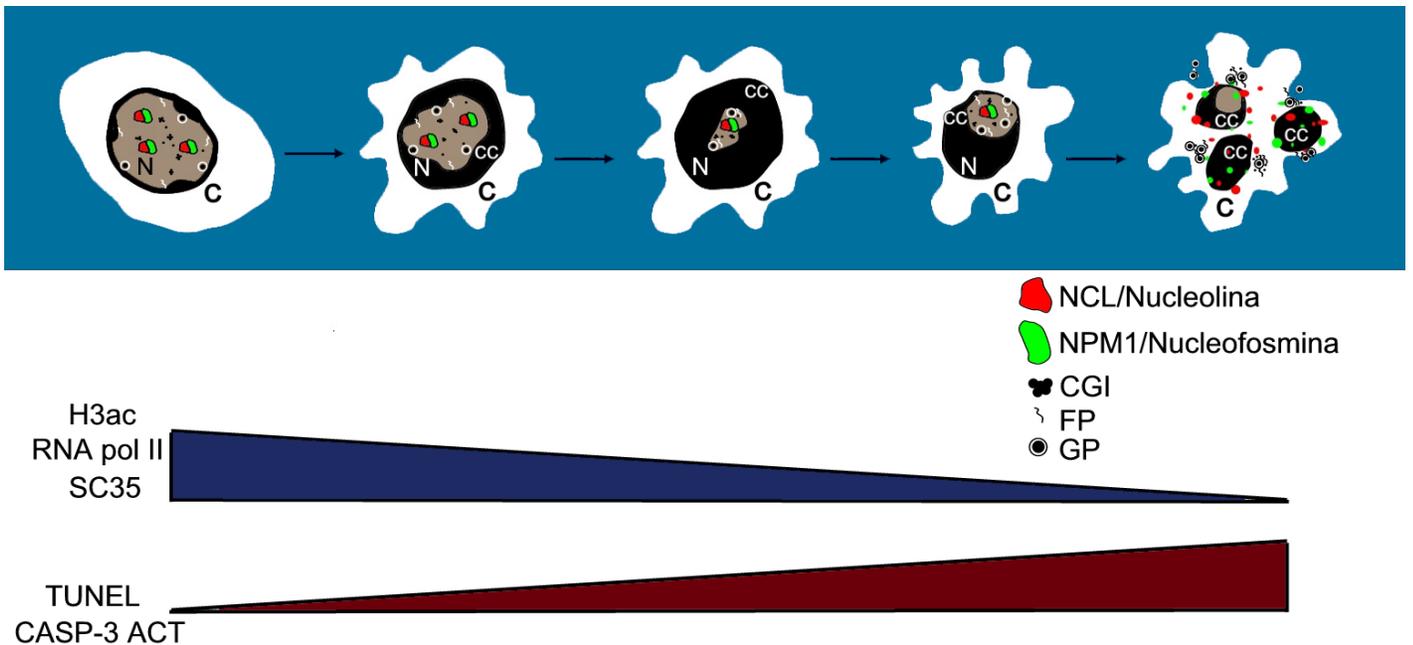


Figura 30. Modelo del comportamiento morfológico de las proteínas nucleolares y transcripcionales durante el curso de la apoptosis. El número de nucléolos se reduce y los componentes nucleolares se desensamblan; NCL y NPM1 se localizan en los restos del componente granular en la etapa tardía de la apoptosis.

Redistribución de las RNPs durante la compactación nuclear; en células apoptóticas tempranas se produce la segregación y agrupación de RNPs y en la apoptosis tardía las HERDS se extruyen en el citoplasma. Las proteínas H3ac, RNA pol II y el factor de *splicing* SC35 se presentan a lo largo de la apoptosis donde disminuyen gradualmente. La presencia de TUNEL y la caspasa-3 activa incrementan gradualmente a través de la muerte celular. C: citoplasma; N: núcleo; cc: cromatina compacta; CGI: cúmulo de gránulos intercromatinianos; FP: fibras pericromatinianas; GP: gránulos pericromatinianos

PERSPECTIVAS

Estudiar la ultraestructura nucleolar en células granulosas con muerte celular autofágica, paraptótica y necrótica.

Estudiar la morfología nuclear y actividad transcripcional de las células del cuerpo lúteo ya que sufren pérdida espontánea de su función celular y estructural para que se desarrolle un nuevo ciclo ovulatorio.

LITERATURA CITADA

- 1) Abdelmohsen, K., & Gorospe, M. (2012). RNA-binding protein nucleolin in disease. *RNA biology*, 9(6), 799-808.
- 2) Alberts, B., Johnson, A., Lewis, J., Morgan, D., Raff, M., Roberts, K., Walter, P., (2015). Chapter 18 Cell Death. In *Molecular cell biology* 6th edition. Garland science.
- 3) Allera, C., Lazzarini, G., Patrone, E., Alberti, I., Barboro, P., Sanna, P., & Balbi, C. (1997). The condensation of chromatin in apoptotic thymocytes shows a specific structural change. *Journal of Biological Chemistry*, 272(16), 10817-10822.
- 4) Allis, C. D., & Jenuwein, T. (2001). The molecular hallmarks of epigenetic control. *Nature Reviews Genetics*.
- 5) Álvarez, M., Estivill, X., & de la Luna, S. (2003). DYRK1A accumulates in splicing speckles through a novel targeting signal and induces speckle disassembly. *Journal of cell science*, 116(15), 3099-3107.
- 6) Aron, J. L., Parthun, M. R., Marcucci, G., Kitada, S., Mone, A. P., Davis, M. E., & Lucas, D. M. (2003). Depsipeptide (FR901228) induces histone acetylation and inhibition of histone deacetylase in chronic lymphocytic leukemia cells concurrent with activation of caspase 8-mediated apoptosis and down-regulation of c-FLIP protein. *Blood*, 102(2), 652-658.
- 7) Bartsch, J., Truss, M., Bode, J., & Beato, M. (1996). Moderate increase in histone acetylation activates the mouse mammary tumor virus promoter and remodels its nucleosome structure. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 93(20), 10741-10746.
- 8) Bartkowiak, B., & Greenleaf, A. L. (2011). Phosphorylation of RNAPII: To P-TEFb or not to P-TEFb?. *Transcription*, 2(3), 115-119.
- 9) Bernhard, W. (1969). A new staining procedure for electron microscopical cytology. *Journal of ultrastructure research*, 27(3-4), 250-265.
- 10) Biggiogera, M., Scherini, E., & Mareš, V. (1990). Ultrastructural cytochemistry of cis-dichlorodiammine platinum II induced apoptosis in immature rat cerebellum. *Acta histochemica et cytochemica*, 23(6), 831-839.
- 11) Biggiogera, M., Bottone, M. G., & Pellicciari, C. (1997a). Nuclear ribonucleoprotein-containing structures undergo severe rearrangement during spontaneous thymocyte

- apoptosis. A morphological study by electron microscopy. *Histochemistry and cell biology*, 107(4), 331-336.
- 12) Biggiogera, M., Bottone, M. G., Martin, T. E., Uchiumi, T., & Pellicciari, C. (1997b). Still immunodetectable nuclear RNPs are extruded from the cytoplasm of spontaneously apoptotic thymocytes. *Experimental cell research*, 234(2), 512-520.
 - 13) Biggiogera, M., Bottone, M. G., & Pellicciari, C. (1998). Nuclear RNA is extruded from apoptotic cells. *Journal of Histochemistry & Cytochemistry*, 46(9), 999-1005.
 - 14) Biggiogera, M., & Pellicciari, C. (2000). Heterogeneous ectopic RNP-derived structures (HERDS) are markers of transcriptional arrest. *The FASEB Journal*, 14(5), 828-834.
 - 15) Biggiogera, M., Bottone, M. G., Scovassi, A. I., Soldani, C., Vecchio, L., & Pellicciari, C. (2004). Rearrangement of nuclear ribonucleoprotein (RNP)-containing structures during apoptosis and transcriptional arrest. *Biology of the Cell*, 96(8), 603-615.
 - 16) Biggiogera, M., Cisterna, B., Bottone, M. G., Soldani, C., & Pellicciari, C. (2007). Nuclear RNP and nucleolar-associated proteins during apoptosis: a politically correct form of segregation. *Dynamic Cell Biol*, 1, 65-71.
 - 17) Björkman, N. (1962). A study of the ultrastructure of the granulosa cells of the rat ovary. *Cells Tissues Organs*, 51(1-2), 125-147.
 - 18) Boisvert, F. M., van Koningsbruggen, S., Navascués, J., & Lamond, A. I. (2007). The multifunctional nucleolus. *Nature reviews Molecular cell biology*, 8(7), 574-585.
 - 19) Boone, D. L., & Tsang, B. K. (1998). Caspase-3 in the rat ovary: localization and possible role in follicular atresia and luteal regression. *Biology of Reproduction*, 58(6), 1533-1539.
 - 20) Box, J. K., Paquet, N., Adams, M. N., Boucher, D., Bolderson, E., O'Byrne, K. J., & Richard, D. J. (2016). Nucleophosmin: from structure and function to disease development. *BMC molecular biology*, 17(1), 19.
 - 21) Brodowska, A., Brodowski, J., Laszczyńska, M., Słuczankowska-Głębowska, S., Rumianowski, B., Rotter, I. & Ratajczak, M. Z. (2014). Immunoexpression of aromatase cytochrome P450 and 17 β -hydroxysteroid dehydrogenase in women's ovaries after menopause. *Journal of ovarian research*, 7(1), 52.
 - 22) Brunelle, J. K., & Letai, A. (2009). Control of mitochondrial apoptosis by the Bcl-2 family. *Journal of cell science*, 122(4), 437-441.
 - 23) Budihardjo, I., Oliver, H., Lutter, M., Luo, X., & Wang, X. (1999). Biochemical pathways of caspase activation during apoptosis. *Annual review of cell and developmental biology*, 15(1), 269-290.
 - 24) Casiano, C. A., & Tan, E. M. (1996). Recent developments in the understanding of antinuclear autoantibodies. *International archives of allergy and immunology*, 111(4), 308-313.
 - 25) Chan, P. K., & Chan, F. Y. (1999). A study of correlation between NPM-translocation and apoptosis in cells induced by daunomycin. *Biochemical pharmacology*, 57(11), 1265-1273.
 - 26) Cmarko, D., Verschure, P. J., Martin, T. E., Dahmus, M. E., Krause, S., Fu, X. D., & Fakan, S. (1999). Ultrastructural analysis of transcription and splicing in the cell nucleus after bromo-UTP microinjection. *Molecular biology of the cell*, 10(1), 211-223.

- 27) Columbaro, M., Gobbi, P., Renò, F., Luchetti, F., Santi, S., Valmori, A., & Falcieri, E. (1998). A multiple technical approach to the study of apoptotic cell micronuclei. *Scanning: The Journal of Scanning Microscopies*, 20(8), 541-548.
- 28) Conway, G. S. (2000). Premature ovarian failure. *British medical bulletin*, 56(3), 643-649.
- 29) Derheimer, F. A., Chang, C. W., & Ljungman, M. (2005). Transcription inhibition: a potential strategy for cancer therapeutics. *European Journal of Cancer*, 41(16), 2569-2576.
- 30) Desai, N., Ludgin, J., Sharma, R., Anirudh, R. K., & Agarwal, A. (2017). Female and male gametogenesis. In *Clinical Reproductive Medicine and Surgery* (pp. 19-45). Springer, Cham.
- 31) Duvall, E., Wyllie, A. H., & Morris, R. G. (1985). Macrophage recognition of cells undergoing programmed cell death (apoptosis). *Immunology*, 56(2), 351.
- 32) Edson, M. A., Nagaraja, A. K., & Matzuk, M. M. (2009). The mammalian ovary from genesis to revelation. *Endocrine reviews*, 30(6), 624-712.
- 33) Escobar, M. L., Vázquez-Nin, G. H., & Echeverría, O. M. (2011). Brief Description of the Histological, Cytological and Functional Aspects of the Ovary. In *Cell Death in Mammalian Ovary* (pp. 3-24). Springer, Dordrecht.
- 34) Escobar, M. L., Echeverría, O. M., Casasa, A. S., García, G., Aguilar, S. J., & Vázquez-Nin, G. H. (2013). Involvement of pro-apoptotic and pro-autophagic proteins in granulosa cell death. *Cell Biology*, 1, 9-17.
- 35) Escobar, M. L., Echeverría, O. M., García, G., Ortiz, R., & Vázquez-Nin, G. H. (2015). Immunohistochemical and ultrastructural study of the lamellae of oocytes in atretic follicles in relation to different processes of cell death. *European journal of histochemistry: EJH*, 59(3).
- 36) Fakan, S., Leser, G., & Martin, T. E. (1984). Ultrastructural distribution of nuclear ribonucleoproteins as visualized by immunocytochemistry on thin sections. *The Journal of Cell Biology*, 98(1), 358-363.
- 37) Fakan, S. (2004). The functional architecture of the nucleus as analysed by ultrastructural cytochemistry. *Histochemistry and cell biology*, 122(2), 83-93.
- 38) Falcone, T., Hurd, W. W., & Abacan, C. (2007). *Clinical reproductive medicine and surgery*. pp.: 57
- 39) Falini, B., Nicoletti, I., Martelli, M. F., & Mecucci, C. (2007b). Acute myeloid leukemia carrying cytoplasmic/mutated nucleophosmin (NPMc+ AML): biologic and clinical features. *Blood*, 109(3), 874-885.
- 40) Felsenfeld, G., & Groudine, M. (2003). Controlling the double helix. *Nature*, 421(6921), 448.
- 41) Falini, B., Nicoletti, I., Bolli, N., Martelli, M. P., Liso, A., Gorello, P., & Martelli, M. F. (2007). Translocations and mutations involving the nucleophosmin (NPM1) gene in lymphomas and leukemias. *Haematologica*, 92(4), 519-532.
- 42) Frascini, A., Bottone, M. G., Scovassi, A. I., Denegri, M., Risueño, M. C., Testillano, P. S., & Pellicciari, C. E. (2005). Changes in extranucleolar transcription during actinomycin D-induced apoptosis.
- 43) Fu, Y., Lin, F., & Liu, H. (2013). Changes in the messenger RNA expression levels of Bcl-2 family members and caspase-8 and-3 in porcine ovarian follicles during follicular atresia. *Animal Science Journal*, 84(3), 222-230

- 44) Gartner, L. P., Hiatt, J. L., & Strum, J. M. (2015). Cell biology and histology. Williams & Wilkins.
- 45) Glamočlija, V., Vilović, K., Saraga-Babić, M., Baranović, A., & Sapunar, D. (2005). Apoptosis and active caspase-3 expression in human granulosa cells. *Fertility and sterility*, 83(2), 426-431.
- 46) Hajji, N., & Joseph, B. (2010). Epigenetic regulation of cell life and death decisions and deregulation in cancer. *Essays in biochemistry*, 48, 121-146.
- 47) Hendzel, M. J., Nishioka, W. K., Raymond y., Allis, C. D., Bazett-Jones, D. P., & Th'ng, J. P. (1998). Chromatin condensation is not associated with apoptosis. *Journal of Biological Chemistry*, 273(38), 24470-24478.
- 48) Hernandez-Verdun, D. (2011). Assembly and disassembly of the nucleolus during the cell cycle. *Nucleus*, 2(3), 189-194.
- 49) Hill, R. W., Wyse, G. A., Anderson, M., & Anderson, M. (2004). *Animal physiology* (Vol. 2).eMassachusetts Massachusetts: Sinauer Associates.
- 50) Hongmei, Z. (2012). Extrinsic and intrinsic apoptosis signal pathway review. In *Apoptosis and Medicine*. Intech.
- 51) Homburg, R., & Amsterdam, A. (1998). Polycystic ovary syndrome—loss of the apoptotic mechanism in the ovarian follicles?. *Journal of endocrinological investigation*, 21(9), 552-557.
- 52) Hozak, P., Roussel, P., & Hernandez-Verdun, D. (1992). Procedures for specific detection of silver-stained nucleolar proteins on western blots. *Journal of Histochemistry & Cytochemistry*, 40(8), 1089-1096.
- 53) Hsin, J. P., Xiang, K., & Manley, J. L. (2014). Function and control of RNA polymerase II CTD phosphorylation in vertebrate transcription and RNA processing. *Molecular and cellular biology*, MCB-00181.
- 54) Hsueh, A. J., Billig, H., & Tsafiriri, A. (1994). Ovarian follicle atresia: a hormonally controlled apoptotic process. *Endocrine reviews*, 15(6), 707-724.
- 55) Hughes JR, F. M., & Gorospe, W. C. (1991). Biochemical identification of apoptosis (programmed cell death) in granulosa cells: evidence for a potential mechanism underlying follicular atresia. *Endocrinology*, 129(5), 2415-2422.
- 56) Hunzicker-Dunn, M., & Mayo, K. (2006). Gonadotropin signaling in the ovary. *Elsevier/Academic Press: San Diego*.
- 57) Hussein, M. R. (2005). Apoptosis in the ovary: molecular mechanisms. *Human reproduction update*, 11(2), 162-178.
- 58) Hyatt, A. D., & Wise, T. G. (2001). Immunolabeling. In *Immunocytochemistry and In Situ Hybridization in the Biomedical Sciences* (pp. 73-107). Birkhäuser, Boston, MA.
- 59) Ireland, J. J., Mihm, M., Austin, E., Diskin, M. G., & Roche, J. F. (2000). Historical perspective of turnover of dominant follicles during the bovine estrous cycle: key concepts, studies, advancements, and terms. *Journal of Dairy Science*, 83(7), 1648-1658.
- 60) Jiménez-García, L., Vázquez, N, G. H., Echeverría, M, O. M., (2003). El núcleo interfásico. morfología y función. En *Biología celular y molecular*, 341.
- 61) Jiménez-García, L. F., Lara, M. Gil, C.I., Zamora, C.A., Salcedo, A. M., Agredano, M. L., Moncayo, S. J.J., Segura, V. M.L., (2007). Biología celular del splicing. *Mensaje bioquímico*, 31.

- 62) Kędzierska, H., & Piekiełko-Witkowska, A. (2017). Splicing factors of SR and hnRNP families as regulators of apoptosis in cancer. *Cancer Letters*.
- 63) Kerr, J. F., Wyllie, A. H., & Currie, A. R. (1972). Apoptosis: a basic biological phenomenon with wideranging implications in tissue kinetics. *British journal of cancer*, 26(4), 239.
- 64) Kerr, L. E., Birse-Archbold, J. L., Short, D. M., McGregor, A. L., Heron, I., Macdonald, D. C., & Sharkey, J. (2007). Nucleophosmin is a novel Bax chaperone that regulates apoptotic cell death. *Oncogene*, 26(18), 2554.
- 65) Klinger, F. G., & De Felici, M. (2011). Programmed cell death in fetal oocytes. In *Cell Death in Mammalian Ovary* (pp. 125-142). Springer, Dordrecht.
- 66) Knobil, E. (2006). *Knobil and Neill's physiology of reproduction* (Vol. 2). Gulf Professional Publishing.
- 67) Koumenis, C., & Giaccia, A. M. A. T. O. (1997). Transformed cells require continuous activity of RNA polymerase II to resist oncogene-induced apoptosis. *Molecular and cellular biology*, 17(12), 7306-7316.
- 68) Krajewska, M., Wang, H. G., Krajewski, S., Zapata, J. M., Shabaik, A., Gascoyne, R., & Reed, J. C. (1997). Immunohistochemical analysis of in vivo patterns of expression of CPP32 (Caspase-3), a cell death protease. *Cancer research*, 57(8), 1605-1613.
- 69) Kroemer, G., Galluzzi, L., Vandenabeele, P., Abrams, J., Alnemri, E. S., Baehrecke, E. H. & Hengartner, M. (2009). Classification of cell death: recommendations of the Nomenclature Committee on Cell Death 2009. *Cell death & differentiation*, 16(1), 3-11.
- 70) Kuhn, A., & Grummt, I. (1992). Dual role of the nucleolar transcription factor UBF: trans-activator and antirepressor. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 89(16), 7340-7344.
- 71) Kumagai, I., & Tsumoto, K. (2002). Antigen–antibody binding. *Encyclopedia of Life Sciences*, 1-7.
- 72) Lafarga, M., Lerga, A., Andres, M. A., Polanco, J. I., Calle, E., & Berciano, M. T. (1997). Apoptosis induced by methylazoxymethanol in developing rat cerebellum: organization of the cell nucleus and its relationship to DNA and rRNA degradation. *Cell and tissue research*, 289(1), 25-38.
- 73) Lallena, M. J., & Correas, I. (1997). Transcription-dependent redistribution of nuclear protein 4.1 to SC35-enriched nuclear domains. *Journal of Cell Science*, 110(2), 239-247.
- 74) Leuenroth, S. J., & Crews, C. M. (2008). Triptolide-induced transcriptional arrest is associated with changes in nuclear substructure. *Cancer research*, 68(13), 5257-5266.
- 75) Li, Q., McKenzie, L. J., & Matzuk, M. M. (2008). Revisiting oocyte–somatic cell interactions: in search of novel intrafollicular predictors and regulators of oocyte developmental competence. *Molecular human reproduction*, 14(12), 673-678.
- 76) Lin, S., Coutinho-Mansfield, G., Wang, D., Pandit, S., & Fu, X. D. (2008). The splicing factor SC35 has an active role in transcriptional elongation. *Nature structural & molecular biology*, 15(8), 819-826.
- 77) Lindemann, R. K., Gabrielli, B., & Johnstone, R. W. (2004). Histone-deacetylase inhibitors for the treatment of cancer. *Cell Cycle*, 3(6), 777-786.

- 78) Lindström, M. S., Jurada, D., Bursac, S., Orsolich, I., Bartek, J., & Volarevic, S. (2018). Nucleolus as an emerging hub in maintenance of genome stability and cancer pathogenesis. *Oncogene*, 1.
- 79) Manabe, N., Kimura, Y., Uchio, K., Tajima, C., Matsushita, H., Nakayama, M., & Miyamoto, H. (2002). Regulatory mechanisms of granulosa cell apoptosis in ovarian follicle atresia. In *Animal Cell Technology: Challenges for the 21st Century* (pp. 343-347). Springer, Dordrecht.
- 80) Martelli, A. M., Bortul, R., Bareggi, R., Grill, V., Narducci, P., & Zweyer, M. (1999). Biochemical and morphological changes in the nuclear matrix prepared from apoptotic HL-60 cells: Effect of different stabilizing procedures. *Journal of cellular biochemistry*, 74(1), 99-110.
- 81) Martelli, A. M., Robuffo, I., Bortul, R., Ochs, R. L., Luchetti, F., Cocco, L., & Falcieri, E. (2000). Behavior of nucleolar proteins during the course of apoptosis in camptothecin-treated HL60 cells. *Journal of cellular biochemistry*, 78(2), 264-277.
- 82) Mastrangelo, A. J., & Betenbaugh, M. J. (1998). Overcoming apoptosis: new methods for improving protein-expression systems. *Trends in biotechnology*, 16(2), 88-95.
- 83) Matalliotakis, I., Kourtis, A., Koukoura, O., & Panidis, D. (2006). Polycystic ovary syndrome: etiology and pathogenesis. *Archives of gynecology and obstetrics*, 274(4), 187-197.
- 84) McGee, E. A., & Hsueh, A. J. (2000). Initial and cyclic recruitment of ovarian follicles. *Endocrine reviews*, 21(2), 200-214.
- 85) Miranda, M. E., Tseng, C. E., Rashbaum, W., Ochs, R. L., Casiano, C. A., Di Donato, F., & Buyon, J. P. (1998). Accessibility of SSA/Ro and SSB/La antigens to maternal autoantibodies in apoptotic human fetal cardiac myocytes. *The Journal of Immunology*, 161(9), 5061-5069.
- 86) Misteli, T., & Spector, D. L. (1998). The cellular organization of gene expression. *Current opinion in cell biology*, 10(3), 323-331.
- 87) Mongelard, F., & Bouvet, P. (2007). Nucleolin: a multiFACeTed protein. *Trends in cell biology*, 17(2), 80-86.
- 88) Monneron, A., & Bernhard, W. (1969). Fine structural organization of the interphase nucleus in some mammalian cells. *Journal of ultrastructure research*, 27(3-4), 266-288
- 89) Nowak, S. J., & Corces, V. G. (2004). Phosphorylation of histone H3: a balancing act between chromosome condensation and transcriptional activation. *TRENDS in Genetics*, 20(4), 214-220.
- 90) O'Day, H.D., & Catalano, A., (2014). *Proteins of the nucleolus*. Springer.
- 91) Olson, M. O. J., & Dundr, M. (2005). The moving parts of the nucleolus. *Histochemistry and cell biology*, 123(3), 203-216.
- 92) Ochs, R. L. (1997). Chapter 14 Methods Used to Study Structure and Function of the Nucleolus. *Nuclear Structure and Function*, 53, 303.
- 93) Olson, M., (2011). The nucleolus. *Springer* New York
- 94) Ortiz, D. A., (2016). Cambios morfológicos en los núcleos de las células de la granulosa durante la atresia folicular en ratas. Tesis de licenciatura. Universidad Nacional Autónoma de México.

- 95) Padmanabhan, J., Brown, K. R., Padilla, A., & Shelanski, M. L. (2015). Functional role of RNA polymerase II and P70 S6 kinase in KCl withdrawal-induced cerebellar granule neuron apoptosis. *Journal of Biological Chemistry*, jbc-M114.
- 96) Pan, Z., Zhang, J., Li, Q., Li, Y., Shi, F., Xie, Z., & Liu, H. (2012). Current advances in epigenetic modification and alteration during mammalian ovarian folliculogenesis. *Journal of Genetics and Genomics*, 39(3), 111-123
- 97) Pang, J., Zeng, X., Xiao, R. P., Lakatta, E. G., & Lin, L. (2009). Design, generation, and testing of mammalian expression modules that tag membrane proteins. *Protein Science*, 18(6), 1261-1271.
- 98) Pellicciari, C., Bottone, M. G., Scovassi, A. I., Martin, T. E., & Biggiogera, M. (2000). Rearrangement of nuclear ribonucleoproteins and extrusion of nucleolus-like bodies during apoptosis induced by hypertonic stress. *European journal of histochemistry: EJH*, 44(3), 247.
- 99) Peluso, J. J., Steger, R. W., & Hafez, E. S. E. (1977). Surface ultrastructural changes in granulosa cells of atretic follicles. *Biology of reproduction*, 16(5), 600-604.
- 100) Petculescu-Ciochină, L., Păcală, N., & Dumitrescu, G. (2012). Cytohistological Changes of the Apoptosis Ovarian Follicles in the Puberty Mouse Ovary. *Scientific Papers Animal Science and Biotechnologies*, 45(2), 197-202.
- 101) Pierce, B. A. (2012). *Genetics: A conceptual approach*. Macmillan.
- 102) Pivko, J., Makarevich, A. V., Kubovičová, E., Ostro, A., Hegedušová, Z., & Louda, F. (2012). Histopathological alterations in the antral ovarian follicles in dairy cows with a tendency to emaciation. *Histology and histopathology*, 27(7), 1211.
- 103) Poele, R. H., Okorokov, A. L., & Joel, S. P. (1999). RNA synthesis block by 5, 6-dichloro-1-β-D-ribofuranosylbenzimidazole (DRB) triggers p53-dependent apoptosis in human colon carcinoma cells. *Oncogene*, 18(42), 5765.
- 104) Portela, A., & Esteller, M. (2010). Epigenetic modifications and human disease. *Nature biotechnology*, 28(10), 1057.
- 105) Porter, A. G., & Jänicke, R. U. (1999). Emerging roles of caspase-3 in apoptosis. *Cell death and differentiation*, 6(2), 99.
- 106) Puvion, E., & Puvion-Dutilleul, F. (1996). Ultrastructure of the nucleus in relation to transcription and splicing: roles of perichromatin fibrils and interchromatin granules. *Experimental cell research*, 229(2), 217-225.
- 107) Quirk, S. M., Cowan, R. G., Harman, R. M., Hu, C. L., & Porter, D. A. (2004). Ovarian follicular growth and atresia: the relationship between cell proliferation and survival. *Journal of animal science*, 82(13_suppl), E40-E52.
- 108) Rodgers, R. J., & Irving-Rodgers, H. F. (2010). Formation of the ovarian follicular antrum and follicular fluid. *Biology of reproduction*, 82(6), 1021-1029.
- 109) Rosen, A., & Casciola-Rosen, L. (1999). Autoantigens as substrates for apoptotic proteases: implications for the pathogenesis of systemic autoimmune disease. *Cell death and differentiation*, 6(1), 6.
- 110) Ross, M. H., & Pawlina, W. (2006). *Histology*. Lippincott Williams & Wilkins.
- 111) Roth, S. Y., Denu, J. M., & Allis, C. D. (2001). Histone acetyltransferases. *Annual review of biochemistry*, 70(1), 81-120.
- 112) SAGARPA (México). SENASICA [en línea]: NOM-062-ZOO-1999. Especificaciones técnicas para la producción, cuidado y uso de los animales de

- laboratorio. [fecha de consulta: 2018]. Disponible desde <http://www.sagarpa.gob.mx/Paginas/default.aspx>
- 113) Sánchez, Q., E. (2003) El ribosoma: estructura y función. En: *Biología celular y molecular*. Pag. 395-410 Ed. Prentice Hall.
 - 114) Scovassi, A. I., Bottone, M. G., Biggiogera, M., & Pellicciari, C. (2008). Dynamic relocation of nuclear proteins during the execution phase of apoptosis. *biochemical pharmacology*, 76(11), 1440-1450.
 - 115) Sendoel, A., & Hengartner, M. O. (2014). Apoptotic cell death under hypoxia. *Physiology*, 29(3), 168-176.
 - 116) Scott, D. D., & Oeffinger, M. (2016). Nucleolin and nucleophosmin: nucleolar proteins with multiple functions in DNA repair. *Biochemistry and Cell Biology*, 94(5), 419-432.
 - 117) Shalini, S., Dorstyn, L., Dawar, S., & Kumar, S. (2015). Old, new and emerging functions of caspases. *Cell death and differentiation*, 22(4), 526.
 - 118) Soldani, C., Bottone, M. G., Pellicciari, C., & Scovassi, A. I. (2009). Nucleolus disassembly in mitosis and apoptosis: dynamic redistribution of phosphorylated-c-Myc, fibrillarin and Ki-67. *European Journal of Histochemistry*, 50(4), 273-280.
 - 119) Spector, D. L., Ochs, R. L., & Busch, H. (1984). Silver staining, immunofluorescence, and immunoelectron microscopic localization of nucleolar phosphoproteins B23 and C23. *Chromosoma*, 90(2), 139-148.
 - 120) Spector, D. L., & Lamond, A. I. (2011). Nuclear speckles. *Cold Spring Harb Perspect Biol* 3: a000646.
 - 121) Strasser, A. (2005). The role of BH3-only proteins in the immune system. *Nature Reviews Immunology*, 5(3), 189.
 - 122) Strauss, J. F., & Williams, C. J. (2013). Ovarian Life Cycle. In *Yen and Jaffe's Reproductive Endocrinology (Eighth Edition)* (pp. 157-256).
 - 123) Sugimoto, M., Manabe, N., Kimura, Y., Myoumoto, A., Imai, Y., Ohno, H., & Miyamoto, H. (2001). Ultrastructural changes in granulosa cells in porcine antral follicles undergoing atresia indicate apoptotic cell death. *Journal of Reproduction and Development*, 44(1), 7-14.
 - 124) Svanberg, B. (1999). Apoptosis-the cellular mechanism of rat ovarian follicular atresia, A study on transcriptionally upregulated genes isolated with differential display of mRNA. Tesis doctoral. Universidad de Gotemburgo, Suecia.
 - 125) Tilly, J. L., Kowalski, K. I., Johnson, A. L., & Hsueh, A. J. (1991). Involvement of apoptosis in ovarian follicular atresia and postovulatory regression. *Endocrinology*, 129(5), 2799-2801.
 - 126) Tilly, J. L., Kowalski, K. I., Schomberg, D. W., & Hsueh, A. J. (1992). Apoptosis in atretic ovarian follicles is associated with selective decreases in messenger ribonucleic acid transcripts for gonadotropin receptors and cytochrome P450 aromatase. *Endocrinology*, 131(4), 1670-1676
 - 127) Tilly, J. L. (1993). Ovarian follicular atresia: a model to study the mechanisms of physiological cell death. *Endocrinol. J.*, 1, 67-72.
 - 128) Tilly, J. L. (2001). Commuting the death sentence: how oocytes strive to survive. *Nature reviews Molecular cell biology*, 2(11), 838.
 - 129) Tilly, J. L., Pru, J. K., & Rueda, B. R. (2004). Apoptosis in ovarian development, function, and failure. *The ovary*, 321-52.

- 130) Torres-Montaner, A., Bolívar, J., Astola, A., Gimenez-Mas, J. A., Brieva, J. A., & Valdivia, M. M. (2000). Immunohistochemical detection of ribosomal transcription factor UBF and AgNOR staining identify apoptotic events in neoplastic cells of Hodgkin's disease and in other lymphoid cells. *Journal of Histochemistry & Cytochemistry*, 48(11), 1521-1529.
- 131) Torres-Ramírez, N., Escobar, M. L., Vázquez-Nin, G. H., Ortiz, R., & Echeverría, O. M. (2016). Paraptosis-like cell death in Wistar rat granulosa cells. *Development, growth & differentiation*, 58(8), 651-663.
- 132) Townson, D. H., & Combelles, C. M. (2012). Ovarian follicular atresia. In *Basic Gynecology-Some Related Issues*. InTech.
- 133) Van Venrooij, W. J., & Pruijn, G. J. (1995). Ribonucleoprotein complexes as autoantigens. *Current opinion in immunology*, 7(6), 819-824.
- 134) Vazquez-Nin, G. H., & Sotelo, J. R. (1967). Electron microscope study of the atretic oocytes of the rat. *Zeitschrift für Zellforschung und Mikroskopische Anatomie*, 80(4), 518-533.
- 135) Vázquez-Nin, G., Echeverría, M., O. (2000). Introducción a la microscopia electrónica aplicada a las ciencias biológicas. Ed. Fondo de Cultura Económica, pp. 153
- 136) Vázquez-Nin, G. H., Escobar, M. L., & Echeverría, O. M. (2011). Follicular Atresia in Adult Animals. In *Cell Death in Mammalian Ovary* (pp. 203-219). Springer, Dordrecht.
- 137) Vázquez-Gutiérrez, J. L., & Langton, M. (2015). Current potential and limitations of immunolabeling in cereal grain research. *Trends in Food Science & Technology*, 41(2), 105-117.
- 138) Voss, T. C., & Hager, G. L. (2014). Dynamic regulation of transcriptional states by chromatin and transcription factors. *Nature Reviews Genetics*, 15(2), 69-81.
- 139) Watson, J. D. (2006). *Biología molecular del gen*. Ed. Médica Panamericana.
- 140) Xiang-Dong, F., & Maniatis, T. (1992). Isolation of a complementary DNA that encodes the mammalian splicing factor SC35. *Science*, 256(5056), 535.
- 141) Xingang, L., Weikai, C., Junxia, G., Guohui, C., & Yan, C. (2004). Regulation of histone acetylation and apoptosis by trichostatin in HL-60 cells. *Journal of Huazhong University of Science and Technology [Medical Sciences]*, 24(6), 572-574.
- 142) Weipoltshammer, K., & Schöfer, C. (2016). Morphology of nuclear transcription. *Histochemistry and cell biology*, 145(4), 343-358.
- 143) Williams, G. T., & Smith, C. A. (1993). Molecular regulation of apoptosis: genetic controls on cell death. *Cell*, 74(5), 777-779.
- 144) Worku, T., Rehman, Z. U., Talpur, H. S., Bhattarai, D., Ullah, F., Malobi, N., ... & Yang, L. (2017). MicroRNAs: New insight in modulating follicular atresia: A review. *International journal of molecular sciences*, 18(2), 333.
- 145) Yuan, W., & Giudice, L. C. (1997). Programmed cell death in human ovary is a function of follicle and corpus luteum status. *The Journal of Clinical Endocrinology & Metabolism*, 82(9), 3148-3155.
- 146) Zhang, J., Liu, Y., Yao, W., Li, Q., Liu, H., & Pan, Z. (2018). Initiation of follicular atresia: gene networks during early atresia in pig ovaries. *Reproduction*, 156(1), 23-33.