



**UNIVERSIDAD NACIONAL AUTÓNOMA  
DE MÉXICO**

---

---

**FACULTAD DE CIENCIAS**

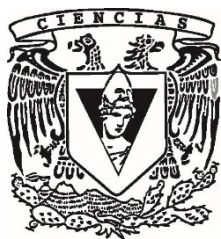
**DESCRIPCIÓN ULTRAESTRUCTURAL DEL  
NUCLÉOLO EN LA FASE DE CIGOTENO DE LA  
PROFASE MEIÓTICA I DE LA RATA**

**T E S I S**

**PARA OBTENER EL TÍTULO DE:**

**BIÓLOGO**

**P R E S E N T A:**



**DIEGO MONTESINOS VALENCIA**

**DIRECTORA DE TESIS:**

**DRA. ROSARIO ORTIZ HERNÁNDEZ**

**Ciudad Universitaria, CD. MX., 2019**



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

### 1. Datos del alumno

Apellido paterno  
Apellido materno  
Nombre  
Teléfono  
Universidad Nacional Autónoma de México  
Facultad  
Licenciatura  
Número de cuenta

### 1. Datos del alumno

Montesinos  
Valencia  
Diego  
78281718  
Universidad Nacional Autónoma de México  
Facultad de Ciencias  
Biología  
307304566

### 2. Datos del tutor

Grado  
Nombre(s)  
Apellido paterno  
Apellido materno

### 2. Datos del tutor

Dra.  
Rosario  
Ortiz  
Hernández

### 3. Datos del sinodal 1

Grado  
Nombre(s)  
Apellido paterno  
Apellido materno

### 3. Datos del sinodal 1

M. en C.  
Miguel Angel  
Palomino  
Garibay

### 4. Datos del sinodal 2

Grado  
Nombre(s)  
Apellido paterno  
Apellido materno

### 4. Datos del sinodal 2

Dr.  
Abrahan  
Hernández  
Hernández

### 5. Datos del sinodal 3

Grado  
Nombre(s)  
Apellido paterno  
Apellido materno

### 5. Datos del sinodal 3

Dr.  
Gabriel  
López  
Velázquez

### 6. Datos del sinodal 4

Grado  
Nombre(s)  
Apellido paterno  
Apellido materno

### 6. Datos del sinodal 4

Dra.  
Nayeli  
Torres  
Ramírez

### 7. Datos del trabajo escrito

Título

### 7. Datos del trabajo escrito

Descripción ultraestructural del nucléolo en la fase de cigoteno de la profase meiótica I de la rata

Número de páginas

77

Año

2019

## **Agradecimientos**

Agradezco a la Universidad Nacional Autónoma de México por ser mi alma máter.

A la Dra. Olga Margarita Echeverría Martínez y al Dr. Gerardo Hebert Vázquez-Nin por abrirme las puertas del laboratorio y del mundo de la microscopía electrónica. Gracias por sus constantes asesorías, apoyo técnico-académico y por ofrecerme las herramientas necesarias para mi formación profesional.

A la Dra. Rosario Ortiz Hernández por ser mi mentora durante todo este tiempo. Gracias por su apoyo técnico-académico, su enorme paciencia, comprensión, amistad y cariño que son invaluable para mí. Realmente me ha ayudado a ser un mejor estudiante y profesionista.

Al Dr. Abraham Hernández Hernández por el apoyo técnico y conceptual sobre el tema de meiosis, por sus cuestionamientos y asesorías ya que me ayudó a ver distintos puntos de vista y a incursionar en nuevas metodologías.

A la Dra. Nayeli Torres Ramírez por su apoyo técnico-académico. Gracias por sus observaciones, aportaciones a mi trabajo en general, su amistad y por ayudarme a incursionar en nuevas metodologías.

A los miembros del jurado conformado por el M. en C. Miguel Angel Palomino Garibay y el Dr. Gabriel López Velázquez. Gracias por sus observaciones, comentarios y aportaciones para mejorar mi trabajo.

A la Dra. Luisa Escobar Sánchez y a la M. en C. Silvia Juárez Chavero por todo el apoyo técnico durante mi estancia en el laboratorio y por ser de las primeras profesoras que me acercaron a la microscopía electrónica de transmisión.

Al proyecto PAPIIT N° IN225917 por el apoyo recibido.

## **Dedicatoria**

A mi madre Maricruz VG y a mi hermana Yazmin MV por su apoyo incondicional, su enorme paciencia, por todo el tiempo y anécdotas vividas. Gracias por el amor que constantemente me han brindado y que se sobrepone a todas las situaciones difíciles.

A mi padre Ramón MM, a mis tíos (Alejandro e Isabel) y a mi abuelito Andrés VG por su apoyo y afecto constante.

A todos mis amigos, a los de toda una vida (Leonardo, Adolfo, Miguel, Mary y Maya) y a los nuevos (Maximiliano, Atzimba y Judith). Gracias por su comprensión y afecto incondicional que va más allá de las complicaciones y de las distintas épocas.

A todas las mujeres en mi vida.

*“Si las puertas de la percepción se depurasen,  
todo aparecería al hombre como realmente es: infinito.*

*Pero el hombre se ha recluso en sí mismo hasta ver todas las cosas a través de las  
estrechas rendijas de su caverna”*

*William Blake*

## ÍNDICE

Abreviaturas	1
Índice de figuras	2
Resumen	3
I. INTRODUCCIÓN	4
I.1. Funcionalidad del nucléolo	4
I.1.1. Ciclo celular	4
I.1.2. Biogénesis de ribosomas	5
I.1.3. Nucléolo en la fase M (Mitosis)	8
I.1.4. Nucleologénesis	10
I.2. Estructura nucleolar	12
I.2.1. Centro fibrilar (FC)	12
I.2.2. Componente fibrilar denso (DFC)	12
I.2.3. Componente granular (GC)	13
I.2.4. Organizadores Nucleolares (NORs)	14
I.2.5. Nucleolina (C23)	15
I.2.6. Fibrilarina	15
I.2.7. Nucleofosmina (B23, numatrina)	16
I.3. Técnicas de visualización del nucléolo en microscopía electrónica de transmisión (MET)	17
I.3.1. Técnica regresiva EDTA	17
I.3.2. Impregnación argéntica (AgNOR)	18
I.3.3. Inmunolocalización ultraestructural	20
I.4. Meiosis (generalidades)	24
I.4.1. La meiosis dentro del proceso espermatogénico de <i>Rattus norvegicus</i>	25
II. ANTECEDENTES	28
III. JUSTIFICACIÓN	30

IV. HIPÓTESIS	30
V. OBJETIVOS	30
VI. METODOLOGÍA	31
VI.1. Obtención de las muestras biológicas	31
VI.2. Microscopía electrónica de transmisión (MET)	31
VI.2.1. Inclusión en resina epóxica (EPON)	31
VI.2.2. Inclusión en resina acrílica (Lowicryl K4M)	31
VI.2.3. Ultramicrotomía	32
VI.2.4. Contraste general UrPb	32
VI.2.5. Técnica regresiva EDTA preferencial para RNPs (Bernhard, 1969)	32
VI.2.6. Técnica AgNOR (Ploton <i>et al.</i> , 1986)	33
VI.2.7. Inmunolocalización ultraestructural	33
VI.3. Obtención de imágenes de MET	34
VII. RESULTADOS	35
VII.1. Los componentes nucleolares en la etapa de cigoteno presentan diversidad morfológica	35
VII.2. Los componentes nucleolares mantienen conexión entre ellos a través de las hebras de DFC	38
VII.3. Los espermatoцитos en cigoteno presentan de 2 a 3 Regiones del Organizador Nucleolar positivas al AgNOR	39
VII.4. Inmunolocalización ultraestructural de proteínas nucleolares	41
VI.4.1. Nucleolina	41
VI.4.2. Nucleofosmina	43
VII.5. Comparación con otros estadios	45
VIII. DISCUSIÓN	47
IX. CONCLUSIONES	63
Referencias	64
Anexo	76

## Abreviaturas

<i>Abreviatura</i>	<i>Descripción</i>
Abs	Anticuerpos
AgNOR	Técnica argéntica para regiones organizadoras del nucléolo
Ags	Antígenos
B23	Nucleofosmina, proteína del componente granular
C23	Nucleolina, proteína del componente fibrilar denso
DFC	Componente fibrilar denso
DNA	Ácido desoxirribonucleico
DNPs	Desoxirribonucleoproteínas
EDTA	Ácido etilendiaminotetraacético
EPON	Resina epóxica (hidrofóbica)
FC	Centro fibrilar
GC	Componente granular
IgG	Inmunoglobulina G
MET	Microscopía electrónica de transmisión
NDF	Foci nucleolares
NE	Envoltura nuclear
NoLS	Señal de localización nucleolar
NORs	Regiones organizadoras del nucléolo
PBS	Solución amortiguadora de fosfatos
PNB	Cuerpo prenucleolares
PR	Región pericromosómica
pre-rRNA	Precursor del RNA ribosomal
rDNA	DNA ribosomal
RNA	Ácido ribonucleico
RNA pol I	RNA polimerasa tipo I
RNA pol III	RNA polimerasa tipo III
RNPs	Ribonucleoproteínas
rRNA	RNA ribosomal
snoRNA	Pequeño RNA nucleolar
SUMO	Pequeña proteína modificadora tipo ubiquitina
UBF	Factor de transcripción de unión río arriba
UrPb	Contraste general uranilo-plomo



## Índice de figuras

<i>No. de figura</i>	<i>Pie de figura</i>
Figura 1	Esquema general del transcrito de rRNA 45S y su procesamiento
Figura 2	Modelo de la biogénesis de ribosomas
Figura 3	Etapas de la mitosis
Figura 4	Ensamblado y desensamblado del nucléolo durante la mitosis
Figura 5	Esquema de la dinámica del nucléolo en el ciclo celular de células humanas
Figura 6	Micrografía electrónica del nucléolo de una célula somática de ratón
Figura 7	Modelo tridimensional del cromosoma metafásico no. 13 del humano.
Figura 8	Diagrama de los tres compartimentos del nucléolo y la ubicación de algunas de las proteínas nucleolares más estudiadas
Figura 9	Micrografía electrónica del nucléolo de una célula del páncreas de rata con la técnica de EDTA
Figura 10	Núcleos y cromosomas de células cancerígenas humanas con la técnica AgNOR
Figura 11	Esquema de una inmunoglobulina IgG
Figura 12	Esquema de la interacción del paratope de la inmunoglobulina y el epítipo del antígeno
Figura 13	Esquematación de los métodos de inmunodetección directo e indirecto
Figura 14	Inmunodetección electrónica de B23 y C23 en el nucléolo de una célula HeLa
Figura 15	Eventos en la profase meiótica I
Figura 16	Esquema general del proceso espermatogénico
Figura 17	Esquema del túbulo seminífero
Figura 18	Esquema de las XIV etapas del ciclo del epitelio seminífero de la rata
Figura 19	Micrografía electrónica de túbulo seminífero de rata
Figura 20	Micrografías electrónicas de una célula de Sertoli y de espermatoцитos primarios (UrPb)
Figura 21	Micrografías electrónicas de espermatoцитos en la fase de cigoteno con contraste UrPb y técnica regresiva EDTA preferencial para ribonucleoproteínas
Figura 22	Micrografías electrónicas de cortes seriados de un espermatoцитo en la etapa de cigoteno que muestra la estructura nucleolar
Figura 23	Cortes seriados que muestran la relación que mantienen los componentes nucleolares mediante las hebras de DFC
Figura 24	Micrografías electrónicas de espermatoцитos con la técnica AgNOR
Figura 25	Micrografías electrónicas de estructuras nucleolares de espermatoцитos en la fase de cigoteno con la técnica AgNOR
Figura 26	Inmunodetección de nucleolina en un espermatoцитo en la fase de cigoteno
Figura 27	Inmunolocalización ultraestructural de nucleolina en el nucléolo de espermatoцитos en la fase de cigoteno
Figura 28	Inmunolocalización ultraestructural de nucleofosmina en el nucléolo de espermatoцитos en la fase de cigoteno
Figura 29	Inmunolocalización ultraestructural de nucleofosmina en el nucléolo de espermatoцитos en la fase de cigoteno
Figura 30	Micrografías del nucléolo de espermatoцитos en la fase de leptoteno
Figura 31	Micrografías del nucléolo de espermatoцитos en la fase de paquiteno
Figura 32	Modelo del movimiento cromosómico durante la profase meiótica I
Figura 33	Esquema de corte de las muestras

## Resumen

El nucléolo se concibe como el dominio nuclear donde se concentra la maquinaria requerida para la generación y maduración de las subunidades que conforman los ribosomas. A nivel ultraestructural consta de tres componentes: el centro fibrilar (FC), el componente fibrilar denso (DFC) y el componente granular (GC). Durante la profase mitótica los componentes del nucléolo se disgregan y cesa la actividad transcripcional, es hasta la telofase tardía e interfase temprana que el nucléolo se restituye con la fusión de los cuerpos prenucleolares alrededor de las regiones organizadoras del nucléolo y se reinicia la transcripción de los pre-rRNAs.

Durante la meiosis algunas investigaciones refieren cambios en la estructura nucleolar, sin embargo, las descripciones ultraestructurales han dejado de lado los primeros estadios de la profase meiótica I como lo es la etapa de cigoteno.

En este trabajo se utilizaron muestras de testículo de rata adulta, las cuales fueron procesadas para microscopía electrónica de transmisión (MET). Se obtuvieron cortes ultrafinos del túbulo seminífero de la rata y se identificaron los espermatoцитos en la etapa de cigoteno conforme a las asociaciones celulares del ciclo del epitelio seminífero. Mediante técnicas convencionales de MET e inmunodetecciones ultraestructurales de nucleolina y nucleofosmina, se observó y describió las características ultraestructurales del nucléolo y sus componentes.

Las micrografías electrónicas muestran que durante la etapa de cigoteno los nucléolos de los espermatoцитos tienen una gran heterogeneidad de formas, pero mantienen una estructura tripartita. Se observaron cambios morfológicos importantes del DFC y del GC: el DFC se muestra como el componente más prominente mientras que el GC parece estar ausente, sin embargo, mediante la inmunodetección de nucleofosmina se postula que el GC está presente, pero se encuentra adosado al DFC.

En este trabajo se postula que la disgregación de los componentes nucleolares durante la etapa de cigoteno parece no ser sustentada debido a que se observaron en íntima relación el FC, DFC y GC. Además, las modificaciones morfológicas observadas podrían deberse al estado de actividad y a eventos propios de los espermatoцитos durante la profase meiótica I.

# I. INTRODUCCIÓN

El nucléolo es un dominio del núcleo celular altamente dinámico y plurifuncional (Boisvert *et al.*, 2007), es la expresión morfológica de la biogénesis de ribosomas (Mélèse & Xue, 1995) y parte de los procesos moleculares que ocurren dentro de este determinan su organización estructural (Hadjiolov, 1985). Fue descrito por primera vez por Felice Fontana en 1774 como una mancha dentro de un cuerpo oviforme (núcleo) (Terence & Graham, 2011), pero no fue hasta 1839 que Valentin acuñó el término nucléolo (nuececilla) para referirse a esta estructura (Shaw, 2015); en el siglo XIX diversos citólogos con ayuda del microscopio óptico describieron su variabilidad morfológica (Montgomery, 1898) y ya para el siglo XX con el desarrollo de distintas metodologías de estudio y el auge de las nuevas tecnologías fue posible evidenciar que en él se concentraban los genes ribosomales y la maquinaria necesaria para la transcripción y el procesamiento del rRNA.

## I.1. Funcionalidad del nucléolo

### I.1.1. *Ciclo celular*

El nucléolo es sensible a los cambios de la célula durante su ciclo de vida, parte de esta respuesta se vincula con la función que tiene en la biogénesis de ribosomas; los cambios en la tasa de síntesis proteica durante la fase de crecimiento y de alta actividad metabólica influyen en su dinámica ya que de él depende que se aporten las subunidades ribosomales requeridas durante estas etapas (Alberts *et al.*, 2002; Raska *et al.*, 2004). Durante el ciclo celular de los eucariontes superiores se tiene registrado que la producción de ribosomas comienza a finales de la mitosis, aumenta durante G1, es máxima durante G2 y se detiene durante la profase mitótica (Alberts *et al.*, 2002; Sirri *et al.*, 2008). La dinámica nucleolar permanece durante toda la interfase y se ha demostrado que hay relación entre la maquinaria nucleolar y distintas modificaciones post-traduccionales (sumoilación y fosforilación) de proteínas específicas que están involucradas con procesos de regulación y con la progresión del ciclo celular (Boisvert *et al.*, 2007).

La sumoilación es una modificación covalente reversible efectuada por una pequeña proteína modificadora tipo ubiquitina (SUMO, *small ubiquitin-like modifier*) y se han descrito un gran número de proteasas específicas que eliminan las cadenas SUMO de sustratos proteicos. En el nucléolo se ha identificado la presencia predominante de la proteasa SENP5 cuya actividad

podría ser necesaria para la correcta continuidad del ciclo celular; algunos estudios evidencian que al ser alterada su funcionalidad de manera experimental se producen defectos en la división celular y una morfología nuclear aberrante (Boisvert *et al.*, 2007; Sirri *et al.*, 2008).

Un ejemplo de regulación mediante fosforilación (en humanos) es el caso de la proteína fosfatasa 1 (PP1), ésta es una serina-trionina fosfatasa ubicua que tiene tres isoformas activas: PP1 $\alpha$ , PP1 $\beta$  /  $\delta$  y PP1 $\gamma$ , las cuales tienen patrones específicos de localización que regulan varios procesos celulares como la división celular (Dimario, 2004; Hernandez-Verdun, 2011). Para el caso de la isoforma PP1 $\gamma$  se ha descrito su acumulación en el nucléolo durante la interfase, pero al entrar la mitosis su ubicación se vuelve difusa en el citoplasma, parte de la PP1 $\gamma$  se concentra en los cinetocoros y otra parte queda en el citoplasma hasta la etapa de anafase donde la PP1 $\gamma$  migra rápidamente del citoplasma a los cromosomas (Boisvert *et al.*, 2007; Nagata & Takeyasu, 2007). Se presume que esta relocalización se vincula con la condensación cromosómica, además se ha observado que una gran cantidad de PP1 $\gamma$  permanece asociada a la cromatina y luego se acumula nuevamente en el nucléolo en la siguiente interfase, esta distribución regulada sugiere que el nucléolo contribuye en la segregación cromosómica y probablemente en la citocinesis (Boisvert *et al.*, 2007).

En el nucléolo también ocurre el secuestro de proteínas específicas como la transcriptasa inversa de telomerasa, ésta es una enzima que agrega secuencias repetidas de nucleótidos a las porciones teloméricas de los cromosomas. Dicha proteína permanece secuestrada en el nucléolo hasta el momento en que los telómeros se replican en las últimas etapas de la fase S (Dimario, 2004; Boisvert *et al.*, 2007). La retención de la telomerasa en el nucléolo está mediada por la unión que tiene ésta con la proteína nucleolar nucleolina, por tal motivo se propone que dicha unión podría garantizar el momento adecuado de actividad de la telomerasa durante la replicación del DNA (Boisvert *et al.*, 2007; Olson, 2011).

### I.1.2. *Biogénesis de ribosomas*

El principal proceso por el que ha sido caracterizado el nucléolo y su dinámica es la biogénesis de ribosomas (Hadjiolov, 1985; Raska *et al.*, 2004); ésta comienza con la transcripción del rDNA localizado en la periferia de los centros fibrilares (FCs) por parte de la RNA polimerasa I (RNA pol I). La transcripción se lleva a cabo en el borde entre el FC y

el componente denso fibrilar (DFC) dando origen al transcrito 45S (Hernandez-Verdun, 2011). Las diferentes etapas del procesamiento están organizadas en regiones consecutivas que rodean los sitios de transcripción y algunos autores consideran que la organización funcional del nucléolo se relaciona con el procesamiento bioquímico de los transcritos nacientes (Beven *et al.*, 1996; Nagata & Takeyasu, 2007). El procesamiento de los pre-rRNAs es bastante complejo e involucra distintas proteínas que regulan eventos de escisión (endonucleasas y exonucleasas), metilación (metil-transferasas) y pseudouridilación (pseudouridina sintasas); diversos autores convergen en que las modificaciones tempranas ocurren a lo largo del DFC donde se concentran distintas ribonucleoproteínas (RNPs) y el procesamiento tardío ocurre en el componente granular (GC) (Raska *et al.*, 2004; Shaw, 2015).

Una vez que ha sido transcrito el precursor 45S es necesario que se escinda y se procese con alrededor de 70 proteínas ribosomales para dar origen a los rRNAs 18S, 5.8S y 28S (Tschochner & Hurt, 2003). El pre-rRNA 45S consta de un espaciador transcrito externo 5' (5'ETS o ETS) seguido de la secuencia del rRNA 18S, el espaciador interno 1 (ITS1), la secuencia del rRNA 5.8S, el ITS2, la porción del rRNA 28S y por último el 3'ETS (Fig. 1) (Hadjiolov, 1985; Raska *et al.*, 2004, Derenzini *et al.*, 2006).

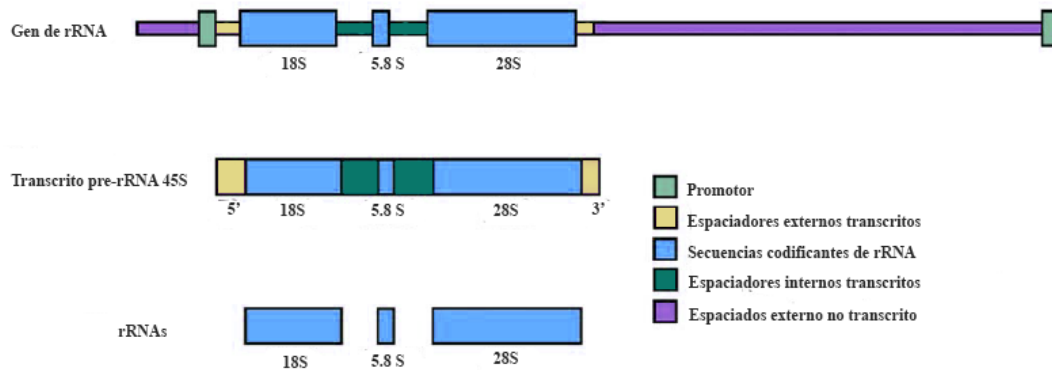


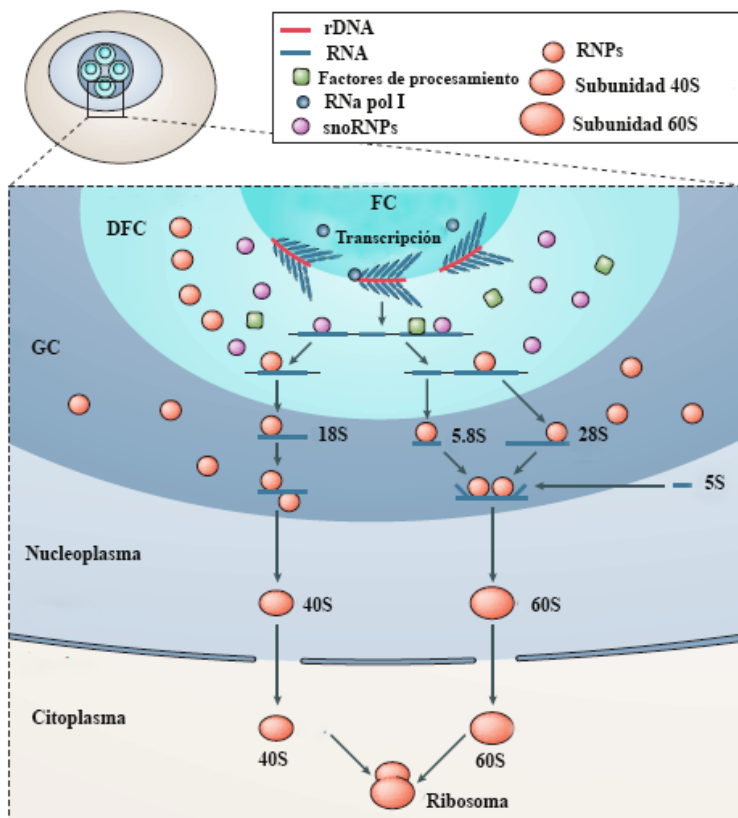
Figura 1. Esquema general del transcrito de rRNA 45S y su procesamiento. Tomado y modificado de Raska *et al.* (2004).

En las etapas consecutivas de procesamiento se remueve primero las secuencias 5'ETS, 3'ETS y posteriormente la región ITS1; en el caso de levaduras y mamíferos las porciones de los ITS se eliminan en dos pasos separados, en el primer paso se produce el rRNA 18S y en el segundo se originan los rRNAs 5.8S y 28S; este procesamiento ocurre inmediatamente después de la transcripción e incluso puede comenzar antes de que esta finalice (Shaw, 2015).

Estudios *in situ* utilizando sondas marcadas que detectan la región ETS del pre-rRNA muestran su ubicación alrededor de los sitios donde se lleva a cabo la síntesis del precursor y que pertenecen al DFC del nucléolo, en el caso de las sondas que detectan la porción ITS1 (la cual se escinde posteriormente) muestran su localización en zonas del GC (Shaw, 2015).

Dentro de las proteínas nucleolares que participan en las etapas tempranas de procesamiento del pre-rRNA se encuentran la fibrilarina, la nucleolina y el snoRNA U3 las cuales se ubican a lo largo del DFC (Biggiogera *et al.*, 1989; Jiménez-García *et al.*, 1994; Ginisty *et al.*, 1998, 2000; Olson, 2011). Por otro lado, proteínas involucradas en etapas intermedias y finales de procesamiento como la nucleofosmina (B23), la Nop 52 y el snoRNA MRP (involucrado en la escisión del ITS1) localizan en el GC (Biggiogera *et al.*, 1989; Boisvert *et al.*, 2007; Olson, 2011).

En etapas finales del procesamiento, la interacción entre los rRNAs 18S con diversas RNPs producen la subunidad pequeña de los ribosomas 40S, pero para generar la subunidad grande 60S es necesario otra molécula de rRNA que es sintetizada fuera del nucléolo (Raska *et al.*, 2004; Hernandez-Verdun, 2006). El rRNA 5S es transcrito por la RNA pol III en distintas regiones cromosómicas separadas del rDNA; una vez sintetizado, es importado al nucléolo



para interactuar con las RNPs y los rRNAs 5.8S y 28S para originar la subunidad 60S del ribosoma (Fig. 2) (Alberts *et al.*, 2002; Tschochner & Hurt, 2003).

Figura 2. Modelo de la biogénesis de ribosomas. Tomado y modificado de Boisvert *et al.* (2007).

### I.1.3. Nucléolo en la fase M (Mitosis)

La mitosis es un tipo de división celular que se lleva a cabo tanto en células haploides como en células diploides y poliploides, en ésta se conserva el número cromosómico y se generan nuevas células para el crecimiento y manutención de un organismo (Cooper *et al.*, 2007). El proceso mitótico corresponde a la fase M del ciclo celular, está compuesto por una división nuclear donde se reparten de manera equitativa las moléculas replicadas de DNA y se forman los dos núcleos de las células hijas con una carga genética idéntica entre sí, a esto le sigue una fase de citocinesis que es el proceso por el cual se divide en dos paquetes el citoplasma para conformar finalmente a las células hijas (Karp, 2008; Lodish *et al.*, 2012). De manera general se divide a la mitosis en 6 etapas (Fig. 3).

Figura 3. Etapas de la mitosis. Tomado de Leblond & El-Alfy (1998).

Etapa	Características
Profase	Durante esta etapa los cromosomas sufren condensación. Comienza a ensamblarse la maquinaria mitótica.
Prometafase	Abarca desde la ruptura de la envoltura nuclear hasta la aparición de los cromosomas metafásicos. Se forma el huso mitótico definitivo y los cromosomas se mueven a una posición central.
Metafase	Todos los cromosomas se alinean en el ecuador del huso cromático.
Anafase	Durante esta etapa se separan las cromátidas hermanas.
Telofase	El huso mitótico se desensambla, vuelve a formarse la envoltura nuclear y los cromosomas se dispersan.
Citocinesis	Se da la división física del citoplasma para dar origen a las dos células hijas.

Durante la mitosis la célula invierte la mayor parte de su energía en la separación cromosómica por lo que adquiere un estado relativo de deficiencia de respuesta a estímulos externos, gran parte de las actividades metabólicas de la célula como la transcripción y la traducción se detiene, aunado a esto hay una serie de eventos, cambios morfológicos y citoquímicos importantes (Dimario, 2004; Boisvert *et al.*, 2007; Sirri *et al.*, 2008).

Dentro de los cambios importantes en la división mitótica está el desensamblado del nucléolo (Fig. 4). A principio de la profase se incrementan los niveles de la ciclina B1/CDK1, esto provoca la fosforilación de los componentes de la maquinaria de transcripción del rDNA entre los que se encuentran el factor de transcripción SL1 y el factor terminador de la transcripción-1 (TTF1), los transcritos nacientes se mantienen asociados con otros componentes del DFC mientras que la hiperfosforilación de componentes del complejo de pre-iniciación de la RNA polimerasa 1 detonan el desensamblado de los compartimentos nucleolares, la redistribución inicia con la pérdida de la subunidad RPA39 de la RNA pol1 del FC antes de la desaparición de la envoltura nuclear (Heix *et al.*, 1998; Boisvert *et al.*, 2007).

Mientras que parte de la maquinaria de transcripción del rDNA permanece asociada a la región activa de los organizadores nucleolares (NORs) como el factor de unión

ascendente (UBF), el cual permanece asociado a los NORs durante toda la mitosis, otras subunidades de la RNA pol 1 como la RPA39, RPA16, RPA20 y RPA194 se disocian progresivamente hasta llegar a la metafase donde desaparecen y reaparecen hasta la etapa de anafase (Chen *et al.*, 2005; Sirri *et al.*, 2008). Por otro lado, la maquinaria de procesamiento no permanece asociada a los NORs, tal es el caso de las proteínas fibrilarina y nucleofosmina,

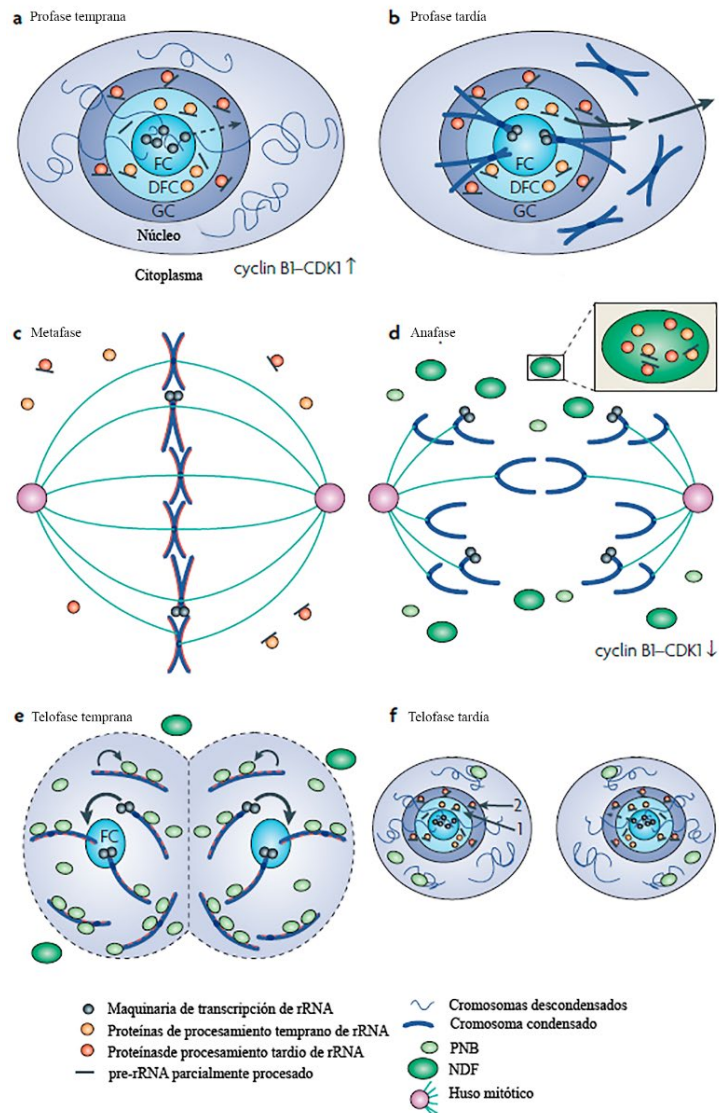


Figura 4. Ensamblado y desensamblado del nucléolo durante la mitosis. Tomado y modificado de Boisvert (2007).



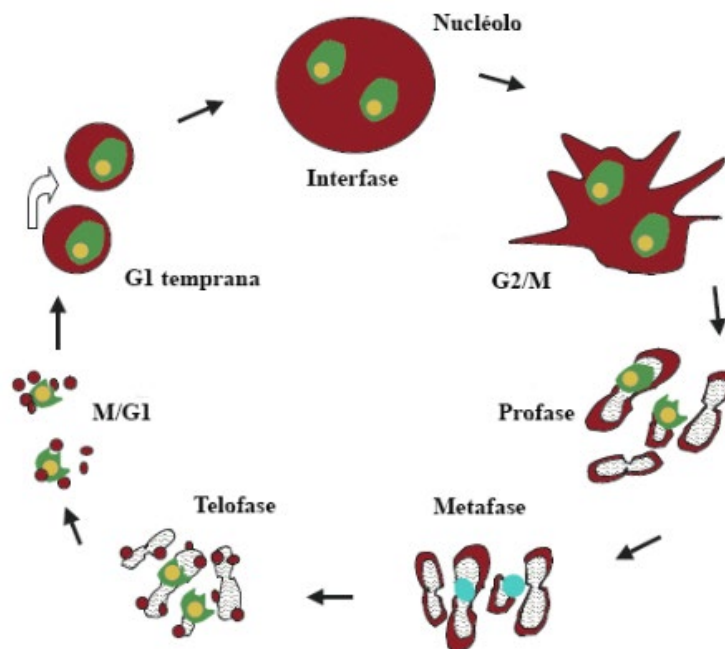
las cuales abandonan el DFC y el GC (respectivamente) del nucléolo una vez que ha cesado la transcripción del rDNA y se ha perdido la subunidad de la RNA pol 1 del FC (Dundr *et al.*, 2000; Boisvert *et al.*, 2007). Pese a que los componentes nucleolares involucrados en el procesamiento del rRNA se redistribuyen mayoritariamente hacia el citoplasma y no permanecen unidos a los NORs, otros más como algunas ribonucleoproteínas, pre-rRNAs, fibrilarina y U3 snoRNA (pequeño RNA nucleolar U3) permanecen asociados a la región pericromosómica (PR) del cromosoma condensado.

En anafase se mantienen asociados algunos componentes nucleolares en la PR mientras que otros comienzan a empaquetarse en partículas citoplasmáticas grandes llamadas foci nucleolares (NDF, *nucleolus-derived foci*) las cuales tienen una alta movilidad y contienen proteínas de procesamiento temprano y tardío del rRNA (Dundr *et al.*, 2000). En etapas tardías de la anafase y tempranas de la telofase los niveles de ciclina B1-CDK1 disminuyen provocando la reactivación de la transcripción del rDNA, la NE comienza a restaurarse y las partículas de los NDF pasan a través ella provocando una disminución progresiva de NDF en el citoplasma hasta finalmente desaparecer en la etapa de G1, durante la telofase algunos complejos de procesamiento entran al núcleo donde eventualmente son incorporados dentro de los cuerpos pre-nucleolares (PNBs) los cuales son estructuras redondas fibrogranulares que miden de 0.6 a 1  $\mu\text{m}$  de diámetro y su contenido es similar al de los NDF ya que contienen RNPs, snoRNAs y pre-RNAs parcialmente procesados (Ochs *et al.*, 1985; Jiménez-García *et al.*, 1994; Dundr *et al.*, 2000). A la vez que la PR se rompe, los cromosomas comienzan a descondensarse y la mayoría de los componentes nucleolares se incorporan a los PNB, los cuales proveen los componentes necesarios para la formación del nucléolo post-mitótico (Ochs *et al.*, 1985; Dundr *et al.*, 2000; Boisvert *et al.*, 2007).

#### I.1.4. *Nucleologénesis*

Retomando la dinámica del nucléolo durante la mitosis, se sabe que éste se desensambla durante la profase mitótica y se re-ensambla durante la telofase tardía casi G1. A este proceso de restructuración del nucléolo se le denomina nucleologénesis. Para que se re-ensamble el nucléolo es necesario que se lleven a cabo dos eventos importantes: la reactivación de la maquinaria de transcripción y el reclutamiento de la maquinaria de procesamiento a partir de la fusión de los PNBs (Dimario, 2004).

La reformación del nucléolo inicia en la anafase tardía cuando el material nucleolar comienza a asociarse en la vecindad de los cromosomas, al mismo tiempo que se inicia la transcripción del rDNA contenido en los NORs por parte de la pol I; los componentes nucleolares específicos que están presentes en la PR son liberados de los cromosomas descondensados y comienzan a asociarse con los PNBs. Posteriormente los PNBs los cuales contienen proteínas involucradas en el procesamiento de rRNA como la fibrilarina y la nucleofosmina, se fusionan alrededor de los NORs en telofase e interfase temprana, así mismo los PNBs se desdoblán y se interconectan para formar la región fibrilar del nucléolo y la región granular, propiciando con esto las condiciones adecuadas para la formación del nucléolo interfásico maduro (Fig. 5) (Jiménez-García *et al.*, 1994; Hernandez-Verdun *et al.*, 2002; Dimario, 2004; Boisvert *et al.*, 2007; Muro *et al.*, 2010; Hernandez-Verdun, 2011).



*Figura 5.* Esquema de la dinámica del nucléolo en el ciclo celular de células humanas. Durante la interfase el nucléolo consta de 3 partes: FC (amarillo), DFC (verde) y CG (rojo). Durante las distintas fases del ciclo células la dinámica de los compartimentos varía. En la transición G2/M parte de la maquinaria nucleolar abandona al nucléolo y otra parte permanece asociada a los cromosomas condensados durante la profase. Durante la metafase se abate la transcripción de la RNA pol I y los FC están inactivos (azul). La reactivación de la actividad transcripcional está acompañada con el reclutamiento de la maquinaria de procesamiento a finales de la telofase. En la transición M/G1 se reforman el nucléolo a partir de los PNB. Tomado y modificado de Hernandez-Verdun *et al.* (2002).

## I.2. Estructura nucleolar

El tamaño, la forma y la estructura del nucléolo varía entre los tipos celulares como entre las especies, pero de acuerdo con la nomenclatura introducida por Busch y Smetana (1970), y Jordan (1979) se diferencian tres regiones o compartimentos: el centro fibrilar (FC), el componente fibrilar denso (DFC) y el componente granular (GC) (Fig. 6) (Jordan & Cullis, 1982; Shaw & Jordan, 1995). Por otro lado, en 1974 Smetana y Busch a partir de las diferencias morfológicas de los componentes nucleolares, definen tres tipos de nucléolos: los que tienen una forma anular, los reticulares (con un nucleolonema desarrollado) y los que tienen una forma pequeña compacta; muchas veces esta característica es particular en diferentes tipos celulares y refleja su estado de actividad celular, es decir, los nucléolos anulares suelen estar asociados a células con baja actividad transcripcional mientras que los nucléolos reticulares se observan a menudo en células con alta actividad sintética, para el caso de los nucléolos con una morfología compacta están asociados a células quiescentes o en proliferación (Smetana & Busch, 1974; Dimario, 2004).

### I.2.1. Centro Fibrilar (FC)

A nivel de microscopía electrónica el centro fibrilar se observa como un compartimento relativamente claro (o poco electrodens) ubicado en la región central dentro del nucléolo, tiene una forma globular con un diámetro de entre 0.05-1  $\mu\text{m}$  y está compuesto por una red de finas fibrillas que van de 4 a 5 nm de grosor (Recher *et al.*, 1969; Schwarzacher & Mosgoeller, 2000). Este compartimento deriva de los NORs por lo que en él reside el rDNA que codifica para los rRNAs y sus IGS (regiones intergénicas), tiene un amplio contacto con el DFC que lo circunda, así como con el GC y algunas fibrillas de cromatina periférica (Smetana, 2011). Los FCs de un nucléolo interfásico están íntimamente relacionados con los NORs mitóticos tanto en la ultraestructura como en su composición molecular (Goessens & Lepoint, 1974; Goessens, 1984). Dentro de las proteínas que han sido descritas en esta región están la RNA pol 1, el factor de transcripción UBF y la DNA topoisomerasa 1 (Olson, 2011).

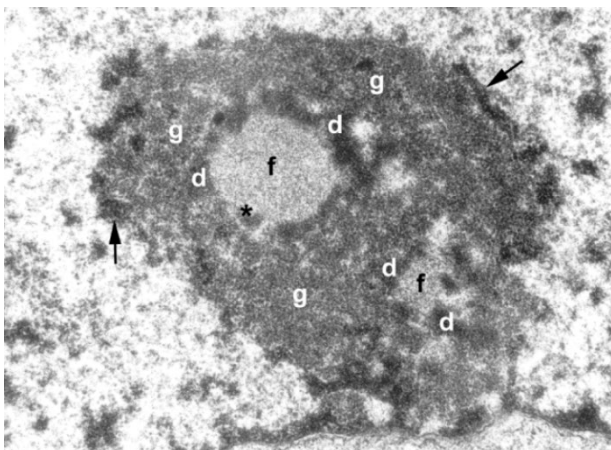
No obstante, se ha reportado la ausencia de FCs en los nucléolos de eucariontes de divergencia temprana (Thiry & Lafontaine, 2005), tal es el caso de *Trypanosoma cruzi* y *Leishmania* ssp. (López-Velázquez *et al.*, 2005; Martínez-Calvillo *et al.*, 2019).

### I.2.2. *Componente Fibrilar Denso (DFC)*

La apariencia ultraestructural oscura del componente fibrilar denso se define por la alta densidad electrónica de este componente que rodea al FC. Está compuesto por fibrillas densamente empaquetadas de entre 3-5 nm de grosor, su mayor contraste se debe a la alta concentración de componentes que lo conforman y a la gran afinidad que dichos componentes tienen a los metales con que son contrastados (Schwarzacher & Mosgoeller, 2000). Es el sitio donde se lleva a cabo el procesamiento temprano del pre-rRNA y por ello puede asumir distintas morfologías que reflejan el grado o la intensidad de la biosíntesis de ribosomas, está compuesto por diversos factores de transcripción, así como de proteínas nucleolares: fibrilarina, nucleolina y U3 snoRNA. En los nucléolos que tienen una apariencia reticular este compartimento llega a formar una red de hebras de 0.05 - 0.1  $\mu\text{m}$  de grosor a la que se le llama nucleolonema (Busch & Smetana, 1970; Sato *et al.*, 2005; Smetana, 2011).

### I.2.3. *Componente Granular (GC)*

Este compartimento se encuentra en la zona más periférica del nucléolo, tiene una apariencia granular compuesta por estructuras granulares que tienen un diámetro de 15-20 nm y que a veces pueden organizarse en cadenas de gránulos (Sirri *et al.*, 2008). En este compartimento se da la maduración tardía de los pre-rRNAs, es aquí donde se lleva a cabo el ensamblado de las partículas ribosomales que darán origen a las subunidades del ribosoma 40S y 60S (Raska *et al.*, 2004). Entre el GC y el DFC hay una zona de transición donde se entremezclan los componentes dando una apariencia “fibro-granular” (Schwarzacher & Mosgoeller, 2000). Algunos estudios mencionan que carece de fibrilarina y contiene pocas cantidades de nucleolina; sin embargo, es rico en nucleofosmina (Spector *et al.*, 1984; Olson *et al.*, 2002).



*Figura 6.* Micrografía electrónica del nucléolo de una célula somática de ratón. Las letras corresponden a los componentes nucleolares centro fibrilar (f) componente fibrilar denso (d) y componente granular (g), las flechas negras indican cromatina perinuclear condensada y el asterisco remarca el componente fibrilar denso. Tomado y modificado de Raska (2003).

#### I.2.4. Organizadores Nucleolares (NORs)

Fueron descritos por primera vez por Heitz en 1931 y por McClintock en 1934 como las regiones de cromatina impregnada con plata alrededor de las cuales se reforma el nucléolo al final de la telofase. A nivel de microscopía óptica se observan como puntos oscuros dentro del núcleo cuando se realizan técnicas de impregnación argéntica. Los NORs se encuentran asociados a las constricciones secundarias de los brazos “p” de los cromosomas acrocéntricos, constan de múltiples copias del rDNA arregladas en tándem con regiones IGS separando a los genes individualmente, en metazoarios cada copia puede generar un precursor de pre-rRNA 45s que es procesado para dar origen a los rRNA maduros 18S, 28S y 5.8S. (Hadjiolov, 1985; Grummt, 1999) (Fig. 7).

La descondensación de los NORs se da posterior a la mitosis para dar paso a la transcripción del rDNA y originar el FC de un nucléolo funcional, el número de NORs varía entre los distintos tipos celulares como entre las especies, por ejemplo: en la especie humana (*Homo sapiens*) se cuentan con cinco organizadores nucleolares

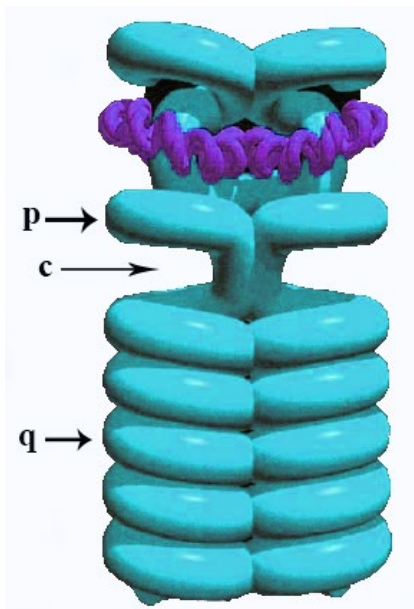


Figura 7. Modelo tridimensional del cromosoma metafásico no. 13 del humano. En rosa se observan las dos cromátidas, el centrómero (c), brazos “p” y “q”, en amarillo se muestra el rDNA asociado a las constricciones secundarias. Tomado y modificado de Dimario (2004).

ubicados en los cromosomas 13,14,15, 21 y 22 (Howell, 1982), en contraste, *Rattus norvegicus* tiene tres y se localizan en los cromosomas 3, 11 y 12 (Badenhorts *et al.*, 2011). Sin embargo, no hay una correlación numérica entre la cantidad de NORs metafásicos y la cantidad de estos en interfase, esto se debe a que un NOR metafásico puede distribuirse en varios FCs durante la interfase y viceversa (Derenzini & Ploton, 1991; Sirri *et al.*, 2008).

La condición argirófila de estas regiones se debe a la asociación que tienen con un grupo de proteínas ácidas no histónicas las cuales están relacionadas con sitios transcripcionalmente activos y pueden ser detectadas mediante técnicas argénticas, por este motivo se les conoce también como Regiones Organizadoras Nucleolares Argirofílicas (AgNORs); las proteínas que

muestran esta cualidad son la nucleolina (C23), nucleofosmina (B23), algunas subunidades de la RNA pol 1, y el factor transcripcional UBF (Howell, 1982; Derenzini, 2000; Sirri *et al.*, 2000).

Los avances en la proteómica de los componentes nucleolares refieren que están conformados por al menos 700 proteínas (Leung *et al.*, 2003; Andersen *et al.*, 2005). Algunas de las proteínas nucleolares más abundantes y más estudiadas en los vertebrados son la fibrilarina, la nucleolina, la nucleofosmina y Nopp140 (Dimario, 2004).

#### 1.2.5. *Nucleolina (C23)*

Es una fosfoproteína abundante en el núcleo de los eucariontes, una de las principales proteínas asociadas al organizador nucleolar y se encuentra en mayor proporción en el DFC del nucléolo (Jordan, 1987); tiene un peso molecular de 110 kDa y está constituida por tres dominios funcionales: el grupo amino terminal que contiene dominios ácidos y básicos los cuales son sitios de fosforilación de la Cdk1/cyclin B, un dominio de unión a RNA (RBD) y un dominio carboxilo terminal rico en glicina que tiene residuos de dimetilarginina que forman motivos Arg-Gly-Gly (RGG) los cuales son comunes en muchas otras proteínas de unión al RNA (Burd & Dreyfuss, 1994; Draper, 1995).

Se postula que tiene una función esencial en los procesos de regulación de la biogénesis de ribosomas tales como la transcripción, procesamiento de pre-RNA, así como en el ensamblado de proteínas ribosomales y rRNAs. Las porciones ácidas de su grupo N-terminal interactúan con la histona H1 induciendo descondensación de la cromatina y estabilizándola en procesos de síntesis y transcripción (Erard *et al.*, 1988; Olson, 2011).

Algunos estudios proponen que el grupo N-terminal está involucrado en su interacción con la plata debido a su concentración de aminoácidos ácidos (Roussel *et al.*, 1992; Sirri, 2000).

#### 1.2.6. *Fibrilarina*

Su nombre se debe a que inicialmente se observó su localización en los componentes FC y DFC del nucléolo de vertebrados (Ochs *et al.*, 1985). La fibrilarina tiene un peso molecular de 34-36 kDa y contiene tres dominios estructurales: la parte N-terminal es rica en glicina y arginina que forman un dominio GAR, la porción central contiene motivos de unión a RNA y su región C-terminal tiene una porción  $\alpha$ -hélice corta que se piensa tiene actividad de

metiltransferasa; en su dominio GAR contiene la secuencia señal que propicia la migración de la fibrilarina hacia los nucléolos (Burd & Dreyfuss, 1994; Olson, 2011). Se encuentra clasificada dentro de la snoRNPs del tipo C/D las cuales son necesarias para el procesamiento y modificación post-transcripcional de los rRNAs 18S y 28S mediante la vía 2'-O-metilación de su ribosa (Kiss-Laszlo *et al.*, 1996; Dunbar *et al.*, 2000).

La fibrilarina se asocia libremente con ribonucleoproteínas nucleolares pequeñas U3 (U3 snoRNPs) y se presume que se asocia indirectamente a la parte amino terminal a través de las U3 snoRNPs en la etapa temprana del procesamiento del pre-RNA (Ginisty *et al.*, 1998). Normalmente se encuentra en sitios de transcripción de rDNA o de procesamiento temprano del rRNA recién sintetizado por lo que se postula tiene una participación importante en el procesamiento y metilación de los pre-RNAs 45s recién sintetizados (Tollervey *et al.*, 1993). Además, es constitutiva de complejos macromoleculares de proteínas nucleolares involucradas en el procesamiento de rRNA (Olson, 2011).

#### I.2.7. Nucleofosmina (B23, numatrina o NPM1)

Esta proteína nucleolar pesa 38kD, está involucrada en la maduración del pre-RNA, la apoptosis, la transcripción dependiente de la RNA pol II y la poliadenilación del mRNA (Okuwaki, *et al.*, 2001; Danton & Catalano, 2013). Es participe de diversas modificaciones post-traduccionales como la fosforilación, acetilación, sumoilación y ubiquitinación, las cuales son cruciales para la asociación nucleolar de la B23 y para la organización general del nucléolo (Okuwaki, 2008). El splicing alternativo genera tres isoformas de la B23, sin embargo, solo la isoforma principal (B23.1) contiene una señal de localización nucleolar (NoLS) C-terminal que regula su direccionamiento al GC del nucléolo (Lindström, 2011; Danton & Catalano, 2013).

Muestra actividad de unión a ácidos nucleicos, como nucleasa e *in vitro* se ha observado su actividad como chaperona; en su forma desfosforilada la B23 se une a otras proteínas nucleolares o proteínas ribosómicas para evitar su agregación errónea y para asegurar su ensamblaje adecuado en las subunidades ribosómicas (Olson *et al.*, 2002; Lindström, 2011). Sus residuos de aspartato parecen ser responsables de su impregnación en técnicas argentícas (Valdez *et al.*, 1995).

Algunos autores como Lischwe *et al.* (1979) y Sirri (2000) propone que esta proteína (junto con la nucleolina) conforma la mayor parte del volumen de las impregnaciones argénticas observadas en los nucléolos interfásicos.

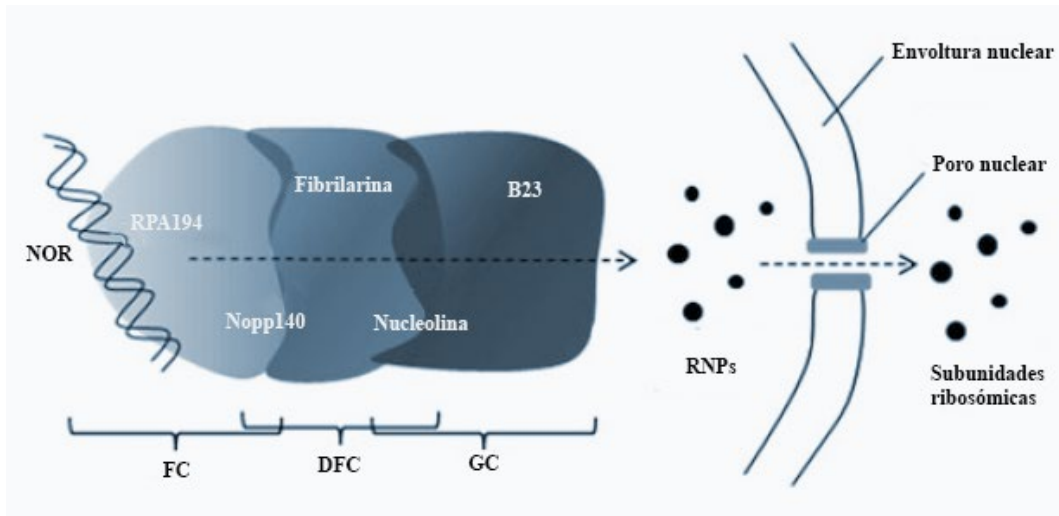


Figura 8. Diagrama de los tres compartimentos del nucléolo y la ubicación de algunas de las proteínas nucleolares más estudiadas. Tomado y modificado de Danton & Catalano (2013).

### I.3. Técnicas de visualización del nucléolo en Microscopía Electrónica de Transmisión (MET)

#### I.3.1. Técnica regresiva EDTA

En 1969 Bernhard propuso un método de contraste preferencial para el RNA basado en la cualidad quelante del ácido etilendiaminotetraacético (EDTA). Este procedimiento histoquímico se aplica a los cortes ultrafinos obtenidos mediante ultramicrotomía y que han sido contrastados con sales de uranilo (acetato de uranilo), a estos se le aplica una solución de EDTA [0.2 M] la cual quela de manera selectiva los iones adquiridos por estructuras que contienen desoxirribonucleoproteínas (DNPs) dando una apariencia de “blanqueado”, posteriormente se le aplica un pequeño contraste con citrato de plomo para propiciar la detección de estructuras con RNP's (como el nucléolo) las cuales adquieren un contraste mayor al observarse en el MET (Pearson *et al.*, 1982; Havaki *et al.*, 2006).

Esta técnica ha sido aplicada para el estudio de las RNP's del núcleo celular en tejidos de rata adulta tales como el hipotálamo, páncreas, hígado y testículos; así mismo se ha utilizado en tejido de otros organismos como las glándulas salivales de *Chironomus thummi* y el flagelado *Trypanosoma cruzi* (Esponda *et al.*, 1983; López-Velázquez *et al.*, 2005; Havaki *et al.*, 2006).



Aunque a partir de la publicación del procedimiento propuesto por Bernhard ha habido un sin número de observaciones y correlaciones que apoyan a esta técnica como verdaderamente consistente, debe tomarse en cuenta que se trata de una técnica “preferencial” y no específica para RNA. Sin embargo, algunos autores como Pearson *et al.* en 1982 proponen dos condiciones en las cuales el procedimiento es confiable: en primer instancia los cortes deben ser contrastados con las sales de uranio por periodos cortos antes de ser tratado con

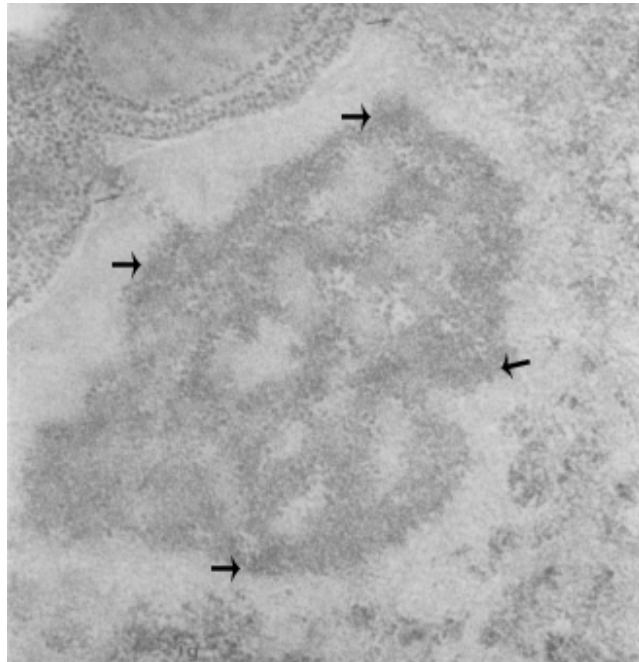


Figura 9. Micrografía electrónica del nucléolo de una célula del páncreas de rata con la técnica de EDTA. Las flechas señalan las RNPs. Tomado y modificado de Bernhard (1969).

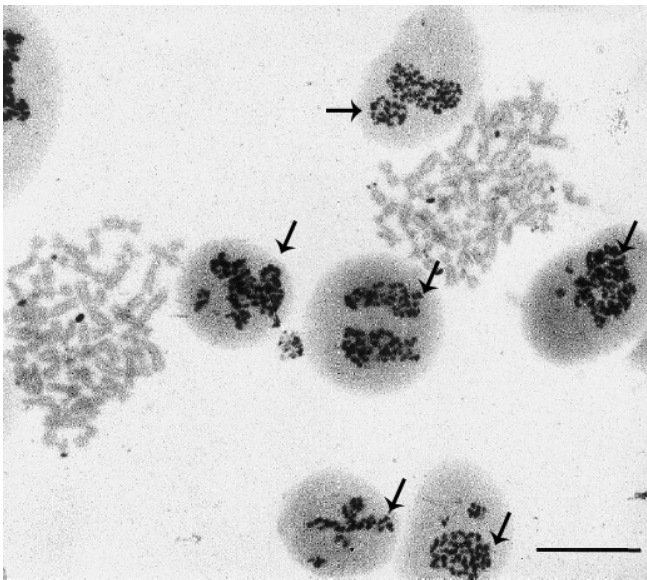
EDTA y en segunda instancia deben compararse muestras contrastadas de forma estándar (contraste general) con muestras a las que se les ha aplicado la técnica regresiva con el fin de evitar confundir estructuras que podrían no ser de carácter ribonucleoproteico.

### I.3.2. Impregnación argéntica (AgNOR)

Dentro de los procedimientos en los que se utilizan sales de plata para evidenciar ciertas estructuras celulares hay distintos protocolos basados en distintos principios, de manera general estos tipos de procedimientos en los que están involucradas diferentes interacciones físico-químicas se pueden agrupar en 5 categorías: métodos argentafines, impregnaciones, tinciones de plata por oxido-reducción, interacciones metal-metal (autometalografía) y métodos argirófilos, en esta última categoría se encuentran procedimientos como el propuesto por Ploton *et al.* en 1986 al que se le denomina técnica de AgNOR; el nombre se debe al precipitado de plata que generan las proteínas no histónicas con afinidad a la plata y que se encuentran asociadas al rDNA localizado en la región del organizador nucleolar de los cromosomas metafásicos (Grizzle, 1996).

Los primeros protocolos de tinción de plata realizados para evidenciar las proteínas AgNOR consistían en dos etapas consecutivas: una etapa de impregnación con nitrato de plata ( $\text{AgNO}_3$ ) y una etapa de desarrollo con un agente reductor como el amoníaco o el ácido fórmico (Goodpasture & Bloom, 1975). Howell y Black (1980) introdujeron un método de tinción con plata de una sola etapa en el que la impregnación (a  $70^\circ\text{C}$  durante 2 minutos) y el desarrollo se realizaban simultáneamente, sin embargo, Ploton *et al.* (1986) propusieron una temperatura más baja y un tiempo de impregnación más largo.

El contraste por métodos argirófilos se debe a que ciertas estructuras absorben rápidamente los iones provenientes de una solución de sales de plata, los iones de plata ( $\text{Ag}^+$ ) una vez absorbidos se reducen a plata metálica mediante agentes reductores añadidos exógenamente como la gelatina de ácido fórmico y generan un precipitado electrodenso que es observable a nivel microscópico (Derenzini, 2000; Trerè, 2000). Pese a que no ha sido plenamente dilucidado el mecanismo por el cual se lleva a cabo esta reacción, diversos estudios apuntalan a que las proteínas ricas en histidina están involucradas y la reacción probablemente dependen de interacciones fisicoquímicas débiles entre la solución de plata y distintos grupos



*Figura 10.* Núcleos y cromosomas de células cancerígenas humanas con la técnica AgNOR. Las flechas señalan las impregnaciones. Bar = 20  $\mu\text{m}$ . Tomado y modificado de Derenzini (2000).

sulfhidrilo y disulfuro de las estructuras tisulares (Buys & Osinga, 1980; Grizzle, 1996).

Debido a su confiabilidad y especificidad, la técnica de AgNOR es actualmente el método más cómodo, confiable y cuantificable para determinar los NORs en los núcleos interfásicos o asociados a los cromosomas metafásicos (Trerè, 2000).

### 1.3.3. Inmunolocalización ultraestructural

La inmunohistoquímica es una técnica utilizada para demostrar la presencia de antígenos (Ags) dentro de secciones de tejido mediante la utilización de anticuerpos específicos (Abs). Este tipo de metodología es utilizada tanto en el campo de la investigación como en el diagnóstico, en ella se entrelazan parte de la inmunología, la biología tisular y celular, así como la química (Ramos-Vara, 2005). Tiene como fundamento la interacción Ags-Abs, la cual puede ser evidenciada mediante una reacción colorimétrica o mediante la unión de un anticuerpo secundario acoplado a una molécula fluorescente, o en el campo de la MET, a un grano de oro.

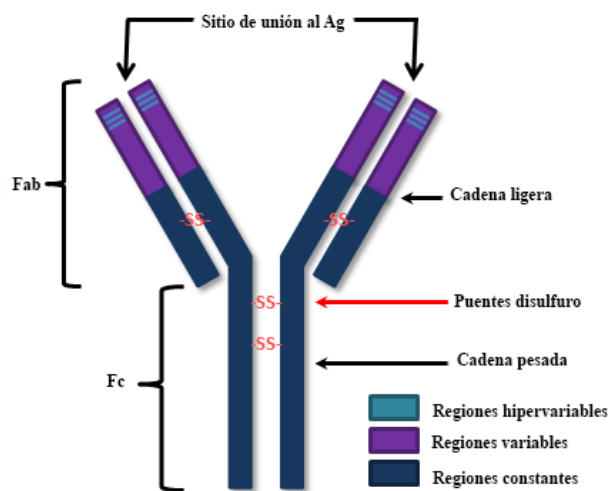


Figura 11. Esquema de una inmunoglobulina IgG.

Dentro de los Abs utilizados comúnmente se encuentran las inmunoglobulinas (Igs) del tipo IgG (aunque también se utiliza la IgM en menor medida), las Igs tienen una estructura en forma de “Y” que consta de dos cadenas ligeras idénticas y dos cadenas pesadas iguales, la porción de la cola de la “Y” se le nombra Fc y la porción que se une al antígeno se denomina Fab, esta última porción contiene segmentos constantes y variables

de la cadena pesada y de la cadena ligera (Kalyuzhny, 2016). Las cadenas ligeras constan de dos regiones distintas: la mitad C-terminal de la cadena que es constante y se denomina “CL” (constant: light chain), y la mitad N-terminal la cual es una secuencia variable por lo que se le llama “VL” (variable: light chain); la porción Fc del anticuerpo determina la función biológica que lleva a cabo y permite la unión de otro anticuerpo o de células inflamatorias con receptores de dicha porción (Cerilli & Frierson, 2001; Ramos-Vara, 2005) (Fig. 11).

El enlace específico de un Ab a un Ag se da a través de regiones hipervariables de ambas cadenas (pesada y ligera) de la porción N-terminal, el sitio de unión del anticuerpo al antígeno se denomina paratope y las regiones de un antígeno que se unen al anticuerpo se les llama epítopes (Kalyuzhny, 2016). Los epítopes son generalmente fracciones pequeñas de 5-21 aminoácidos de longitud, su estructura terciaria, así como la forma en que las cadenas peptídicas se pliegan juntas o interactúan con péptidos adyacentes son importantes para que se dé la interacción Ag-Ab. El paratope interactúa

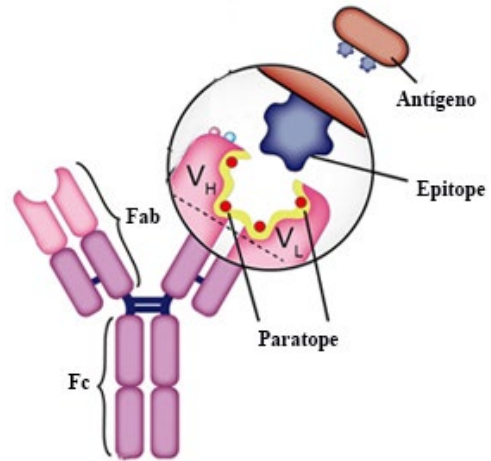


Figura 12. Esquema de la interacción del paratope de la inmunoglobulina y el epítopo del antígeno.

con la estructura terciaria del epítopo a través de fuerzas electrostáticas, hidrofóbicas y no covalentes (de Van der Waals), entre mayor sea el número de interacciones entre el Ag y el Ab, mayor es la afinidad entre ellos (Cerilli & Frierson, 2001).

Para llevar a cabo el procedimiento inmunohistoquímico es necesario llevar a cabo un procesamiento adecuado del material biológico, parte esencial de ello es su fijación ya que esta permite una preservación adecuada de los componentes celulares (componentes solubles y proteínas estructurales), previene la autólisis y el desplazamiento de moléculas constitutivas de las células (Ags y algunas enzimas), facilita las tinciones convencionales y estabiliza el material celular para evitar su deterioro durante el procedimiento.

Generalmente se utilizan dos tipos de fijadores: los fijadores coagulantes y los fijadores por reticulación (no coagulantes) (Ramos-Vara, 2005). El paraformaldehído es el fijador no coagulante más utilizado en el campo de la histopatología, este preserva la mayoría de los péptidos y la estructura general de los organelos celulares; su propiedad de fijación se debe a que forma enlaces cruzados producto de la adición de grupos amino reactivos sin carga (-NH o NH<sub>2</sub>) (Ramos-Vara, 2005).

Sin embargo, la fijación resultante del paraformaldehído dificulta la inmunoreactividad debido a que produce un cambio importante en la conformación tridimensional de algunas macromoléculas y en la estructura terciaria-cuaternaria de las proteínas; mientras que la estructura primaria y secundaria es afectada en menor medida. Los efectos del formaldehído

pueden ser parcialmente revertidos realizando una recuperación antigénica mediante calor-hidrólisis alcalina o enzimas (tripsina, proteinasa k y pepsina) (Cerilli & Frierson, 2001; Ramos-Vara, 2005).

Otro punto a tomar en cuenta es la inclusión del material procesado en un material que permita realizar los cortes empleados para los procedimientos histoquímicos. Dentro del campo de la microscopía electrónica de transmisión (MET) se utilizan resinas plásticas hidrofílicas que polimerizan a bajas temperaturas con el fin de preservar el contenido celular, la arquitectura celular-tisular, así como la antigenicidad del mismo; una de ellas es la nombrada Lowicryl cuya cualidad hidrofílica facilita la permeabilidad de distintas soluciones con el tejido, permitiendo distintas reacciones histoquímicas: desde tinciones o impregnaciones argénticas hasta inmunolocalizaciones (Hunter, 1993; Hayat, 2000; Ertault-Daneshpouy *et al.*, 2003).

La detección del antígeno puede realizarse de manera directa o indirecta (Cerilli & Frierson, 2001; Ramos-Vara, 2005; Kalyuzhny, 2016). El método directo se realiza en un solo paso y se utiliza un anticuerpo acoplado a una enzima, a biotina, a un fluorocromo o a oro coloidal de un diámetro específico, de esta manera es posible observar la interacción y localización

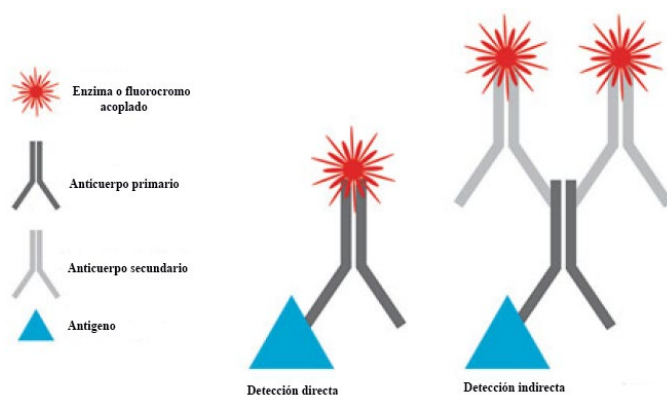


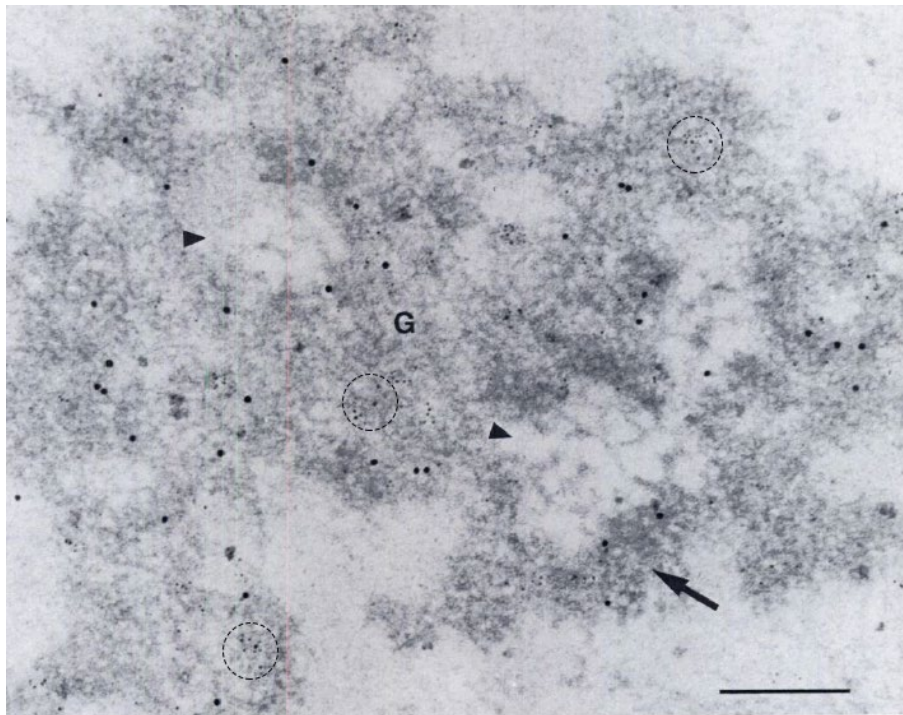
Figura 13. Esquemización de los métodos de inmunodetección directa e indirecta. Tomado y modificado de Kalyuzhny (2016).

de ciertos Ags dentro de un tejido o célula en particular (Hayat, 2000; Cerilli & Frierson, 2001). Por otro lado, el método indirecto se realiza en dos pasos utilizando un anticuerpo primario (no marcado) y uno secundario (marcado); en el primer paso el antígeno es detectado por el primer Ab y posteriormente éste es detectado por un segundo Ab

acoplado a una molécula que evidencia la interacción entre los dos anticuerpos y el Ag. Algunos estudios muestran que el método indirecto tiene un mayor grado de efectividad ya que se conserva la actividad y sensibilidad del primer Ab al no estar acoplado a alguna molécula, esto propicia una interacción Ag-Ab más fuerte y la capacidad de medir pequeñas cantidades del antígeno (Cerilli & Frierson, 2001; Ramos-Vara, 2005; Kalyuzhny, 2016).

En el campo de la MET se han adecuado distintos protocolos citoquímicos a partir de los años 70s y 80s, inicialmente con el desarrollo de técnicas de inmunoperoxidasa y posteriormente con el marcaje con oro (Hunter, 1993). La técnica con oro coloidal fue introducida en 1971 por Faulk y Taylor quienes detectaron antígenos de la membrana celular al utilizar inmunoglobulinas acopladas con oro, desde ese momento la metodología empleada demostró ser de las mejores para evidenciar diversos antígenos a nivel de MET, esto se debe a que la marca electrodensa con oro es fácilmente reconocible en bajas resoluciones, es precisa, no tiene algún efecto de enmascaramiento, evidencia moléculas en pequeñas cantidades, puede ser cuantificada y tiene una baja afinidad a las resinas lo que da como resultado un bajo ruido de fondo (Hunter, 1993; Hayat, 2000) .

La inmunohistoquímica ha demostrado ser una metodología sólida y confiable para el diagnóstico y detección de antígenos en distintos tipos de tejidos, por tal motivo es usada en distintos campos dentro de la medicina y la biología (Cerilli & Frierson, 2001).



*Figura 14.* Inmunodetección electrónica de B23 y C23 en el nucléolo de una célula HeLa. Las partículas grandes y pequeñas más electrodensas corresponde a la marca de grano de oro correspondiente a la detección de C23 (15 nm) y la B23 (5 nm) (círculos punteados). La G corresponde al componente granular mientras que la flecha señala al DFC y las cabezas de flecha marcan los FCs. Bar. = 0.3  $\mu$ m. Tomado y modificado de Biggiogera *et al.* (1989).

#### I.4. Meiosis (generalidades)

Los organismos que llevan a cabo la reproducción sexual presentan un tipo de división celular especializada en la producción de gametos denominada meiosis; es el único tipo de división en el que a partir de una célula diploide ( $2n$ ) se producen gametos haploides ( $n$ ) genéticamente distintos que al concretar la fecundación restauraran la carga cromosómica  $2n$  característica de cada especie (Benavente & Volff, 2009). Durante el proceso meiótico se llevan a cabo los eventos de recombinación genética, los cuales son de suma importancia para la reparación de defectos genéticos de las células de la línea germinal y propiciar la diversidad génica sobre la cual actúa la selección natural (Holliday, 1984).

La división meiótica consta de una ronda previa de replicación del DNA seguida de dos divisiones consecutivas (meiosis I y meiosis II), la segunda división de la meiosis (división ecuacional) es muy similar a la mitosis pues al final de ésta las cromátidas hermanas se separan y se segregan en las células resultantes (Benavente & Volff, 2009). Por otro lado, la meiosis I tiene características particulares que la hacen una etapa única e importante dentro del proceso meiótico, algunos autores la han subdividido en cinco etapas: profase, metafase, anafase, telofase y diacinesis; de las etapas antes mencionadas la profase tiene la mayor duración por lo que se divide en sub-estadios basados en los cambios morfológicos observables que sufren los cromosomas durante cada uno de ellos: leptoteno, cigoteno, paquiteno y diploteno (Roeder *et al.*, 1997; Alberts *et al.*, 2002) (Fig. 15).

Figura 15. Eventos de la profase meiótica I (Tomado y modificado de Roeder, 1997).

Estadios de la profase meiótica.	Morfología cromosómica y morfogénesis del SC.	Formación del <i>bouquet</i> .	Reparación de DSB.	Evidencias citológicas de recombinación.
Leptoteno	Comienzan a desarrollarse los elementos axiales	Telómeros comienzan a conglomerarse	Ocurren DSBs	Nódulos tempranos
Cigoteno	Inicia sinapsis entre cromosomas	Telómeros estrechamente conglomerados, conformación del <i>bouquet</i>	Desaparecen los DSBs	Nódulos temprano
Paquiteno	Completa sinapsis entre cromosomas	Telómeros dispersos	Doble Holliday, uniones maduras de recombinación	Nódulos tardíos
Diploteno	Desensamblaje del SC; condensación de los cromosomas			Quiasmas
Diacinesis	Posterior compactación de los cromosomas			Quiasmas



#### I.4.1. La meiosis dentro del proceso espermatogénico de *Rattus norvegicus*

La meiosis es una de las etapas dentro de un proceso que en los mamíferos particularmente en los machos se denomina espermatogénesis. A su vez, la espermatogénesis se define como el proceso por el cual se originan los espermatozoides ( $n$ ) a partir de las células precursoras llamadas espermatogonias ( $2n$ ) (Russell *et al.*, 1990; Alberts *et al.*, 2002).

El proceso espermatogénico ocurre en el testículo y está dividido de manera general en tres fases: fase de proliferación, meiótica y de espermiogénesis (Russell *et al.*, 1990). Durante la fase proliferativa las espermatogonias sufren una serie de divisiones mitóticas originando una población importante y dando lugar a dos tipos de espermatogonias: el tipo A y el tipo B. En

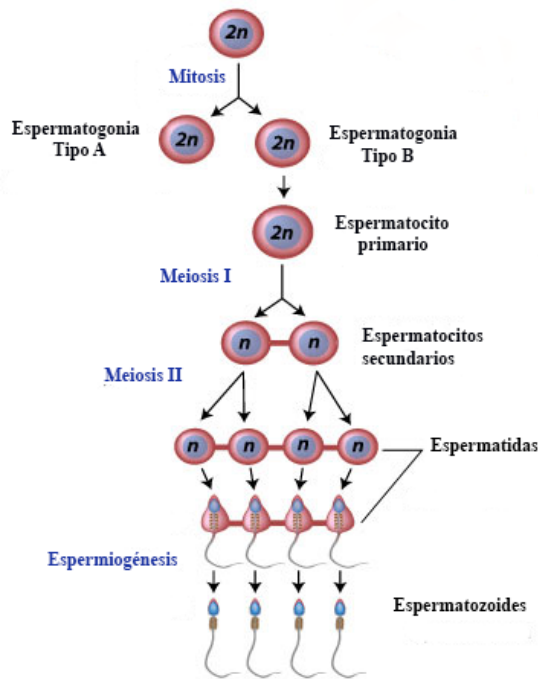


Figura 16. Esquema general del proceso espermatogénico.

el caso particular de la rata (a diferencia de los humanos) las espermatogonias de tipo A se subdividen en diferentes subtipos: A1, A2, A3, A4, tipo intermedia y tipo B, sin embargo, estas últimas son las que al madurar originan a los espermatocitos primarios quienes entran propiamente a la segunda fase de la espermatogénesis: el proceso meiótico (Hermo *et al.*, 2010). Los espermatocitos que sufren la primera división meiótica se les nombra de primer orden y originan a los espermatocitos de segundo orden que son los que entran a la meiosis II, al término de este proceso se originan las células haploides ( $n$ ) a las que se les nombra espermátidas (Alberts *et al.*, 2002;

Hermo *et al.*, 2010). Por último, las espermátidas entran en la etapa de espermiogénesis donde sufrirán una serie de cambios morfológicos importantes y así adquirir la morfología característica de un espermatozoide maduro (Russell *et al.*, 1990) (Fig. 16).

Como se mencionó anteriormente, el proceso espermatogénico se lleva a cabo en el testículo específicamente en los túbulos seminíferos, dentro de éstos es posible diferenciar de manera



general dos grupos celulares: las células somáticas y las células de la línea germinal que forman un epitelio especializado (Fig. 17).

Las células somáticas están conformadas por las células de Leydig que se encuentran en los intersticios de los túbulos seminíferos (tienen una función esteroidogénica) y las células de Sertoli que funcionan como células nodrizas y de sostén. Las células de Sertoli se encuentran dentro del túbulo seminífero adheridas a la membrana basal, tienen una morfología cilíndrica irregular, un retículo endoplásmico liso extenso, un retículo endoplásmico rugoso y aparato de Golgi bien desarrollados, mitocondrias esferoidales alargadas y un núcleo

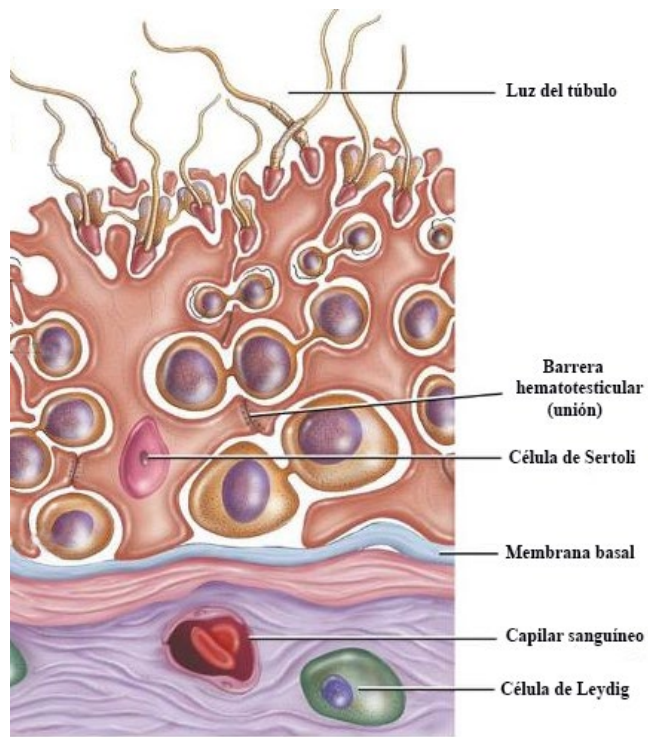


Figura 17. Esquema del túbulo seminífero.

ovoide dentro del cual (en los mamíferos) es posible apreciar un nucléolo reticular de gran tamaño con una estructura tripartita (Oliveira & Alves, 2015). Las células de Sertoli tienen prolongaciones apicales y laterales de su citoplasma que rodean a las células espermatogénicas, dichas prolongaciones forman uniones herméticas que dan lugar a la “barrera hematotesticular” la cual divide al epitelio seminífero en dos compartimientos: el compartimiento basal y el compartimiento adluminal (Russell *et al.*, 1990; Oliveira & Alves, 2015).

Por otro lado, las células de la línea germinal forman un epitelio que consta de distintos estratos dentro del túbulo seminífero, las espermatogonias se encuentran en el compartimiento basal y todos los demás tipos celulares (espermatocitos, espermátidas y espermatozoides) transitan durante la espermatogénesis hacia el compartimiento adluminal formando diferentes asociaciones concéntricas (Russell *et al.*, 1990; Garner & Hiatt, 2001).

Leblond y Clermont al estudiar una serie de cortes transversales de túbulos seminíferos propusieron en 1952 el término “ciclo del epitelio seminífero”, haciendo referencia a la serie completa de las diferentes asociaciones de las células germinales en distintas etapas del proceso espermatogénico, las cuales pueden ser identificadas dentro del túbulo. La duración del ciclo, así como el número de estadios descritos varía entre las especies: en los humanos tiene una duración de 16 días y se han descrito 6 estadios, en el ratón dura 8.65 días y tiene 12 estadios, en el caso de la rata se han descrito 14 diferentes asociaciones y el ciclo tiene una duración de 13 días (Hermo *et al.*, 2010) (Fig. 16).

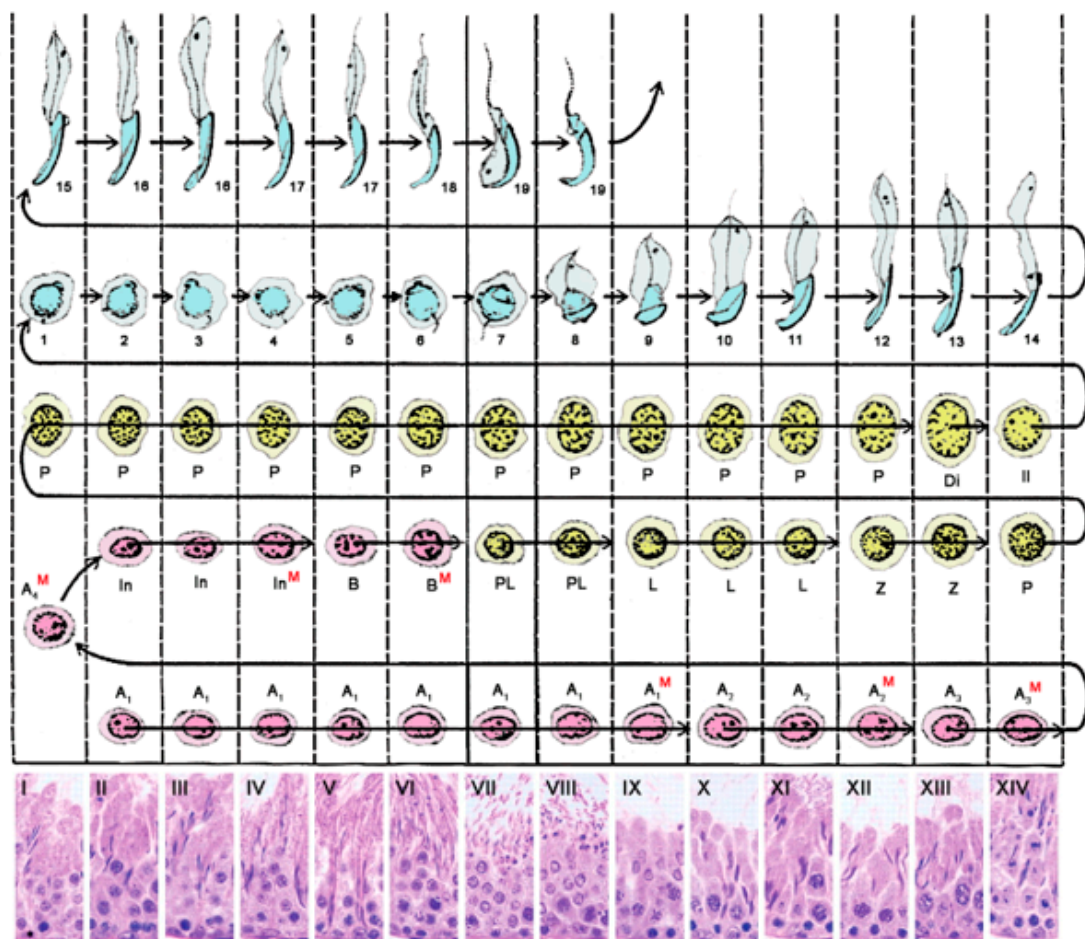


Figura 18. Esquema de las XIV etapas del ciclo del epitelio seminífero de la rata. En el cuadro superior se ejemplifican los diferentes tipos celulares. Las células de color rosa pertenecen a la etapa proliferativa: espermatozonias tipo A (A), intermedias (In) y tipo B (B). Las células en color en amarillo transitan el proceso meiótico: espermatozonios primarios en preleptoteno (PL), leptoteno (L), cigoteno (Z), paquíteno (P), diploteno y espermatozonios secundarios (II). Las células en azul claro se encuentran en la etapa de espermiogénesis. En los cuadrantes inferiores se muestran cortes histológicos transversales de túbulos seminíferos de rata con la tinción HE. Tomado y modificado de Beltrame & Sasso-Cerri (2017).

## II. ANTECEDENTES

En la labor de describir el estado activo o inactivo del nucléolo durante la meiosis, en los años 60s varios estudios de autoradiografía con pulsos cortos de <sup>3</sup>H-uridina en espermatocitos de hámster (Utakoji, 1966) y ratón (Monesi, 1964; Monesi *et al.* 1978), no encontraron incorporación de precursores de RNA marcados lo cual llevó a pensar que había una inhibición en la transcripción de rRNA.

A mediados de los años 70s estudios de autoradiografía con intervalos largos demostraron que había incorporación de precursores marcados en microsporocitos de *Lilium* durante la profase meiótica. Por otro lado, los estudios llevados a cabo por Stefanini y Monesi en 1974 demostraron que había cierto grado de incorporación de precursores marcados en espermatocitos primarios de rata, esto sucedía en todas las etapas de la profase meiótica a excepción de la etapa de diploteno donde había ausencia de marcaje. De igual manera, otros autores como Kierszenbaum & Tres (1974), Söderström (1976), Schultz & Leblond (1990) utilizando técnicas de autoradiografía de alta resolución convergen en que la síntesis de rRNA es baja en los espermatocitos en leptoteno y cigoteno, pero que el marcaje (reflejo de la actividad) aumenta en las etapas de paquiteno alcanzando un pico en paquiteno medio para posteriormente decrecer y cesar.

Aunado a los ensayos de autoradiografía, el núcleo de la espermatogonia humana ha sido investigado por Tres y Solari (1968) y los estudios morfológicos del núcleo meiótico en la rata refieren que el nucléolo aumenta de tamaño gradualmente durante el paquiteno (Daoust & Clermont, 1955; Ureña & Solari, 1970; Stefanini *et al.*, 1974), que el número de nucléolos disminuye hacia el final de la profase (Daoust & Clermont, 1955) y en la etapa de diploteno se segregan los componentes nucleolares (Stefanini *et al.*, 1974; Schultz & Leblond, 1990). En los años 90s Schultz & Leblond mencionan que el nucléolo de los espermatocitos primarios en paquiteno no solo tiene los tres compartimentos clásicos de un nucléolo tripartito sino que existen estructuras granulares asociadas denominadas extranucleolares, uno de ellos denominado cuerpo redondo el cual es un elemento de RNPs que ha sido identificado en asociación con nucléolos meióticos en el hombre (Paniagua *et al.*, 1986), el mono, el gasterópodo *Achatina fulica* y el insecto *Locusta migratoria* (Schultz, 1990).

No obstante, muchas de las descripciones ultraestructurales de las primeras etapas de la profase meiótica se limita a mencionar que los nucléolos de los espermatocitos muestran

poco cambio en tamaño y apariencia, ya que el cambio en tamaño más importante lo describen durante el paquiteno.

Recientemente algunos autores como Andraszek & Smalec (2012) reportan que el nucléolo sufre una degradación gradual a lo largo de la profase meiótica y que la forma en que desaparecen es probablemente característica de grupos particulares de vertebrados, ejemplo de esto es lo que sucede en espermatoцитos de ganado domestico donde los nucléolos se fragmentan gradualmente y se dividen en estructuras muy pequeñas cuyo número corresponde al número de regiones organizadoras del núcleo (Andraszek & Smalec, 2012). Aunado a esto, otros autores como Peruquetti *et al.* (2012) proponen que los mecanismos de disminución de tamaño, fragmentación y reorganización de los nucléolos durante el proceso espermatogénico, tienen un papel importante en la formación del cuerpo cromatoide (CB) ya que éste tiene cierta relación funcional con el nucléolo y está involucrado en las etapas de diferenciación de las células haploides durante la espermatogénesis.

### **III. JUSTIFICACIÓN**

Se requiere estudiar la ultraestructura del nucléolo de mamíferos durante la etapa de cigoteno de la profase meiótica I, debido a que diversos autores denotan que no hay un consenso en cuanto a lo que sucede con él durante el proceso meiótico y a que las descripciones encontradas en la bibliografía agrupan a las primeras etapas de la profase meiótica I, siendo el cigoteno la etapa menos abordada. Aunado a esto, se considera que actualmente existen nuevos descubrimientos respecto a la dinámica nucleolar y respecto al proceso meiótico.

### **IV. HIPÓTESIS**

Durante la etapa de cigoteno de la profase meiótica I, una posible fragmentación o reconstrucción del nucléolo podría afectar la interrelación de los componentes nucleolares evidenciando la disgregación o reagrupación de estos durante etapas tempranas-intermedias del proceso meiótico.

### **V. OBJETIVOS**

#### **V.1. Objetivo general**

- Describir la ultraestructura del nucléolo durante la fase de Cigoteno de la profase meiótica I en la espermatogénesis de la rata.

#### **V.2. Objetivos particulares**

- Detallar las características ultraestructurales del nucléolo en el Cigoteno.
- Definir la distribución del centro fibrilar, componente denso fibrilar y componente granular del nucléolo durante el Cigoteno.
- Determinar la distribución de la nucleolina y nucleofosmina durante el Cigoteno.

## **VI. METODOLOGÍA**

### **VI.1. Obtención de las muestras biológicas**

Se utilizaron 6 ratas (*Rattus norvegicus*) machos adultos de la cepa Wistar. Cada individuo fue manipulado conforme a los lineamientos establecidos en la Norma Oficial Mexicana NOM-062-ZOO-1999 “Especificaciones técnicas para la producción, cuidado y uso de animales de laboratorio” (SAGARPA, 2015). Las ratas se anestesiaron en una cámara saturada con gases de isoflurano (Sofloran Vet PiSA Agropecuaria Reg S.A.G.A.R.P.A. Q-78833-2222) y posteriormente fueron colocadas en una bandeja de disección en donde se realizó la extracción quirúrgica de los testículos, al término del proceso fueron eutanasiadas. Ambos testículos fueron fijados y procesados para microscopía electrónica de transmisión.

### **VI.2. Microscopía electrónica de transmisión (MET)**

Se realizaron los protocolos de procesamiento para microscopía electrónica correspondientes a dos tipos de resina: epóxica (EPON) y acrílica (Lowicryl K4M).

#### **VI.2.1. Inclusión en resina epóxica (EPON)**

Se fijaron los fragmentos de testículo en una solución de glutaraldehído [2.5%] en buffer de cacodilatos [0.2 M] pH 7.2 durante 2 horas. Posteriormente se les hizo lavados con el buffer y se procedió a la deshidratación del tejido en alcoholes graduales. Se realizó la preinclusión del material biológico con óxido de propileno como agente intermediario, posteriormente con una mezcla de óxido de propileno-resina epóxica (EPON) en las proporciones 2:1, 1:1 y 1:2 respectivamente. Por último, las muestras se dejaron en resina epóxica pura durante 24 hrs. Se realizó la inclusión del material procesado con EPON puro en moldes de silicón y se dejaron polimerizar durante 48 hrs en una estufa a 60°C.

#### **VI.2.2. Inclusión en resina acrílica (Lowicryl K4M)**

Se fijaron los fragmentos de testículo en una solución de paraformaldehído [4%] en buffer PBS 1X (pH 7.2) durante 2 horas a 4°C. Posteriormente se les hicieron lavados en PBS 1X y una deshidratación del tejido en concentraciones graduales de metanol a -20°C. Se efectuó la preinclusión con mezclas de metanol-resina en distintas proporciones (2:1, 1:1 y 1:2) hasta dejar las muestras en resina acrílica pura, una vez que las muestras estuvieron en resina pura

se dejaron ahí toda la noche. La inclusión del material procesado se realizó con resina pura Lowicryl K4M en capsulas de gelatina y se dejaron polimerizar en una cámara UV durante 72 horas a una temperatura de -20°C.

### **VI.2.3. Ultramicrotomía**

Los bloques obtenidos del procesamiento de inclusión para ambas resinas fueron explorados y cortados utilizando el ultramicrotomo Leica Ultracut R. En primera instancia se obtuvieron cortes semifinos de 500 nm de espesor, los cuales se tiñeron con azul de toluidina y se observaron en el microscopio óptico para ubicar dentro del tejido la zona de interés. Posteriormente se identificaron los estadios del epitelio seminífero para cada uno de los túbulos observados, la identificación se realizó de acuerdo a las descripciones de las etapas del ciclo espermatogénico de la rata publicadas por Russell en 1977, en este caso se eligieron los túbulos seminíferos correspondientes a los estadios XII y XIII debido a que en estas etapas se encuentran los espermatoцитos en la fase de cigoteno. Una vez elegida la región de interés se delimitó (retalló) y se sometió a ultramicrotomía, se obtuvieron cortes ultrafinos seriados de 70 nm de grosor los cuales se montaron en rejillas con una sola ranura (anillos de Sjöstrand) de cobre y níquel. Por último, se realizaron las técnicas de contraste para microscopía electrónica que se presentan a continuación.

### **VI.2.4. Contraste general UrPb**

Se utilizaron cortes ultrafinos seriados del material incluido en resina epóxica montados en anillos de Sjöstrand de cobre. En una cámara húmeda protegida de la luz se colocó una gota de acetato de uranilo [4%] y se dejó incubar el anillo durante 20 minutos, al término de este tiempo se realizó un lavado por inmersión con agua milliQ, posteriormente en otra cámara húmeda provista de lentes de NaOH para eliminar el CO<sub>2</sub> se colocó una gota de citrato de plomo [0.4%] y se dejó incubar la rejilla durante 10 minutos, por último, la rejilla fue enjuagada con agua milliQ por inmersión.

### **VI.2.5. Técnica regresiva EDTA preferencial para RNPs (Bernhard, 1969)**

Se emplearon cortes ultrafinos seriados del material incluido en resina epóxica montados en anillos de Sjöstrand de cobre. Se prepararon tres cámaras húmedas: en la primera se colocó una gota de acetato de uranilo [4%] y se protegió de la luz, en la segunda se colocó una gota

de ácido etilendiaminotetraacético (EDTA) pH 7 [0.2 M] y en la tercera cámara se colocó una gota de citrato de plomo [0.4%] además de un receptáculo con lentejas de NaOH para eliminar el CO<sub>2</sub>. El anillo de Sjöstrand se incubó en cada una de las gotas colocadas en las cámaras previamente mencionadas en el siguiente orden y durante los siguientes intervalos de tiempo: cámara 1 (Ur) durante 1 minuto, cámara 2 (EDTA) durante 18 minutos y cámara 3 (Pb) durante 2 minutos. En cada cambio de reactivo se lavó la rejilla con agua milliQ por inmersión.

#### **VI.2.6. Técnica AgNOR (Ploton *et al.*, 1986)**

Se usaron cortes ultrafinos del material incluido en resina acrílica Lowicryl K4M montados en anillos de Marinozzi (de película fotográfica virgen). En un recipiente de vidrio se preparó una solución de nitrato de plata al 50% con agua destilada. Utilizando otro recipiente de vidrio se preparó la solución de trabajo en una proporción 2:1 de la mezcla de plata [50%] (preparada previamente) y de gelatina ácido fórmico. Se tomó una gota de la solución de trabajo y se colocó en una cámara húmeda. El anillo de Marinozzi se dejó flotar en la gota de la solución de trabajo durante 15 minutos protegiendo la cámara de la luz, al término de este tiempo se lavaron abundantemente los cortes con agua destilada mediante flotación.

#### **VI.2.7. Inmunolocalización ultraestructural**

Se obtuvieron cortes ultrafinos de 70 nm de espesor (aproximadamente) del tejido incluido en la resina acrílica Lowicryl K4M y se montaron en anillos de Sjöstrand de níquel. Todo el proceso se llevó a cabo en una cámara húmeda. En primera instancia se dejó flotar de manera consecutiva los anillos de Sjöstrand en una gota de las siguientes soluciones: agua milliQ durante 5 minutos, solución de glicina en PBS [50 mM] durante 15 minutos, solución bloqueadora “AURION” (blocking solution for goat gold conjugated) (AURION, Cat. 905.002) durante 15 minutos y PBS (dos cambios de 5 minutos cada uno). Posteriormente se incubó el anillo en una dilución de anticuerpo primario-PBS durante 90 minutos a temperatura ambiente y durante 18 hrs a 4°C. Se utilizó un anillo para cada uno de los siguientes anticuerpos:  $\alpha$ -nucleofosmina/NPM1 [1/1000] (Bethyl. Cat. A-302-404-T, Lot. GR760013) y  $\alpha$ -nucleolina [1/50] (Bethyl Cat. IHC-00083, Lot. IHC-00083-1).



Al término del periodo de incubación en el anticuerpo primario se realizaron 5 lavados con PBS por flotación durante 5 minutos cada uno. A continuación, se dejó incubar la rejilla durante 90 minutos en una dilución de anticuerpo secundario acoplado a oro coloidal y PBS [1:50] a temperatura ambiente. Tanto para los ensayos de  $\alpha$ -nucleolina como para  $\alpha$ -nucleofosmina/NPM1 se utilizó el anticuerpo secundario fracción IgG (Electron Microscopy Science, Cat. 25364, Lot. 98F8985) acoplado a oro coloidal de 6 nm. Por último, se realizaron 5 lavados con PBS mediante flotación durante 5 minutos cada uno y al término de estos se dejaron secar los anillos durante 24 horas. Para observar las muestras en el Microscopio Electrónico de Transmisión se les dio un contraste muy ligero con acetato de uranilo [4%] y citrato de plomo [0.4%] (30 segundos cada uno).

### **VI.3. Obtención de imágenes de MET**

Las observaciones del material procesado y contrastado se realizaron en el Microscopio Electrónico de Transmisión modelo JEM-1010 de la marca Jeol. Las imágenes se registraron mediante una cámara digital MT1 modelo CCD-300-RC y el programa AMT. Las imágenes digitales obtenidas que se presentan en la sección de resultados fueron ordenadas y señaladas utilizando el programa Adobe Photoshop CC 2018.

## VII. RESULTADOS

### VII.1. Los componentes nucleolares en la etapa de cigoteno presentan diversidad morfológica

Dentro del túbulo seminífero de la rata en el estadio XII y XIII es posible comparar dos tipos celulares que conforman el epitelio especializado: los espermatoцитos primarios en la etapa de cigoteno que transitan el proceso meiótico y las células nodrizas adyacentes en interfase denominadas células de Sertoli (Fig. 19).

La célula de Sertoli (Fig. 20 A) muestra un nucléolo tripartito con un nucleolonema muy desarrollado ubicado en el centro del núcleo. Por otro lado, el espermatoцитo en cigoteno (Fig. 20 B-C) presenta de dos a tres estructuras fibrogranulares que por su

aparición y morfología se asume son parte del nucléolo, se encuentran orientadas mayormente hacia la envoltura nuclear, con respecto al nucléolo de la célula de Sertoli son de menor tamaño y tienen diversas formas irregulares (Fig. 20).

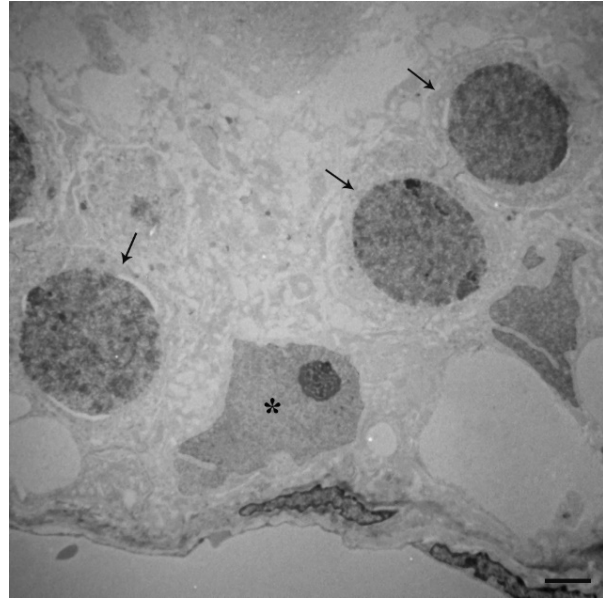


Figura 19. Micrografía electrónica del túbulo seminífero de la rata. Contraste UrPb. Se observan espermatoцитos primarios en la fase de cigoteno (flechas) y células de Sertoli (\*). Barra de cal.=10  $\mu$ .

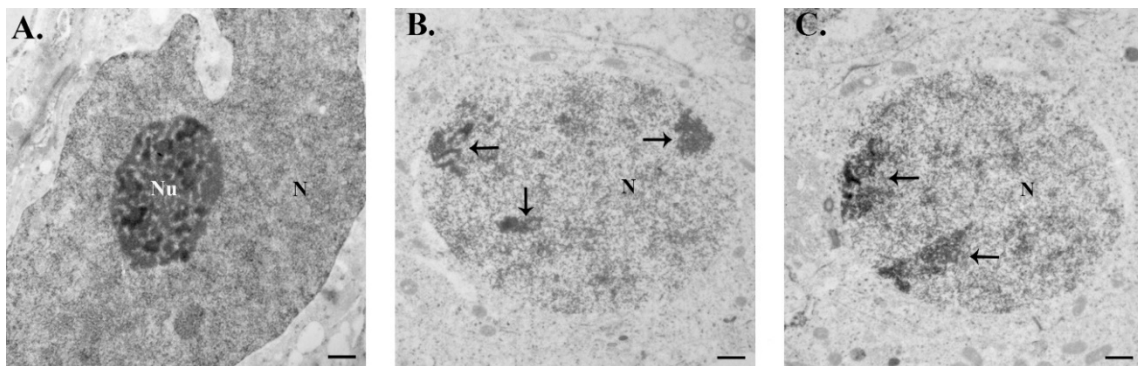
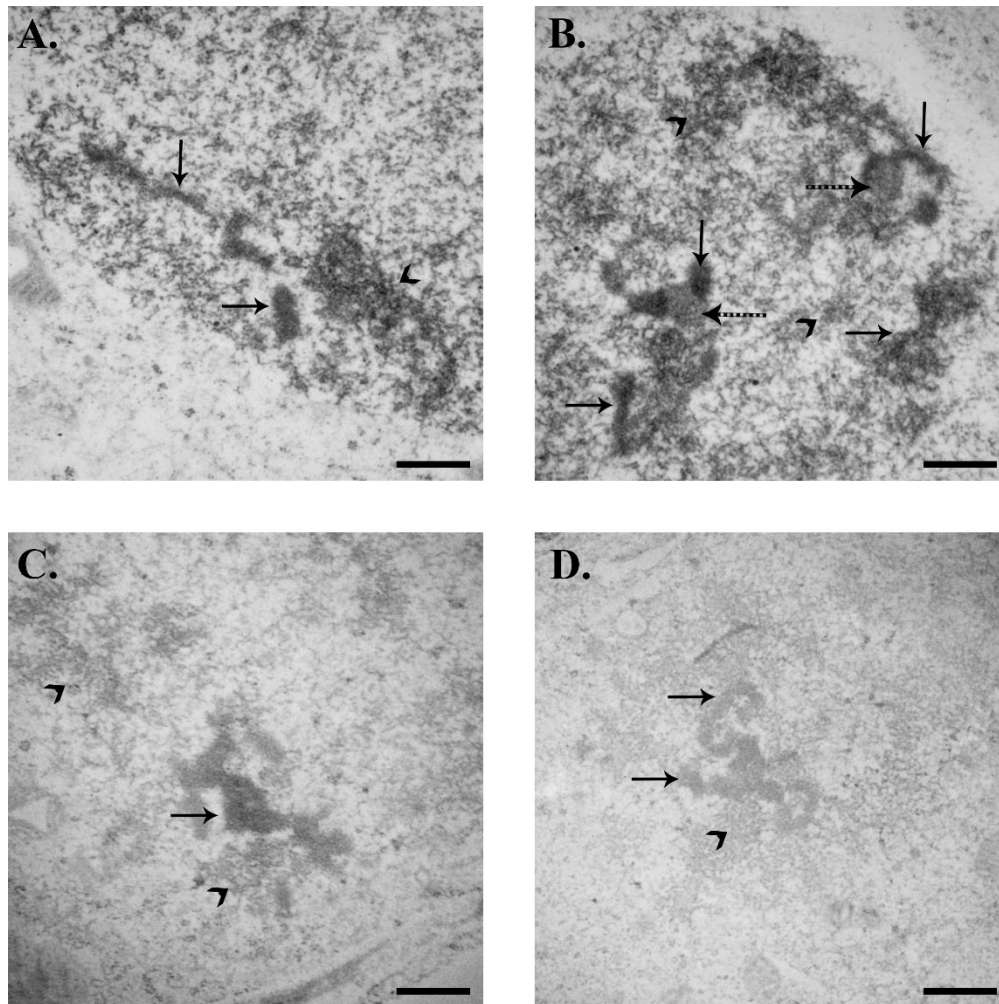


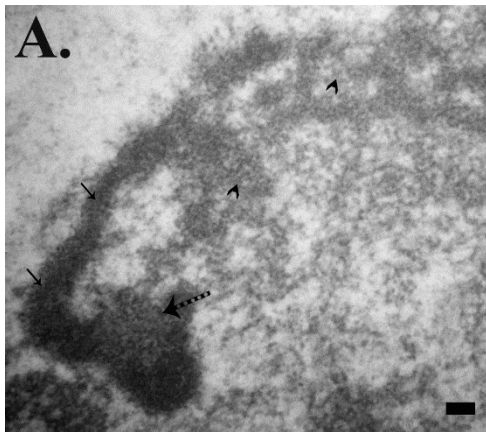
Figura 20. Micrografías electrónicas de una célula de Sertoli y de espermatoцитos primarios (UrPb). La célula de Sertoli (A) presenta un nucléolo (Nu) reticular prominente en su parte central, mientras que los núcleos (N) de los espermatoцитos en la fase de cigoteno (B-C) muestran dos o tres estructuras fibrogranulares (flechas). Barra de cal.= 500 nm.

La heterogeneidad de las estructuras nucleolares abarca desde formas pequeñas compactas con pequeños intersticios, hasta estructuras alargadas con pequeñas porciones fibrogranulares, a primera vista pueden estar provistas o no de un centro fibrilar o de porciones granulares adyacentes, cabe señalar que el componente granular no es evidente como en el nucléolo de la célula de Sertoli. En la Fig. 21 se muestran algunas de las formas que pueden identificarse, las porciones más electrodensas sugieren ser parte del DFC. El DFC tiene morfologías alargadas y se mantiene en contacto con los centros fibrilares sin que se localicen rodeándolos por completo (Fig. 21 B). Por otro lado, hay porciones granulares cercanas a las hebras de los DFCs que sugieren ser parte del GC, estas se encuentran en cercanía con el DFC, entremezcladas o en cúmulos separados (Fig. 21 C-D).

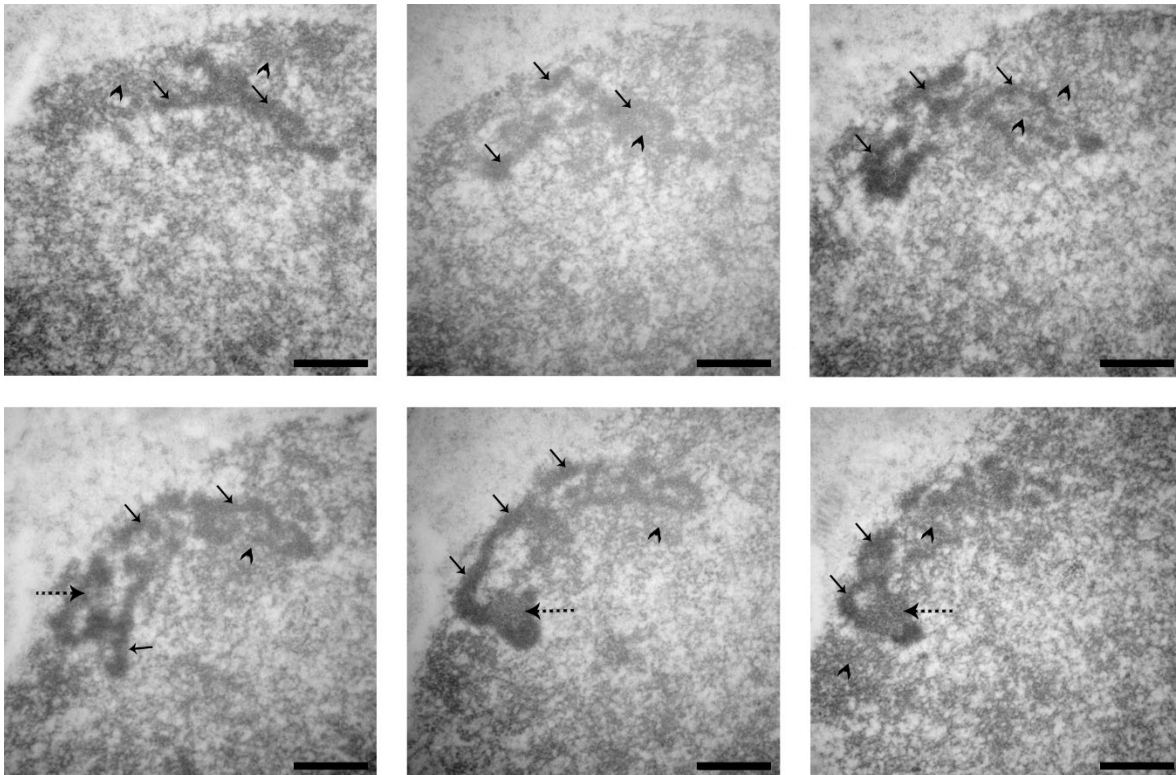


*Figura 21.* Micrografías electrónicas de espermatocitos en la fase de cigoteno con contraste UrPb (A-B) y técnica regresiva EDTA preferencial para ribonucleoproteínas (C-D). En las imágenes se observan estructuras nucleolares donde las porciones alargadas más electrodensas corresponde al DFC (flechas), estas pueden estar en contacto con centros fibrilares (flecha punteada) y tener porciones granulares adyacentes o en cúmulos separados (cabezas de flecha). Barra de cal.= 500 nm.

Para verificar si había una correlación entre el tamaño-forma de las estructuras nucleolares y la presencia de los tres componentes (FC, DFC y GC), se evaluó su morfología mediante cortes seriados (Fig. 22). En la mayoría de los casos se observó que cada estructura nucleolar cuenta con al menos un FC homogéneo, pequeño y esférico que se mantiene en contacto con el DFC. El DFC muestra diversas morfologías como hebras alargadas, en forma de gancho y en algunas otras ocasiones se aprecia en forma semi-reticular de apariencia muy laxa con proyecciones dentro del nucleoplasma, debido a su alta electrodensidad es distinguible de la heterocromatina. Por otro lado, cuando están presentes las porciones granulares estas se aprecian en zonas más distales a la zona de contacto entre el FC y DFC (Fig. 22).

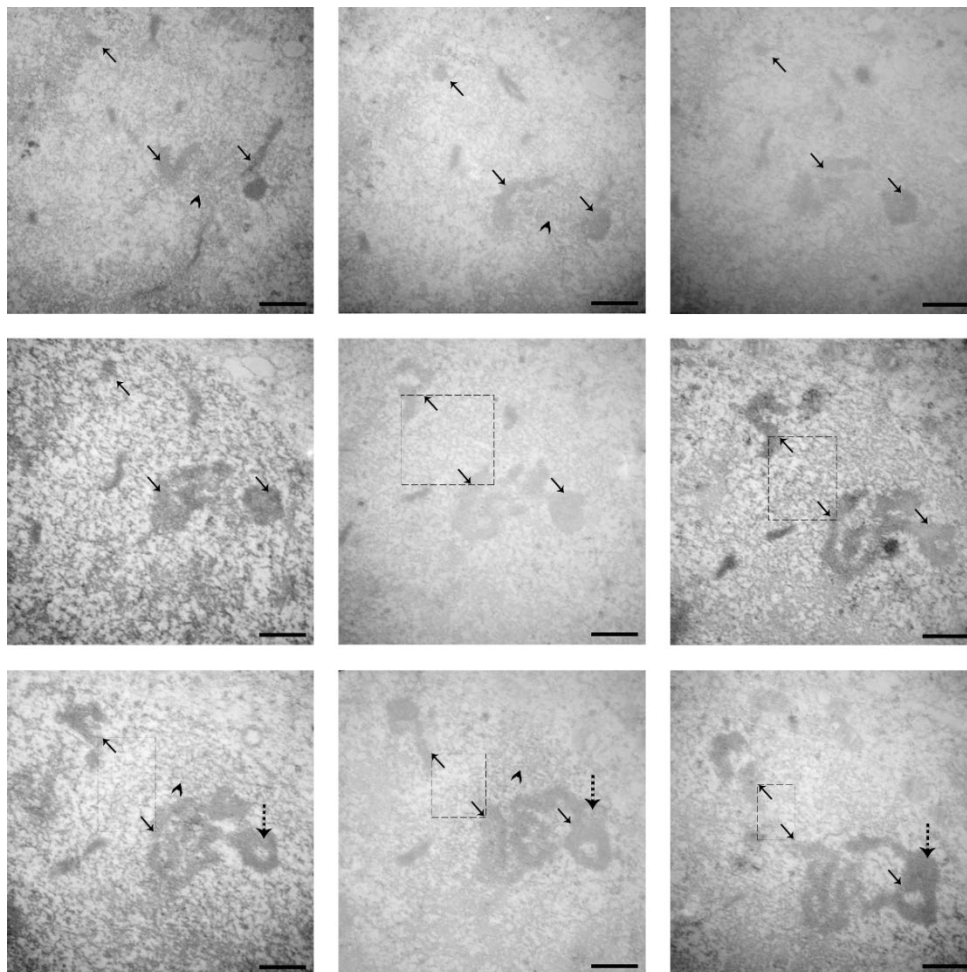


*Figura 22.* Micrografías electrónicas de cortes seriados de un espermatozoido en la etapa de cigoteno que muestra la estructura nucleolar. Contraste UrPb. La imagen A corresponde a un nucleolo a gran aumento el cual contiene el FC (flecha punteada), el DFC (flechas) y una parte granular (cabeza de flecha) (Barra de cal.= 100 nm). La serie de micrografías debajo corresponden a la evaluación en cortes seriados de dicho nucleolo, se observa el cambio en la morfología del DFC (flechas) y algunas pequeñas porciones granulares (cabeza de flecha), además se aprecia la asociación del FC (flecha punteada). (Barra de cal.= 500 nm).



## VII.2. Los componentes nucleolares tienen conexión entre ellos a través de las hebras de DFC

Los cortes seriados mostraron la diversidad morfológica y el arreglo de los componentes nucleolares (Fig. 21 y 22). De manera similar, los cortes seriados contrastados con la técnica EDTA preferencias para RNPs evidencian cierta continuidad entre las porciones de nucléolo, además, es posible observar que las hebras alargadas de DFC se extienden dentro del nucleoplasma hacia los componentes de otros nucléolos próximos entre sí. Al realizar la técnica de EDTA en cortes seriados se observó al DFC como el componente predominante debido a su relativo mayor tamaño en comparación al FC y al GC que parece estar ausente (Fig. 23).



*Figura 23.* Cortes seriados que muestran la relación que mantienen los componentes nucleolares mediante las hebras de DFC. Técnica EDTA. La serie de micrografías corresponden al seguimiento en cortes seriados de dos estructuras donde se observa el cambio en la morfología del FC (flecha punteada) y el DFC (flechas), además se observa la confluencia de las hebras de DFC (rectángulo). Las cabezas de flecha señalan porciones de RNPs cercanas al nucléolo. (Barra de cal.= 500 nm).

### VII.3. Los espermatoцитos en cigoteno presentan de 2 a 3 Regiones del Organizador Nucleolar positivas al AgNOR

Los organizadores nucleolares en la etapa de cigoteno se destacan como estructuras altamente contrastadas por un fino precipitado conformado por las sales de plata reducida en la técnica de AgNOR, estos se ubican cercanas a la envoltura nuclear y su número varia de dos a tres (Fig. 24-B y C). Se aprecian con una morfología irregular y representan sitios que corresponden tanto al FC como a hebras del DFC donde la impregnación es mayor.

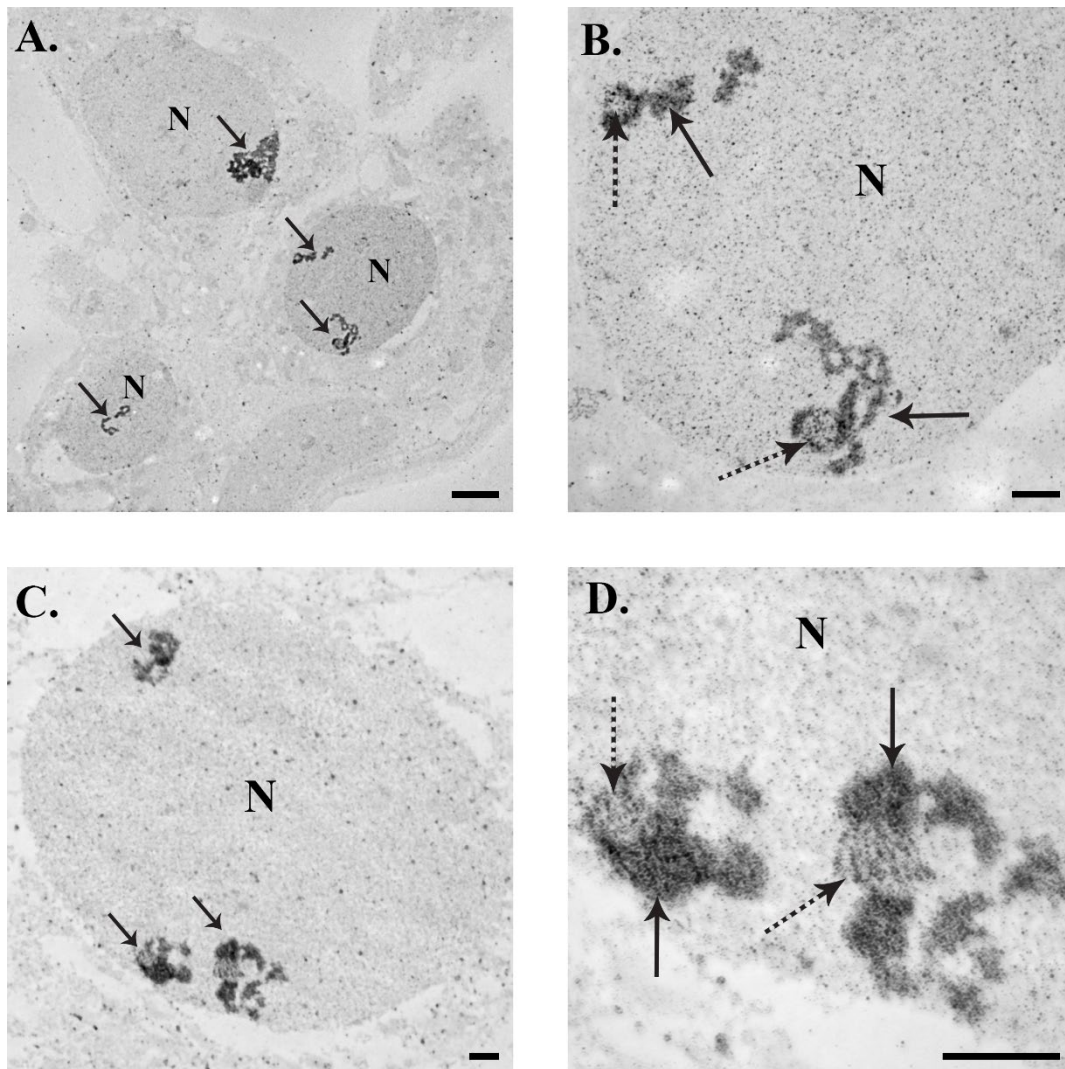
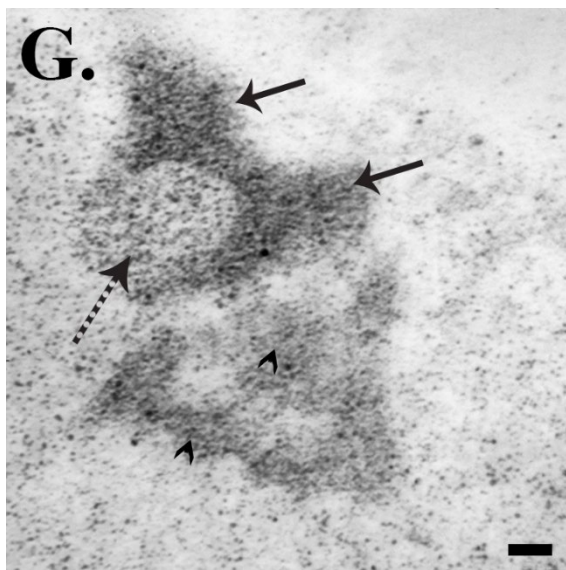
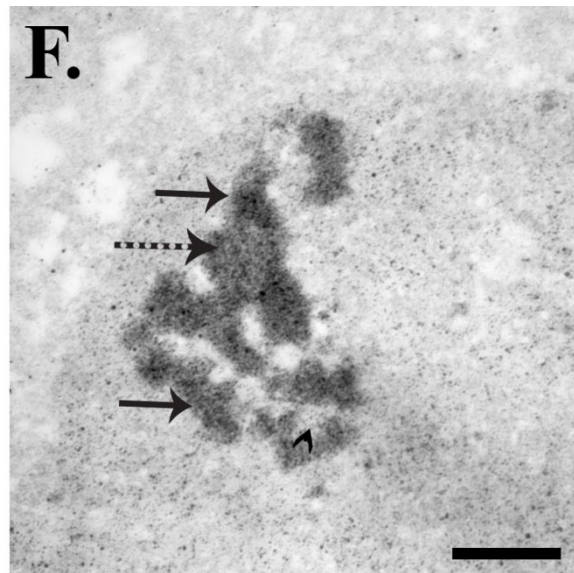
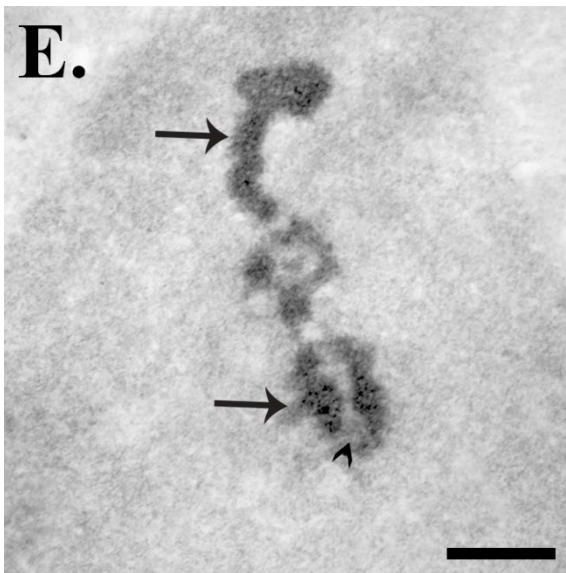


Figura 24. Micrografías electrónicas de espermatoцитos con la técnica AgNOR. La imagen A es una foto panorámica del túbulo seminífero donde se muestran las impregnaciones detectadas mediante la técnica (flechas) (Barra de cal.= 2 $\mu$ ). En las imágenes B y C se muestra que el número de impregnaciones (flechas) en espermatoцитos en la fase de cigoteno son entre 2 o 3 (Barra de cal.=500 nm). La imagen D es una captura a mayor aumento de las impregnaciones de la imagen C donde se observa el FC (flecha punteada) de cada nucléolo y el DFC que exhibe una mayor cantidad del precipitado fino de la plata reducida (flechas) (Barra de cal.=500 nm).



A mayores aumentos se observan tres porciones en función del grado de impregnación, en la figura 25 se evidencia que las hebras de DFC corresponden a las zonas con mayor impregnación de las sales de plata, le sigue una porción pequeña esférica compacta la cual está compuesta por pequeñas fibrillas que son medianamente impregnadas de manera homogénea (Fig. 25-F y G), esta estructura corresponde al FC el cual mantiene contacto con las hebras de DFC, por último se observan pequeños precipitados difusos y menos electrodensos entremezclados con el DFC que sugieren ser GC pero de manera muy discreta ya que nuevamente parece estar ausente.



*Figura 25.* Micrografías electrónicas de estructuras nucleolares de espermátocitos en la fase de cigoteno con la técnica AgNOR. Diversidad de formas del DFC (flechas) en el que se observa el fino precipitado de las sales de plata (E y F) (Barra de cal.= 500 nm). Detalle a gran aumento del precipitado localizado en los componentes nucleolares: FC (flecha punteada) DFC (flechas). Las cabezas de flecha muestran parte de los precipitados difusos. (Barra de cal.= 100 nm).

#### VII.4. Inmunolocalización ultraestructural de proteínas nucleolares.

Debido a que hasta el momento se han descrito los componentes nucleolares en función de las micrografías obtenidas utilizando contraste general y técnicas preferenciales de contraste (EDTA y AgNOR), se realizó la detección de proteínas específicas de los componentes del nucléolo para así corroborar lo previamente observado.

##### VI.4.1 Nucleolina

La marca de grano de oro de 6 nm que evidencia la inmunodetección de nucleolina muestra una distribución preferencial sobre las hebras de DFC y es específica para él mismo (Fig. 26).

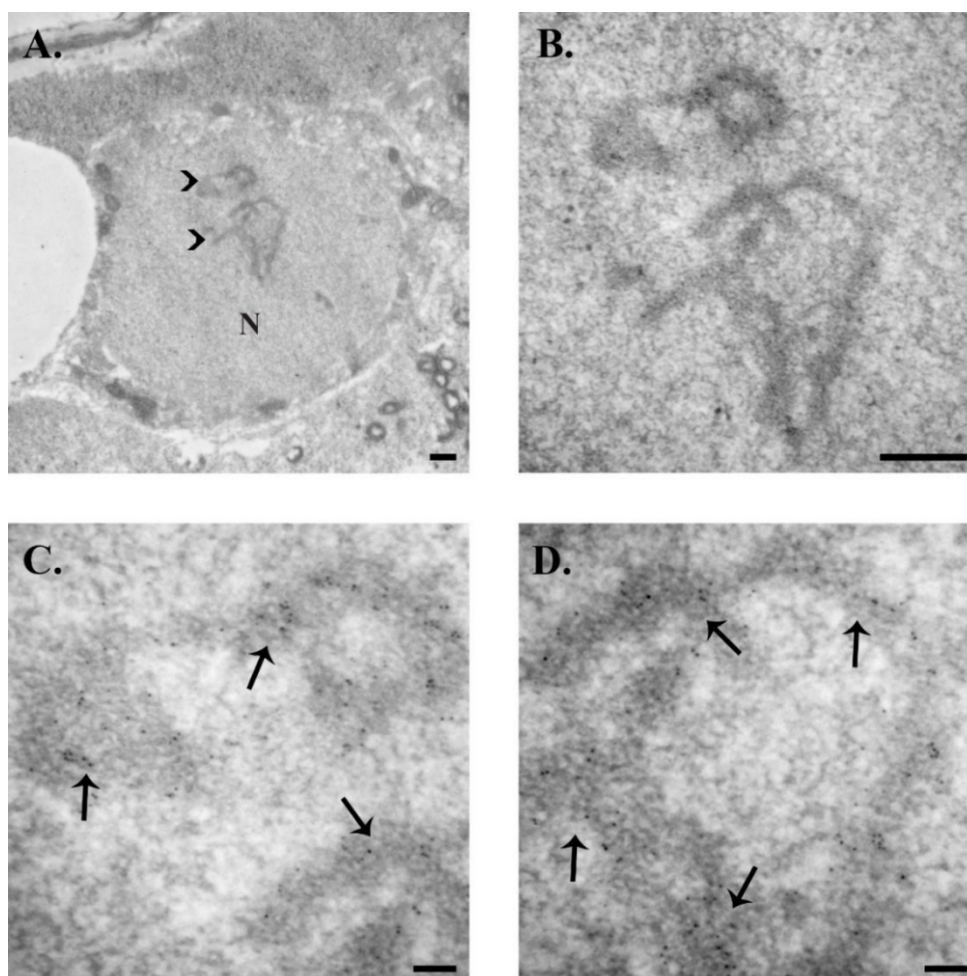
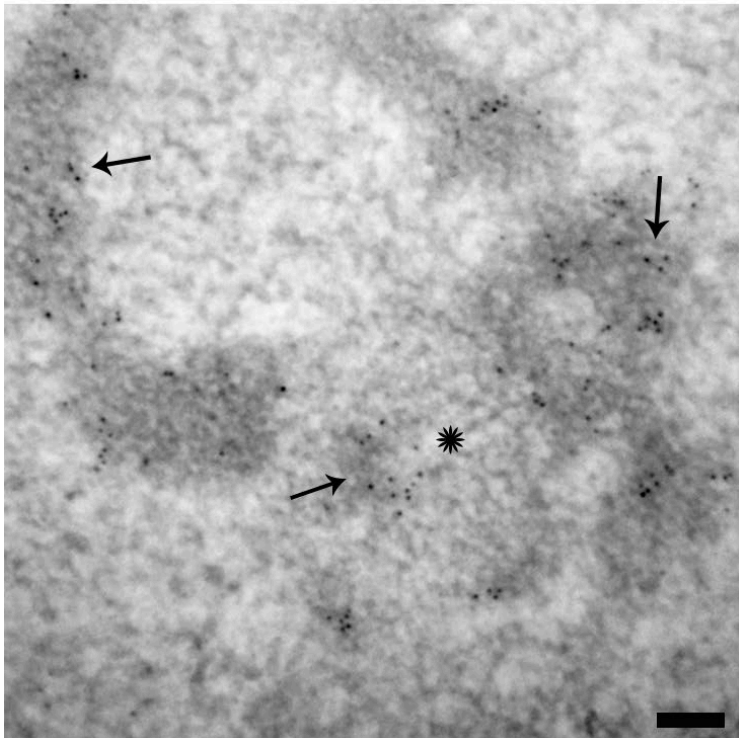
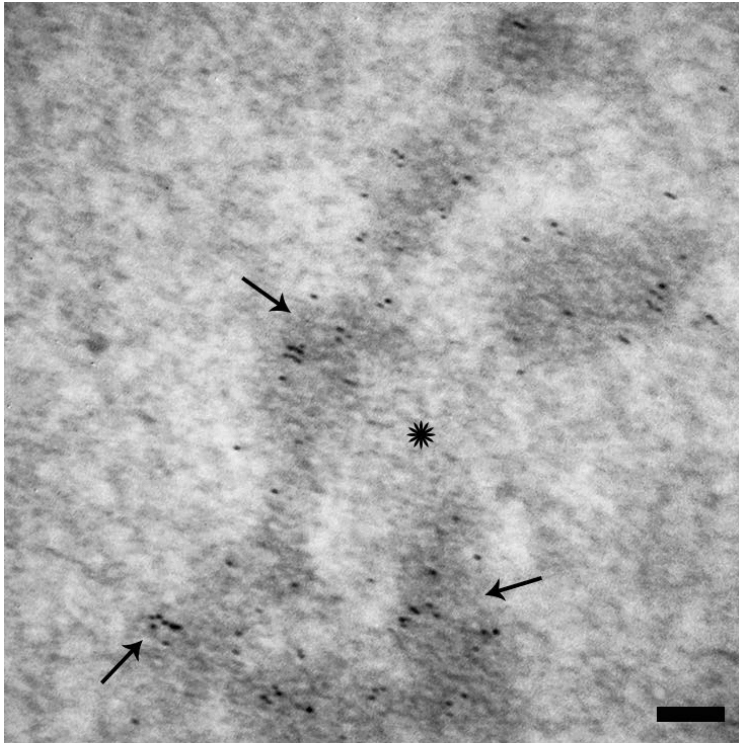


Figura 26. Inmunodetección de nucleolina en un espermatocito en la fase de cigoteno. Micrografía panorámica (A) en la que se aprecia la disposición de las estructuras nucleolares (cabeza de flecha) dentro del núcleo (N) y su apariencia a mayor aumento (B) (Barra de cal.= 500 nm). Detalle de la distribución de la marca (flechas) sobre las estructuras nucleolares (C y D) (Barra de cal.=100 nm).





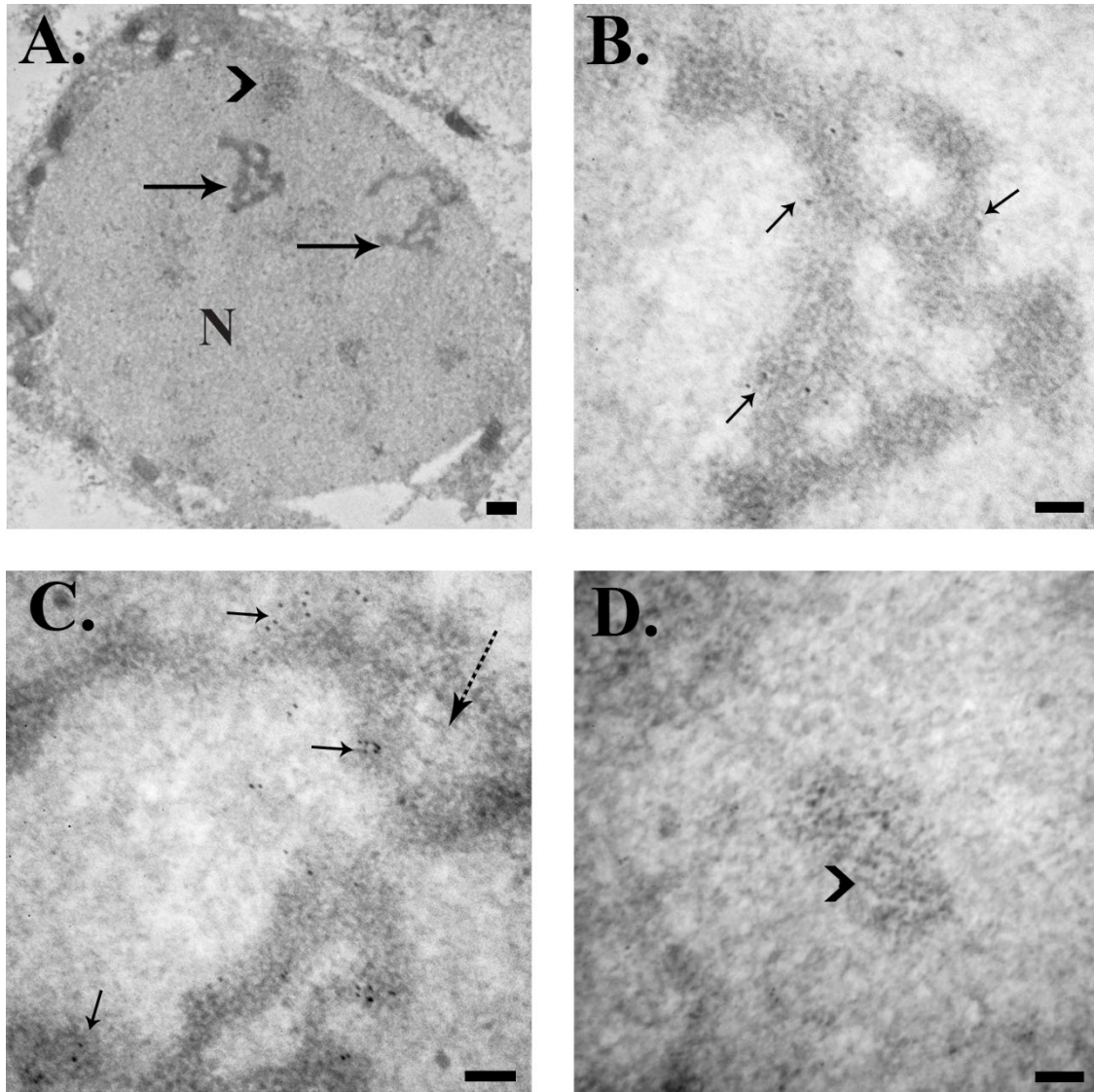
*Figura 27.* Inmunolocalización ultraestructural de nucleolina en el nucléolo de espermatocitos en la fase de cigoteno. En las micrografías a grandes aumentos (120 k) se observa el FC (\*) y las zonas del DFC donde se encuentra de manera preferencial la marca del grano de oro señalada con las flechas (Barra de cal.=100 nm).

En la figura 27 se muestran dos micrografías a grandes aumentos que muestran la localización de la marca positiva para nucleolina en regiones con una apariencia más fibrilar localizadas en las porciones interiores de las hebras de DFC. Por otro lado, se observa el FC desprovisto de marca del grano de oro en su interior, con una apariencia redonda y compuesto de manera homogénea por pequeñas fibrillas, sin embargo, hay marca en las regiones de contacto entre el DFC y FC.

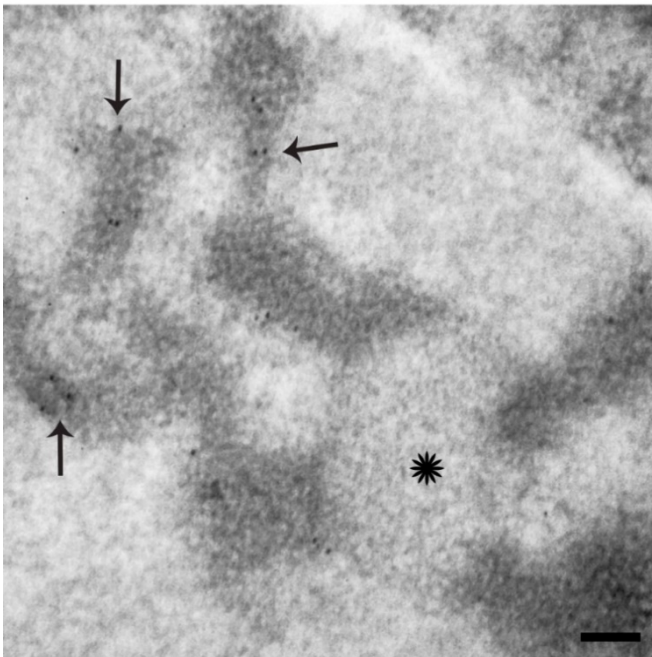
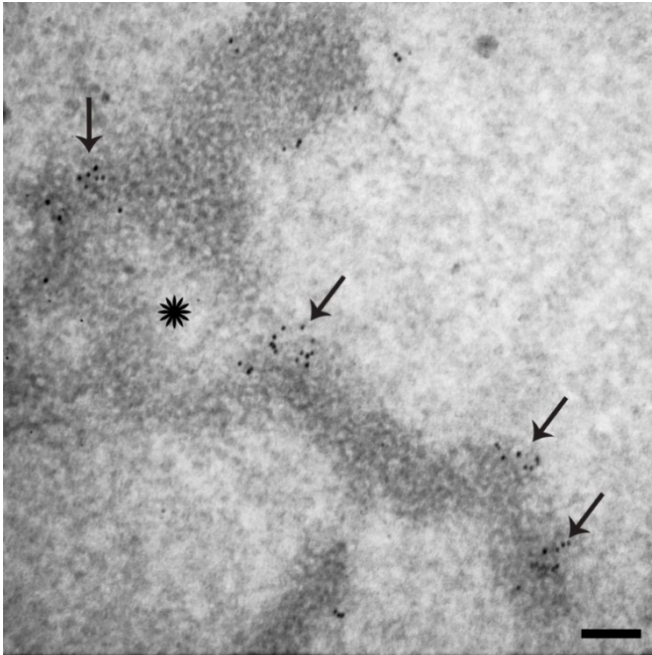
Cabe destacar que fuera del DFC no hay marca y tampoco se observa un componente granular como tal.

## VII.4.2 Nucleofosmina

En el caso de la nucleofosmina, la marca del grano de oro tuvo una localización inesperada, aunque la cantidad de marca fue menor que la de nucleolina, ésta se ubicó muy cerca del DFC específicamente en las zonas discretas y más granulares localizadas a su alrededor (Fig. 28), además, los cúmulos de gránulos adyacentes que son positivos para la técnica regresiva de contraste EDTA se exhiben desprovistos de marca (Fig. 28-D).



*Figura 28.* Inmunolocalización ultraestructural de nucleofosmina en el nucléolo de espermatocitos en la fase de cigoteno. La imagen A es una captura de un espermatocito en la fase de cigoteno donde se muestran dos estructuras nucleolares (flechas) y un cúmulo de RNPs (cabeza de flecha) (Barra de cal.=500 nm). Las imágenes B y C son micrografías a mayor aumento de las dos estructuras nucleolares respectivamente, se muestran las zonas donde se distribuye el grano de oro (flechas) y el FC (flecha punteada) (Barra de cal.=100 nm). La imagen D es un aumento del cúmulo de RNPs (cabeza de flecha) el cual carece de marca positiva a la nucleofosmina (Barra de cal.=100 nm).



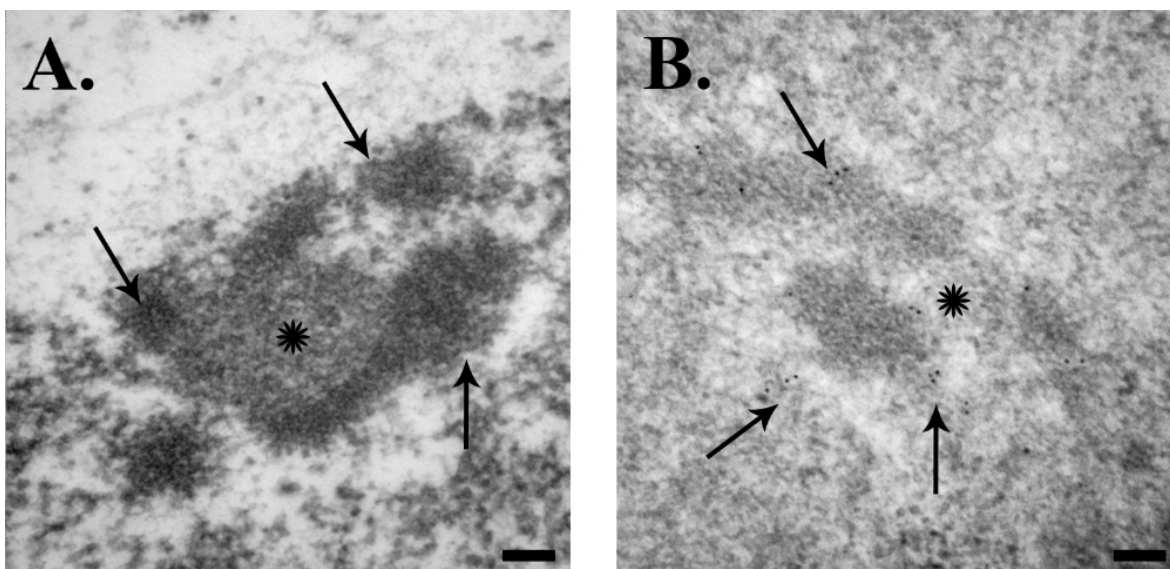
En la figura 29 se detalla la marca positiva a nucleofosmina localizada en la periferia de las hebras de DFC, se observa en regiones con apariencias más fibrogranulares que pueden estar distales o no al FC (el cual carece de marca). La presencia de la marca para esta ribonucleoproteína sugiere que las estructuras nucleolares hasta ahora descritas cuentan con elementos de los tres compartimentos funcionales, pero el GC no se encuentra como un compartimento bien definido ya que se encuentra en menor medida como una porción discreta de gránulos entremezclados con el DFC. Por otro lado, el DFC sufre una modificación morfológica importante que pese a la heterogeneidad de formas que adopta, mantiene su interrelación con los otros dos componentes durante la etapa del cigoteno.

*Figura 29.* Inmunolocalización ultraestructural de nucleofosmina en el nucléolo de espermatoocitos en la fase de cigoteno. En las micrografías a grandes aumentos (120 k) se observa el FC (\*) y las zonas granulares discretas adyacentes al DFC donde se encuentra la marca del grano de oro (flechas) (Barra de cal.=100 nm).

## VII.5. Comparación con otros estadios

La morfología nucleolar en el leptoteno que es el estadio previo al cigoteno durante el proceso meiótico, se caracteriza por tener FCs pequeños y DFC compactos los cuales en algunas ocasiones están desprovistos de una zona granular adyacente (Fig. 30 A). En comparación con el cigoteno, durante la etapa de leptoteno el tamaño relativo del DFC es menor y la diversidad de formas se reduce a pequeñas hebras compactas electrodensas ubicadas alrededor del FC.

De manera similar como lo muestran los resultados previamente descritos en cigoteno, la inmunolocalización de nucleofosmina demuestra la presencia de marca localizada en regiones cercanas al DFC que hacen referencia al GC (Fig. 30 B) y que se encuentra de manera discreta adyacentes al DFC dando una apariencia fibro-granular.

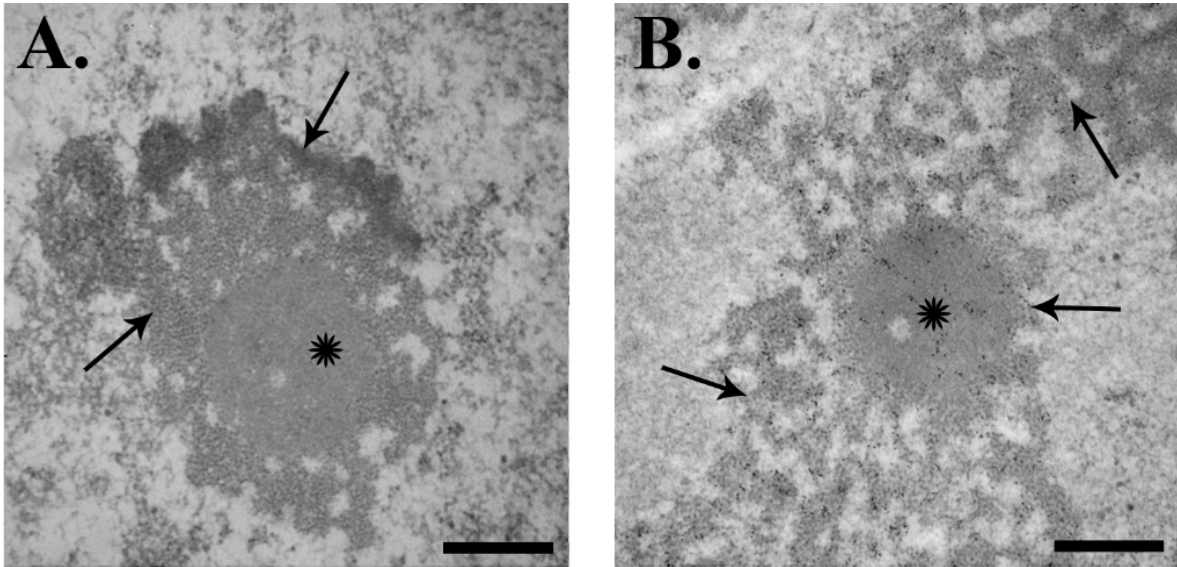


*Figura 30.* Micrografías del nucléolo de espermatocitos en la fase de leptoteno. En la imagen A (UrPb) se observa un nucléolo pequeño con su FC (\*) en contacto con el DFC (flechas). La imagen B corresponde a una inmunolocalización de nucleofosmina, se observa el FC (\*) y las zonas adyacentes al DFC provistas de granos de oro (flechas) (Barra de cal.=100 nm).

Conforme avanza el proceso meiótico hacia el paquiteno (etapa subsecuente al cigoteno), se observa una tendencia a la conformación de un nucléolo bien consolidado semejante al de una célula en interfase (célula de Sertoli) con un nucleolonema bien desarrollado (Fig. 31 A), se observa la presencia de los FCs rodeados por el DFC el cual exhibe una forma reticular y que tiene entre sus intersticios al GC, además de hacerse patente la presencia de una



estructura granular (descrita como extranucleolar) a la que se denomina el cuerpo redondo. La inmunodetección para nucleofosmina puso en evidencia la presencia de ésta en las regiones de apariencia más granular del nucleolonema y en el cuerpo redondo (Fig. 31 B).



*Figura 31.* Micrografías del nucléolo de espermatocitos en la fase de paquiteno. En la imagen A se observa un nucléolo reticular de gran tamaño, en el que se distingue el DFC (flechas) y el cuerpo redondo (\*). La imagen B corresponde a una inmulo-localización de nucleofosmina, se observa el cuerpo redondo (\*) con gran cantidad de marca y las zonas intersticiales del DFC (flechas) provistas de granos de oro (Barra de cal.=500 nm).

## VIII. DISCUSIÓN

En este trabajo a través de técnicas de microscopía electrónica convencionales se observó que durante la etapa de cigoteno hay de 2 a 3 estructuras nucleolares orientadas hacia la NE, dicha cantidad está estrechamente relacionado con el número de NORs característico de la especie *Rattus norvegicus*, el cual es de 3 y están ubicados en los cromosomas acrocéntricos 3, 11 y 12 (Kano *et al.*, 1976; Badenhorts *et al.*, 2011). Sin embargo, la heterogeneidad de formas observadas, así como la organización general del nucléolo durante esta etapa muy posiblemente está determinada por 2 factores importantes: la dinámica cromosómica y el estado transcripcional del nucléolo.

### **Nuécleo y la dinámica cromosómica**

A inicios de la profase meiótica los cromosomas parecen estar inmóviles dentro del nucleoplasma, pero al final del leptoteno el núcleo comienza a girar y pueden observarse distintos movimientos oscilatorios por parte de los cromosomas, durante esta etapa los elementos axiales son ensamblados y cada uno es asociado a un par de ejes de cohesinas que organizan las dos cromátidas hermanas (Page & Hawley, 2004; Zickler & Kleckner, 2016); algunos estudios en espermatozoides de rata y ratón muestran que las oscilaciones cromosómicas ocurren desde el leptoteno tardío hasta el paquiteno temprano, pero el movimiento cromosómico mayor se da durante el cigoteno (Alleva & Smolikove, 2017).

La oscilación cromosómica tiene un patrón evolutivamente conservado y es dirigida por el movimiento de los telómeros, los cuales al iniciar la meiosis cambian su forma, migran a la periferia nuclear y se anclan físicamente a la NE, una vez anclados éstos se mueven hacia un polo de la envoltura dando una configuración similar a un “ramo de flores” o “*bouquet*” (Scherthan, 2001; Siderakis & Tarsounas, 2007). Algunos autores postulan que la configuración de *bouquet* sirve para intensificar las interacciones inter-homólogas de los cromosomas las cuales son necesarias para el apareamiento y correcta recombinación, aunado a esto, los cromosomas sufren una serie de cambios morfológicos como compactación y la formación de elementos axiales que estructuralmente definen a cada homólogo (Fig. 32) (Benavente & Volff, 2009; Zickler & Kleckner, 1998, 2016).

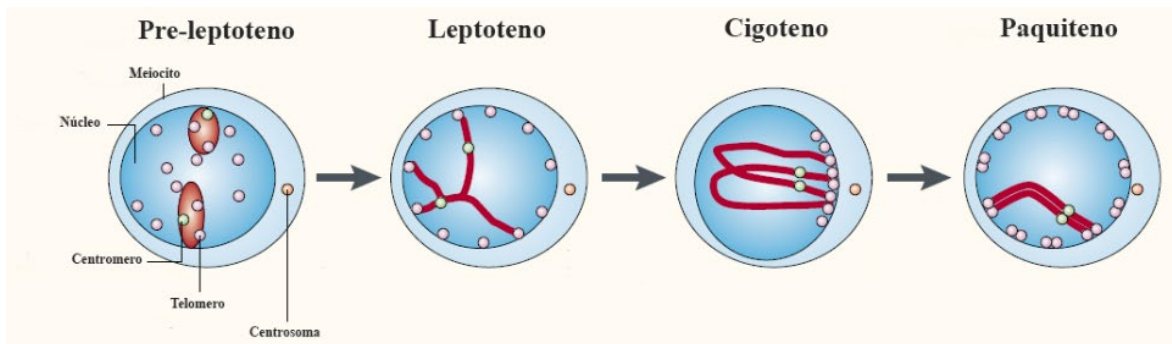


Figura 32. Modelo del movimiento cromosómico durante la profase meiótica I. Tomado y modificado de Scherthan (2001).

Tomando en cuenta lo anterior, se ha descrito que durante la profase meiótica I en mamíferos los bivalentes cromosómicos están implicados en la organización del nucléolo durante las primeras etapas, por lo que el FC se mantiene en asociación a su respectivo cromosoma (Stahl, 1991; Tres, 2005). Sumado a esto, la influencia mecánica que tiene la reorganización y reubicación cromosómica explica en cierta medida la polaridad que tienen los nucléolos durante el cigoteno, ya que los FCs están orientados hacia un lado mientras las hebras de DFC muestran cierta direccionalidad opuesta, similar a la de la cola de un cometa (Fig. 22, 24B-D, 25G). Debe tomarse en cuenta que las estructuras nucleolares observadas a nivel ultraestructural representan un instante capturado dentro de un proceso fisiológico y que pueden reflejar cualidades espacio-temporales, en este caso la influencia del movimiento de los cromosomas sobre la estructura nucleolar.

Otro punto a tratar es la disposición de los nucléolos hacia la NE, la cual posiblemente está determinada por la arquitectura específica del núcleo durante esta etapa ya que cada cromosoma ocupa un territorio dentro de él. Algunos autores como Berrios *et al.* (2004) correlacionan la posición de los cromosomas que llevan el NOR dentro del núcleo y la posición que tiene el NOR en el cromosoma, es decir, en las especies en las que la región organizadora del nucléolo se localiza en las partes terminales de los brazos de los cromosomas (como en los cromosomas acrocéntricos de la rata), el nucléolo se observa mayormente hacia la periferia de los espermatoцитos; por otro lado, en las especies en las que el NOR se encuentra en las partes intersticiales del cromosoma, el nucléolo tiende a estar orientado al centro del espermatoцитo (Berrios *et al.*, 2017).

Respecto a la variación en el número de nucléolos observados en este trabajo (2-3), posiblemente se correlaciona con lo descrito por Stahl (1991) en humanos; él vio de manera general la asociación de un NOR/FC a un autosoma bivalente, pero también observó la asociación de dos FCs y rara vez tres. Parte de lo que él propone es que podría ocurrir la inactividad de uno de los NORs o la fusión temprana de los nucléolos formados durante leptoteno (Stahl *et al.*, 1991).

Adicionalmente se han referido otros factores que podrían influir en la disposición espacial del nucléolo hacia la NE, por ejemplo, la proteína lamin-B1 (perteneciente a una familia de proteínas que conforman la matriz de la lámina nuclear) la cual mantiene la plasticidad funcional de los nucléolos y participa en la reorganización estructural post-mitótica de éstos y del núcleo (Martin *et al.*, 2009), sumado a esto hay dominios de cromatina asociada al nucléolo que muestran sitios específicos de asociación tanto para éste como para la NE (van Koningsbruggen *et al.*, 2010).

### **Nuécleo y actividad transcripcional**

Se ha reportado que en la primera profase meiótica la síntesis de rRNA no está abatida por completo como ocurre en la profase mitótica. Algunos autores como Stefanini & Monesi (1974) han documentado mediante ensayos de autoradiografía de alta resolución la incorporación de precursores marcados en los espermatoцитos de rata y ratón; el patrón de etiquetado exhibe poca marca durante las primeras etapas de la profase (leptoteno-cigoteno), un aumento de la marca en el estadio de paquiteno hasta alcanzar un pico en paquiteno medio y una disminución progresiva en las etapas finales de la profase meiótica (Kierszenbaum & Tres, 1974; Tres, 1975; Schultz & Leblond; 1990).

En contraste, autores como Schmid *et al.* (1977) y Hofgärtner *et al.* (1979) consideraron que hay una congruencia precisa entre los estudios de autoradiografía y las impregnaciones de plata, específicamente en las etapas pre-meióticas, meióticas y post-meióticas de la espermatogénesis del ratón, por consiguiente, en este trabajo se optó por realizar la técnica de AgNOR implementada por Ploton *et al.* (1986) para así determinar si en todas las



estructuras nucleolares el FC se encontraba en asociación con el DFC y de manera indirecta determinar si el nucléolo se encontraba activo o inactivo.

Al igual que en la técnica de contraste general (UrPb), en las micrografías obtenidas con la técnica de AgNOR se observaron de 2 a 3 impregnaciones, con base en la literatura, a nivel ultraestructural cada impregnación corresponde a un FC/NOR el cual se observó íntimamente asociado al DFC como ha sido referido en distintas líneas celulares (Derenzini *et al.*, 1990; Derenzini & Ploton, 1991; Sousa & Carvaleiro, 1994; Trerè, 2000).

El precipitado observado durante el cigoteno que evidencia las proteínas AgNOR se detectó exclusivamente en los FCs y en los DFCs excluyendo al GC como se ha establecido en la literatura (Roussel *et al.*, 1992; Roussel & Hernandez-Verdun, 1994); el precipitado observado dentro del FC se debe a una subunidad de la RNA pol I y al UBF que han sido descritas como argirófilas (Weisenberger & Scheer, 1995; Gébrane-Younès *et al.*, 1997; Kálmarová *et al.*, 2007), estos dos componentes junto con el factor de selectividad 1 forma el complejo de pre-iniciación en el promotor de rDNA y son parte de la maquinaria esencial de transcripción (Raska *et al.*, 2006).

Las proteínas destacadas por el AgNOR están asociadas a los genes ribosomales activos, su presencia o ausencia es un criterio para la discriminación *in situ* entre NORs activos e inactivos, esto fue establecido por primera vez por Miller *et al.* (1976) en líneas celulares somáticas híbridas en las que sólo la especie capaz de transcribir los genes ribosómicos poseían proteínas positivas al AgNOR. Partiendo de esta premisa y de acuerdo con las observaciones puntualizadas por los estudios de autoradiografía, el nucléolo durante la etapa de cigoteno puede considerarse transcripcionalmente activo.

La impregnación de AgNOR se ha observado en diversas etapas de la espermatogénesis de diferentes grupos de animales, desde peces hasta mamíferos, conservando un patrón de positividad en las espermatogonias, durante las primeras etapas de la profase meiótica (hasta paquitenio) y en las espermátidas redondas (Hofgärtner *et al.*, 1979; Schmid *et al.*, 1977, 1982, 1983). Por otro lado, la impregnación está ausente en las metafases I y II, así como en las etapas de alargamiento de las espermátidas donde la transcripción se encuentra fuertemente disminuida o abatida (Schmid *et al.*, 1977, 1982, 1983).

Las observaciones del presente trabajo apuntalan a que la heterogeneidad de formas está influenciada por la dinámica cromosómica característica del cigoteno, pese a esto el FC y DFC se mantienen en íntima relación, los nucléolos están activos transcripcionalmente y la mayor cantidad de proteínas argirófilas se encuentran en el DFC, sin embargo, el componente granular parece estar separado de los otros dos componentes ya que pueden observarse estructuras granulares adyacentes o distantes al nucléolo (Figs. 21, 22, 23), por tal motivo se decidió realizar una inmunodetección de proteínas nucleolares que permitiera discernir entre la presencia o ausencia de estas proteínas y su ubicación dentro del nucléolo.

### **Proteínas nucleolares**

Dentro de los distintos pasos que conforman la biogénesis de ribosomas hay una multitud de proteínas implicadas y muchas de ellas modulan funciones específicas en la cromatina nucleolar (Danto & Catalano, 2013). Como se ha mencionado anteriormente, el nucléolo está compuesto por tres sub-compartimientos principales (FC-DFC-GC) y algunos autores han propuesto marcadores distintivos para cada uno: la subunidad RPA194 de la RNA pol I y UBF para el FC, la fibrilarina y nucleolina para el DFC y la nucleofosmina para el GC (Biggiogera *et al.*, 1989; Olson, 2011; Danto & Catalano, 2013).

Tomando en cuenta lo anterior, para este trabajo se realizaron inmunolocalizaciones ultraestructurales de nucleolina y nucleofosmina que son distintivas del DFC y GC respectivamente, con el fin de visualizar su localización dentro y fuera del nucléolo durante la etapa de cigoteno.

#### *Nucleolina*

La nucleolina es una proteína multifuncional, ubicua y de las más abundantes en el DFC del nucléolo, se describió por primera vez en hígado de rata por Orrick *et al.* en 1973, no obstante, se han identificado sus proteínas homologas (y sus correspondientes genes) en otros roedores, humanos, pollos y en el anfibio *Xenopus laevis* (Srivastava *et al.*, 1989, Olson, 2011).

En las micrografías obtenidas en este trabajo se observa que la marca del grano de oro detecta a la nucleolina en porciones medias o internas de las hebras de DFC (específicamente en las

regiones más fibrilares), además puede observarse marca en regiones próximas a las zonas de contacto entre el FC y el DFC (Figs. 26, 27), dicha ubicación posiblemente se debe a que es una proteína asociada a la cromatina nucleolar en interfase capaz de ayudar en el ensamblaje del nucleosoma y la remodelación de la cromatina (Olson, 2011); esto se debe a que el dominio N-terminal de la nucleolina es el sitio de múltiples interacciones proteína-proteína y sus secuencias ácidas interactúan con la histona H1 para inducir la descondensación de la cromatina (Olson *et al.*, 1983; Olson & Thompson, 1983; Erard *et al.*, 1988; Ginisty *et al.*, 1999; Hanakahi *et al.*, 1999; Pollice *et al.*, 2000).

Algunos autores postulan que la transcripción de los genes ribosomales está condicionada a la accesibilidad y la dinámica de la cromatina (Birch & Zomerdijk, 2008; McStay & Grummt, 2008). Tomando en cuenta esto, la marca de C23 relativamente abundante observada en el DFC, podría evidenciar la función de ésta en la regulación de la transcripción de rDNA, ya sea regulando la estabilidad del genoma o mediante la interacción y modulación de distintas proteínas (Angelov *et al.*, 2006; Rickards *et al.*, 2007; Cong *et al.*, 2012).

Por otro lado, se sabe que la nucleolina desempeña un papel clave en los primeros pasos de procesamiento y en el ensamblaje de los pre-rRNAs (Bourbon *et al.*, 1983; Kass *et al.*, 1990; Ginisty *et al.* 2000, 2001; Roger *et al.*, 2003), la presencia de esta proteína en las estructuras nucleolares durante el cigoteno es indicio de que se están llevando a cabo los eventos de procesamiento temprano de los pre-rRNAs.

### *Nucleofosmina*

La fosfoproteína nucleolar B23 (NPM, numatrina en mamíferos y NO38 en anfibios) fue descubierta en células del hígado de rata y en células de Novikoff (Orrick *et al.*, 1973, Olson, 2011); ésta participa en el ensamblaje del nucleosoma, se une a las histonas y las transfiere al DNA, es una ribonucleasa esencial para la escisión del pre-rRNA y tiene una abundante localización en el GC por lo que ha sido considerada como una proteína representante de dicha región (Grisendi *et al.*, 2006, Danton & Catalano, 2013).

Para el caso particular de la rata, se ha determinado que las isoformas B23.1 y B23.2 tienen diferentes patrones de distribución sub-celular, la isoforma B23.1 contiene la NoLS en su

porción C-terminal la cual direcciona su ubicación en el GC del nucléolo, mientras que la isoforma B23.2 se encuentra en el nucleoplasma con bajos niveles de expresión (Spector *et al.*, 1984; Wang *et al.*, 1993; Danton & Catalano, 2013), por lo tanto en este trabajo se detectó la isoforma B23.1 que es la que se asocia en mayor medida al nucléolo.

Como se ha mencionado anteriormente, el GC durante el cigoteno se asume está algunas veces disociado de los componentes FC y DFC o se encuentra cercano a estos (Figs. 21, 22, 28D), es evidente que dentro de la heterogeneidad de formas observadas predominan las formas irregulares donde el DFC parece no tener la organización habitual ni conforman un nucleolonema, esto da pauta para asumir que el GC se pierde o se disgrega de los demás componentes por acción de los movimientos cromosómicos. Sin embargo, en este trabajo se observó que la marca de B23 está adyacente a las hebras de DFC en las porciones más granulares (Figs. 28, 29). Adicionalmente y de manera inesperada, la inmunolocalización de B23 no marcó los cúmulos de RNPs que se pensaba eran parte del GC y estaban separados del FC/DFC (Fig. 28-D), por lo tanto, el nucléolo de los espermatozoides en la fase de cigoteno tiene una estructura tripartita conformada por FC/DFC/GC.

Sumado a esto se ha descrito que la B23 tiene la capacidad de transbordar entre el núcleo y el citoplasma para unirse a los ácidos nucleicos y transportar partículas pre-ribosómicas (Olson *et al.*, 1986; Borer *et al.*, 1989; Dumber *et al.*, 1989), puede procesar pre-rRNAs en la secuencia espaciadora transcrita interna (ITS) y previene la agregación de proteínas en el nucléolo durante el proceso de ensamblaje ribosomal en etapas tardías de la biogénesis de ribosomas (Herrera *et al.*, 1995; Savkur & Olson, 1998; Grisendi *et al.*, 2006). La poca presencia de marca de B23 asociada a las estructuras nucleolares durante la etapa de cigoteno, es un factor que sugiere en cierta medida que los procesos de maduración tardía se encuentran disminuidos o no se están llevando a cabo.

### **Integridad estructural del nucléolo durante cigoteno**

Los resultados obtenidos en este trabajo empleando técnicas convencionales de contraste de MET (UrPb, EDTA) y específicas para identificar el organizador nucleolar (AgNOR), permiten postular que los nucléolos durante la etapa de cigoteno están transcripcionalmente

activos y muestran una ultraestructura que sugiere ser bipartita, donde el FC y el DFC se mantienen en estrecha interrelación y el GC parece estar cercano a ellos (o ausente).

Es pertinente recalcar que hay un evidente cambio morfológico en el DFC y el GC. En el caso del DFC se exhiben formas alargadas que van de 0.5  $\mu\text{m}$  a 2  $\mu\text{m}$ , las cuales parecen no tener una organización particular y se observan en una gran diversidad de formas (Fig. 21). Para el caso del GC se observa una disminución en el tamaño de esta región a tal grado que parece estar ausente, sin embargo, tomando como referencia las inmunodetecciones de B23 se evidencia que el GC se encuentra adyacente al DFC.

Adicional a la influencia que tiene la dinámica cromosómica durante la etapa de cigoteno y la actividad transcripcional; la presencia, ubicación y la implicación de la C23 y B23 durante las etapas de la biogénesis de ribosomas, dan pauta para pensar que hay otros factores que probablemente estén ayudando a determinar la integridad y las proporciones de los componentes nucleolares durante el cigoteno, algunos de ellos podrían ser la interacción entre C23-B23 y los procesos de generación y maduración de los pre-rRNAs.

### **Interacción de C23-B23 y la integridad del nucléolo.**

Mientras que los NORs organizan los nucléolos, parte de la estructura nucleolar depende de la actividad transcripcional por parte de la RNA pol I (Grummt, 2003), sin embargo, no es suficiente para mantener una estructura nucleolar adecuada ya que los mutantes *knockout* han demostrado que la nucleolina y la nucleofosmina son esenciales para la integridad del nucléolo (Danton & Catalano, 2013).

Emmott & Hiscox (2009) proponen que la nucleolina y la nucleofosmina son las proteínas centrales del nucléolo y pese a que no existe una superposición completa entre ellas, se ha reportado que comparten una gran cantidad de interacciones con muchas proteínas ribosómicas y son responsables del anclaje de éstas al nucléolo a lo largo de todo el ciclo celular (Danton & Catalano, 2013; Mitrea *et al.*, 2016; Scott & Oeffinger, 2016).

Por otro lado, en el caso particular del proceso espermatogénico Biggiogera *et al.* (1991) sugieren que los niveles de C23 y B23 podrían estar ligados funcionalmente a la síntesis de

rRNA debido a que estos varían a lo largo del proceso. Ellos observaron que los niveles de mRNA de C23 son mayores en las etapas tempranas de la espermatogénesis y que declinan progresivamente hacia paquiteno, de manera inversa los niveles de mRNA de B23 aumentan en cuanto el proceso espermatogénico avanza, es decir, hay una relación casi inversa entre los niveles de C23 y de B23 a lo largo de la espermatogénesis.

Así mismo, algunos autores han descrito que las proteínas con actividades de remodelación de la cromatina, tales como la C23 y la B23, promueven el alargamiento de la transcripción de la RNA pol I e intervienen en la formación del nucléolo (Ma *et al.*, 2007; Rickards *et al.*, 2007; Murano *et al.*, 2008). Adicionalmente, se sabe que la C23 es la proteína nucleolar más abundante pues representa aproximadamente el 10% del contenido de proteínas nucleolares y más del 90% de ésta se localiza en el nucléolo (Scherl *et al.*, 2002; Durut & Sáez-Vásquez, 2015), lo cual correlaciona en cierta medida la abundancia de C23 en las largas hebras de DFC que se observan durante el cigoteno.

Otro punto a tratar es que la producción de ribosomas depende del equilibrio cinético entre la tasa de síntesis de rRNA y las tasas de plegamiento y maduración del mismo (Schneider *et al.*, 2007), adicionalmente, se ha descrito la pérdida de la compacidad, deformación y desestabilización de la estructura nucleolar en células cancerosas en las cuales la B23 está abatida o en células donde la B23 está reducida debido a una mutación (Holmberg Olausson, Nistér & Lindström, 2014; Sasinkova *et al.*, 2018).

Tomando en cuenta lo hasta ahora mencionado sobre la interacción C23-B23 y con base en lo establecido para estas dos proteínas, durante la fase de cigoteno se puede asumir que hay una mayor cantidad de C23 la cual promueve la generación, alargamiento y las primeras etapas de procesamiento de los de pre-rRNAs, dando como resultado la formación de largas hebras de transcritos nacientes que en asociación con otras proteínas nucleolares conforman el DFC (el cual parece el compartimento de mayor tamaño) (Fig. 26).

Por otro lado, los bajos niveles de nucleofosmina descritos por Biggiogera *et al.* (1991) y evidenciados por las inmunodetecciones (Fig. 29), parecen limitar las etapas tardías de procesamiento y la interacción con otras proteínas nucleolares durante el cigoteno, lo que da como resultado una morfología nucleolar irregular y un GC disminuido entremezclado con el DFC; adicionalmente, se ha reportado que algunas alteraciones ligeras en la expresión de

B23 cuando ésta es atenuada, es considerada como indicativo de una proliferación celular amortiguada o una síntesis ribosomal disminuida (Sasinkova *et al.*, 2018).

En contraste, los espermatoцитos en paquiteno muestran niveles de C23 y B23 semejantes a los niveles observados en las células somáticas metabólicamente activas (Biggiogera *et al.*, 1991), lo cual se correlaciona con el hecho de que durante esta etapa el nucléolo muestra una estructura tripartita y un nucleolonema bien consolidado (Fig. 31).

### **Fusión nucleolar**

Otro aspecto importante a discutir es si los componentes nucleolares tienen influencia en la fusión de nucléolos, ya que se ha descrito la disminución en el número de nucléolos durante la profase meiótica de la rata. En este trabajo las observaciones de las series contrastadas con el método EDTA evidenciaron que existe una interconexión entre dos nucléolos contiguos mediante las hebras de DFC, dicha interacción podría facilitar o propiciar la fusión nucleolar durante la etapa de paquiteno en donde pueden verse claramente implicados dos o tres bivalentes cromosómicos formando un nucléolo, por tal motivo, se discute esta hipótesis con base en las observaciones referidas en la literatura sobre el proceso de nucleologénesis.

La nucleologénesis implica el ensamblaje de componentes nucleolares alrededor de los cromosomas que contienen al rDNA para establecer estructuras morfológicamente bien definidas al comienzo de la interfase (Dousset *et al.*, 2000). Una cualidad importante para el re-ensamblaje nucleolar post-mitótico es la reanudación de la transcripción del rDNA, sin embargo, se ha demostrado que la transcripción activa no posee la capacidad de organizar el nucléolo por completo debido a que esta cualidad también depende de las proteínas y los snoRNAs de los complejos de procesamiento, las RNPs y el rRNA 45S producido durante la profase y presente en el compartimento peri-cromosómico (Ochs *et al.*, 1985; Benavente *et al.*, 1987; Jiménez-García *et al.*, 1994; Dousset *et al.*, 2000).

Es pertinente hacer hincapié que el cigoteno es una fase temprana-intermedia de la profase meiótica y por lo tanto el evento de nucleologénesis post-mitótico ya se ha dado, sin embargo, durante el cigoteno los nucléolos son transcripcionalmente activos y pueden observarse

largas hebras de DFC (compuestas por los pre-rRNAs transcritos y proteínas de procesamiento) en interconexión entre dos nucléolos (Fig. 23).

Tomando en cuenta lo anterior, varias observaciones consistentes sugieren que el pre-rRNA tiene un papel clave en la conformación del nucléolo, pues estudios de nucleogénesis en metazoarios muestran que el reclutamiento de proteínas nucleolares puede producirse en presencia de pre-rRNAs sin procesar. El ejemplo más conocido es el caso de los embriones de *Xenopus laevis* en los que se produce la formación de nucléolos mediante las interacciones del pre-rRNAs (proporcionados por la vía materna) antes de que se detecte cualquier transcripción por parte de la RNA pol I (Verheggen *et al.*, 1998, 2000). De manera similar ocurre en embriones porcinos donde el rRNA heredado por la madre colocalizado con el rDNA y las proteínas nucleolares, puede iniciar un ensamblaje nucleolar parcial de estructuras fibro-granulares (DFC y GC) aun sin la activación de la transcripción de rDNA (Morovic *et al.*, 2018).

Por otro lado, Dousset *et al.* (2000) proponen que los pre-rRNA y sus proteínas de unión durante la nucleogénesis podrían formar un complejo macromolecular con factores de procesamiento de pre-rRNA, además dicho complejo podría contribuir a la arquitectura de los nucléolos recién formados y reclutar algunos otros factores o proteínas. Adicionalmente, se ha reportado que la asociación física de proteínas nucleolares en grandes complejos está mediada en gran parte por el rRNA (Pinol-Roma, 1999), de acuerdo con lo anterior, este tipo de interacciones si bien no explican totalmente cómo es que se da la fusión nucleolar durante la profase meiótica I, podrían ser tomadas en cuenta para posteriores observaciones.

## Otros RNAs

Otra de las interrogantes a tratar en este trabajo es la ausencia de marca para nucleofosmina en estructuras que se han descrito como estructuras granulares cercanas al nucléolo (Fig. 28 D, 29), debido a que la marca de nucleofosmina se encontró solamente en las regiones más granulares ubicadas en la periferia de las hebras de DFC. Esta cuestión puede ser parcialmente abordada con base en lo definido en la literatura.



Los estudios de autoradiografía también han demostrado la síntesis de RNA extra-nucleolar con una localización pericromosómica en los espermatoцитos que transitan la profase meiótica (Kierszenbaum & Tres, 1974; Geremia *et al.*, 1978; Monesi *et al.*, 1978).

Diversos autores han demostrado la síntesis de algunos RNAs en el proceso espermatogénico de la rata; se ha descrito que la tasa de síntesis de RNA no ribosómico durante las diferentes etapas de la espermatogénesis de ratones es mucho mayor en espermatoцитos en la etapa de paquiteno medio/diploteno que en las etapas de leptoteno y cigoteno (Moore, 1971; Loir, 1972; Kierszenbaum & Tres, 1974; Söderström & Parvinen, 1976; Geremia *et al.*, 1978; Monesi *et al.*, 1978). Adicional a los trabajos de autoradiografía, Schultz & Leblond en 1990 mencionan la desaparición de los cuerpos espiralados hacia el final de la etapa de leptoteno en espermatoцитos de rata, la ausencia de estos cuerpos permanece durante el cigoteno y la mayor parte del paquiteno temprano; es hasta finales del paquiteno temprano cuando los cuerpos espiralados reaparecen.

Los cuerpos espiralados se describieron por primera vez en células somáticas por Monneron & Bernhard (1969) y están compuesto por RNAs heterogéneos (hnRNAs) y RNAs nucleares pequeños (Fakan *et al.*, 1984). Algunos estudios bioquímicos refieren que los hnRNA y snRNAs forman los spliceosomas en los que se produce el empalme del pre-mRNA (Reed *et al.*, 1988).

Tomando en cuenta lo anterior, es probable que las estructuras granulares adyacentes al nucléolo observadas en las inmunodetecciones en las que no se detectó la B23 (Fig. 28), sean cúmulos de pre-mRNAs o gránulos intercromatinianos (ICG) ya que fueron EDTA positivos. Habría que demostrar mediante la localización de factores de splicing o mediante la detección de hnRNP que se trata de pre-mRNAs, los cuales tienen una vida media larga y podrían observarse dentro del núcleo del espermatoцитo en la etapa cigoteno (Monneron & Bernhard, 1969; Fakan & Bernhard, 1971).

### **Relación con la profase meiótica I**

Para contrastar y correlacionar los cambios en la estructura nucleolar que se observa en el espermatoцитo durante la etapa de cigoteno, es necesario hacer hincapié en que las células de

la línea germinal más temprana en los testículos adultos son las espermatogonias, las cuales después de una serie de mitosis darán lugar a los espermatoцитos primarios.

Contextualizando las distintas sucesiones celulares dentro de la espermatogénesis de la rata, se ha descrito que las espermatogonias se dividen para dar origen a las espermatogonias tipo A1, A2, A3 y A4, a su vez la espermatogonia tipo A4 pueden dividirse para dar origen a una espermatogonia tipo A1 o una espermatogonia In, posteriormente al dividirse la espermatogonia In se origina una espermatogonia tipo B y al dividirse esta última da origen al espermatoцитo primario que propiamente entra al proceso meiótico en la fase de preleptoteno (o fase S) (Leblond & Clermont, 1952; Clermont & Bustos-Obregon, 1968; de Rooij & Kramer, 1968).

Como se ha mencionado anteriormente, el proceso de nucleogénesis se inicia posterior a la división mitótica, sin embargo, la etapa post-mitótica anterior a la meiosis se da en espermatogonias, mientras que la etapa anterior al leptoteno es una fase de duplicación. Por lo tanto, el nucléolo pequeño conformado por el FC y un DFC poco desarrollado (Fig. 30) en la etapa de leptoteno es precedido de una duplicación del genoma y no de una etapa post-mitótica.

Aunado a esto se ha descrito en células HeLa y en células de ratón MFC la interrupción estructural del FC y DFC durante la fase S, es decir, los FC-DFC se desmontan generando una estructura bipartita cuando las células ingresan a la fase S y al concluir ésta la conformación tripartita se restituye (Guan *et al.*, 2017; Chen *et al.*, 2018). A pesar de que en este trabajo no se hace referencia a este tipo de modificaciones estructurales durante el preleptoteno, es pertinente considerar lo que sucede en otras células como un ejemplo de la modificación estructural durante la fase S, ya que de ocurrir en los espermatoцитos podría influir en la morfología nucleolar que se observa en la etapa de leptoteno, donde el nucléolo parece no estar totalmente restituido (Fig. 30).

Inicialmente Daoust & Clermont (1955) estudiaron el comportamiento de los nucléolos durante la meiosis de la rata y definieron que durante las etapas de leptoteno y cigoteno el nucléolo aumenta en número y para la etapa de paquiteno el nucléolo aumenta en tamaño, sin embargo, las observaciones realizadas durante este trabajo muestran que hay modificaciones estructurales importantes de al menos dos de los compartimentos nucleolares

en los espermatoцитos durante el cigoteno (DFC y GC), la idea de una disgregación entre los componentes parece no estar sustentada durante esta etapa, debido a que la actividad transcripcional no está totalmente abatida y se aprecian en íntima relación los tres componentes fundamentales (FC, DFC y GC), esto da pauta para decir que se mantiene hasta cierto grado la integridad funcional del nucléolo. No obstante, los cambios morfológicos observados durante el cigoteno parecen estar influenciados por los factores discutidos en los apartados anteriores (dinámica cromosómica, actividad transcripcional, dinámica e interacción de la C23-B23, procesamiento de pre-rRNAs y fusión de nucléolos) dando como resultado la heterogeneidad de formas observadas.

Tomando en consideración lo previamente dicho se abren las siguientes interrogantes: ¿qué implicaría el hecho de que el nucléolo mantiene su integridad funcional, pero hay un evidente cambio morfológico durante el cigoteno? y ¿hay una correlación funcional del nucléolo de cigoteno con el de paquiteno?

Parte de las implicaciones que conllevan las modificaciones morfológicas que sufre el nucléolo en cigoteno pueden estar relacionadas con la hipótesis en la cual se asume como una estructura tributaria en la formación del cuerpo cromatoide (CB).

#### *Cuerpo cromatoide (CB)*

El cuerpo cromatoide (CB) es una estructura citoplasmática que parece estar relacionada con el almacenamiento de mRNA y proteínas que tienen un papel en la diferenciación final de los espermatozoides (Söderström & Parvinen, 1976; Saunders *et al.*, 1992). Es considerado una estructura altamente especializada que actúa como un coordinador sub-celular de varias vías de procesamiento de RNA y centraliza el control del mRNA post-transcripcional en el citoplasma de células germinales masculinas haploides (Kotaja *et al.*, 2006), además, hay evidencia de que contiene factores que median la degradación del mRNA y la represión de la traducción (Beyret y Lin, 2011; Kleene y Cullinane, 2011; Peruquetti *et al.*, 2010, 2012; Peruquetti & Azeredo-Oliveira, 2013).

Por otro lado, hay suficientes evidencias que demuestran que el nucléolo también está involucrado en modificaciones de RNA covalente (no ribosómico) y ensamblaje de proteínas

para múltiples complejos de RNPs, snRNA, telomerasa y diversos RNAs pequeños que son transcritos por la RNA pol III (rRNA 5S), algunos tRNA, la partícula de reconocimiento de señal (SRP) y miRNAs (Pederson, 2002; Gerbi *et al.*, 2003).

Sumado a esto, algunos autores han propuesto que el CB se origina a partir del material intersticial denso que ocurre entre los grupos mitocondriales (Söderström, 1978) y algunos otros proponen que su origen es de carácter nucleolar debido a que se ha observado una aparente fragmentación del nucléolo en las primeras etapas de la espermatogénesis (Peruquetti *et al.*, 2010, 2012; Peruquetti & Azeredo-Oliveira, 2013).

Paniagua *et al.* (1986) han planteado que el CB se origina a partir de los “nuages”, un complejo ribonucleoproteico derivado del nucléolo que migra al citoplasma durante la espermatogénesis. Los resultados de las observaciones de este trabajo sugieren que durante el cigoteno hay factores que podrían apoyar esta premisa ya que se observaron cúmulos de RNPs sin marca de nucleofosmina dentro del nucleoplasma, estos podrían ser de carácter no ribosomal y cabe la posibilidad de que algunos complejos de RNPs no involucrados directamente con la maduración de los ribosomas se hayan perdido del GC durante los movimientos cromosómicos de las primeras etapas, dando como resultado un nucléolo con una menor porción granular.

#### *Relación con la etapa de paquiteno*

En el caso de la etapa de paquiteno se ha descrito que el nucléolo recupera su forma ovoide, se reduce el número de ellos (2-1) y puede encontrarse asociado en algunos casos con el cuerpo XY. Durante el paquiteno medio el nucléolo está conformado por el DFC y el GC que conforman un nucleolonema bien desarrollado, un prominente FC y el cuerpo redondo (Fig. 31) (Solari, 1969; Paniagua *et al.*, 1986; Schultz, 1990).

Algunos autores plantean que los FCs en combinación con el DFC podrían representar un complejo autónomo del GC, no en el tránsito de rRNAs nacientes y pre-ribosomas, más bien como diseño arquitectónico y sitios de montaje (Muro *et al.*, 2010), por tal motivo el que se observe un amplio desarrollo del DFC en contacto con el FC durante el cigoteno, podría deberse a una cualidad necesaria para completar la madurez nucleolar en la etapa de

paquiteno, además, el bajo nivel de síntesis de rRNA durante el cigoteno podría estar correlacionado con eventos que se están llevando a cabo de forma prioritaria: el reconocimiento de homologías, formación de sinapsis y la alineación precisa entre los cromosomas homólogos, es decir, tienen mayor prioridad los eventos vinculados con el proceso meiótico sobre algunos otros procesos nucleares.

Esto abre la siguiente interrogante: ¿para qué es necesario un nucléolo bien consolidado en las últimas etapas del proceso meiótico?

Los estudios de autoradiografía indican que se producen niveles sustanciales de síntesis de RNA en espermatogonias, espermatoцитos en paquiteno medio y, en menor medida, en espermátidas redondas, además la tasa más alta de síntesis de RNA nucleolar se alcanza mucho antes que la de otros RNAs cromosómicos (Monesi, 1965; Utakoji, 1966; Loir, 1972; Tres, 1975; Geremia *et al.*, 1977). Los productos de la transcripción génica durante la meiosis están relacionados con la síntesis cuantiosa de proteínas requeridas durante la profase meiótica, no sólo para la biogénesis de los organelos nuevos, sino también para satisfacer la demanda de un considerable crecimiento y aumento de volumen celular en las etapas subsecuentes de la profase meiótica, por tal motivo, la morfología alargada y desarrollada que presenta el nucléolo de cigoteno podría funcionar como un almacén de transcritos medianamente procesados, que permitirían optimizar y satisfacer la demanda de ribosomas que se necesitan durante la etapa de paquiteno.

La cualidad plurifuncional que actualmente se le da al nucléolo, ha abierto distintas líneas de investigación que revelan las posibles implicaciones en la regulación del ciclo celular y que podrían tener relación con el proceso meiótico. Se ha demostrado que la restauración morfológica nucleolar después de las divisiones celulares es importante, ya que está implicada en el secuestro de moléculas en ciertas fases, en la liberación de proteínas involucradas en el silenciamiento de genes, en procesos de senescencia y de división celular (Carmo-Fonseca *et al.*, 2000; Olson *et al.*, 2000; Pederson, 2002; Cremer & Cremer, 2010; Rajapakse & Groudine, 2011), además, ayuda a restablecer la vida útil durante la gametogénesis al eliminar el daño accidental inducido por el envejecimiento de la célula (Ünal *et al.*, 2011).

Particularmente en la meiosis, el nucléolo contiene la mayor parte de la proteína celular Pch2, que participa en la detección de la organización defectuosa de los complejos sinaptonémicos y evita la segregación de los cromosomas durante la recombinación meiótica (San-segundo & Roeder, 1999; Peruquetti *et al.*, 2012).

Por último, el ciclo nucleolar mitótico y meiótico ha sido estudiado y se ha establecido que el reajuste del núcleo es crucial para la reactivación transcripcional y de traducción de las células hijas, esto se debe a que los compartimentos nucleolares además de regular la transcripción de rRNA, pueden participar en el control del empalme de genes no ribosómicos y la transcripción asociada a ellos (Lefevre *et al.*, 2008; Bártová *et al.*, 2010).

## IX. CONCLUSIONES

- Hay una importante heterogeneidad de formas del nucléolo durante el cigoteno, las cuales reflejan la actividad transcripcional del espermatocito durante esta etapa y la influencia de los eventos propios del proceso meiótico sobre la estructura nucleolar.
- Los nucléolos de los espermatocitos en la etapa de cigoteno mantienen su integridad funcional y su estructura tripartita (FC, DFC y GC), no parece ocurrir una disgregación de sus componentes.
- El mayor desarrollo de las hebras de DFC del nucléolo de los espermatocitos en cigoteno, podría ser una cualidad necesaria para la consolidación de un nucléolo reticular con mayor actividad sintética durante la etapa de paquiteno.
- La interrelación entre las hebras de DFC podría ser el indicio de una interacción entre los componentes nucleolares implicada con la fusión y reducción del número de nucléolos.
- Los cúmulos de RNPs observados dentro del nucleoplasma de los espermatocitos en cigoteno no corresponden al GC del nucléolo.
- La morfología nucleolar de los espermatocitos durante el cigoteno, es una característica distintiva de este estadio. De manera general, el nucléolo parece tener una morfología distintiva y particular en cada una de las etapas de la profase meiótica I.

## Referencias

1. Alberts, B., Bray, D., Lewis, J., Raff, M., Roberts, K. & Watson, J. (2002). *Biología molecular de la célula*. Barcelona, España: Omega.
2. Alleva, B. & Smolikove, S. (2017). Moving and stopping: Regulation of chromosome movement to promote meiotic chromosome pairing and sinapsis. *Nucleus*, 8, 613-624 pp.
3. Andersen, J.S., Lam, Y.W., Leung, A.K., Ong, S.E., Lyon, C.E., Lamond, A.I. & Mann, M. (2005). Nucleolar proteome dynamics. *Nature*, 433, 77-83 pp.
4. Andraszek, K. & Smolec, E. (2012). Structure of the nucleoli in domestic cattle spermatocytes. *Folia Histochem Cytobiol*, 50, 346-351 pp.
5. Angelov, D., Bondarenko, V.A., Almagro, S., Menoni, H., Mongelard, F., Hans, F., Mietton, F., Studitsky, V.M., Hamiche, A., Dimitrov, S. & Bouvet P. (2006). Nucleolin is a histone chaperone with FACT-like activity and assists remodeling of nucleosomes. *EMBO J*, 25,1669-1679 pp.
6. Badenhorts, D., Dobigny, G., Adegá, F., Chaves, R., O'Brien, P.C., Ferguson-Smith, M.A., Waters, P.D. & Robinson, T.J. (2011). Chromosomal evolution in Rattini (Muridae, Rodentia). *Chromosome Res.*, 19, 709-727 pp.
7. Bártová, E., Horáková, A.H., Uhlířová, R., Raska, I., Galiová, G., Orlova, D. & Kozubek, S. (2010). Structure and epigenetics of nucleoli in comparison with non-nucleolar compartments. *J. Histochem. Cytochem.*, 58, 391-403 pp.
8. Beltrame, F.L. & Sasso-Cerri, E. (2017). Vitamin B12 -induced spermatogenesis recovery in cimetidine-treats rats: effect on the spermatogonia number and sperm concentration. *Asian Journal of Andrology*, 19, 567-572 pp.
9. Benavente, R. & Volff J. N. (2009). *Meiosis*. Switzerland: Karger.
10. Benavente, R., Rose, K.M., Reimer, G., Hugle-Dorr, B., & Scheer, U. (1987). Inhibition of nucleolar reformation after microinjection of antibodies to RNA polymerase I into mitotic cells. *J. Cell Biol.*, 105, 1483-1491 pp.
11. Bernhard, W. (1969). A new staining procedure for electron microscopical cytology. *J Ultrastructure Research*, 27, 250-265 pp.
12. Berrios, S. & Fernández-Donoso, R. (1990) Nuclear architecture of human pachytene spermatocytes: quantitative analysis of associations between nucleolar and XY bivalents. *Hum. Genet.*, 86, 103-116 pp.
13. Berrios, S. (2017). Nuclear Architecture of Mouse Spermatocytes: Chromosome Topology, Heterocromatin, and Nucleolus. *Cytogenet Genome Res*, 151, 61-71 pp.
14. Berrios, S., Fernández-Donoso, R., Pincheira, J., Page, J., Manterola M. & Cerda, C. (2004). Number and nuclear localisation of nucleoli in mammalian spermatocytes. *Genetica*, 121, 219-228 pp.
15. Beven, A., Lee, R., Razaz, M., Leader, D., Brown, J. & Shaw, P. (1996). The organization of ribosomal RNA processing correlates with the distribution of nucleolar snRNAs. *Journal of Cell Science*, 109, 1241-1251 pp.
16. Beyret, E & Lin, H. (2011). Pinpointing the expression of piRNAs and function of the PIWI protein subfamily during spermatogenesis in the mouse. *Dev. Biol.*, 355, 215-226 pp.
17. Biggiogera, M., Fakan, S., Kaufmann, S., Black, A., Shaper, J. & Busch, H. (1989). Simultaneous Immunoelectron Microscopic Visualization of Protein B23 and C23

- Distribution in the HeLa Cell Nucleolus. *The Journal of Histochemistry and Cytochemistry*, 37, 1371-1374 pp.
18. Biggiogera, M., Kaufmann, S.H., Shaper, J. H., Gas, N., Amalric, F. & Fakan, S. (1991). Distribution of nucleolar proteins B23 and nucleolin during mouse spermatogenesis. *Chromosoma*, 162-172 pp.
  19. Birch, J. & Zomerdijk, J. (2008). Structure and function of ribosomal RNA gene chromatin. *Biochem Soc Trans*, 36, 619-624 pp.
  20. Boisvert, F. M., Van Koningsbruggen, S., Navascues, J. & Lamond, A. I. (2007). The multifunctional nucleolus. *Nature*, 8, 574-585 pp.
  21. Borer, R.A., Lehner, C.F., Eppenberger, H.M. & Nigg, E.A. (1989). Major nucleolar proteins shuttle between nucleus and cytoplasm. *Cell*, 56, 379-390 pp.
  22. Bourbon H., Bugler, B., Caizergues-Ferrer, M. & Amalric, F. (1983). Role of phosphorylation on the maturation pathways of a 100 kDa nucleolar protein. *FEBS Lett.*, 155, 218-222 pp.
  23. Burd, C.G. & Dreyfuss, G. (1994). Conserved structures and diversity of functions of RNA-binding proteins. *Science*, 265, 615-621 pp.
  24. Busch, H. & Smetana, K. (1970). *The Nucleolus*. USA: Academic Press.
  25. Buys, C.H. & Osinga, J. (1980). Abundance of protein-bound sulfhydryl and disulfide groups at chromosomal nucleolus organizing regions: a cytochemical study on the selective silver staining of NORs. *Chromosoma*, 77, 1-11 pp.
  26. Carmo-Fonseca, M., Mendes-Soares, L. & Campos, I. (2000). To be or not to be in the nucleolus. *Nat. Cell. Biol.*, 2, 107-112 pp.
  27. Cerilli, L. & Frierson, H. (2001). The immunohistochemical method. *Methods Mol Med*, 50, 213-229 pp.
  28. Chen, D., Dundr, M., Wang, C., Leung, A., Lamond, A., Misteli, T. & Huang, S. (2005). Condensed mitotic chromatin is accessible to transcription factors and chromatin structural proteins. *Journal Cell Biol*, 168, 41-54 pp.
  29. Chen, L., Jiao, Y., Guan, X., Li, X., Feng, Y. & Jiao, M. (2018). Investigation of cell cycle-associated structural reorganization in nucleolar FC/DFCs from mouse MFC cells by electron microscopy. *Microscopy*, 1-10 pp.
  30. Clermont, Y. & Antar, M. (1973). Duration of the cycle of the seminiferous epithelium and the spermatogonial renewal in the monkey *Macaca arctoides*. *Am. J. Anat.*, 136, 153-165 pp.
  31. Cong, R., Das, S., Ugrinova, I., Kumar, S., Mongelard, F., Wong, J. & Bouvet, P. (2012). Interaction of nucleolin with ribosomal RNA genes and its role in RNA polymerase I transcription. *Nucleic Acids Res*, 40, 9441-9454 pp.
  32. Cooper, G. M. & Hausman, R. E. (2007). *The Cell: A Molecular Approach*. Washington, USA: ASM Press.
  33. Cremer, T. & Cremer, M. (2010). Chromosome territories. *Cold Spring Harbor Perspect. Biol.* 2: a003889. doi:10.1101/cshperspect.a003889
  34. Danton, H. & Catalano, A. (2013). *Proteins of the Nucleolus. Regulation, Translocation & Biomedical Functions*. USA: Springer.
  35. Daoust, R & Clermont, Y. (1955). Distribution of nucleic acids in germ cells during the cycle of the seminiferous epithelium in the rat. *Am. J. Anat.*, 96, 255-283 pp.
  36. de Rooij, D.G. & Kramer, M.F. (1968). Spermatogonial stem cell renewal in rats and mice. *Z Zellforsch Mikrosk Anat.*, 85, 206-209 pp.



37. Derenzini, M. & Ploton, D. (1991). Interphase Nucleolar Organizer Regions in Cancer Cells. *Int. Rev. Exp. Pathol.*, 32, 149-192 pp.
38. Derenzini, M. (2000). The AgNORs. *Micron*, 31, 117-120 pp.
39. Derenzini, M., Pasquinelli, G., O'Donohue, M. F., Ploton, D. & Thiry, M. (2006). Structural and functional organization of ribosomal genes within the mammalian cell nucleolus. *J Histochem Cytochem*, 54, 131-145 pp.
40. Derenzini, M., Pession, A. & Trerè, D. (1990). Quantity of nucleolar silver-stained proteins is related to proliferating activity in cancer cells. *Lab. Invest.*, 63, 137-140 pp.
41. Derenzini, M., Pession, A., Farabegoli, F., Trerè, D., Badiali, M. & Dehan, P. (1989). Relationship between interphasic nucleolar organizer regions and growth rate in two neuroblastoma cell lines. *Am. J. Pathol.*, 134, 925-932 pp.
42. Dimario, P. J. (2004). Cell and Molecular Biology of Nucleolar Assembly and Disassembly. *International Review of Cytology*, 239, 99-178 pp.
43. Dousset, T., Wang, C., Verheggen, C., Chen, D., Hernandez-Verdun, D. & Huang, S. (2000). Initiation of nucleolar assembly is independent of RNA polymerase I transcription. *Mol Biol Cell*, 11, 2705–2717 pp.
44. Draper, D.E. (1995). Protein-RNA recognition. *Annu. Rev. Biochem.*, 64, 593-620 pp.
45. Dunbar, T.S., Gentry, G.A. & Olson, M.O. (1989). Interaction of nucleolar phosphoprotein B23 with nucleic acids. *Biochemistry*, 28, 9495–9501 pp.
46. Dunbar, D.A., Wormsley, S., Lowe, T.M. & Baserga, S.J. (2000). Fibrillarin-associated box C/D small nucleolar RNAs in *Trypanosoma brucei*. Sequence conservation and implications for 2'-O-ribose methylation of rRNA. *J. Biol. Chem.*, 275, 14767-14776 pp.
47. Dunder, M., Misteli, T. & Olson, M.O. (2000). The dynamics of postmitotic reassembly of the nucleolus. *J Cell Biology*, 150, 433-446 pp.
48. Durut, N. & Sáez-Vásquez, J. (2015). Nucleolin: dual roles in rDNA chromatin transcription. *Gene*, 556, 7-12 pp.
49. Emmott, E. & Hiscox, J.A. (2009). Nucleolar targeting: the hub of the matter. *EMBO Rep.*, 10, 231–238 pp.
50. Erard, M., Belenguer, P., Caizergues-Ferrer, M., Pantaloni, A. & Amalric, F. (1988). A major nucleolar protein, nucleolin, induces chromatin decondensation by binding to histone H1. *Eur J Biochem*, 175, 525-530 pp.
51. Ertault-Daneshpouy, M., Deschaumes, C., Leboeuf, C., Brus-Ramer, M., Amira, F., Legres, L. & Janin, A. (2003). Histochemical and immunohistochemical protocols for routine biopsies embedded in Lowicryl resin. *Biotechnic & Histochemistry*, 78, 35-42 pp.
52. Esponda, P., Souto-Padron, T. & De Souza, W. (1983). Fine structure and cytochemistry of the nucleus and the kinetoplast of epimastigotes of *Trypanosoma cruzi*. *J Protozool*, 30, 105-110 pp.
53. Fakan, S. & Bernhard, W. Localisation of rapidly and slowly labelled nuclear RNA as visualized by high resolution autoradiography. *Exp. Cell. Res.*, 67, 129-141 pp.
54. Fakan, S., Leser, G. & Martin, T.E. (1984). Ultrastructural distribution of nuclear ribonucleoproteins as visualized by immunocytochemistry on thin sections. *J. Cell. Biol.*, 98, 358-363 pp.

55. Gébrane-Younès, J., Fomproix, N. & Hernandez-Verdun, D. (1997) When rDNA transcription is arrested during mitosis, UBF is still associated with non-condensed rDNA. *J. Cell. Sci.*, 110, 2429-2440 pp.
56. Gerbi, S.A., Borovjagin, A.V. & Lange, T.S. (2003). The nucleolus: a site of ribonucleoprotein maturation. *Curr. Opin. Cell. Biol.*, 15, 318–325 pp.
57. Geremia, R., Boitani, C., Conti, M. & Monesi, V. (1977). RNA synthesis in spermatocytes and spermatids and preservation of meiotic RNA during spermiogenesis in the mouse. *Cell. Differ.*, 5, 343-355 pp.
58. Geremia, R., d'Agostino, A. & Monesi, V. (1978). Biochemical evidence of haploid gene activity in spermatogenesis of the mouse. *Exp. Cell. Res.*, 111, 23-30 pp.
59. Ginisty, H., Amalric, F. & Bouvet, P. (1998). Nucleolin functions in the first step of ribosomal RNA processing. *EMBO J*, 17, 1476-1486 pp.
60. Ginisty, H., Amalric, F. & Bouvet, P. (2001). Two different combinations of RNA-binding domains determine the RNA binding specificity of nucleolin. *J Biol Chem*, 276,14338-14343 pp.
61. Ginisty, H., Serin, G., Ghisolfi-Nieto, L., Roger, B., Libante, V., Amalric, F. & Bouvet, P. (2000). Interaction of nucleolin with an evolutionarily conserved pre-ribosomal RNA sequence is required for the assembly of the primary processing complex. *J Biol Chem*, 275, 18845-18850 pp.
62. Ginisty, H., Sicard, H., Roger, B. & Bouvet, P. (1999). Structure and functions of nucleolin. *J Cell Sci*, 112, 761-772 pp.
63. Goessens, G. & Lepoint, A. (1974). The fine structure of the nucleolus during interphase and mitosis in Ehrlich tumour cells cultivated in vitro. *Exp Cell Res*, 1, 63-72 pp.
64. Goessens, G. (1984). Nucleolar structure. *Int. Rev. Cyt.*, 87, 107-158 pp.
65. Goodpasture, C. & Bloom, S. (1975). Visualization of Nucleolar Organizer Regions in Mammalian Chromosomes Using Silver Staining. *Chromosoma*, 53, 37-50 pp.
66. Grisendi, S., Mecucci, C., Falini, B. & Pandolfi, P. (2006). Nucleophosmin and cancer. *Nat Rev Cancer*, 6, 493-505 pp.
67. Grizzle, W. E. (1996). Theory and Practice of Silver Staining in Histopathology. *The Journal of Histotechnology*, 19, 183-194 pp.
68. Grummt, I. (1999). Regulation of mammalian ribosomal gene transcription by RNA polymerase I. *Prog Nucleic Acid Res Mol Biol*, 62, 109-154 pp.
69. Grummt, I. (2003). Life on a planet of its own: regulation of RNA polymerase I transcription in the nucleolus. *Genes Dev*, 17, 1691–1702 pp.
70. Guan, X., Jiao, Y., Chen, L., Li, X., Shang, G., Wang, F., Feng, Y. & Jiao, M. (2017). Disruption and restoration of nucleolar FC and DFC during S phase in HeLa cells. *Cell. Biol. Int.*, 41, 258-266 pp.
71. Hadjiolov, A. A. (1985). *The Nucleolus and Ribosome Biogenesis*. USA: Springer Verlag.
72. Hanakahi, L., Sun, H., Maizels, N. (1999). High affinity interactions of nucleolin with G-G-paired rDNA. *J Biol Chem*, 274, 15908-15912 pp.
73. Havaki, S., Voloudakis-Baltatzis, I., Goutas, N., Arvanitis, L., Vassilaros, S., Arvanitis, D., Kittas, C. & Marinos, E. (2006). Nuclear localization of cytokeratin 8 and the O-linked N-acetylglucosamine containing epitope H in epithelial cells of infiltrating ductal breast carcinomas: a combination of immunogold and EDTA regressive staining methods. *Ultrastructural Pathology*, 30, 177-186 pp.

74. Hayat, M. (2000). *Principles and Techniques of Electron Microscopy*. USA: Cambridge University Press.
75. Heix, J., Vente, A., Voit, R., Budde, A., Michaelidis, T. & Grummt, I. (1998). Mitotic silencing of human rRNA synthesis: inactivation of the promoter selectivity factor SL1 by cdc2/cyclin B-mediated phosphorylation. *EMBO J*, 17, 7373-7381 pp.
76. Hermo, L., Pelletier, R., Cyr, D. & Smith, C. (2010). Surfing the Wave, Cycle, Life History, and Genes/Proteins Expressed by Testicular Germ Cells. Part 1: Background to Spermatogenesis, Spermatogonia, and Spermatocytes. *MYCROSCOPY RESEARCH AND TECHNIQUE*, 73, 243-278 pp.
77. Hernandez-Verdun, D. (2006). The nucleolus: a model for the organization of nuclear functions. *Histochem Cell Biol*, 135-148 pp.
78. Hernandez-Verdun, D. (2011). Assembly and disassembly of the nucleolus during the cell cycle. *Nucleus*, 3, 189-194 pp.
79. Hernandez-Verdun, D., Pascal, R. & Gébrane-Younès, J. (2002). Emerging concepts of nucleolar assembly. *Journal of Cell Science*, 115, 2265-2270 pp.
80. Herrera, J.E., Savkur, R. & Olson, M.O. (1995). The ribonuclease activity of nucleolar protein B23. *Nucleic Acids Res.*, 23, 3974-3979 pp.
81. Hofgärtner, F., Schim, M., Krone, W., Zenzes, M. & Engel, W. (1979). Pattern of Activity of Nucleolar Organizers During Spermatogenesis in Mammals as Analyzed by Silver-Staining. *Chromosoma*, 71, 197-216 pp.
82. Holliday, R. (1984). The biological significance of meiosis. *Symp Soc Exp Biol*, 38, 381-394 pp.
83. Holm, P.B. & Rasmussen S.W. (1977). Human meiosis, I. The human pachytene karyotype analyzed by three dimensional reconstruction of synaptonemal complexes. *Carlsberg Res. Commun.*, 42, 283-323 pp.
84. Holmberg Olausson, K., Nistér, M. & Lindström, M.S. (2014). Loss of nucleolar histone chaperone NPM1 triggers rearrangement of heterochromatin and synergizes with a deficiency in DNA methyltransferase DNMT3A to drive ribosomal DNA transcription. *J. Biol. Chem.*, 289, 34601-34619 pp.
85. Howell, W.M. & Black, D.A. (1980). Controlled silver-staining of nucleolar organizer regions with a protective colloidal developer: a 1-step method. *Experientia*, 336, 1014-1015 pp.
86. Howell, W.M. (1982). Selective staining of nucleolar organizer regions (NORs). In: Busch, H. & Rothblum, L. (Eds). *The Cell Nucleus*. USA: Academic Press.
87. Hunter, E. (1993). *Practical Electron Microscopy*. Canada: Cambridge University Press.
88. Jiménez-García, L.F., Segura-Valdez, M.L., Ochs R., Rothblum, L., Hannan, R. & Spector, D. (1994). Nucleologenesis: U3 snRNA-containing prenucleolar bodies move to sites of active pre-rRNA transcription after mitosis. *Mol Biol Cell*, 5, 955-966 pp.
89. Jordan, E.G. & Cullis, C. (1982). *The Nucleolus*. USA: Cambridge University Press.
90. Jordan, E.G. (1979). The nucleolus at Weimar. *Nature*, 281, 529-530 pp.
91. Jordan, E.G. (1987). At the heart of the nucleolus. *Nature*, 329, 489-490 pp.
92. Kalyuzhny, A. (2016). *Immunohistochemistry*. USA: Springer.
93. Kano, Y., Maeda, S. & Sugiyama, T. (1976) The location of ribosomal cistrons (rDNA) in chromosomes of the rat. *Chromosoma*, 55, 37-42 pp.

94. Karp, G. (2008). *Biología molecular y celular. Conceptos y experimentos*. México: MacGraw-Hill.
95. Kass, S., Tyc, K., Steitz, J.A. & Sollner-Webb, B. (1990). The U3 small nucleolar ribonucleoprotein functions in the first step of preribosomal RNA processing. *Cell*, 60, 897–908 pp.
96. Kierszbaum, A.L. & Tres, L.L. (1974). Nucleolar and perichromosomal RNA synthesis during meiotic prophase in the mouse testis. *J. Cell. Biol.*, 60, 39-53 pp.
97. Kiss-Laszlo, Z., Henry, Y., Bachellerie, J.P., Caizergues-Ferrer, M. & Kiss, T. (1996). Site-specific ribose methylation of preribosomal RNA a novel function for small nucleolar RNAs. *Cell*, 85, 1077-1088 pp.
98. Kleene, K.C. & Cullinane, D.L. (2011). Maybe repressed mRNAs are not stored in the chromatoid body in mammalian spermatids. *Reproduction*, 142, 383-388 pp.
99. Kotaja, N., Bhattacharyya, S.N., Jaskiewicz, L. et al. (2006). The chromatoid body of male germ cells: similarity with processing bodies and presence of Dicer and microRNA pathway components. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 103, 2647–2652 pp.
100. Leblond, C.P. & Clermont, Y. (1952). Definition of the stages of the cycle of the seminiferous epithelium in the rat. *Ann. N. Y. Acad. Sci.*, 55, 548-573 pp.
101. Leblond, C.P. & El-Alfy, M. (1998). The eleven stages of the cell cycle, with emphasis on the changes in chromosomes and nucleoli during interphase and mitosis. *THE ANATOMICAL RECORD*, 252, 426-443 pp.
102. Lefevre, P., Witham, J., Lacroix, C.E., Cockerill, P.N., & Bonifer, C. (2008). The LPS-induced transcriptional upregulation of the chicken lysozyme locus involves CTCF eviction and noncoding RNA transcription. *Mol. Cell*, 32, 129–139 pp.
103. Leung, A.K., Andersen, J.S., Mann, M. & Lamond, A.L. (2003). Bioinformatic analysis of the nucleolus. *Biochem J.*, 376, 553-569 pp.
104. Lindström, M.S. (2011). NPM1/B23: A Multifunctional Chaperone in Ribosome Biogenesis and Chromatin Remodeling. *Biochem. Res. Int.*, 2011:195209. doi: 10.1155/2011/195209.
105. Lischwe, M., Smetana, K. Olson, M. & Busch, H. (1979). Proteins C23 And B23 Are The Major Nucleolar Silver Staining Proteins. *Life Sciences*, 25, 701-708 pp.
106. Lodish, H., Berk, A., Kaiser, C., Krieg, M., Bretscher, A., Ploegh, H., Amon, A. & Scott, M. (2012). *Molecular Cell Biology*. USA: W. H. Freeman and Company.
107. Loir, M. (1972). Metabolism of ribonucleic acid and proteins in spermatocytes and spermatids of the ram (*Ovis aries*), Incorporation and fate of 3H-uridine. *Ann. Biol. Anim. Biochim. Biophys.*, 12, 203-219 pp.
108. López-Velázquez, G., Hernández, R., López-Villaseñor, I., Reyes-Vivas, H., Segura-Valdez, M.L. & Jiménez-García, L.F. (2005). Electron Microscopy Analysis of the Nucleolus of *Trypanosoma cruzi*. *Microscopy and Microanalysis*, 11, 293-299 pp.
109. Ma, N., Matsunaga, S., Takata, H., Ono-Maniwa, R., Uchiyama, S. & Fukui, K. (2007). Nucleolin functions in nucleolus formation and chromosome congression. *J. Cell. Sci.*, 120, 2091-2105 pp.
110. Martin, C., Chen, S., Maya-Mendoza, A., Lovric, J., Sims, P.F. & Jackson, D.A. (2009). Lamin B1 maintains the functional plasticity of nucleoli. *J. Cell. Sci.*, 122, 1551-1562 pp.

111. Martínez-Calvillo, S., Florencio-Martínez, L.E. & Nepomuceno-Mejía, T. (2019). Nucleolar Structure and Function in Trypanosomatid Protozoa. *Cells*, 8, 421; doi:10.3390/cells8050421.
112. McStay, B. & Grummt, I. (2008). The epigenetics of rRNA genes: from molecular to chromosome biology. *Annu Rev Cell Dev Biol*, 24, 131-157 pp.
113. Mélése, T. & Xue, Z. (1995). The nucleolus: an organelle formed by the act of buiding a riobosome. *Curr Opin Cell Biol*, 7, 319-324 pp.
114. Miller, O., Miller, D., Dev, V., Tantravahi, R. & Croce, C. (1976). Expression of human and suppression of mouse nucleolus organizer activity in mouse-human somatic cell hybrids. *Proc. Natl. Acad. Sci.*, 73, 4531-4535 pp.
115. Mitrea, D.M., Cika, J.A., Guy, C.S., Ban, D., Banerjee, P.R., Stanley, C.B., Nourse A., Deniz, A.A. & Kriwacki, R.W. (2016). Nucleophosmin integrates within the nucleolus via multi-modal interactions with proteins displaying R-rich linear motifs and rRNA. *Elife*, 5. pii: e13571. doi: 10.7554/eLife.13571.
116. Monesi, V. (1964). RIBONUCLEIC ACID SYNTHESIS DURING MITOSIS AND MEIOSIS IN THE MOUSE TESTIS. *J. Cell. Biol.*, 22, 521-532 pp.
117. Monesi, V. (1965). Differential rate of rubonucleic acis synthesis in the autosomes and sex chromosomes during male meiosis in the mouse. *Chromosoma*, 17, 11-21 pp.
118. Monesi, V. (1965). Synthehic activities during spermatogenesis in the mouse RNA and protein. *Exp. Cell. Res.*, 39, 197-224 pp.
119. Monesi, V. (1971). Chromosome activities during meiosis and spermatogenesis. *J. Reprod. Fertil Suppl.*, 13, 1-14 pp.
120. Monesi, V., Geremia, R. & D'Agostino, A. & Boitani, C. (1978). Biochemistry of male germ cell differentiation in mammals: RNA synthesis in meiotic and postmeiotic cells. *Curr. Top. Dev. Biol.*, 12, 11-36 pp.
121. Monneron, A. & Bernhard, W. (1969). Fine structural organization of the interphase nucleus in some mammalian cells. *Journal of Ultrastructure Research*, 27, 266–288 pp.
122. Montgomery, T.H. (1898). Comparative cytological studies, with special regard to the morphology of the nucleolus. *J Morphology*, 15, 265-582 pp.
123. Moore, G.P. (1971). DNA-dependent RNA synthesis in fixed cells during spermatogenesis in mouse. *Exp. Cell. Res.*, 68, 462-465 pp.
124. Morovic, M., Østrup, O., Strejcek, F., Benc, M., Murin, M., Jedlickova, K., Bartkova, A., Lucas-Hahn, A., Pendovski, L. & Laurincik, J. (2018). Maternally inherited rRNA triggers de novo nucleolus formation in porcine embryos. *Zygote*, 26, 395-402 pp.
125. Murano, K., Okuwaki, M., Hisaoka, M. & Nagata, K. (2008). Transcription regulation of the rRNA gene by a multifunctional nucleolar protein, B23/nucleophosmin, through its histone chaperone activity. *Mol. Cell. Biol.*, 28, 3114–3126 pp.
126. Muro, E., Gébrane-Younès, J., Jobart-Malfait, A., Louvet, E., Roussel, P. & Hernandez-Verdun, D. (2010). The traffic of proteins between nucleolar organizers regions and prenucleolar bodies governs the assembly of the nucleolus at exit of mitosis. *Nucleus*, 1, 202-211 pp.
127. Nagata, K. & Takeyasu, K. (2007). *Nuclear Dynamics: Molecular Biology and Visualization of the Nucleus*. Japan: Springer.

128. Ochs, R. L., Lischwe, M. A., Shen, E., Carroll, R. E. & Busch, H. (1985). Nucleologenesi: composition and fate of prenucleolar bodies. *Chromosoma*, 92, 330- 306 pp.
129. Okuwaki, M. (2008). The structure and functions of NPM1/Nucleophosmin/B23, a multifunctional nucleolar acidic protein. *J. Biochem.*,143, 441-448 pp.
130. Okuwaki, M., Matsumoto, K., Tsujimoto, M. & Nagata, K. (2001). Function of nucleophosmin/B23, a nucleolar acidic protein, as a histone chaperone. *FEBS Lett*, 506, 272-276 pp.
131. Oliveira, P. & Alves M. (2015). *Sertoli Cell Metabolism and Spermatogenesis*. USA: Springer International Publishers.
132. Olson, M. O. J. (2011). *The Nucleolus*. USA: Springer.
133. Olson, M.O. & Dunder, M. (2005). The moving parts of the nucleolus. *Histochem. Cell. Biol.*, 123, 203-216 pp.
134. Olson, M.O. & Thompson, B. (1983). Distribution of proteins among chromatin components of nucleoli. *Biochemistry*, 22, 3187-3193 pp.
135. Olson, M.O., Dunder, M. & Szebeni, A. (2000). The nucleolus: an old factory with unexpected capabilities. *Trends. Cell. Biol.*, 10, 189-196 pp.
136. Olson, M.O., Hingorani, K. & Szebeni, A. (2002). Conventional and nonconventional roles of the nucleolus. *Int. Rev. Cytol.*, 219, 199-266 pp.
137. Olson, M.O., Rivers, Z., Thompson, B., Kao, W. & Case, S. (1983). Interaction of nucleolar phosphoprotein C23 with cloned segments of rat ribosomal deoxyribonucleic acid. *Biochemistry*, 22, 3345-3351 pp.
138. Olson, M.O., Wallace, M.O., Herrera, A.H., Marshall-Carlson, L. & Hunt, R.C. (1986). Preribosomal ribonucleoprotein particles are a major component of a nucleolar matrix fraction. *Biochemistry*, 25, 484–491 pp.
139. Orrick, L., Olson, M. & Busch, H. (1973). Comparison of nucleolar proteins of normal rat liver and Novikoff hepatoma ascites cells by two-dimensional polyacrylamide gel electrophoresis. *Proc Natl Acad Sci*, 70,1316–1320 pp.
140. Page, S.L. & Hawley, R.S. (2004). The genetics and molecular biology of the synaptonemal complex. *Annu Rev Cell Dev Biol*, 20:525-558 pp.
141. Paniagua, R., Nistal, M., Amat, P. & Rodríguez M. (1986). Ultrastructural observations on nucleoli and related structures during human spermatogenesis. *Anatomy and Embriology*, 301-306 pp.
142. Pearson, E.C. & Davies, H.G. (1982). A critical evaluation of Bernhard's EDTA regressive staining technique for RNA. *J. Cell. Sci.*, 54, 207-240 pp.
143. Pederson, T. (2002). Proteomics of the nucleolus: more proteins, more functions?. *Trends in Biochemical Sciences*, 27, 111–112 pp.
144. Peruquetti, R.L. & Azeredo-Oliveira, M.T. (2013). Chromatoid Body Assembling and Nucleolar Cycle: Two Important Physiological Events for the Spermatogenesis in Vertebrates. In: Recent Advances in Germ Cells Research. Editors: Aubry Perrotte. USA: Nova Science Publishers.
145. Peruquetti, R.L., Taboga, S.R. & Azeredo-Oliveira, M.T. (2010). Characterization of Mongolian gerbil chromatoid bodies and correlation with nucleolar cycle during spermatogenesis. *Reprod. Domest. Anim.*, 45, 399-406 pp.

146. Peruquetti, R.L., Taboga, S.R. & Azeredo-Oliveira, M.T. (2012). Morphological Changes of Mammalian Nucleoli during Spermatogenesis and Their Possible Role in the Chromatoid Body Assembling. *Cell Biology*, 12.
147. Pinol-Roma, S. (1999). Association of nonribosomal nucleolar proteins in ribonucleoprotein complexes during interphase and mitosis. *Mol. Biol. Cell*, 10, 77–90 pp.
148. Ploton, D., Menager, M., Jeannesson, P. Himber, G., Pigeon, F. & Adnet, J. (1986). Improvement in the staining and in the visualizarion of the argyrophylic proteins of the nucleolar organizer region at the optical lever. *Histochemical Journal*, 18, 5-14 pp.
149. Pollice, A., Zibella, M., Bilaud, T., Laroche, T., Pulitzer, J. & Gilson, E. (2000). In vitro binding of nucleolin to double-stranded telomeric DNA. *Biochem Biophys Res Commun*, 268, 909-915 pp.
150. Rajapakse, I. & Groudine, M. (2011). On emerging nuclear order. *J Cell Biol*, 192, 711-721 pp.
151. Ramos-Vara, J. (2005). Technical Aspects of Immunohistochemistry. *Vet Pathol*, 42, 405-426 pp.
152. Raska, I. (2003). Oldies but goldies: searching for Christmas trees within the nucleolar architecture. *Trends in Cell Biology*, 13, 517-526 pp.
153. Raska, I. (2006). New insights into nucleolar architecture and activity. *Int. Rev. Cytol.*, 255, 177-235 pp.
154. Raska, I., Koberna, K., Malinsky, J., Fidlerova, H. & Masata, M. (2004). The nucleolus and transcription of ribosomal genes. *Biol Cell*, 96, 579-594 pp.
155. Recher, L., Whitescarver, J., & Briggs, L. (1969). The fine structure of a nucleolar constituent. *J Ultrastruct Res*, 29, 1-14 pp.
156. Reed, R., Griffith, J. & Maniatis, T. (1988). Purification and visualization of native spliceosomes. *Cell*, 53, 949-961 pp.
157. Rickards, B., Flint, S., Cole, M. & LeRoy, G. (2007). Nucleolin is required for RNA polymerase I transcription in vivo. *Mol Cell Biol*, 27, 937–948 pp.
158. Roeder, G. S. (1997). Meiotic chromosomes: it takes two tango. *GENES AND DEVELOPMENT*, 11, 2600-2621 pp.
159. Roger, B., Moisand, A., Amalric, F. & Bouvet, P. (2003). Nucleolin provides a link between RNA polymerase I transcription and pre-ribosome assembly. *Chromosoma*, 111, 399-407 pp.
160. Roussel, P. & Hernandez-Verdun, D. (1994). Identification of Ag-NOR Proteins, Markers of Proliferation Related to Ribosomal Gene Activity. *EXPERIMENTAL CELL RESEARCH*, 214, 465-472 pp.
161. Roussel, P., Belenguer, P., Amalric, F. & Hernandez-Verdun, D. (1992). Nucleolin Is an Ag-NOR Protein; This Property Is Determined by Its Amino-Terminal Domain Independently of Its Phosphorylation State. *EXPERIMENTAL CELL RESEARCH*, 203, 259-269 pp.
162. Russell, L., Ettlin, R., Sinhahikim, A. & Clegg, E. (1990). *Histological and histopathological evaluation of the testis*. USA: Cache River Press.
163. San-Segundo, P.A. & Roeder G.S. (1999). Pch2 links chromatin silencing to meiotic checkpoint control. *Cell*, 97, 313–324 pp.

164. Sasinkova, M., Holubek, A., Otevrelva, P., Kuzelova, K. & Brodska, B. (2018). AML-associated mutation of nucleophosmin compromises its interaction with nucleolin. *Int. J. Biochem. Cell Biol.*, 103, 65-73 pp.
165. Sato, S., Yano, H., Makimoto, Y., Kaneta, T. & Sato, Y. (2005). Nucleolonema as a fundamental substructure of the nucleolus. *J Plant Res*, 118, 71-81 pp.
166. Saunders, P.T.K., Millar, M.R., Maguire, S.M. & Sharpe R.M. (1992). Stage-specific expression of rat transition protein 2 mRNA and possible localization to the chromatoid body of step 7 spermatids by in situ hybridization using a nonradioactive riboprobe. *Molecular Reproduction and Development*, 33, 385–391 pp.
167. Savkur, R.S. & Olson, M.O. (1998). Preferential cleavage in pre-ribosomal RNA by protein B23 endoribonuclease. *Nucleic Acids Res.*, 26, 4508–4515 pp.
168. Scherl, A., Couté, Y., Déon, C., Callé, A., Kindbeiter, K., Sanchez, J.C., Greco, A., Hochstrasser, D. & Diaz, J.J. (2002). Functional proteomic analysis of human nucleolus. *Mol. Biol. Cell.*, 13, 4100-4109 pp.
169. Scherthan, H. (2001). A Bouquet makes ends meet. *Nat Rev Mol Cell Biol*, 8, 621-627 pp.
170. Schmid, M., Hofgärtner, F.J., Zenzes, M.T. & Engel, W. (1977). Evidence for postmeiotic expression of ribosomal RNA genes during male gametogenesis. *Hum. Genet.*, 38, 279-284 pp.
171. Schmid, M., Löser, C., Shmidtke, J. & Engel W. (1982). Evolutionary Conservation of a Common Pattern of Activity of Nucleolus Organizers During Spermatogenesis in Vertebrates. *Chromosoma*, 86, 149-179 pp.
172. Schmid, M., Müller, H., Stasch, S. & Engel, W. (1983). Silver staining of nucleolus organizer regions during human spermatogenesis. *Hum Genet*, 64, 363-370 pp.
173. Schneider, D.A., Michel, A., Sikes, M.L., Vu, L., Dodd, J.A., Salgia, S., Osheim, Y.N., Beyer, A.L. & Nomura, M. (2007). Transcription elongation by RNA polymerase I is linked to efficient rRNA processing and ribosome assembly. *Mol Cell.*, 26, 217–229 pp.
174. Schultz, M.C. & Leblond, C.P. (1990). Nucleolar Structure and Synthetic Activity During Meiotic Prophase and Spermiogenesis in the Rat. *THE AMERICAN JOURNAL OF ANATOMY*, 189, 1-10 pp.
175. Schultz, M.C. (1990). Three Structures Associated With the Nucleolus in Male Rat Germinal Cells: Round Body, Coiled Body, and “Nubecula” and General Presence of Round Body at Male Meiosis. *THE AMERICAN JOURNAL OF ANATOMY*, 189, 11-23 pp.
176. Schwazacher, H.G. & Mosgoeller, W. (2000). Ribosome biogenesis in man: current views on nucleolar structures and function. *Cytogenet Cell Genet*, 91, 243-252 pp.
177. Scott, D.D. & Oeffinger, M. (2016). Nucleolin and nucleophosmin: nucleolar proteins with multiple functions in DNA repair. *Biochem. Cell. Biol.*, 94, 419-432 pp.
178. Shaw, P. & Jordan, G.E. (1995). The nucleolus. *Annu Rev Cell Dev Biol*, 11, 93–121 pp.
179. Shaw, P. (2015). Nucleolus. In: eLS. John Wiley & Sons, Ltd: Chichester. DOI: 10.1002/9780470015902.a0001352.pub4.



180. Siderakis, M. & Tarsounas, M. (2007). Telomere regulation and function during meiosis. *Chromosome Res.*, 15, 667-679 pp.
181. Sirri, V. Roussel, P. & Hernandez-Verdun, D. (2000). The AgNOR proteins: quantitative and qualitative changes during the cell cycle. *Micron*, 31, 121-126 pp.
182. Sirri, V., Urcuqui-Ichima, S., Pascal, R. & Hernandez-Verdun, D. (2008). Nucleolus: the fascinating nuclear body. *Histochem Cell Biol*, 129, 13-31 pp.
183. Smetana, K. & Busch, H. (1974). *The Cell Nucleus*, USA: Academic Press.
184. Smetana, K. (2011). The nucleolus through the years. *Journal of applied biomedicine*, 9, 119-127 pp.
185. Söderström, K.O. & Parvinen, M. (1976). Incorporation of H3 Uridine by the chromatoid body during rat spermatogenesis. *J. Cell. Biol.*, 70, 239-246 pp.
186. Söderström, K.O. & Parvinen, M. (1976). Transport of material between the nucleus, the chromatoid body and the Golgi complex in the early spermatids of the rat. *Cell and Tissue Research*, 168, 335-342 pp.
187. Söderström, K.O. (1976). Characterization of RNA synthesis in mid-pachytene spermatocyte of the rat. *Exp. Cell. Res.*, 102, 237-245 pp.
188. Söderström, K.O. (1978). Formation of chromatoid body during rat spermatogenesis. *Z Mikrosk Anat Forsch.*, 92, 417-430 pp.
189. Solari, A.J. (1969). The evolution of the ultrastructure of the sex chromosomes (sex vesicle) during meiotic prophase in mouse spermatocytes. *J. Ultrastruct. Res.*, 27, 289-305 pp.
190. Sousa, M. & Carvalheiro, J. (1994). A cytochemical study of the nucleolus and nucleolus-related structures during human spermatogenesis. *Anatomy and Embryology*, 479-487 pp.
191. Spector, D., Ochs, R. & Busch, H. (1984). Silver staining, immunofluorescence, and immunoelectron microscopic localization of nucleolar phosphoproteins B23 and C23. *Chromosoma*, 90, 139-148 pp.
192. Srivastava, M., Fleming, P., Pollard, H. & Burns, A. (1989). Cloning and sequencing of the human nucleolin cDNA. *FEBS Lett*, 250, 99-105 pp.
193. Stahl, A., Wachtler, F., Hartung, M., Devictor, M., Schöfer, C., Mosgöller, W., de Lanversin, A., Fouet, C. & Schwazacher, H. (1991). Nucleoli, nucleolar chromosomes and ribosomal genes in the human spermatocyte. *Chromosoma*, 101, 231-244 pp.
194. Stefanini, M., Martino, C., d'Agostino, A., Agrestini, A. & Monesi, V. (1974). Nucleolar activity of rat primary spermatocytes. *Experimental Cell Research*, 166-170 pp.
195. Terence, A. & Graham C. (2011). *The Cell: A Very Short Introduction*. USA: Oxford University Press.
196. Thiry, M. & Lafontaine, D.L. (2005). Birth of a nucleolus: The evolution of nucleolar compartments. *Trends Cell Biol*, 15, 194-199 pp.
197. Tollervy, D., Lehtonen, H., Jansen, R., Kern, H. & Hurt, E.C. (1993). Temperature sensitive mutations demonstrate roles for yeast fibrillarin in pre-rRNA processing, pre-rRNA methylation, and ribosome assembly. *Cell*, 72, 443-457 pp.
198. Trerè, D. (2000). AgNOR staining and quantification. *Micron*, 31, 127-131 pp.

199. Trerè, D., Pession, A. & Derenzini, M. (1989). The silver-stained proteins of interphasic nucleolar organizer regions as a parameter of cell duplication rate. *Exp. Cell. Res.*, 184, 131-137 pp.
200. Tres, L.L. & Solari, A.J. (1968). The ultrastructure of the nuclei and the behaviour of the sex chromosomes of human spermatogonia. *Z Zellforsch Mikrosk Anat.*, 91, 75-89 pp.
201. Tres, L.L. (1975). Nucleolar RNA synthesis of meiotic prophase spermatocytes in the human testis. *Chromosoma*, 53, 141-151 pp.
202. Tres, L.L. (2005). XY Chromosomal Bivalent: Nucleolar Attraction. *MOLECULAR REPRODUCTION AND DEVELOPMENT*, 72, 1-6 pp.
203. Tschochner, H. & Hurt, E. (2003). Pre-ribosomes on the road from the nucleolus to the cytoplasm. *Trends Cell Biol*, 13, 255-263 pp.
204. Ünal, E., Kinde, B. & Amon, A. (2011). Gametogenesis eliminates age induced cellular damage and resets life span in yeast. *Science*, 332, 1554-1557 pp.
205. Ureña, F. & Solari, A.J. (1970). Ultrastructure of the X-Y pair in rats and its relations to cell nucleoli. *C. R. Seances Soc. Biol. Fil.*, 164, 2661-2662 pp.
206. Utakoji, T. (1966). Chronology of nucleic acid synthesis in meiosis of the male Chinese hamster. *Exp. Cell. Res.*, 42, 585-596 pp.
207. Valdez, B.C., Hening, D., Le, T.V. & Busch, H. (1995). Specific aspartic acid-rich sequences are responsible for silver staining of nucleolar proteins. *Biochem. Biophys. Res. Commun.*, 207, 485-491 pp.
208. van Koningsbruggen, S., Gierlinski, M., Schofield, P., Martin, D., Barton, G.J., Ariyurek, Y., et al. (2010). High resolution whole-genome sequencing reveals that specific chromatin domains from most human chromosomes associate with nucleoli. *Mol. Biol. Cell.*, 21, 3735-3748 pp.
209. Verheggen, C., Le Panse, S., Almouzni, G., & Hernandez-Verdun, D. (1998). Presence of pre-rRNAs before activation of polymerase I transcription in the building process of nucleoli during early development of *Xenopus laevis*. *J. Cell Biol.*, 142, 1167-1180 pp.
210. Verheggen, C., Almouzni, G. & Hernandez-Verdun, D. (2000). The ribosomal RNA processing machinery is recruited to the nucleolar domain before RNA polymerase I during *Xenopus laevis* development. *J. Cell. Biol.*, 149, 293-306 pp.
211. Wang, D., Umekawa, H. & Olson, M. (1993). Expression and subcellular locations of two forms of nucleolar protein B23 in rat tissues and cells. *Cell Mol Biol Res*, 39, 33-42 pp.
212. Weisenberger, D. & Scheer, U. (1995). A possible mechanism for the inhibition of ribosomal RNA gene transcription during mitosis. *J. Cell. Biol.*, 129, 561-575 pp.
213. Zickler, D. & Kleckner, N. (1998). The leptotene-zygotene transition of meiosis. *Annu. Rev. Genet.*, 619-697 pp.
214. Zickler, D. & Kleckner, N. (2016). A few of our favorite things: Pairing, the bouquet, crossover interference and evolution of meiosis. *Semin. Cell. Dev. Biol.*, 54, 135-148 pp.

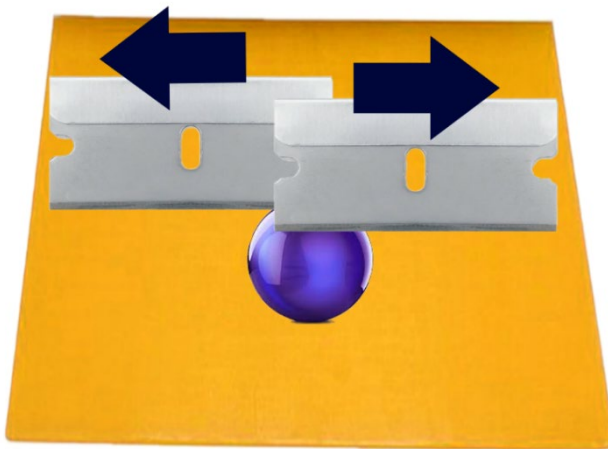
## Anexos

### Especificaciones de las técnicas.

#### ➤ *Muestras biológicas*

Una vez extraídos los testículos se procedió a fijarlos por inmersión, esto se realizó inicialmente sumergiendo el tejido en una gota del fijador la cual estaba sobre la superficie de una cera de dentista. Utilizando dos navajas *Gillette* se fragmentaron los testículos realizando cortes transversales de manera firme, rápida y limpia moviendo las navajas en direcciones opuestas una de la otra y oprimiendo el tejido contra la cera como se muestra en la Fig. 33, inicialmente se cortó en dos partes el testículo para después cortar sucesivamente en dos cada una de las partes resultantes hasta llegar a obtener fragmentos de  $1\text{ mm}^3$  aproximadamente, la manera en que se cortó el tejido tuvo como fin minimizar el daño mecánico infringido por la navaja, en ningún momento se extrajeron los fragmentos de la gota de fijador por el contrario se trató de mantener siempre impregnado el material biológico con la solución.

Posteriormente los fragmentos obtenidos se colocaron en frascos pequeños de cristal transparentes los cuales contenían 20 ml del fijador y estaban provistos de una taparrosca, se dejó fijar el material biológico durante 2 hrs a temperatura ambiente los frascos que contenían glutaraldehído [2.5%] y a  $4^{\circ}\text{C}$  los frascos con paraformaldehído [4%].



*Figura 33.* Esquema de corte de las muestras. En amarillo se esquematiza la superficie (cera de dentista) sobre la cual se seccionó el material biológico (azul). Las flechas señalan la direccionalidad de las navajas al momento de realizar los cortes.

➤ *Inclusión en resina epóxica.*

En primera instancia se realizaron lavados a las muestras con buffer de cacodilatos (el cual fue empleado para diluir los fijadores) con el propósito de eliminar el fijador en su totalidad y así iniciar la deshidratación. La deshidratación gradual de las muestras se realizó con etanol en el siguiente orden de concentración: 30%, 50%, 60%, 70%, 80%, 90% y alcohol absoluto (dos cambios), las muestras permanecieron 10 minutos en cada uno de los alcoholes. La preinclusión se hizo inicialmente con 3 lavados de óxido de propileno de 15 minutos cada uno, posteriormente las muestras se dejaron durante 24 horas en cada mezcla de óxido de propileno-resina epóxica (EPON) en diferentes diluciones: 2:1, 1:1, 1:2 respectivamente.

➤ *Inclusión en resina acrílica Lowicryl K4M*

Se realizaron lavados a las muestras con buffer de cacodilatos (el cual fue empleado para diluir los fijadores) con el propósito de eliminar el fijador en su totalidad y así iniciar la deshidratación. La deshidratación gradual de las muestras se realizó con metanol en el siguiente orden de concentración: 30%, 50%, 60%, 70%, 80%, 90% y metanol absoluto (dos cambios), las muestras permanecieron 10 minutos en cada uno de los alcoholes. La preinclusión se realizó con una mezcla (volumen-volumen) de metanol-resina en diferentes diluciones: 2:1, 1:1, 1:2 respectivamente, por último las muestras se dejaron en resina acrílica pura durante toda la noche. Todo el procesamiento de deshidratación e infiltración se llevó a cabo a una temperatura de -20°C.

➤ *Técnica de AgNOR*

Todas las soluciones se prepararon en recipientes de vidrio y utilizando agua destilada.

La gelatina de ácido fórmico se preparó y almacenó a temperatura ambiente en un frasco ámbar.

Durante todo el procedimiento se protegió de la luz las soluciones de plata y la cámara húmeda en la que se incubaron los anillos de Marinozzi.

Los anillos de Marinozzi fueron elaborados manualmente utilizando secciones de película fotográfica virgen y tijeras curvas.