

00377



UNIVERSIDAD NACIONAL AUTONOMA DE MEXICO

**POSGRADO EN CIENCIAS
BIOLOGICAS**

Facultad de Ciencias

**“Relación entre la apoptosis y el mecanismo
de atresia folicular en ovario de rata”**

T E S I S

QUE PARA OBTENER EL GRADO ACADEMICO DE

**MAESTRO EN CIENCIAS BIOLOGICAS
(BIOLOGIA EXPERIMENTAL)**

P R E S E N T A :

ROBERTO CARLOS SALGADO DELGADO

DIRECTOR DE TESIS: **DR. ENRIQUE HEBERT VAZQUEZ NIN.**



MEXICO, D. F.

COORDINACIÓN

OCTUBRE, 2004



Universidad Nacional
Autónoma de México

Dirección General de Bibliotecas de la UNAM

Biblioteca Central



UNAM – Dirección General de Bibliotecas
Tesis Digitales
Restricciones de uso

DERECHOS RESERVADOS ©
PROHIBIDA SU REPRODUCCIÓN TOTAL O PARCIAL

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

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



UNIVERSIDAD NACIONAL
AUTÓNOMA DE
MÉXICO

POSGRADO EN CIENCIAS BIOLÓGICAS COORDINACIÓN

Ing. Leopoldo Silva Gutiérrez
Director General de Administración Escolar, UNAM
Presente

Por medio de la presente me permito informar a usted que en la reunión ordinaria del Comité Académico del Posgrado en Ciencias Biológicas, celebrada el día 13 de septiembre del 2004, se acordó poner a su consideración el siguiente jurado para el examen de grado de Maestría en Ciencias Biológicas (Biología Experimental) del(a) alumno(a) **Roberto Carlos Salgado Delgado**, con número de cuenta 97563637 con la tesis titulada: "Relación entre la apoptosis y el mecanismo de atresia folicular en varío de rata", bajo la dirección del(a) **Dr. Gerardo Hebert Vázquez Nin**.

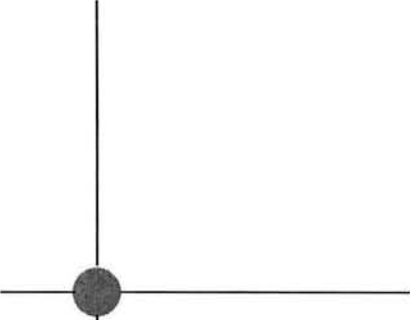
Presidente:	Dr. Enrique Antonio Pedemera Asteguiano
Vocal:	Dra. Teresa Imelda Fortoul van der Goes
Secretario:	Dr. Gerardo Hebert Vázquez Nin
Suplente:	Dra. Olga Margarita Echeverría Martínez
Suplente:	Dr. Juan Arcadio Molina Guameros

Sin otro particular, quedo de usted.

Atentamente
"POR MI RAZA HABLARA EL ESPIRITU"
Cd. Universitaria, D.F. a, 12 de octubre del 2004

Dr. Juan José Morrone Lupi
Coordinador del Programa

c.c.p. Expediente del interesado



Agradezco a los doctores miembros del jurado por el tiempo dedicado a la revisión de la tesis y haber aportado comentarios para mejorarla, les agradezco particularmente la disposición que tuvieron en todo este tiempo.

Dr. Enrique Antonio Pedernera Asteguiano

Dra. Teresa I. Fortoul Van Der Goes

Dr. Gerardo Hebert Vázquez Nín

Dra. Olga Margarita Echeverría Martínez

Dr. Juan Arcadio Molina Guarneros

Este trabajo se llevó acabo en el laboratorio de Microscopía Electrónica de la Facultad de Ciencias de la Universidad Nacional Autónoma de México. El desarrollo del proyecto de investigación contó con el apoyo económico de CONACYT y la DGEP.

RELACIÓN ENTRE LA APOPTOSIS Y EL MECANISMO DE ATRESIA FOLICULAR EN OVARIOS DE RATA

Alumno: Roberto C. Salgado D
Director: Dr. Gerardo H. Vázquez N.

ÍNDICE

I RESUMEN	1
II. MARCO TEORICO	2
II.1 CARACTERÍSTICAS GENERALES DEL OVARIO	2
II.2 FOLICULOGÉNESIS	5
II. 3 FACTORES DE CRECIMIENTO	6
II.4 DESARROLLO DEL OVOCITO	8
II.4.1 FOLÍCULO PRIMORDIAL	9
II.4.2 FOLÍCULO PRIMARIO	9
II.4.3 FOLÍCULO SECUNDARIO (ANTRAL)	10
II.4.4 FOLÍCULO MADURO O DE GRAFF (CUERPO LUTEO).	10
II.5 ORGANIZACIÓN DE CELULAS FOLICULARES	10
II.6 ORGANIZACIÓN DE CELULAS DE LA TECA	11
II.7 FOLÍCULOS POSTOVULATORIOS O CUERPOS LUTEOS	12
II.8 ENDOCRINOLOGÍA DEL OVARIO	13
II.8.1 CICLO ESTRAL DE LA RATA	13
II.9 FOLÍCULOS ATRESICOS	15
II.10 ANTECEDENTES DE LA MUERTE CELULAR PROGRAMADA	18
II.10.1 CARACTERIZACIÓN DE LA APOPTOSIS	21
II.11 ANTECEDENTES NUCLEARES	27
II.12 ULTRAESTRUCTURA DEL NUCLEO EN INTERFASE	
II.12.1 ENVOLTURA NUCLEAR	28
II.12.2 LAMINA NUCLEAR	29
II.12.3 CROMATINA	29
II.13. ESTRUCTURAS RIBONUCLEOPROTEICAS	33
II.13.1 GRANULOS INTERCROMATINIANOS (GIC).	34
II.13.2 PROCESO POSTRANSCRIPCIONAL DEL RNA MENSAJERO	35
II.13.3 GRANULOS PERICROMATINIANOS	35
II.13.4 FIBRAS PERICROMATINIANAS	36

II.13.5 CUERPOS NUCLEARES	37
II.13.6 NUCLEOLO.	38
III. OBJETIVO	40
IV. MATERIAL Y METODOS	41
IV.1 FIJACIÓN	41
IV.2 DESHIDRATACIÓN	41
IV.3 PREINCLUSION	42
IV.4 INCLUSIÓN	42
IV.5 CORTE	43
IV.6 CONTRASTE	43
IV.7 REACCION DE FEULGEN	44
IV.8 HEMATOXILINA EOSINA	44
IV.9 TECNICA DE TUNEL (APOPTAG).	45
IV.10 INMUNOGOLD PARA ME (APOPTAG)	47
IV.11 ESQUEMA DEL PROCESAMIENTO DE MATERIAL	49
V. HIPÓTESIS.	50
VI. RESULTADOS.	51
VI.1 ULTRAESTRUCTURA DE LAS CÉLULAS DE LA GRANULOSA EN FOLÍCULOS SANOS.	53
VI.1.1 C. F. EN OVARIO DE RATA DE 1 A 10 DÍAS DE NACIDA	53
VI.1.2 C. F. EN OVARIO DE RATA DE 11 A 28 DÍAS DE NACIDAS	54
VI.2 ULTRAESTRUCTURA DE OVOCITOS EN FOLÍCULOS SANOS EN DESARROLLO	55
VI.2.1 OVOCITOS EN OVARIO DE RATA DE 1 A 10 DÍAS DE NACIDA	55
VI.2.2 OVOCITOS EN OVARIO DE RATA DE 11 A 28 DIAS DE NACIDAS	55
VI.3 ULTRAESTRUCTURA DE LAS CÉLULAS DE LA GRANULOSA EN FOLÍCULOS ATRÉSICOS.	62
VI.3.1 C. F. ATRÉSICAS DE OVARIOS DE RATA DE 1 A 5 DÍAS	62
VI.3.2 C. F. ATRÉSICAS DE OVARIOS DE RATA DE 10 A 20 DÍAS	62
VI.3.3 C. F. ATRÉSICAS DE OVARIOS DE RATA DE 22 A 28 DÍAS	64
VI.4 ULTRAESTRUCTURA DE LOS OVOCITOS EN FOLÍCULOS ATRÉSICOS EN DESARROLLO	72
VI.4.1 OVOCITOS ATRÉSICOS DE RATA DE 1 A 5 DÍAS DE EDAD	72
VI.4.2 OVOCITOS ATRÉSICOS DE RATA DE 10-20 DÍAS DE EDAD	75
VI.4.3 OVOCITOS ATRÉSICOS DE RATA DE 22-28 DÍAS DE EDAD	75

VI.5 TUNEL (TERMINAL DEOXYNUCLEOTIDYL TRANSFERASE-MEDIATED DEOXY-UTP NICK END LABELIN)	85
VI.5.1 TUNEL EN OVARIOS DE 1-20 DIAS	85
VI.5.2 TUNEL EN OVARIOS DE 21-28 DIAS	86
VI.6 LAS RIBONUCLEOPROTEÍNAS EXPERIMENTAN UN IMPORTANTE ARREGLO DURANTE LA APOPTOSIS FOLICULAR EN OVARIO DE RATA.	94
VII. DISCUSIÓN.	100
VII.1. COMPARACIÓN DE LA MUERTE CELULAR DEL OVOCITO CON APOPTOSIS	101
VII.2 LAS VARIACIONES EN LA MUERTE FISIOLÓGICA CELULAR DEL OVOCITO	103
VII.3 LOS ASPECTOS ÚNICOS DE OVOCITOS.	103
VII.4 LAS VARIACIONES EN LA MUERTE FISIOLÓGICA DE LAS CÉLULAS DE LA GRANULOSA.	104
VII.5 TERMINAL DEOXYNUCLEOTIDYL TRANSFERASE-MEDIATED DEOXY-UTP NICK END LABELING. (TUNEL) .	106
VII.6 ARREGLO DE LAS RIBONUCLEOPROTEÍNAS DURANTE LA APOPTOSIS	107
VIII. CONCLUSIONES.	110
IX. BIBLIOGRAFIA.	111
X. AGRADECIMIENTOS	117
XI. DEDICATORIA	118
XII. LISTA DE ABREVIATURAS	119

I. RESUMEN

En la vida postnatal de la rata, los folículos primordiales se activan en un proceso de desarrollo folicular, atravesando por períodos sucesivos de crecimiento temprano (folículos primarios y preantrales) seguidas de una maduración rápida (folículos antrales) hasta el estado preovulatorio. Sin embargo la vasta mayoría de folículos no completa este esquema de maduración, degenerando por atresia.

Por lo tanto la atresia folicular se refiere a los cambios degenerativos que sufren los folículos antes de la ovulación, caracterizada por el constante agotamiento de células germinales y somáticas, vía apoptosis.

La atresia folicular se ha estudiado intensamente, pero prácticamente todos los estudios conocidos sobre este tema se han llevado a cabo en hembras adultas, o en folículos cultivados también de adulto. La(s) oleada(s) de atresia *in situ* que ocurren en la etapa prepúber no han sido suficientemente estudiadas en los mamíferos.

En este trabajo se examinaron numerosos folículos ováricos de ratas vírgenes de 1 a 28 días, por Microscopía Electrónica (ME), con Tinción general (Ur-Pb) y con técnicas preferenciales para RNA (EDTA) y para DNA (Amina de Osmio). Para inmunohistoquímica en Microscopía de Luz e inmunohistoquímica para ME se utilizó un kit de detención de apoptosis o TUNEL (terminal deoxynucleotidyl transferase-mediated deoxy-UTP nick end labeling).

Nuestros resultados demuestran que los folículos ováricos experimentan diferentes procesos de degradación dependiendo de la etapa de crecimiento o desarrollo, siendo distintas en cada una de ellas.

En términos generales, se distinguen morfológicamente dos mecanismos extensamente descritos de la muerte celular aparte de la apoptosis. Mientras que la habilidad del ovocito para experimentar apoptosis está aún en estudio, ya que basados en criterios ultraestructurales tradicionalmente asociados a la apoptosis, la muerte del ovocito debe ser asignada a una clase diferente de muerte celular fisiológica, lo que aumenta el interés sobre la atresia folicular ya que puede ocurrir no solo por apoptosis, sino acompañarse de otro tipo de muerte celular; incluso diferente a la necrosis.

I. SUMMARY

In the postnatal life of the rat, the primordial follicles activate in a process of follicular development, crossing per successive periods of early growth (primary and preantral follicles) followed of a fast maturation (antral follicles) until the state preovulation. Nevertheless the vast majority of follicles does not complete each scheme of maturation, degenerating by atresia.

Therefore atresia follicular talks about the degenerative changes that undergo the follicles before the ovulation, characterized by the constant exhaustion of germinal and somatic cells, via apoptosis.

Atresia follicular has studied intensely, but practically all the studies known on this subject have been carried out in adult females, or in follicles also cultivated of adult. The waves of atresia *in situ* which they happen in the stage to prepuber has not been studied sufficiently in the mammals.

In this work numerous ovarian follicles of virgin rats of 1 to 28 days were examined, by Electronic Microscopy (ME), with general stained (uranyl acetate followed by lead citrate) and preferential techniques for RNA (EDTA) and DNA (Osmium Amine). For immunohistochemistry in microscopy of light and immunohistochemistry for ME kit of halting of apoptosis or TUNEL was used (terminal deoxynucleotidyl transferase-mediated deoxy-UTP nick end labeling).

Our results demonstrate that the ovarian follicles experiment different processes from degradation depending on the stage of development, being different in each one from them. In general terms, two mechanisms extensively described of the cellular death aside from the apoptosis are distinguished morphologically. Whereas the ability of the oocyte to still experiment apoptosis this in study, since based on traditionally associated ultrastructural criteria to the apoptosis, the death of the oocyte must be assigned to a class different from physiological cellular death, what increases the interest on atresia follicular since can happen nonsingle by apoptosis, but to accompany itself by another type of cellular death; even different from the necrosis.

II.I CARACTERÍSTICAS GENERALES DEL OVARIO DE MAMÍFEROS

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

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

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

El tamaño del folículo indica el estado de desarrollo del ovocito. Las etapas iniciales de la ovogénesis ocurren durante la vida fetal, cuando las hembras producen una gran cantidad de oogonias durante el desarrollo ovárico fetal por división mitótica. Alrededor de la época del nacimiento en la mayoría de los mamíferos, la proliferación de las oogonias se detiene y los ovocitos comienzan a detenerse en la etapa del diploteno de la primera división meiotica.

En este punto, los ovocitos se rodean por una capa de células de la granulosa para formar los folículos primordiales en los cuales cada folículo individual sigue siendo quiescente hasta que una señal es recibida para su activación. Una vez que un animal es reproductivamente maduro, algunos folículos activados se accionan para experimentar un desarrollo adicional hacia la ovulación durante cada ciclo reproductivo.

En condiciones normales sólo un ovocito alcanza la madurez (en los que tienen solo una cría) y es liberado por el ovario en cada ciclo menstrual. Una hembra produce aproximadamente 400 óvulos maduros, la mayor parte (99%) de los 600 000 - 800 000 ovocitos primarios presentes en el nacimiento no maduran y se pierden gradualmente por **atresia** (Nahum R. et al 1996).

La atresia describe la muerte espontánea y la consecuente desaparición de los ovocitos inmaduros y esta puede ocurrir en cualquier etapa del desarrollo folicular, del más pequeño (primordial) al más maduro (antral). El proceso de atresia ocurre continuamente después del nacimiento hasta que el almacén de folículos se agotan totalmente y ocurre la senectud reproductiva. (Hirshfield A. 1991 y Kaipia A, et al 1997). En primates, esto da lugar a la menopausia.

Se ha aceptado extensamente que el mecanismo subyacente a la atresia ovárica es la apoptosis. (Hsueh A., et al 1996 y Tilly J.L., et al 1998). La evidencia para esto se ha adquirido en gran parte con el gravamen de las células de la granulosa en folículos antrales grandes. Las alteraciones morfológicas que correspondan a la apoptosis se han descrito en las células de la granulosa de los folículos atrésicos de la rata. (Hughes F. et al, 1991 y Boone D.L, 1997). Similar a la mayoría de los tipos celulares, las células apoptóticas de la granulosa demuestran la marginación de la cromatina, vacuolización citoplasmática, condensación citoplásmica y nuclear, el *blebbing* citoplásmico, y fragmentación, y segregación nucleolar.

Algunos estudios bioquímicos han apoyado la asignación de apoptosis a las células de la granulosa demostrado por la fragmentación internucleosomal de la cadena de ADN, por la técnica de TUNEL (Billig H, et al, 1994 y Chun S., et al. 1996), aunque no todos los estudios han apoyado estos resultados (D'Herde K., et al 1994, Van Wezel I. et al.,1999 y Gondos B., 1982). Por lo tanto, varios estudios han proporcionado evidencia de que la muerte de las células de la granulosa durante atresia ocurre vía apoptosis en etapas de madurez de la rata.

El conocer si el ovocito también experimenta la degeneración por apoptosis durante la atresia ha sido muy controversial. Por ejemplo, en un estudio al usar óvulos murinos y los ovocitos humanos incubados *in vitro*, la carencia de la fragmentación de ADN y la unión a la membrana de anexina -V sugirieron que había evidencia escasa para concluir que el mecanismo de la muerte de la célula era por apoptosis (Van Blerkom J. 1998). Sin embargo, esta conclusión fue desafiada por otro informe en donde se observa la actividad creciente de la caspasa-3 exhibida en ovocitos *in vitro*; una característica extensamente aceptada de la apoptosis (Perez G., et al 1999). Ni uno ni otro de estos estudios implicaron la evaluación morfológica en el nivel ultraestructural, que se considera el método definitivo para identificar a la apoptosis, según lo descrito originalmente por Wyllie. (Wyllie A., et al. 1972). Además, estos estudios anteriores han caracterizado la muerte del ovocito *in vitro*. Así, que el proceso por el cual la degeneración del ovocito ocurre durante la atresia *in vivo* sigue siendo desconocido. Por lo tanto, la determinación del mecanismo de muerte que sufre el ovocito todavía no se ha resuelto.

Pocas observaciones ultraestructurales de ovocitos atrésico se han descrito, y en pocos de estos informes han hecho comparaciones con apoptosis. Vázquez-Nin y Sotelo (Vázquez-Nin G.H, Sotelo J.R. 1967) describieron una distribución y un aspecto alterado de organelos, la pérdida de microvellosidades, y la segmentación del ovocito en la degeneración de folículos preantrales atrésicos de ratas no maduras. Gondos B. et al. 1982; divulgó la pérdida de microvellosidades, distorsión en los organelos citoplásmicos, y alteración en el aspecto de la zona pelúcida en los folículos atrésicos preantral de tamaño mediano en ratas no maduras. Algo interesante en el desarrollo mitótico de la ovogonia es lo

descrito por De Pol et al (1997) sobre la condensación de la cromatina y la formación de cuerpos apoptóticos durante la embriogénesis humana y poco después del parto, describiendo un proceso similar a la apoptosis.

Sin embargo, al describir a la ovogonia atrésica, Cohen y Tilly (Cohen J. et al 1994 y Tilly J.L. 1996) sugirieron que hay diferencias en la atresia de gametos entre los ovarios prenatales y postnatales. Por lo tanto, los estudios que describían la atresia folicular ovárica no han comparado las características ultraestructurales de ovocitos atrésicos.

II.2 FOLICULOGÉNESIS

En la región cortical del ovario se localizan los folículos primordiales, unidad funcional por excelencia que se encuentran sin signos aparentes de diferenciación. Durante la vida reproductiva, la mayoría de los folículos (>90 %) son primordiales, estos se encuentran constituidos por una sola capa de células de la granulosa que rodean al ovocito y forman la reserva folicular. La progresión de los folículos primordiales a folículos maduros, foliculogénesis, está basada en la capacidad que las células de la granulosa tienen para dividirse y diferenciarse.

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

Clásicamente, se pensaba que todas las fases del reclutamiento folicular estaban controladas por el eje hipotálamo-hipofisario. Sin embargo se ha demostrado que en los primeros estadios de diferenciación y división de las células de la granulosa de los folículos primordiales inician su crecimiento en ausencia de estímulos gonadotróficos, aparentemente bajo el control de señales provenientes del ovocito. En esta etapa de folículos preantrales aunque no hay estimulación de LH y FSH, las células foliculares y tecaes empiezan a sintetizar receptores para estas hormonas. (Hirshfield A. y Midgley R. 1978). Hoy se sabe

que existen señales originadas en el ovario que pondrían en marcha el programa mitótico y de diferenciación de las células ováricas dentro de las múltiples señales que gobiernan la vida celular, algunos son péptidos (denominados factores de crecimiento) que de forma universal controlan la división y la diferenciación celular.

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

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

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

II.3 FACTORES DE CRECIMIENTO

De todos los factores de crecimiento implicados en la foliculogénesis, la familia de los factores de crecimiento semejantes a insulina (IGF) I y II han sido los más estudiados (Gilbert S. et al 1994). En las células ováricas de origen humano y murino, el IGF-I y el IGF-II inducen la formación de esteroides (estrógenos, progesterona, andrógenos), aumenta la síntesis de AMPc y el número de receptores para la LH. En el ciclo mitótico los IGFs son considerados como factores de progresión. (Danilovich N., et al. 2000 y Eisenhauer K. 1996).

El gen del IGF-I se expresa exclusivamente en el compartimiento teca-intersticial y en los ovocitos de los folículos en fase de crecimiento. Estos resultados inducen a pensar que quizás una de las señales (IGF-I) necesaria para la iniciación de la diferenciación y división de las células de la granulosa se origine en el ovocito. (Eppig J., et al. 1997).

El gen del IGF-II en el ovario humano se expresa únicamente en las células de la granulosa.

Los IGFs pueden interaccionar con tres receptores diferentes: el receptor del IGF-I, el receptor IGF-II y el receptor de insulina (Hsueh A.J., 1994). Esta homología estructural hace posible que ambos receptores sean capaces de unir y mediar las acciones biológicas de IGF-I e insulina. Esta subrogación de receptores tiene importantes implicaciones fisiopatológicas. Por ejemplo en ovarios poliquísticos, hiperinsulinemia, hiperandrogenismo y acantosis nigricans, se cree que la alta oferta de insulina no pudiendo acceder a su propio receptor lo haría a través del receptor del IGF-I, induciendo constitutivamente la formación de andrógenos. (Makrigiannakis A., et al. 1999. y Malkinson A., 1980).

El factor de crecimiento alfa ($TGF\alpha$) que comparte una alta homología estructural y funcional con el EGF y actúan a través del mismo receptor presente en los ovocitos de los folículos primarios, células de la granulosa y de la teca inhibiendo la formación de estrógenos.

Las células granulosas - luteicas humanas, las de la teca y los folículos en desarrollo sintetizan $TGF\beta$. En el ovario murino. $TGF\beta$ influye en la diferenciación y división celular del ovocito, estimula la formación de estrógenos en las células de la granulosa e inhibe la síntesis de andrógenos en el compartimento teca-intersticial. (Tilly J., et al 1991).

EGF, sin embargo inhibe la expresión del gen p450, la producción de estradiol y la capacidad de aromatización, inducida por la FSH, en las células de la granulosa humana. Al EGF también se le atribuye la capacidad para estimular la maduración de los ovocitos de rata y humanos.

Otros factores como el FGF inhibe la síntesis de estrógenos y andrógenos, así como la adquisición de receptores para la LH. El TGF favorece la formación de receptores para la LH, la síntesis de progesterona aumenta el índice de la división de las células de la granulosa. IL-1 es un potente inhibidor de la diferenciación ovárica (inhibe la síntesis de estrógenos, andrógenos y de la enzima 17- β hidroxilasa en el ovario de rata). Pru j. et al. 2001., demostraron que en presencia de IL-1 las células de la granulosa entran en un proceso de apoptosis.

En las células de la granulosa de ratas inmaduras TNF α inhibe la capacidad de aromatización de la FSH de forma dosis dependiente, inhibe la producción de estrógenos y progesterona independiente de la formación de AMPc así como la formación de andrógenos en el compartimiento teca-intersticio. (Vendola K. A., et al. 1998).

II.4 DESARROLLO DEL OVOCITO

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

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

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

11.4.1 FOLÍCULO PRIMORDIAL

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

II.4.2 FOLÍCULO PRIMARIO

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

- 1.- El ovocito crece de 50 a 80 micras y desarrolla múltiples complejos de Golgi y abundantes ribosomas libres. Las microvellosidades sobre la superficie del ovocito penetran a la zona pelúcida en formación, una cubierta glucoproteica neutral gruesa, que se tiñe intensamente y al parecer es elaborada por el ovocito en combinación con las células epiteliales circundantes.
- 2.- La capa única y plana de las células foliculares, primero es cúbica y luego se divide para formar una capa estratificada de células de la granulosa, sostenida sobre una membrana basal.
- 3.- El tejido conectivo que rodea al folículo comienza a condensarse y forma una teca (del griego, "caja"), que encapsula al folículo. En una etapa más tardía, esta teca se diferencia en dos capas funcionales (Borysenko M. et al.1985).

II.4.3 FOLÍCULO SECUNDARIO (ANTRAL)

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

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

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

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

II.4.4 FOLÍCULOS MADUROS O DE GRAAF.

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

II.5 ORGANIZACIÓN DE LAS CÉLULAS FOLICULARES.

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

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

II.6 ORGANIZACIÓN DE LA TECA

La teca folicular se subdivide en dos capas:

- **La teca interna** es una capa muy vascularizada, formada de células secretoras cúbicas. Las células totalmente diferenciadas de la teca interna poseen características ultraestructurales de las células productoras de esteroides. Las células de la teca interna poseen abundantes receptores para la hormona luteinizante (LH), sintetizan y secretan los andrógenos precursores del estrógeno. Además de las células secretoras, la teca interna contiene fibroblastos, haces de colágena y una rica red de vasos de pequeño calibre.
- **La teca externa** está formada por células de tejido conectivo, células musculares lisas y haces de fibras de colágena.
- Los límites entre las capas tecales, la teca externa y el estroma circulante no están del todo definidos. Sin embargo, la lámina basal entre la capa de la granulosa y la teca interna establece un límite definido entre estas capas y separa el rico lecho capilar de la teca interna de la capa granulosa avascular, durante el período de crecimiento folicular. (Morales M. et al. 1983)

II.7 FOLÍCULOS POSTOVULATORIOS O CUERPOS LÚTEOS

Una vez producida la ovulación, las células de la granulosa sufren un cambio denominado luteinización formando el Cuerpo Lúteo. El cuerpo lúteo es el que produce progesterona que es la hormona relacionada con los cambios en los genitales, preparatorios para la eventual gestación.

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

El cuerpo lúteo es una glándula transitoria, ya que si después de 8 a 10 días de la ovulación no aparece una señal de presencia embrionaria: hormona gonadotrofina coriónica humana (HCG, para el caso de humanos), el cuerpo lúteo inicia un proceso regresivo autónomo con caída en la producción de estrógeno y progesterona que en el endometrio produce la menstruación.

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

II.8 ENDOCRINOLOGÍA DEL OVARIO

CICLO ESTRAL DE LA RATA

La secreción de esteroides ováricos, así como la secreción de gonadotrofinas hipofisiarias y factores liberadores del hipotálamo, actúan sobre el ovario mismo, dando como resultado el crecimiento y la maduración de los folículos, la ovulación y la formación del cuerpo lúteo. El proceso ocurre de forma cíclica con la participación del Sistema Nervioso Central a través de algunos mecanismos bien conocidos, como el caso de los roedores, en los que la ovulación requiere de estímulos externos como la vista, la olfacción y el contacto con otros individuos del sexo opuesto y de otros mecanismos aún poco conocidos.

La regulación del ciclo está determinada por una red compleja de eventos secretores anatómicos y conductuales que interactúan de manera rítmica y que funcionan para asegurar la reproducción. (Alonso-Pozos I. 2003).

En principio el ciclo estral fue descrito en los roedores a partir de datos aportados por Sockard y Papanicolau en los que describieron los cambios cíclicos del contenido celular de un frotis vaginal, lo que permitió determinar el momento del calor en las hembras. Más adelante el ciclo estral fue estudiado con detalle en el ratón por Allen (1931), Reitschel (1929), Clauberg (1931) y otros, estableciéndose así, las bases de los cambios sufridos en el epitelio vaginal (Snell, 1941). La periodicidad que se observa en el ciclo estral de hembras ya maduras, es el resultado directo de cambios también cíclicos que ocurren en la actividad hipotalámica, en la secreción de gonadotrofinas y en el ovario.

El ciclo estral en el ratón y la rata se ha dividido convencionalmente en cinco estadios o etapas llamadas, proestro, estro, metaestro 1, metaestro 2 y diestro, los cuales se establecen por el examen del frotis vaginal que refleja características celulares específicas que dependen de los estrógenos. Los tres tipos de células que se encuentran en el frotis vaginal son: leucocitos, células epiteliales cornificadas y células epiteliales nucleadas, la abundancia relativa de estos tipos de células, son los que marcan la pauta para definir cada etapa o estadio (Braw-tal R. 2002).

En el ciclo estral de la rata, se han establecido cinco fases las cuales son:

Proestro.- Abundantes células epiteliales nucleadas, algunas células epiteliales cornificadas y escasos leucocitos.

Estro.- células epiteliales cornificadas y unas pocas células epiteliales nucleadas

Metaestro 1.- abundante cantidad de células epiteliales cornificadas.

Metaestro 2.- abundantes células epiteliales cornificadas y abundantes leucocitos.

Diestro.- abundantes leucocitos, pocas células epiteliales nucleadas y un poco de moco.

Los primeros dos estadios son etapas anabólicas en las cuales la actividad de crecimiento es progresiva en varias partes del tracto genital. Estos cambios coinciden en el ovario, con la ovulación para que, si ocurre apareamiento haya fertilización. El tercero y el cuarto estadio, el metaestro 1 y 2 se caracterizan por ser estadios catabólicos, en los que se dan cambios degenerativos del tracto genital. En el último o primer estadio (según se vea), el diestro es un periodo de quiescencia o poco crecimiento. (Braw-tal R. 2002 y Garret W. et al 1996).

Las ratas presentan un ciclo estral de 4 días y su ovulación es espontánea, los cuerpos lúteos que se forman después de la ovulación nunca son funcionales, pero, si hay cópula, se estimula el desarrollo de un cuerpo lúteo funcional y entonces la rata tiene una preñez o una pseudopreñez, dependiendo de que la copulación haya sido fértil o no.

Toda la cronología del ciclo estral se determina con base en el ritmo diurno, la ovulación siempre se presenta poco después de la media noche. Un día antes de que la rata entre en celo, en la mañana del proestro, la secreción del 17- β estradiol de los folículos de Graaf que se encuentran en desarrollo alcanza su valor máximo. Esto desencadena un incremento en la secreción del cuerpo lúteo de progesterona durante la tarde del proestro y la ovulación se presenta en las primeras horas de la mañana siguiente, (Austin C. y Short R. 1982). La liberación de 17- β estradiol estimula la proliferación del endometrio y el aumento de LH en el torrente sanguíneo e inhibe la producción del factor liberador de gonadotropinas por el hipotálamo. (Tounekti O. et al 1995).

II.9 FOLÍCULOS ATRÉSICOS

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

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

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

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

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

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

- * Invasión de células de la granulosa hacia el interior del antro folicular (Ross M. et al. 1998).

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

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

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

Con relación a las células foliculares atrésicas, se ha descrito la aparición de dos poblaciones, un tipo cuyo citoplasma es basófilo y que aparece denso en el microscopio electrónico, las células están aplastadas, sus contornos son cóncavos y forman una red tridimensional entre ellas denominadas células oscuras y las otras son redondeadas, su citoplasma claro y están desprovistas de gránulos densos denominadas células claras. Las prolongaciones de estas células a menudo desaparecen al comienzo del proceso atrésico, aunque este rasgo no siempre se presenta.

Ambas presentan pérdida de microvellosidades y deformación celular, en estas células se ha descrito la formación de cuerpos laminares.

Cuando ocurre la atresia en folículos primarios, el contorno del ovocito se torna irregular y las células de la granulosa reducen su tamaño. Ambos se degradan, dejando al final un espacio que es ocupado por las células del estroma (Salgado R C., 2001).

Con respecto a las células tecales existe cierta controversia con relación a si tienen o no cambios.

En los ovocitos de folículos atrésicos se ha descrito pérdida de microvellosidades, deformación celular, pseudosegmentación y aparición de cuerpos laminados y cuerpos multivesiculares (Vázquez Nin G. y Sotelo J. 1967).

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

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

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

El factor de crecimiento de hepatocitos (Zachowk K. et al. 1997), la interleucina 1 β , el factor de crecimiento de fibroblastos y el factor de crecimiento semejante a insulina, entre otros (Besnard N. y Pisselet C. 1996). Bajo condiciones de cultivo se sabe que el suero fetal evita la atresia. (Frederick L. y Xinbo Z. 1998).

Basándose en las características bioquímicas como morfológicas, en años recientes se ha logrado establecer que el proceso de atresia presenta una estrecha relación con el fenómeno de la **APOPTOSIS**. (Frederick L. y Xinbo Z. 1998). Aunque esta idea sigue siendo muy debatida por muchos grupos de investigación.

II.10 ANTECEDENTES DE LA MUERTE CELULAR PROGRAMADA

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

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

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

Además de la necrosis se ha descubierto otro tipo de muerte celular denominada apoptosis conocida también como muerte celular programada la cual manifiesta una actividad celular característica en donde se necesita la expresión de genes específicos y la presencia de una serie de fenómenos bioquímicos y moleculares.

La palabra 'apoptosis'(αποπτωση), se utiliza en griego para describir la caída de las hojas de los árboles o de los pétalos de las flores.

Este concepto fue introducido por primera vez por Kerr, Wyllie y Currie en 1972 para describir las características morfológicas de un mecanismo controlado (por genes) de muerte celular en el desarrollo embrionario y de recambio tisular en tejidos normales y en circunstancias nocivas y/o patológicas celulares.

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

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

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

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

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

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

Tabla 1: Características diferenciales de necrosis y apoptosis.

II.10.1 CARACTERIZACIÓN DE LA APOPTOSIS

Los cambios morfológicos indicativos de un proceso apoptótico se presentan en dos etapas. La primera comprende la condensación nuclear y citoplásmica, y la ruptura de la célula en numerosos fragmentos estructuralmente preservados denominados cuerpos apoptóticos (CA). En la segunda etapa, estos cuerpos se desprenden de la superficie de la capa epitelial o son fagocitados por las células epiteliales adyacentes o por macrófagos, de tal forma que se impide la liberación del contenido citoplasmático celular y, por ende, se imposibilita también la activación de la respuesta inflamatoria. La condensación y/o fragmentación de la cromatina y los CA puede observarse con el microscopio de luz utilizando una tinción convencional de hematoxilina eosina. Es de anotar que el reconocimiento de la apoptosis bajo el microscopio de luz depende principalmente de la detección de CA discretos y bien preservados (Kerr J.F. et al 1995).

Sin embargo, la evidencia morfológica definitiva de apoptosis es ultraestructural y definida de acuerdo con los criterios establecidos por Kerr J. F., et al (1995) y Wyllie A., (1985) por microscopía electrónica. Estas características ultraestructurales incluyen la preservación temprana de los organelos intracelulares (mitocondria), así como de las membranas nuclear y plasmática. La condensación o fragmentación de la cromatina, la cual debe aparecer extremadamente electrondensa y homogénea, es decir, se observa negra en la micrografía electrónica con bordes bien definidos, puede localizarse subyacente a la membrana nuclear o marginada dentro del espacio nuclear (Wyllie A., 1985).

Posteriormente, Wyllie A. 1980 demostró que el criterio morfológico de identificación de la apoptosis se relacionaba con la activación de una enzima endonucleasa endógena, que corta el ADN genómico durante el proceso de condensación de la cromatina y crea un patrón en escalera de fragmentos internucleosomales de ADN, de aproximadamente 180-200 pares de bases visualizados en un gel de agarosa por electroforesis. Es importante destacar que esta observación fue inicialmente descrita en timocitos *in vitro* tratados con glucocorticosteroides.

Estos criterios morfológicos y bioquímicos de la apoptosis se han utilizado ampliamente para diferenciarla de la muerte celular por necrosis. La necrosis se caracteriza por el hinchamiento de la célula y de sus organelos con la consiguiente ruptura de las membranas celulares. Como resultado de la lisis celular se induce una respuesta inflamatoria. A diferencia de la apoptosis, el reconocimiento morfológico de la necrosis en tejido por microscopía de luz se identifica por presentar una cromatina homogénea débilmente teñida, con un citoplasma granular finamente vacuolado y con pérdida de basofilia. La ruptura de la membrana plasmática disminuye los límites entre los compartimentos celulares. Es muy importante tener en cuenta que el proceso de muerte tisular por necrosis afecta a un grupo de células en el centro de la lesión aguda y células vecinas, y origina el fenómeno de infiltración leucocitaria neutrófila o de fagocitos mononucleares. Curiosamente, en los tejidos las células necróticas tienden a retener su forma hasta ser eliminados por los macrófagos. Ultraestructuralmente, la necrosis se caracteriza por la floculación moderada de la cromatina nuclear y su marginación en pequeños e indefinidos agregados, así como por la hinchazón de todos los compartimentos citoplásmicos con ruptura y/o disolución del citoplasma, de los organelos y membrana nuclear (Kerr J. F., et al 1995 y Wyllie A., 1985). Bioquímicamente, el ADN de las células necróticas se fragmenta de forma irregular o al azar en numerosas partículas sin un patrón definido por endonucleasas, y se visualiza en forma de mancha en gel de agarosa por electroforesis (Schwartz L.M, et al 1995).

De acuerdo con la observación de que la fragmentación del ADN *in vitro* es una característica importante de apoptosis. Gavrieli Y., et al (1992) desarrollan la técnica de marcaje *in situ* denominada TUNEL (*TdT-mediated dUTP-biotin Nick End Labeling*). TUNEL consiste en la incorporación de nucleótidos marcados con biotina en los grupos hidroxilos (3'OH) terminales que han quedado expuestos durante el proceso de fragmentación de la doble cadena de ADN por activación de la endonucleasa endógena. Este grupo hidroxilo es utilizado como sustrato por la enzima transferasa terminal de deoxinucleótidos (TdT), la cual sintetiza un polímero de dUTP-biotina, que, a su vez, es reconocido por el conjugado proteico avidina-peroxidasa y visualizado por una reacción con peróxido de hidrógeno y el cromóforo 3-amino-9-etil-carbazol (AEC). Los núcleos se

observan con una coloración café - rojiza, indicativa de marcaje TUNEL positivo. (Thiry M. et al 1998).

Posteriormente, Wijsman J.H., et al. 1993 introdujeron una técnica alternativa de marcaje *in situ* denominada ISEL (*In Situ End Labeling*) (Wijsman J.H., et al. 1993). Esta técnica se basa en el mismo principio práctico de TUNEL, salvo por la utilización del fragmento de la polimerasa-I de Klenow para la incorporación de desoxinucleótidos y el empleo del cromóforo de diaminobencidina, el cual revela núcleos con una coloración café - oscuro, indicativa de marcaje TUNEL positivo. Aunque estas técnicas de marcaje histoquímico son muy útiles para la visualización de núcleos fragmentados, la simple demostración de una reacción TUNEL positivo o ISEL positivo debe interpretarse con precaución, pues estas técnicas no constituyen un criterio definitivo de identificación de apoptosis, debido a que el marcaje del grupo hidroxilo por TUNEL o ISEL no es selectivo para este tipo de muerte. Por lo tanto, es imperioso demostrar adicionalmente cambios morfológicos típicos de apoptosis (descritos anteriormente), para confirmar que el marcaje positivo representa un verdadero proceso de muerte celular por apoptosis. (Eastman A. 1995 y Gavrieli Y., et al. 1992).

Por último, si aún no se logra clarificar el tipo de muerte celular que ocurre en una situación de estudio experimental particular, la alternativa decisiva es como han sugerido Kerr J.F., et al 1995- la utilización de microscopía electrónica para el análisis ultraestructural.

Durante los últimos años, las investigaciones sobre los mecanismos moleculares involucrados en el proceso de muerte por apoptosis han aumentado considerablemente. (Bosman F. et al. 1996). Actualmente, la apoptosis puede subdividirse en tres etapas de señalización molecular diferentes: de iniciación, de activación de los sistemas de efectores y de activación del sistema de degradación. (Budihardjo I. 1999 y Carambula S.F., et al., 2002). A diferencia de las dos últimas etapas, la iniciación depende de la clase del estímulo apoptótico inductor (toxinas, factor necrótico tumoral alfa, radiaciones gamma) y del tipo celular que recibe dicho estímulo, mientras que las etapas de activación de efectores (sujeta a regulación) y la etapa de activación del sistema de degradación (no sujeta a regulación) no dependen del estímulo y son vías comunes a todos los procesos apoptóticos. La etapa de

activación de los sistemas de efectores se vincula, principalmente, a la activación de una familia de proteínas reguladoras de apoptosis denominada familia de proteínas relacionadas con bcl-2. La abreviatura bcl-2 se refiere al gen del linfoma de células B/leucemia 2. Como su nombre indica, este gen fue descubierto inicialmente por su papel en procesos tumorales de las células B debido a una translocación del gen del cromosoma 18q21 al cromosoma 14q32 que produce una superproducción de ARN mensajeros (ARNm) de bcl-2 y, por ende, de las proteínas que codifica (Bosman F. et al. 1996). Estudios recientes han demostrado que bcl-2 pertenece a una creciente familia de productos genómicos que pueden actuar como proteínas inhibidoras de la apoptosis (Bcl-2, Bcl-XL, Bcl-w, Bfl-1, Brag-1, Mcl-1 y A1) o como proteínas inductoras de apoptosis (Bax, Bak, Bcl-Xs, Bad, Bid, Bik y Hrk). (Cohen G. M. 1997).

Adicionalmente a esta familia, se ha identificado otro grupo importante de proteínas capaces de unirse al ADN y regular la transcripción de genes diana que intervienen en la normalización de la apoptosis.

Estas proteínas se conocen como factores de transcripción, tales como el factor nuclear kappa B (FN-kB (Garret W. 1996), p53 , *c-Jun* y *c-Fos* (Kaipia A; 1996 y Maillet G., et al. 2003). La detección positiva de la sobre expresión de las proteínas Bcl-2 y/o la detección de cambios de localización de los factores de transcripción de los compartimentos celulares (del citoplasma al núcleo) constituyen el criterio bioquímico *in situ* más relevante y sugieren a la apoptosis como el tipo de muerte celular en el tejido *post mortem*.

La etapa de activación del sistema de degradación de la apoptosis se caracteriza por la activación de una familia de proteasas encargadas del desmantelamiento y la ejecución celular. Este grupo de proteínas se conoce con el nombre genérico de caspasas; la letra 'c' representa el sitio catalítico de la proteasa compuesto de cisteína y el radical 'aspasa' se refiere a su habilidad proteolítica para cortar después del residuo de ácido aspártico. (Matikainen T. et al. 2001). Las caspasas son sintetizadas como zimógenos (proteasas inactivas) y son activadas por la acción de una cascada intracelular de proteasas. Cuando son activas, las caspasas cortan gran variedad de polipéptidos intracelulares que incluyen

elementos estructurales del citoplasma y del núcleo, componentes de la maquinaria de reparación del ADN y un gran número de proteínas cinasas. Las caspasas reconocen en las proteínas diana un sitio específico de cuatro residuos aminoacídicos y luego cortan obligatoriamente en el dominio C-terminal después del ácido aspártico (XXXD). Estas proteasas, de acuerdo con los sustratos sobre los que actúan, se han subdividido en tres grupos:

Grupo I (caspasa-1, -4, -5; sustrato WEHD o YVAD);

Grupo II (caspasa-2, -3, -7, -10; sustrato DEXD) y

Grupo III (caspasa-6,-8, -9; sustrato (I,V,L)EXD) (Budihardjo I. 1999, Cohen G., 1997 y Carambula S., et al., 2002).

Las caspasas -11, -12, -13 no se han clasificado aún. La detección de activación de las caspasas es otro de los criterios para implicar la apoptosis como mecanismo de muerte celular.

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

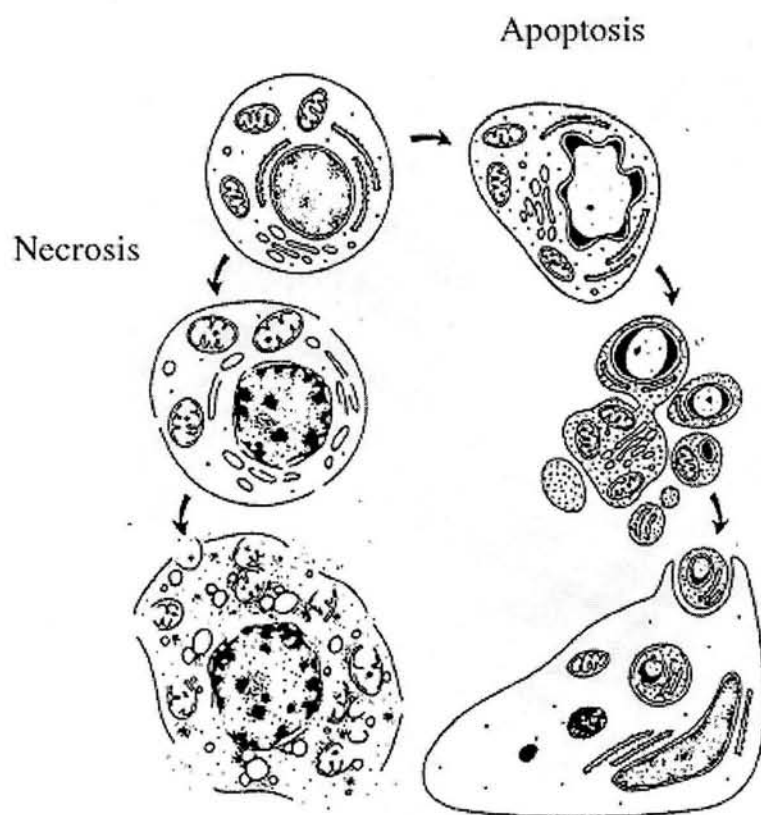


Figura 1. Ilustración de las características morfológicas de necrosis y apoptosis, según Kerr, et al (1995).

II.11 ANTECEDENTES NUCLEARES

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

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

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

II.12 ULTRAESTRUCTURA DEL NÚCLEO EN INTERFASE

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

↳ II.12.1 Envoltura nuclear

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

II.12.2 Lámina nuclear.

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

11.12.3 CROMATINA

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

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

La histona H1 tiene un peso molecular de 20 000 Kda, es rica en lisina y ampliamente variable en las especies. La histona H2A tiene un peso molecular de 13 700 KDa, es relativamente rica en lisina y, desde el punto de vista evolutivo, es relativamente conservada

en las especies. La H2B posee las características de la H2A. La histona H3 tiene un peso molecular de 15 700, es rica en arginina y evolutivamente muy conservada en las especies.

En general podemos decir que alrededor de un 25% de los restos totales de los aminoácidos de las histonas pertenecen a la arginina, histidina y lisina a las cuales se debe la carga positiva que poseen las histonas. La lisina ocupa la mayor proporción de todos los aminoácidos; entre 10 y 20% del total. Exceptuando la H1 la evolución de las histonas ha sido extremadamente conservada en particular la H3 y H4. La relación de ADN-histonas es de 1:1 (Karp, 1987).

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

El nucleosoma está formado por un oligómero de histonas: dos unidades de H2A, dos unidades de H2B, dos unidades de H3 y dos unidades de H4. Las técnicas de difracción de rayos X y de neutrones sugieren que este octámero conforma una estructura cilíndrica de aproximadamente 1100 Å de diámetro y 500 Å de altura (Grunstein,1992). Se ha demostrado que la histona H2A y H2B, son capaces de intercambiarse dentro y fuera de la estructura del nucleosoma.

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

La cromatina en su nivel estructural más interna está ordenada de una forma simple mediante una subestructura fundamental repetitiva integrada por una agrupación nucleoproteica globular discreta, que contiene histonas asociadas a un fragmento de doble hebra de ADN de longitud determinada (Grunstein,1992). Con nucleasa micrococcal se obtienen fragmentos de ADN de 140 pares de bases lo que hace suponer que el nucleosoma posee dos partes diferenciadas. Una de ellas correspondería al núcleo de la partícula

constituida por el oligómero de histonas y la otra a la hebra de ADN de 140 pares de bases (Kornberg, 1981; Getzenberg et al. 1991). Además de ADN estrechamente relacionado con el octámero, hay una parte de la hebra de ADN interconectado entre dichos octámeros.

Cuando los fragmentos son mayores, equivalentes a dos o más nucleosomas, se puede demostrar la presencia de las cinco histonas, las H1 puede estar involucrada uniendo a los nucleosomas (Kornberg, 1981).

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

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

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

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

Se cree que la cromatina tiene otros niveles de compactación como el propuesto por el modelo de solenoide, en este modelo los nucleosomas se disponen de forma helicoidal con un diámetro externo de 300 Å y un diámetro interno de 100 Å y una inclinación de 110 Å por vuelta. Cada vuelta contiene de 4 a 10 nucleosomas. La máxima compactación de los nucleosomas permitiría que solamente hubiera 2.7 nucleosomas por vuelta, por lo que se ha propuesto que la parte central podría contener a la histona H1, o proteínas no histónicas u otros elementos de control o bien ADN desnudo (Finch y Klug, 1976). El diámetro de la fibra de cromatina "*in situ*" es equivalente a 250-300 Å (Grosor de la fibra) ello es estable y discernible en la metafase, igual que la cromatina de interfase aislada después de dispersarla con disolventes catiónicos. Los nucleosomas se empaquetan en forma de solenoide que se caracteriza por una elevación de 110 Å (el diámetro de un nucleosoma) y por un diámetro de cerca de 300 Å (6-7 nucleosomas por giro) formando una vuelta del solenoide. Micrografías electrónicas de cromosomas, revelan anillos de fibras de cromatina que emanan de un eje central, lo que hace suponer que hay niveles superiores de organización (Alberts, 1989).

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

II.13 ESTRUCTURAS RIBONUCLEOPROTEICAS

Las estructuras formadas por ribonucleoproteínas, están involucradas en el proceso de transcripción y maduración del ARN mensajero, y están formadas por ARN y proteínas provenientes del citoplasma celular (Monneron A. y Bernhard M. 1969; Vázquez Nin G. y Echeverría O. 1996). La transcripción es el proceso por el cual se polimeriza una molécula de ácido ribonucleico (ARN) a partir de nucleótidos que contienen el azúcar ribosa en lugar de la desoxirribosa del ácido desoxirribonucleico (ADN). Las ARN polimerasas catalizan la formación de los enlaces estéricos entre el ácido fosfórico de un nucleótido y el oxidrilo en posición 3' de la ribosa de otro nucleótido. De esta manera se va formando una molécula de ARN con una secuencia de bases complementaria a la hebra de ADN. A la mayoría de los transcritos primarios de ARN se les denomina ARN heterogéneo nuclear o ARN premensajero, hnARN o pre-mARN respectivamente. La nueva molécula de ARN se une a proteínas constituyendo partículas ribonucleoproteicas heterogéneas nucleares (hnRNP), las cuales sufren un proceso de maduración antes de salir del núcleo como ARN mensajero (Echeverría O. et al.1995). Esta maduración consiste en la adición de un capuchón o “cap” en el extremo 5' de la molécula de ARN, la adición de una “cola” de ácido poliadenílico (poli A) en el extremo 3' y el proceso de “splicing”, que consiste en la eliminación de secuencias que no codifican para algún aminoácido denominadas intrones, (Jiménez García L. F. et al. 1985). Las ribonucleoproteínas son visibles al microscopio electrónico, en forma de:

Gránulos intercromatinianos (GIC)

Gránulos pericromatinianos (GPC)

Fibras pericromatinianas (FPC)

Cuerpos Nucleares

Nucleolo.

II.13.1 Los gránulos intercromatinianos (GIC)

Fueron descritos por primera vez por Swift H. 1959, aparecen en todas las células animales como grupos de partículas aisladas de un diámetro de 20 a 25 nm. Estas partículas se contrastan con el método preferencial (EDTA) (Bernhard W. et al 1969), y con oxinitrato de bismuto (Medina F. et al. 1989). Los GIC están interconectados con fibras y aparecen como cadenas que forman una malla o de red. Estas cadenas están presentes en pequeños fragmentos que parecen estar en contacto con cúmulos de cromatina en células vegetales. (Medina F. et al. 1989). Se sabe que son sitios de acumulación de partículas de ribonucleoproteínas que contienen ARNs de bajo peso molecular ricos en uridina (snARN-U), (Spector D et al. 1983, Puvion E et al. 1984). Estas snRNP son esenciales en el proceso de splicing que da como resultado la maduración de los mARNs y se les conoce como factores de “splicing”, algunos de los cuales están bien identificados, como el SC-35, SF2. (Spector D. et al 1993; Melcak I. y Raska I. 1996). En algunos núcleos las snRNP se encuentran organizadas en snurposomas de tres tipos: los snurposomas A, que varían de 1 a 5 μm de diámetro y contienen únicamente U1snRNP, los snurposomas de tipo B, tienen 4 μm de diámetro y contienen U1, U2, U4, U5, U6, y SC-35, y los snurposomas C son los más grandes miden 20 μm de diámetro, y contienen inclusiones granulares. Se cree que los snurposomas de tipo B sean equivalentes a los cúmulos de gránulos intercromatinianos en células de mamíferos. (Spector D. et al. 1993; Pombo A. y Cook P. 1996). Se ha propuesto que los cúmulos de gránulos intercromatinianos juegan un papel en el almacenamiento de moléculas seleccionadas con el splicing y posiblemente que pueden ser un sitio de degradación de moléculas anormales incluyendo los RNA ribosomales ya que han sido detectados en los cúmulos de gránulos intercromatinianos, (Puvion E. y Puvion Dutilleul F. 1996).

II.13.2 Proceso postranscripcional del RNA mensajero

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

II.13.3 Los gránulos pericromatinianos.

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



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

II.13.4 Fibras pericromatinianas.

Fueron descritas por Monneron y Bernhard (1969). Se encuentran rodeando a la cromatina periférica en algunas de sus áreas, su diámetro varía entre 30 y 50 Å en ocasiones aparecen plegadas. Algunas son más gruesas y miden alrededor de 200 Å. En otros casos se observan con conexiones hacia dentro de los gránulos con transiciones visibles que dan continuidad entre los GIC o GPC (Monneron y Bernhard, 1969), pero éstas no son equivalentes a las FPC. Se ha sugerido que la fibras pericromatinianas pueden representar el RNA heterogéneo

(RNAhn) en proceso de transcripción o recién sintetizado (Fakan S. et al. 1976; Puvion E. y Moyne G. 1978), son estructuras que contienen fósforo. Se han observado en diferentes grados de enrollamiento que llegan a formar cuerpos irregulares y finalmente forman gránulos esféricos, este proceso es similar al de los gránulos de Balbiani, las fibras pueden emigrar a través del espacio intercromatiniano, desde los sitios de transcripción, se ha propuesto que en estas fibras se realiza el proceso de splicing (Vázquez Nin G. y Echeverría O. 1996), Se han localizado factores de splicing como proteínas con dominios SC-35 (Fakan et al 1984 y Puvion et al 1989) cerca de las fibras (Spector D. et al. 1993), lo que sugiere la existencia de un "splicing" co-transcripcional. así como las moléculas poli A, U1 y U2, (Spector D. et al. 1993, Puvion E. et al. 1996).

II.13.5 Cuerpos nucleares

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

II.13.6 Nucleolo

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

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

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

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

Hernández-Verdún P. et al. 1993), el componente granular es el sitio de almacenamiento o acumulación de las moléculas preribosomales (Spector D. et al. 1993; Shaw P. et al. 1995). La cromatina nucleolar condensada es transcripcionalmente inactiva, y se encuentra esparcida entre la cromatina laxa (Delgado M. et al. 1995).

III. OBJETIVOS

OBJETIVOS GENERALES

- ◆ Determinar la edad en la que existe mayor cantidad de atresia en ovarios de ratas recién nacidas, prepúberes y de madurez sexual temprana en la rata.
- ◆ Comparar las características del proceso atrésico en etapas prepúberes y de madurez sexual temprana.
- ◆ Estudiar las características ultraestructurales que distinguen el fenómeno de atresia en folículos prepúberes.
- ◆ Realizar estudios citoquímicos e inmunohistoquímicos tendientes a caracterizar los mecanismos de la atresia en ovarios de ratas prepúberes.
- ◆ Caracterizar la relación entre atresia folicular y apoptosis en edades tempranas.
- ◆ Analizar la degeneración del ovocito de ratas durante atresia en las primeras etapas de desarrollo folicular, en etapas prepúberes y de madurez.

IV. MATERIAL Y MÉTODO

Se utilizaron ratas prepúberes hembras de la raza Wistar desde 1 hasta 28 días.

Se ovariectomizaron todas las ratas, con el siguiente método: se tomó al animal y se le inyectó (0.14 ml) de anestésico (pento barbital sódico) como anestésico, hasta que la rata se quedó inconsciente, en ese momento se pasó a una charola de disección. Se procedió a realizar una incisión longitudinal ventral de tal manera que nos permitiera localizar los ovarios y una vez localizados se disecaron y se extrajeron.

IV.1 FIJACIÓN

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

LAVADOS

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

IV.2 DESHIDRATACIÓN

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

IV.3 PREINCLUSIÓN

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

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

En el caso de las muestras en parafina se realizó una preinclusión usando como agente intermediario, Xilol al 50%.

IV.4 INCLUSIÓN

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

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

En el caso de la Parafina se incluyeron las muestras y se dejaron enfriar a temperatura ambiente o a 4° C en el refrigerador.

IV.5 CORTE

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

Para el caso de la parafina se sacaron cortes semifinos en el micrótomo.

IV.6 CONTRASTE

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

Además se contrastaron con la técnica preferencial para ribonucleoproteínas, EDTA (Bernhard, 1969) y para DNA (Amina de Osmio) (Cagliatti y Gaution 1976.).

Las diferentes rejillas se llevaron al microscopio electrónico Jeol modelo 1010 y se localizaron las regiones deseadas para proceder a la toma de fotografías.

IV.7 REACCIÓN DE FEULGEN

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

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

IV.8 TÉCNICA DE HEMATOXILINA EOSINA

La tinción de hematoxilina-eosina ha sido considerada una tinción de rutina tanto en laboratorios histopatológicos como de docencia, ya que nos proporciona información general de los tejidos y sin variaciones importantes en sus resultados.

Se trata de una coloración donde se establece un contraste entre los dos colorantes para poner de manifiesto estructuras de diferente composición química.

La hematoxilina es un colorante que en sí, tiene poca afinidad por los tejidos, pero cuando se le combina con sales de aluminio, cromo o cobre, que se encuentran en forma de alumbre, es un excelente colorante nuclear.

En la técnica de tinción de hematoxilina de Harris-Eosina los resultados son los siguientes:

Núcleo	Azul
Nucleolo	Azul (depende del PH durante la tinción).
Citoplasma	Rosa
Fibras musculares	Rosa intenso
Eritrocitos	Rosa
Tejido conjuntivo	Rosa intenso

IV.9 TECNICA DE TUNEL (Apop Tag).

Para los tejidos incluidos en parafina se utilizó el siguiente procedimiento:

1.- DESPARAFINAR LAS SECCIONES DEL TEJIDO

- a.- Lavar la muestra en 3 cambios de xileno por 5 minutos cada lavado
- b.- Lavar la muestra en dos cambios de etanol absoluto por 5 minutos cada lavado
- c.- Lavar el espécimen una vez en etanol al 95% y una vez en etanol al 70% por 3 min cada lavado
- d.- Lavar el espécimen en un cambio de PBS por 5 minutos.

2.- PRETRATAMIENTO DEL TEJIDO

- a.- Aplicar recién diluida la proteinasa K directamente sobre el espécimen por 15 min. a temperatura ambiente (aprox. $60 \mu\text{l}/5 \text{ cm}^2$).
- b.- Lavar en dos cambios de H₂O destilada en un vaso de coplin por 2 min cada lavado.

3.- INHIBIR LA PEROXIDASA ENDOGENA

- a.- Inhibir en peróxido de hidrógeno al 3% en PBS por 5 minutos a temperatura ambiente (T.A.) en un vaso coplin.
- b.- Enjuagar el espécimen dos veces en PBS o H₂O por 5 minutos cada vez.

4.- APLICAR BUFFER DE EQUILIBRIO

- a.- Sacudir suavemente el exceso de líquido y cuidadosamente secar o aspirar alrededor de la sección
- b.- Inmediatamente aplicar 75 μl de buffer de equilibrio directamente sobre el espécimen
- c.- Incubar al menos 10 segundos a T.A.

5.- APLICAR LA ENZIMA TDT

- a.- Sacudir el exceso de líquido y limpiar o aspirar alrededor de la sección
- b.- Inmediatamente pipetear en la sección $55 \mu\text{l}/5 \text{ cm}^2$ de enzima TDT
- c.- Incubar en cámara húmeda a 37 °C por una hora.

6.- APLICAR EL BUFFER DE LAVADO Y PARO

a.- Colocar el espécimen en un vaso coplin conteniendo el buffer de paro, agitar por 15 seg. e incubar por 10 minutos a T.A.

7.- APLICAR ANTI-DIGOXIGENINA CONJUGADA

a.- Lavar el espécimen en 3 cambios de PBS por 1 minuto cada uno

b.- sacudir suavemente el exceso de líquido y cuidadosamente secar o aspira alrededor de la sección.

c.- Aplicar la Anti-digoxigenina peroxidasa aprox $65 \mu\text{l}/5\text{cm}^2$.

d.- Incubar en una cámara húmeda por 30 minutos a temperatura ambiente y en oscuridad.

8.- LAVAR EN PBS

a.- Lavar en 4 cambios de PBS por 2 minutos a T.A.

9.- DESARROLLAR EL COLOR EN UN SUBSTRATO DE PEROXIDASA

a.- Sacudir el exceso de líquido y cuidadosamente limpiar o aspirar alrededor de la sección.

b.- Aplicar el sustrato peroxidasa hasta cubrir completamente el espécimen ($75 \mu\text{l}/5\text{cm}^2$).

c.- esperar de 3 a 6 min.

d.- observar sobre el microscopio el desarrollo del color.

10.-LAVAR EL ESPÉCIMEN

a.- Lavar el espécimen en 3 cambios de dH_2O en un vaso coplin por 1 min. cada uno.

b.- incubar en dH_2O en una caja coplin por 5 minutos a tem amb.

11.- CONTRATEÑIR EL ESPÉCIMEN

a.- Contrateñir en 0.5% de verde de metilo por 10 minutos a temperatura ambiente

b.- Lavar el espécimen en 3 cambios de dH_2O . Sumergiendo varias veces para el primer lavado y el segundo y 30 segundos con agitación para el tercer lavado.

c.- Enjuagar en 3 cambios con N-Butanol de una manera similar a la antes mencionada.

12.- DESHIDRATAR Y MONTAR

a.- Se deshidrata con alcoholes graduales hasta darle 3 cambios de xileno y se montan con resina sintética.

13.- OBSERVAR EN EL MICROSCOPIO

a.- Puede almacenarse indefinidamente a temperatura ambiente.

IV.10 TUNEL PARA MICROSCOPIA ELECTRÓNICA ACOPLADA CON PARTICULAS DE ORO DE 10 nm.

El protocolo seguido para ME se realizó de una manera muy similar, eliminando o cambiando algunos reactivos para poder adaptar la técnica y observar granos de oro.

- A) Se obtuvieron cortes ultrafinos de 60 nm aproximadamente, fijados en paraformaldehído al 4 % incluidos en resina LR White
- B) Se colocó la rejilla en H₂O desionizada por 5 min.
- C) Se colocó por 10 minutos a T. A. en buffer de equilibrio.
- D) Posteriormente se incubó con la enzima TDT por 1 hr. a 37° C en cámara húmeda
- E) Se colocó en buffer de paro x 10 minutos a T. A.
- F) Se lavó muy bien con TBS x 5 Minutos.
- G) Se colocó la rejilla en una gota de TBS + Reactivo de bloqueo (blocking reagen) por 1 hora a T. A.
- H) Posteriormente se dejó en TBS + Agente de Bloqueo + (anticuerpo primario) Anti Digoxigenina toda la noche a 4° C en cámara húmeda, dilución 1:20.
- I) Se enjuagó muy bien en TBS, 3 cambios x 5 min. Cada uno

J) Se colocó en el anticuerpo secundario Goat anti-rabbit (GAR) IgG 10 nm Auroprobe, dilución. 1:20 con TBS por 30 min. a T. A.

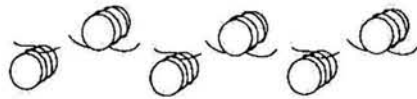
K) Se lavó en PBS, 3 cambios x 5 minutos.

L) Se lavó con dH₂O 3 cambios por 5 minutos

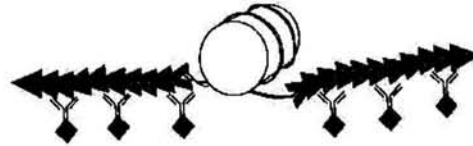
M) Se dejó secar y se contrasta suavemente con uranilo - plomo.

N) Se observó en el Microscopio Electrónico Jeol 1010.

DIAGRAMA REPRESENTATIVO DE LA TÉCNICA DE TUNEL



1.- Como resultado de la apoptosis: Fragmentos Nucleosomales de DNA.



3.- Se une un anticuerpo conjugado



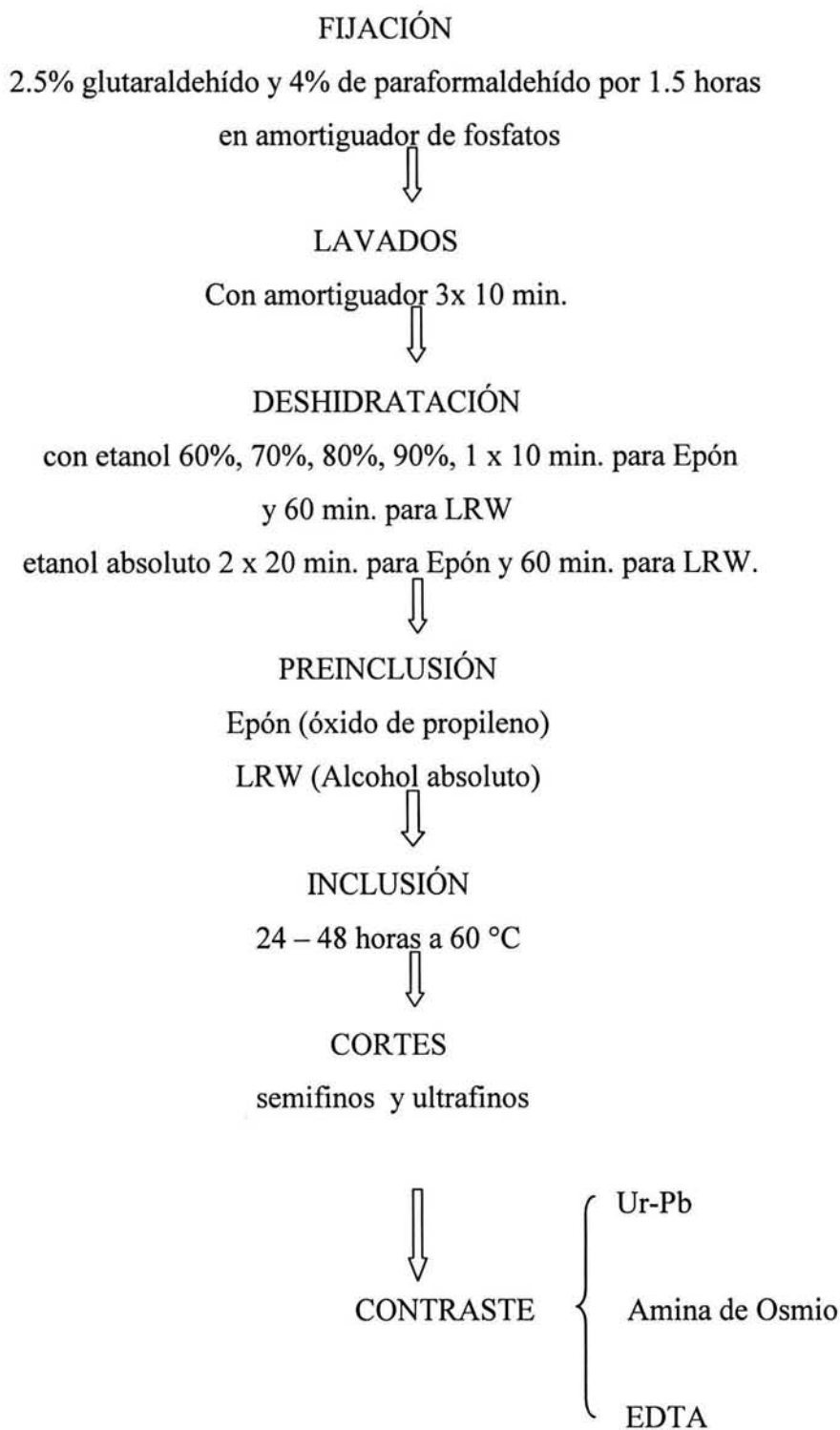
2.- Se marca con dNTP-Digoxigenin



4.- Se Tiñe con un sustrato y se observa la reacción con un microscopio óptico (peroxidasa).

IV. 11 DIAGRAMA DE FLUJO PARA LA INCLUSIÓN DE MATERIAL EN ME.

Ovarios de ratas prepúberes hembras de 1-28 días de nacidas.



V. HIPÓTESIS

La fragmentación del ADN de los núcleos de células foliculares puede ocurrir en distintos procesos de muerte celular.

Los folículos ováricos experimentan diferentes procesos de degeneración dependiendo de la etapa de crecimiento o desarrollo, siendo procesos distintos en cada una de las etapas, por lo que puede presentarse más de un mecanismo de muerte en las células foliculares.

El ovocito no presenta una apoptosis típica, ya que no existen observaciones ultraestructurales que la demuestren.

RESULTADOS

Las ratas utilizadas en este estudio tenían de 1 a 28 días de edad y en su mayoría seguían siendo no maduras a la hora del sacrificio. Aunque algunas edades (25-28 días) estén en un punto muy cercano a la madurez sexual, las vaginas todavía estaban cerradas.

A continuación se muestran las edades y número de preparaciones procesadas con diferentes técnicas.

EDAD/Semifinos	Rata 1		Rata 2		Rata 3		Rata 4		Tinción
	Izquier	Derecha	Izquier	Derecha	Izquier	Derecha	Izquier	Derecha	
1 día	✓	✓	✓	✓	✓	✓	✓	✓	Apop Tag
5 días	X	✓	✓	✓	✓	✓	✓	✓	Apop Tag
10 días	✓	✓	✓	✓	✓	✓	✓	✓	Apop Tag
11 días	✓	✓	✓	✓	✓	✓	✓	✓	Apop Tag
12 días	✓	✓	✓	✓	✓	✓	✓	✓	Apop Tag
13 días	✓	✓	✓	✓	✓	✓	✓	✓	Apop Tag
14 días	✓	✓	✓	✓	✓	✓	✓	✓	Apop Tag
15 días	✓	✓	✓	X	✓	✓	✓	✓	Apop Tag
17 días	✓	✓	✓	✓	✓	✓	✓	✓	Apop Tag
18 días	✓	✓	✓	✓	✓	✓	✓	✓	Apop Tag
19 días	✓	✓	✓	✓	✓	✓	✓	✓	Apop Tag
20 días	✓	✓	✓	✓	✓	✓	✓	✓	Apop Tag
21 días	✓	✓	✓	✓	✓	✓	✓	✓	Apop Tag
25 días	✓	✓	✓	✓	✓	✓	✓	✓	Apop Tag
28 días	✓	✓	✓	✓	✓	✓	✓	✓	Apop Tag
Timo (control)	✓	✓	✓	✓	✓	✓	✓	✓	Apop Tag
Testículo	✓	✓	✓	✓	✓	✓	✓	✓	Apop Tag

Tabla 1: preparaciones de ovarios de rata de 1 a 28 días con la técnica de TUNEL. Se realizaron controles positivos y negativos de preparaciones de tejidos de timo y testículo respectivamente.

✓ : muestras procesadas correctamente

X: muestras perdidas o dañadas.

EDAD/Semifinos	Rata 1		Rata 2		Rata 3		Rata 4		Tinción
	Izquier	Derecha	Izquier	Derecha	Izquier	Derecha	Izquier	Derecha	
1 día	✓	✓	✓	✓	✓	✓	X	X	Feulgen
5 días	X	✓	X	✓	✓	✓	X	X	Feulgen
10 días	✓	✓	✓	✓	✓	✓	✓	✓	Feulgen
11 días	✓	✓	✓	✓	✓	✓	✓	✓	Feulgen
12 días	✓	✓	✓	✓	✓	✓	✓	✓	Feulgen
13 días	✓	✓	✓	✓	✓	✓	✓	✓	Feulgen
14 días	✓	✓	✓	✓	✓	✓	✓	✓	Feulgen
15 días	✓	✓	✓	X	✓	✓	X	X	Feulgen
17 días	✓	✓	✓	✓	✓	✓	✓	✓	Feulgen
18 días	✓	✓	✓	✓	✓	✓	✓	✓	Feulgen
19 días	✓	✓	✓	✓	✓	✓	X	✓	Feulgen
20 días	✓	✓	✓	✓	✓	✓	✓	✓	Feulgen
21 días	✓	✓	✓	✓	✓	✓	✓	✓	Feulgen
25 días	✓	✓	✓	✓	✓	✓	✓	✓	Feulgen
28 días	✓	✓	✓	✓	✓	✓	✓	✓	Feulgen
Timo	✓	✓	✓	✓	✓	✓	✓	✓	Feulgen
Testículo	✓	✓	✓	✓	✓	✓	✓	✓	Feulgen

Tabla 2: preparaciones de ovarios de rata de 1 a 28 días con la técnica de Feulgen. Se realizaron controles positivos y negativos de preparaciones de tejidos de timo y testículo respectivamente.

✓ : muestras procesadas correctamente

X: muestras perdidas o dañadas.

EDAD/Semifinos	Rata 1		Rata 2		Rata 3		Rata 4		Tinción
	Izquier	Derecha	Izquier	Derecha	Izquier	Derecha	Izquier	Derecha	
1 día	✓	✓	✓	✓	✓	✓	✓	✓	Hema- Eosi
5 días	X	✓	✓	✓	✓	✓	✓	✓	Hema- Eosi
10 días	✓	✓	✓	✓	✓	✓	✓	✓	Hema- Eosi
11 días	✓	✓	✓	✓	✓	✓	✓	✓	Hema- Eosi
12 días	✓	✓	✓	✓	✓	✓	✓	✓	Hema- Eosi
13 días	✓	✓	✓	✓	✓	✓	✓	✓	Hema- Eosi
14 días	✓	✓	✓	✓	✓	✓	✓	✓	Hema- Eosi
15 días	✓	✓	✓	X	✓	✓	✓	✓	Hema- Eosi
17 días	X	✓	X	✓	✓	✓	✓	✓	Hema- Eosi
18 días	✓✓	✓	✓	✓	✓✓	✓	✓	✓	Hema- Eosi
19 días	✓	✓	✓	✓	✓	✓	✓	✓	Hema- Eosi
20 días	✓	✓	✓	✓	✓	X	✓	✓	Hema- Eosi
21 días	✓	✓	✓	✓	✓	✓	✓	✓	Hema- Eosi
25 días	✓	✓	✓	✓	✓	✓	✓	✓	Hema- Eosi
28 días	✓	✓	✓	✓	✓	✓	✓	✓	Hema- Eosi
Timo	✓	✓	✓	✓	✓	✓	✓	✓	Hema- Eosi
Testículo	✓	✓	✓	✓	✓	✓	✓	✓	Hema- Eosi

Tabla 3: preparaciones de ovarios de rata de 1 a 28 días con la técnica de Hematoxilina-Eosina. Se eligieron controles positivos y negativos en tejidos de timo y testículo respectivamente.

✓ : muestras procesadas correctamente

X: muestras perdidas o dañadas.

ULTRAESTRUCTURA DE LAS CÉLULAS DE LA GRANULOSA EN FOLÍCULOS SANOS.

CÉLULAS DE LA GRANULOSA EN OVARIO DE RATA DE 1 A 10 DÍAS DE NACIDA

Las células de la granulosa en los folículos primordiales tienen una forma escamosa aplanada las cuales rodean completamente al ovocito primario (Fig. 1 y 2) y se unen entre sí fuertemente mediante desmosomas (Fig. 5). El núcleo contiene pequeñas cantidades de heterocromatina oscura adosada a la envoltura nuclear (fig.2,3 y 4). Se observan grandes cantidades de fibras intercromatinianas (FI), pericromatinianas (FP) y de gránulos pericromatinianos (GP) (no se muestra). En el citoplasma se reconocen fácilmente mitocondrias, ribosomas y esporádicamente retículo y Golgi (Fig. 3 y 4). Los folículos presenta una lámina basal que los separa del tejido conectivo (Fig. 3).

Conforme avanza el desarrollo, las células de la granulosa comienzan a dar origen a folículos primarios, tornándose en forma cuboide, rodeando en una sola capa al ovocito primordial (Fig. 2). Algunos de ellos presentan una proliferación y estratificación rodeando en varias capas al ovocito. Las microvellosidades de la zona pelúcida comienzan a hacerse notorias al igual de la relación entre el ovocito y las células de la granulosa a través de esta. (Fig. 3).

Las células del estroma se organizan alrededor del folículo primario y comienzan a dar origen a la teca interna y a la teca externa. Una lamina basal separa a las células de la granulosa de la teca interna. (Fig. 3).

CÉLULAS DE LA GRANULOSA EN OVARIO DE RATA DE 11 A 28 DÍAS DE NACIDAS

La morfología ultraestructural de las células de la granulosa en folículos sanos es similar sin importar la etapa de desarrollo en que se encuentren.

El citoplasma de las células de la granulosa es escaso y los organelos son poco abundantes. La mayoría de organelos están situados normalmente en las regiones corticales y perinucleares. Las mitocondrias son redondas u ovals, algo oscuras, y tienen una pequeña cantidad de crestas identificables (Fig. 4).

Las pequeñas cantidades de retículo endoplasmático rugoso (RER) están situadas adyacentes a racimos de mitocondrias y llenas uniformemente de material débilmente electrón denso.

En algunas células de la granulosa, hay áreas con concentraciones localizadas de ribosomas, RER y de mitocondrias que pueden indicar sitios altamente activos de síntesis proteica. En contraste con los folículos primordiales, la maquinaria sintética compleja no se observa en los folículos preantrales y antrales. Las vacuolas o los lisosomas se observan raramente en las células de la granulosa de folículos sanos. El núcleo de las células de la granulosa siempre presenta muy poca cromatina compacta adosada a la envoltura nuclear (Fig. 4).

ULTRAESTRUCTURA DE OVOCITOS EN FOLÍCULOS SANOS EN DESARROLLO

OVOCITOS EN OVARIO DE RATA DE 1 A 10 DÍAS DE NACIDA

Los folículos primordiales se componen de un ovocito rodeado por un número pequeño de células de la granulosa (Fig.1 A, B y Fig.2). El núcleo contiene pequeñas cantidades de heterocromatina oscura adosada a la envoltura nuclear (Fig. 6). Se observan grandes cantidades de fibras intercromatinianas (FI), pericromatinianas (FP) y de gránulos pericromatinianos (GP), lo que nos puede indicar que es un núcleo transcripcionalmente muy activo.(No se muestra). Presentan uno o varios nucleolos grandes, intactos con nucleolonemas bien desarrollados. (Fig. 5).

En el citoplasma se reconocen fácilmente mitocondrias, ribosomas y esporádicamente retículo y Golgi (Fig. 5) ya que estos últimos son muy poco abundantes en el ovocito. La membrana celular esta muy bien conservada y la relación con las células vecinas es muy fuerte formando varias uniones tipo desmosomas (Fig. 5).

OVOCITOS EN OVARIO DE RATA DE 11 A 28 DIAS DE NACIDAS

La morfología ultraestructural de ovocitos en folículos sanos en aparecen similares sin importar la etapa de desarrollo en que se encuentren. Los ovocitos en los folículos a los cuales se han desarrollado más allá de la etapa primaria han adquirido una zona pelúcida (Fig. 3 y 4). Ésta es una capa integrada totalmente por glicoproteínas que es fijada firmemente al ovocito y a la capa circundante de las células de la granulosa (Fig. 4). Las microvellosidades del ovocito y de las prolongaciones más gruesas de las células de la granulosa penetran la zona pelúcida (Fig. 4). Los organelos citoplasmáticos se encuentran libremente agrupados y la mayoría están situados normalmente en las regiones corticales y perinucleares del ovocito. Las mitocondrias en los ovocitos aparecen redondas u ovales, algo oscuras, y tienen una pequeña cantidad de crestas identificables (Fig. 4 y 5).

Las pequeñas cantidades de retículo endoplasmático rugoso (RER) están situadas adyacentes a racimos de mitocondrias y llenas uniformemente de material débilmente electrón denso. Hay también agrupaciones pequeñas de cortas y ásperas estructuras lineales, dispersadas de forma paralela a través del citoplasma. Éstos pueden ser distinguidos de RE, porque no forman las estructuras típicas del RE, además de que nunca están cerca del núcleo (Fig. 4).

Éstas estructuras previamente se han llamado laminillas o estructuras laminares (Vázquez-Nín y Sotelo, 1969) cuyo origen y naturaleza son desconocidos. Estas estructuras se observan tanto en ovocitos sanos como alterados, pero en estos últimos aumentan en número considerablemente. En algunos ovocitos, hay áreas con concentraciones localizadas de ribosomas, de RER, y de las mitocondrias que pueden indicar sitios altamente activos de síntesis proteica. En contraste con los folículos primordiales, la maquinaria sintética compleja no se observa en los folículos en desarrollo. Las vacuolas o los lisosomas se observan raramente en los ovocitos de folículos sanos. El núcleo de los ovocitos en desarrollo siempre contiene muy poca cromatina compacta adosada a la envoltura nuclear (Fig. 2, 4, 5 y 6).

En los folículos primarios los ovocitos tienen nucleolos bien desarrollados, sugiriendo que están sintetizando activamente el RNA (Fig. 5).

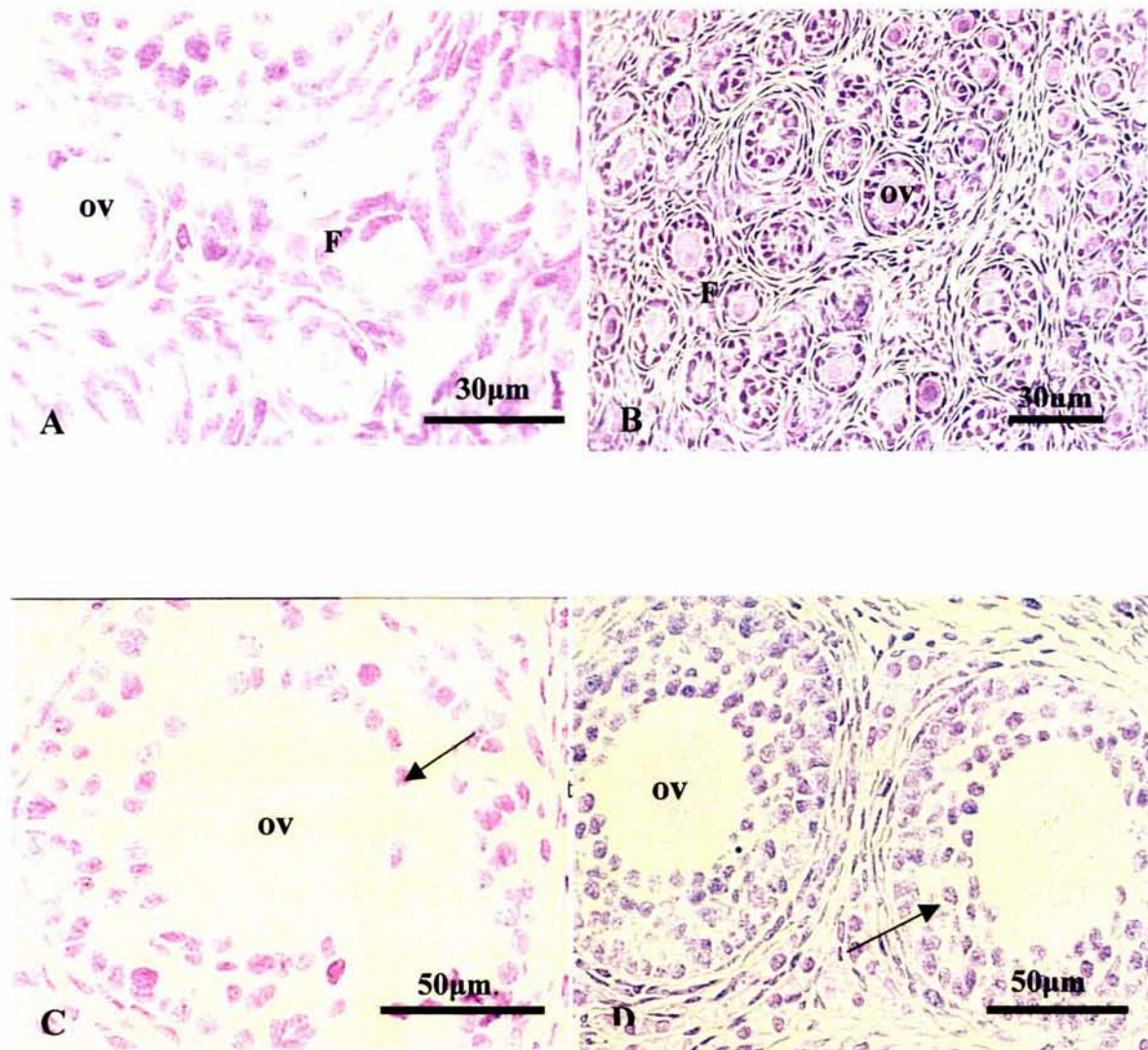


Fig. 1. En (A y B), se observan los ovocitos (Ov) y células foliculares (F) normales de ovario de rata de 5 días de edad. En (C y D), se muestran ovocitos (Ov) y células foliculares normales (—▶) de ovario de rata de 18 días de edad. A y C. Feulgen, B y D.

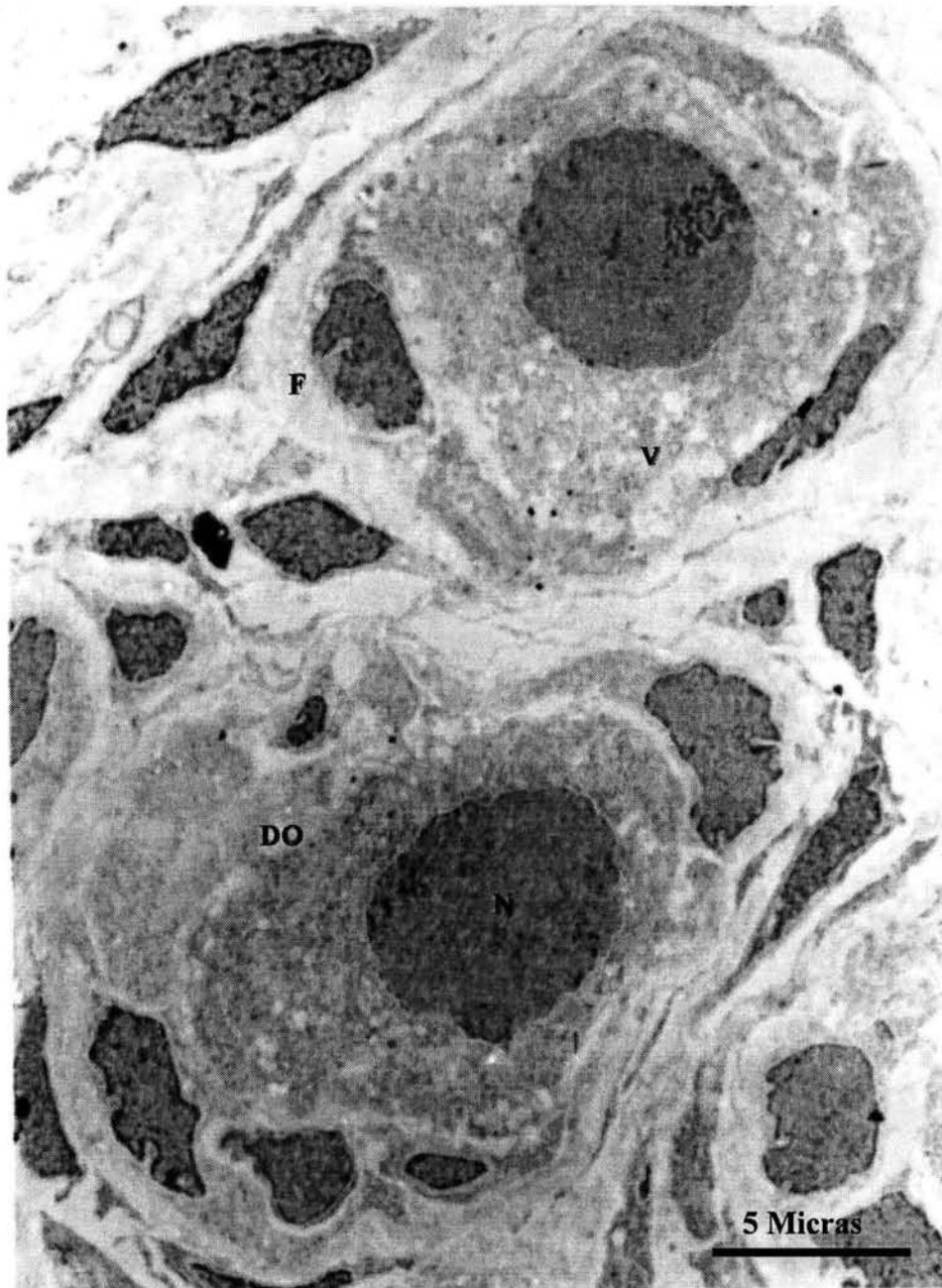


Fig. 2. Fotomicrografía de una sección de ovario de 5 días de edad. Se observa que los folículos ya se han individualizado. Un folículo está atrésico ya que existe deformación del ovocito (DO), su núcleo se observa normal, las células foliculares (F) se encuentran normales. Ur- Pb. 7000 X.

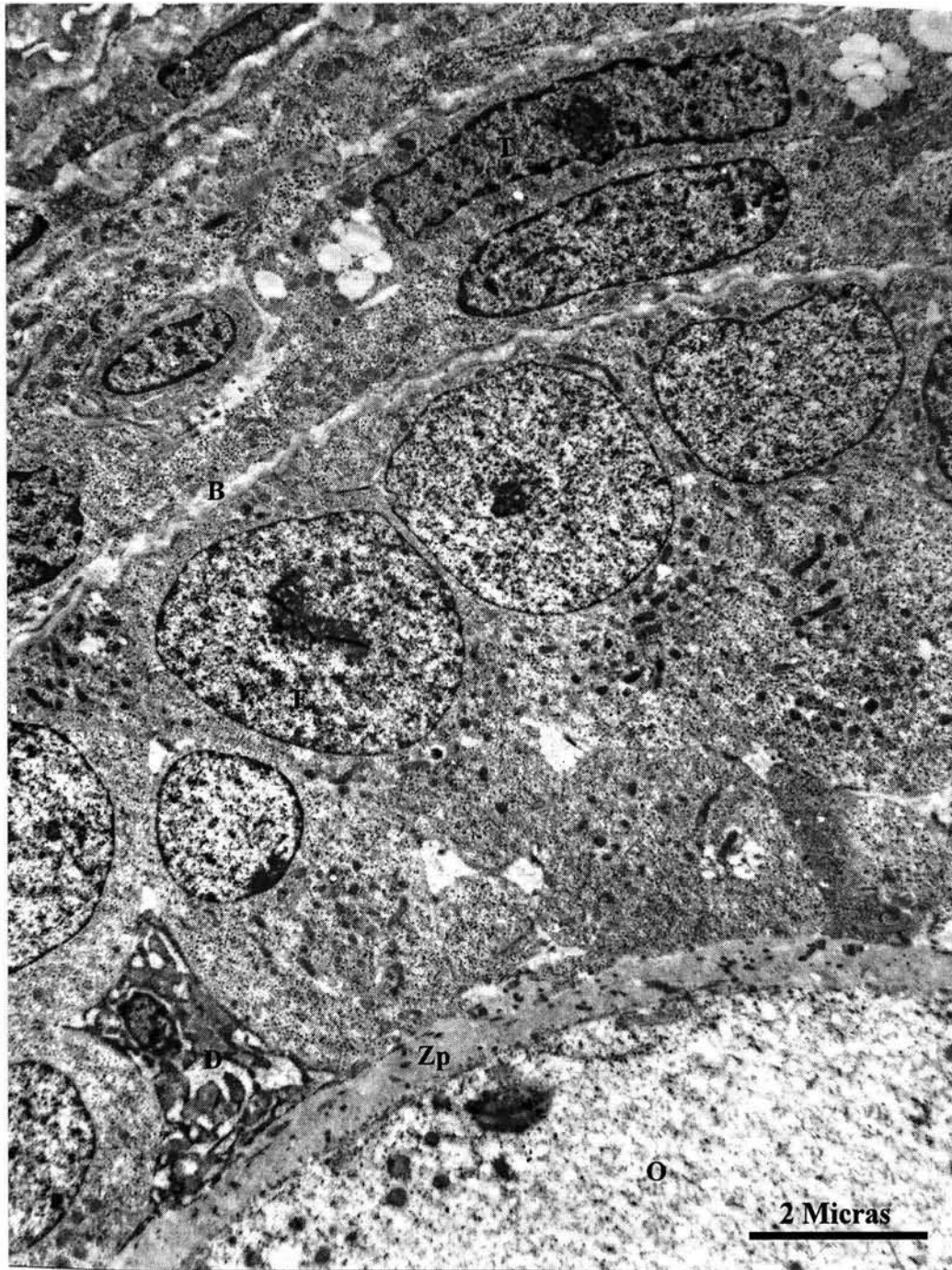


Fig. 3 Folículo de ovario de rata de 12 Días de edad. Se observa una célula folicular degenerando (D), y tanto ovocito (O), como foliculares (F) y tecales (T) se observan normales. Zona pelúcida (Zp), Membrana Basal (B). Ur – Pb. 6250X.

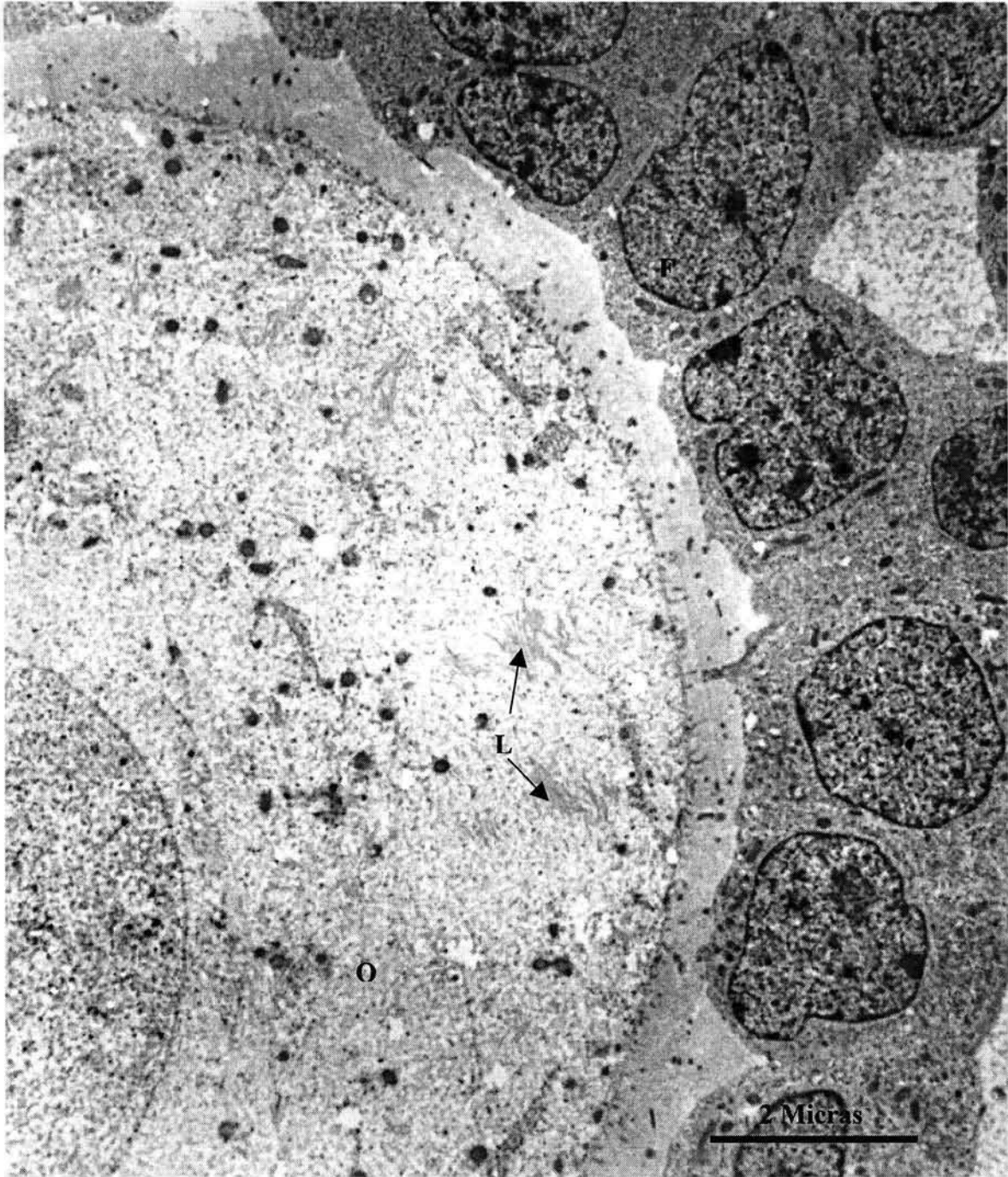


Fig. 4. Folículo de ovario de rata de 19 días de edad. Se observa un ovocito normal (O) y células foliculares (F) adyacentes. Cuerpos laminares en formación (L). Ur - Pb. 6750X



FIG 5.- Ovario de rata de 1 día de edad en donde se muestra un ovocito de un folículo sano, el cual presenta una estrecha relación con las células foliculares vecinas con uniones tipo desmosomas (D), Nótese que las mitocondrias (M) se observan claramente y sin alteraciones. La cantidad de cromatina en el núcleo del ovocito (N) es muy poca. Se observa un nucleolo normal (Nu). Ur – Pb. 12000 X.

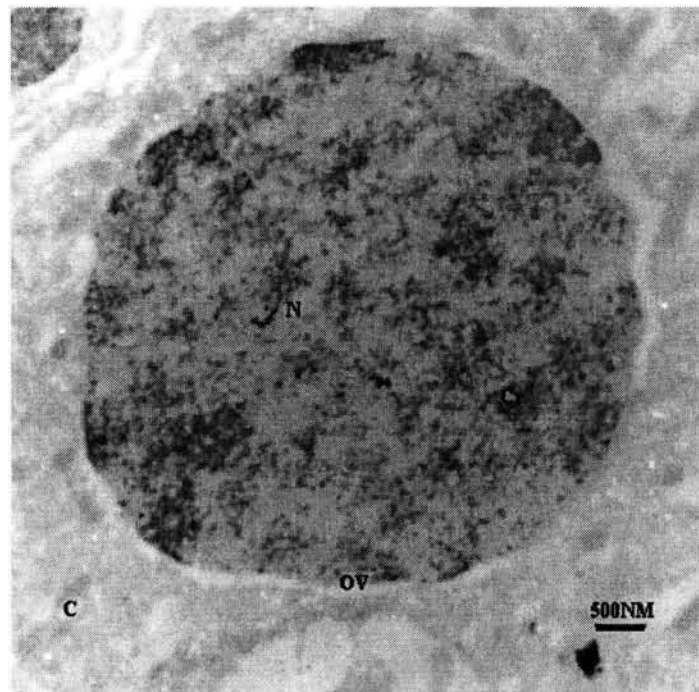


Fig 6 .- Ovario de rata de 1 Día de edad. Se muestra un ovocito (OV) normal teñido con el método de amina de osmio para contrastar DNA. Se observa el núcleo(N) con poca cantidad de cromatina (Cr) adosada a la envoltura nuclear. El nucleoplasma presenta una importante cantidad de fibras de cromatina y las RNPs no se perciben porque no han sido contrastadas. 15000X.

ULTRAESTRUCTURA DE LAS CÉLULAS DE LA GRANULOSA EN FOLÍCULOS ATRÉSICOS

CÉLULAS DE LA GRANULOSA ATRÉSICAS DE OVARIOS DE RATA DE 1 A 5 DÍAS.

Los folículos atrésicos primordiales fueron identificados por presentar grandes alteraciones sólo en el ovocito. Las células de la granulosa no presentan alteraciones. (Fig. 7 y 8).

Las células foliculares normales tienen forma escamosa aplanada rodeando al ovocito y presentan uniones fuertes entre sí. El núcleo contiene pequeñas cantidades de heterocromatina oscura adosada a la envoltura nuclear sin alteraciones (fig. 7 y 8). Se observan grandes cantidades de fibras intercromatinianas, pericromatinianas y de gránulos pericromatinianos. En el citoplasma se reconocen fácilmente mitocondrias, ribosomas y pocas veces retículo y Golgi (Fig. 7).

CÉLULAS DE LA GRANULOSA ATRÉSICAS DE OVARIOS DE RATA DE 10 A 20 DÍAS.

Los folículos atrésicos primordiales y primarios fueron identificados por grandes cantidades de vacuolización citoplásmica y la pérdida de organelos identificables, aunque la ultraestructura de las células de la granulosa siguen siendo normales (Fig. 8 y 9). Una gran cantidad de folículos primarios y secundarios (preantrales) observados eran atrésicos.

Los folículos atrésicos fueron identificados por la alteración de la forma del ovocito y el manchado uniformemente anormal y de un aspecto redondo de las células de la granulosa (Fig. 10). Los folículos sanos mantuvieron siempre una capa intacta de células de la granulosa que rodeaban al ovocito permaneciendo siempre en contacto con la superficie del ovocito. Abundantes vacuolas y los lisosomas secundarios contienen desechos y los organelos citoplásmicos llegaron a ser difíciles de identificar (Fig. 10 y 11).

La mayoría de los folículos en crecimiento y los folículos preantrales aparecen alterados, según lo juzgado por la ultraestructura del ovocito y de la células de la granulosa. (Fig. 8, 9 10-A y 10-B).

Las muestras más tempranas de la atresia en folículos primarios y más grandes incluyen características como la pérdida de contactos focales entre el ovocito y las células circundantes de la granulosa (Fig. 9 y 10). Al progresar la atresia, hay pérdida substancial de células de la granulosa antes de que el ovocito sea fuertemente afectado (Fig. 9, 10-A y 10-B).

Sigue habiendo contacto entre las membranas de las células de la granulosa durante el proceso de atresia pero las capas de la célula de la granulosa se encuentran retiradas del ovocito. Las microvellosidades de las células de la granulosa se contraen o se pierden de la zona pelúcida (Fig. 9, 10-A y 10-B). Al mismo tiempo, las microvellosidades del ovocito también se han desarrollado al menos en número, con la mayoría de las terminales justo dentro de la superficie de la zona pelúcida. En esta etapa, la mayoría de los ovocitos aparecen con deformaciones severas (Fig. 10-A y 10-B).

Una característica de las más importantes, es que en esta etapa de desarrollo folicular, *una gran cantidad de células de la granulosa aparentemente normales son fagocitadas por células vecinas, y que en esta etapa rara vez se observan células de la granulosa apoptóticas.*

Es muy importante resaltar que desde el primer día hasta el día 11-12 no se observan cuerpos apoptóticos en células de la granulosa y cuanto más grande es el folículo y la edad de la rata, estos cuerpos apoptóticos se hacen mas evidentes. A los 25-28 días abundan las células apoptóticas en casi todos los folículos. (Fig. 12 y 13).

CÉLULAS DE LA GRANULOSA ATRÉSICAS DE OVARIOS DE RATA DE 22 A 28 DÍAS.

Los folículos atrésicos fueron identificados por picnosis, manchas muy oscuras y células de la granulosa contraídas y secundariamente, por la alteración de la forma del ovocito y la condensación anormal de estructuras (Fig. 13, 14 y 15). También, los folículos sanos mantuvieron siempre una capa intacta de células de la granulosa que rodean al ovocito permaneciendo siempre en contacto con la superficie de este. Las vacuolas y los lisosomas secundarios contienen desechos abundantes. (Fig. 15 y 16).

La mayoría de folículos en crecimiento y folículos antrales aparecen alterados, analizados a nivel de ultraestructura del ovocito y de las células de la granulosa (Fig 12). Las muestras más tempranas de la atresia en folículos primarios, secundarios y antrales incluyen características establecidas de apoptosis en células de la granulosa y la pérdida de contactos focales entre el ovocito y las células circundantes de la granulosa. La apoptosis en las capas celulares de la granulosa, según lo evidenciado por los cuerpos oscuros, picnóticos, parecen estar distribuidos aleatoriamente a través de un folículo atrésico (Fig. 13 y 14) y estos son muy abundantes.

Sigue habiendo contacto entre las células de la granulosa durante el proceso de atresia pero no entre células de la granulosa y el ovocito (Fig. 14). Las microvellosidades de las células de la granulosa se contraen o se pierden de la zona pelúcida (Fig. 14). En esta etapa, el ovocito aparece morfológicamente anormal con deformaciones fuertes o fragmentaciones (Fig. 27-A). Los organelos se observan normales.

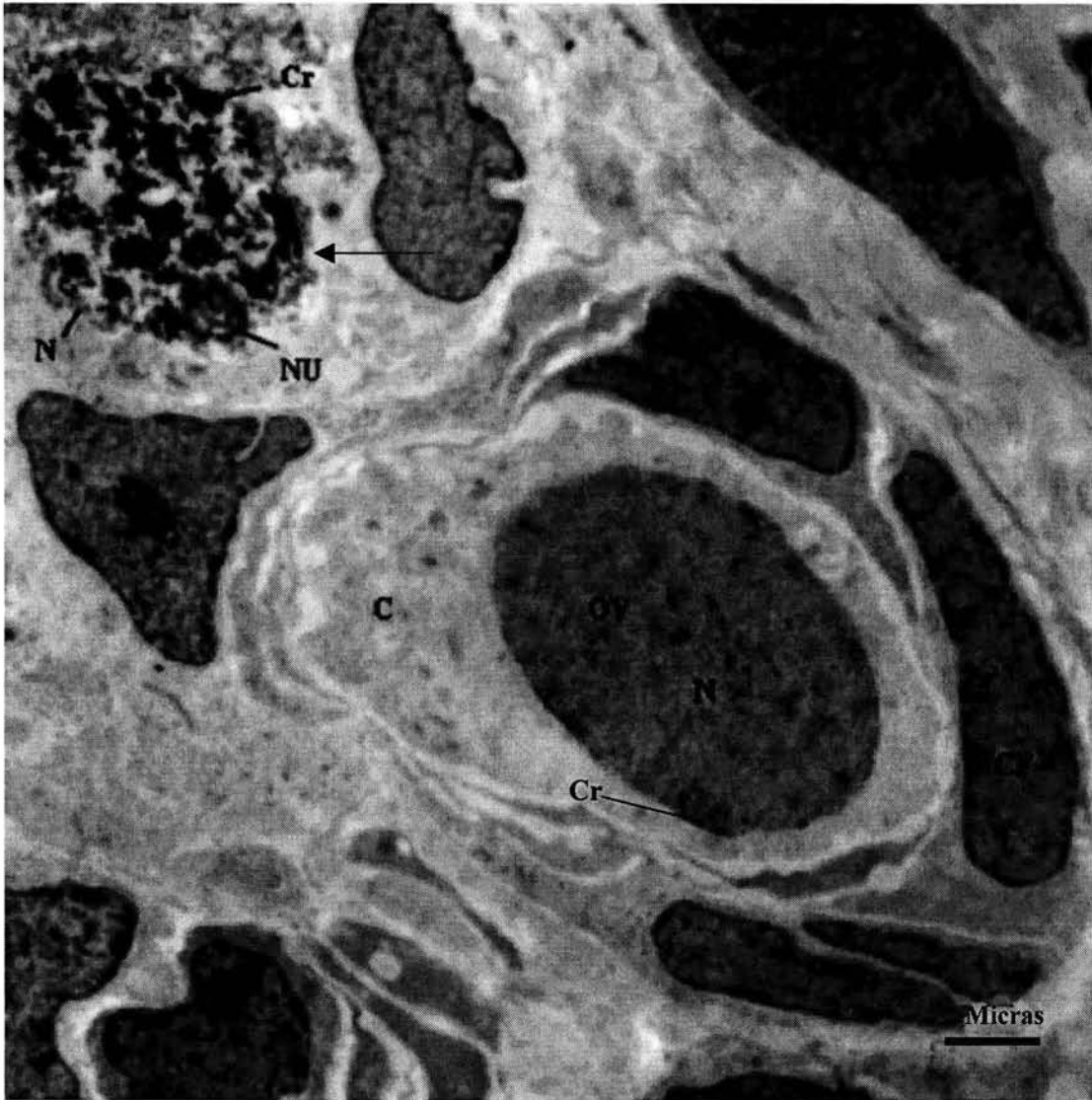


FIG. 7: Ovario de rata de 1 día de edad. Se muestra una vista general de un folículo primordial sano y un folículo atrésico (—→). Nótese el estado, la cantidad y distribución de la cromatina (Cr) en ambos núcleos (N) de los ovocitos (Ov). Las células foliculares se encuentran normales (CF). Ur - Pb. 5000 X.

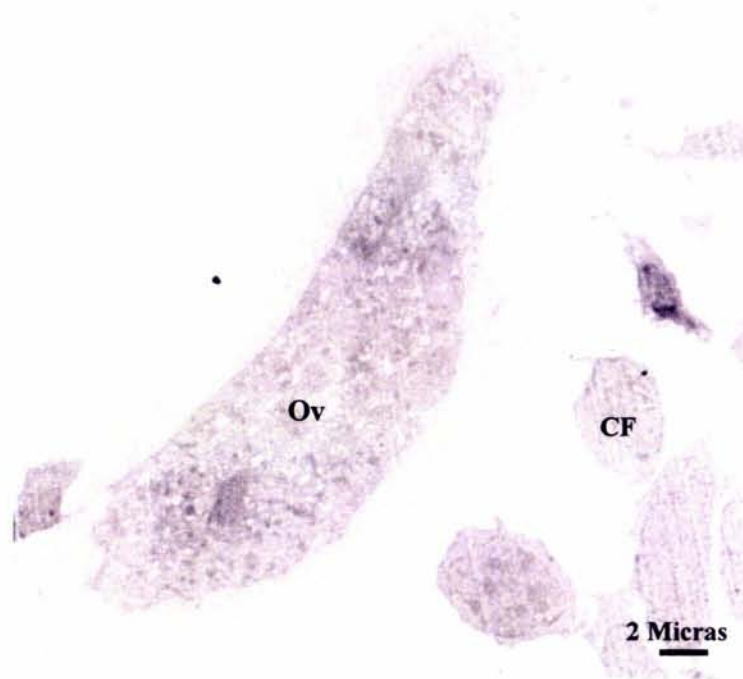


Fig. 10-A. Ovario de rata de 15 días de edad. Se observa un ovocito atrésico muy degenerado (Ov), se observa muy deformado y la mayoría de células foliculares (Cf) perdieron contacto con él. No se observan cuerpos apoptóticos. Ur-Pb 4000X.

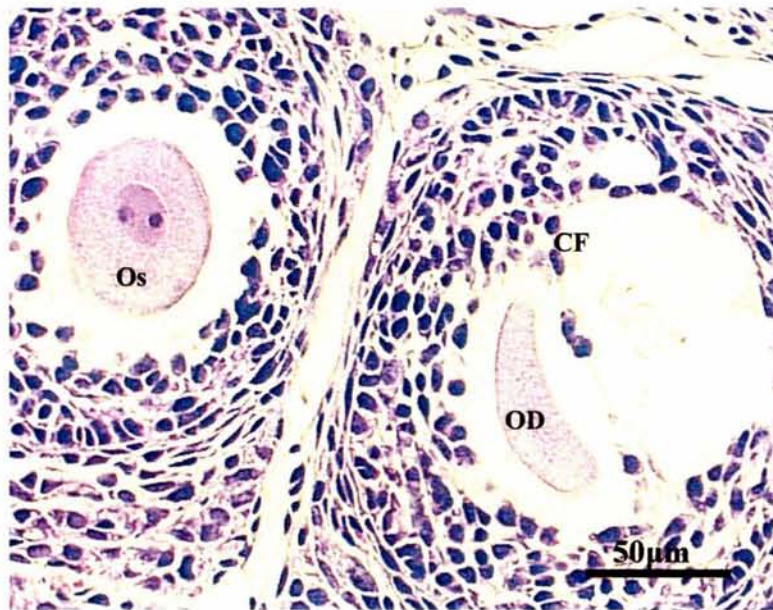


Fig. 10-B: Ovario de rata de 15 días de edad. Se observa un ovocito atrésico muy degenerado (OD) y un ovocito sano (Os). Nótese que la mayoría de células foliculares (CF) perdieron contacto con el ovocito degenerado y comienzan a separarse entre ellas. No se observan cuerpos apoptóticos. HE.

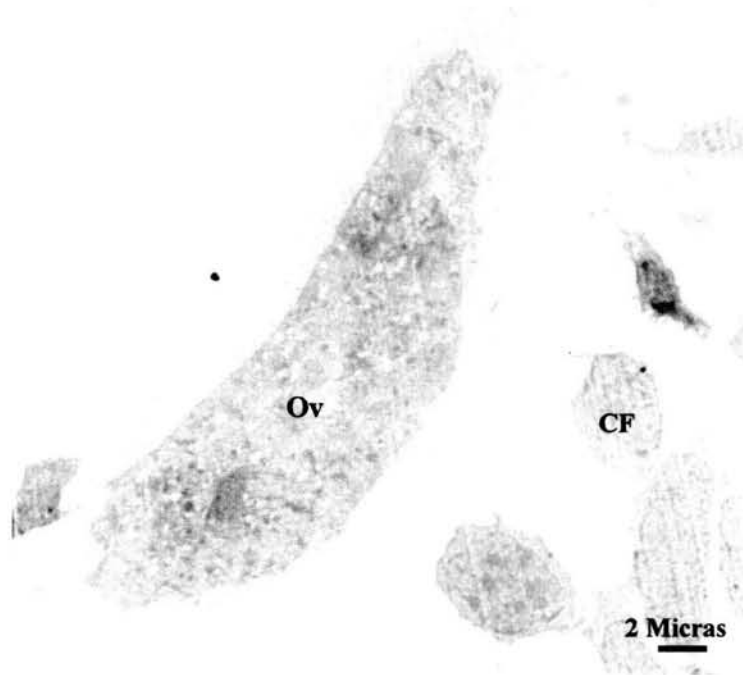


Fig. 10-A. Ovario de rata de 15 días de edad. Se observa un ovocito atrésico muy degenerado (Ov), se observa muy deformado y la mayoría de células foliculares (Cf) perdieron contacto con él. No se observan cuerpos apoptóticos. Ur-Pb 4000X.

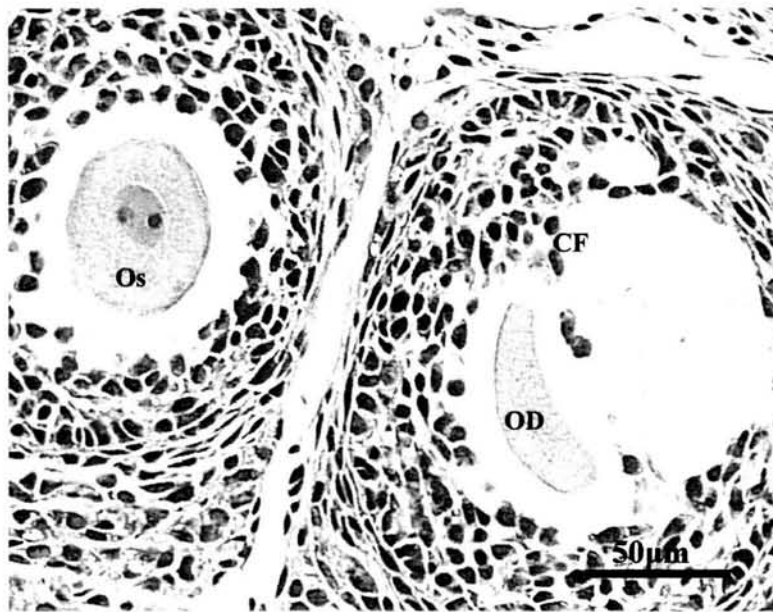


Fig. 10-B: Ovario de rata de 15 días de edad. Se observa un ovocito atrésico muy degenerado (OD) y un ovocito sano (Os). Nótese que la mayoría de células foliculares (CF) perdieron contacto con el ovocito degenerado y comienzan a separarse entre ellas. No se observan cuerpos apoptóticos. HE.

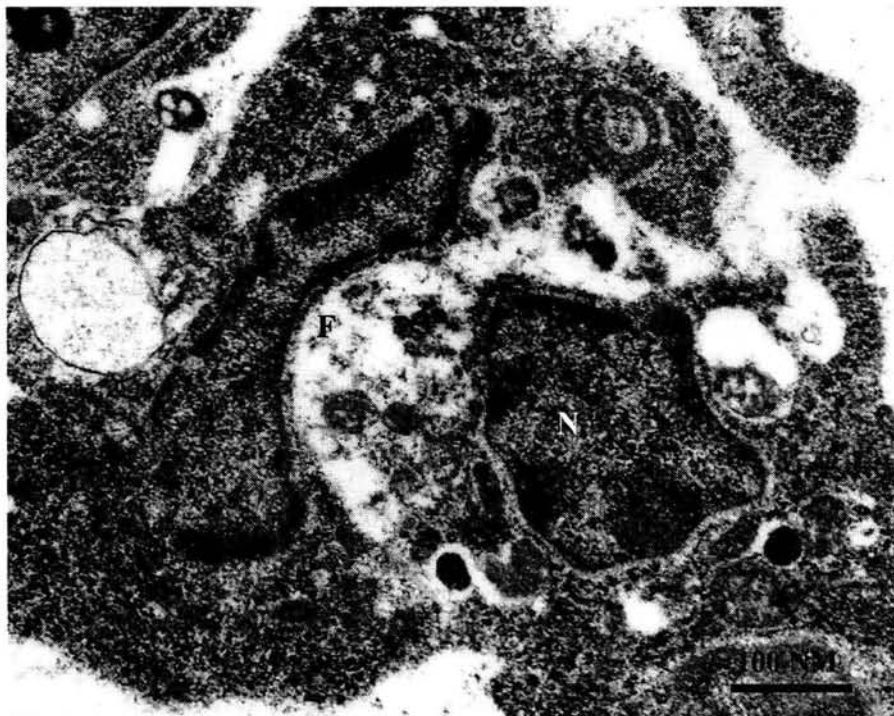


Fig. 11: Micrografía electrónica de células foliculares de ovario de rata de 17 días de edad. Se observa una gran alteración en las células foliculares, además de fagocitosis (F) de una célula folicular con un núcleo (N) aparentemente normal.. Ur-Pb. 36250X.

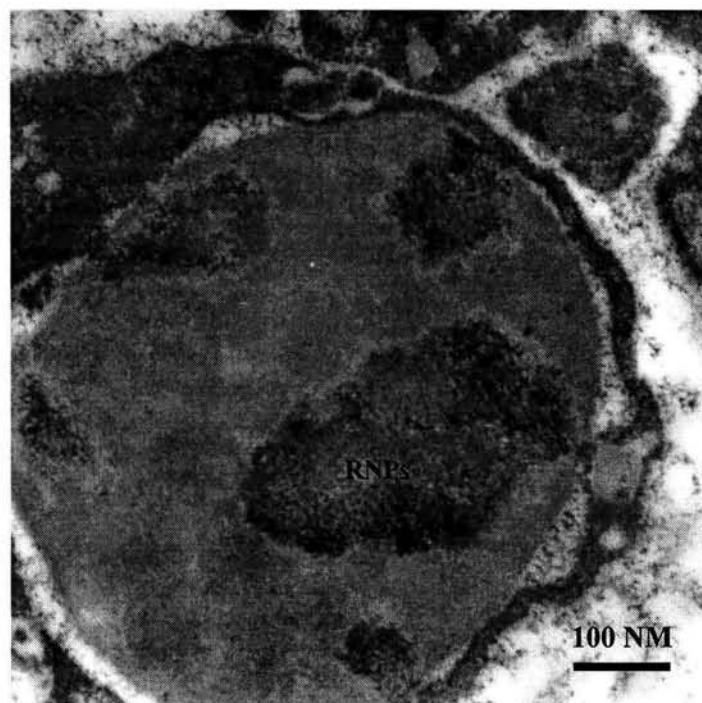


Fig. 12. Célula foliculares de ovario de rata de 28 días de edad. Se observa una gran condensación de la cromatina, se muestra además la distribución de algunas RNPs. EDTA, tinción para estructuras ribonucleoproteicas. 38400X.

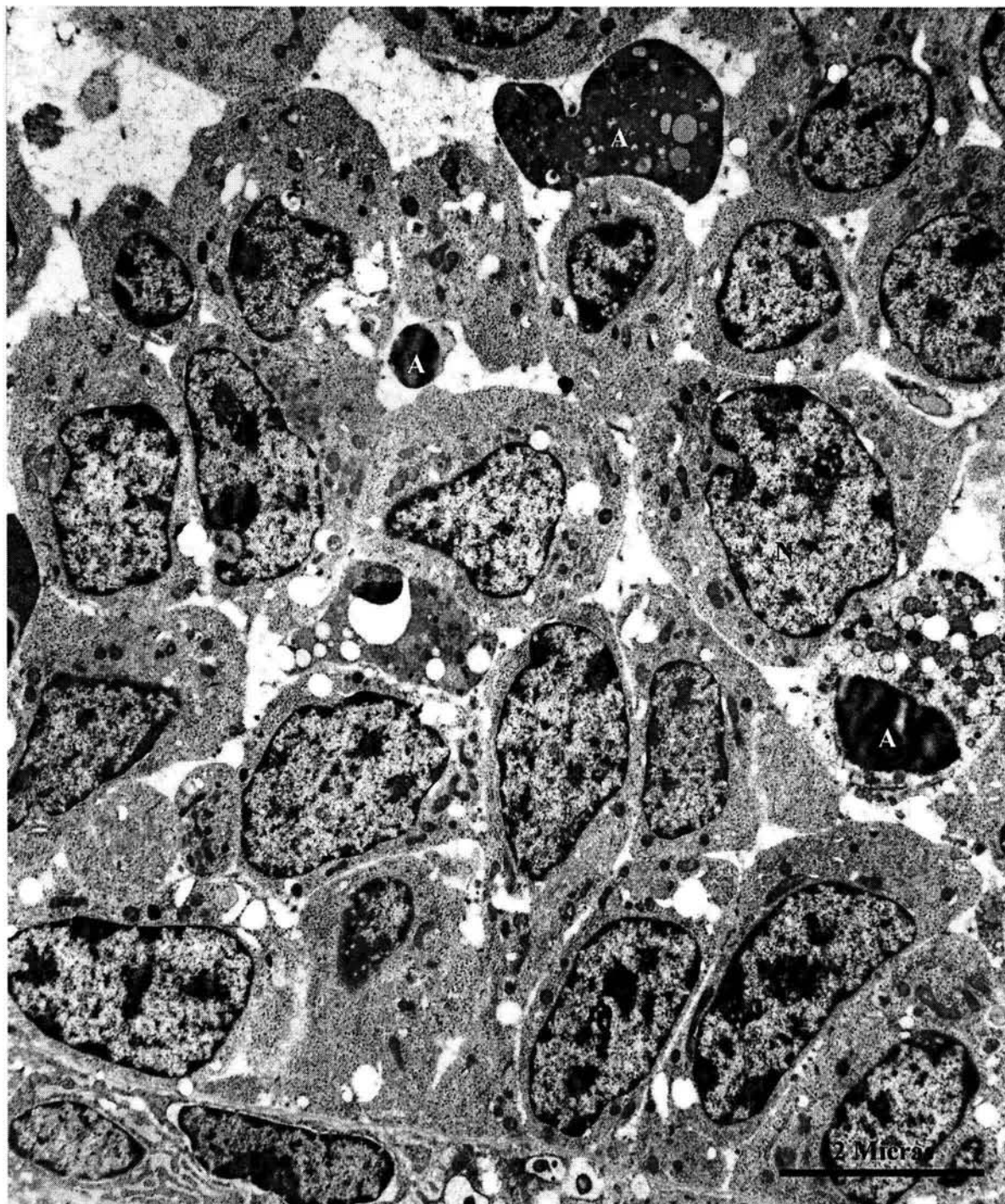


Fig. 13. Vista panorámica de células foliculares de ovario de rata de 28 días de edad. Se observan células foliculares normales (N) y apoptóticas (A). Ur-Pb 6750X.

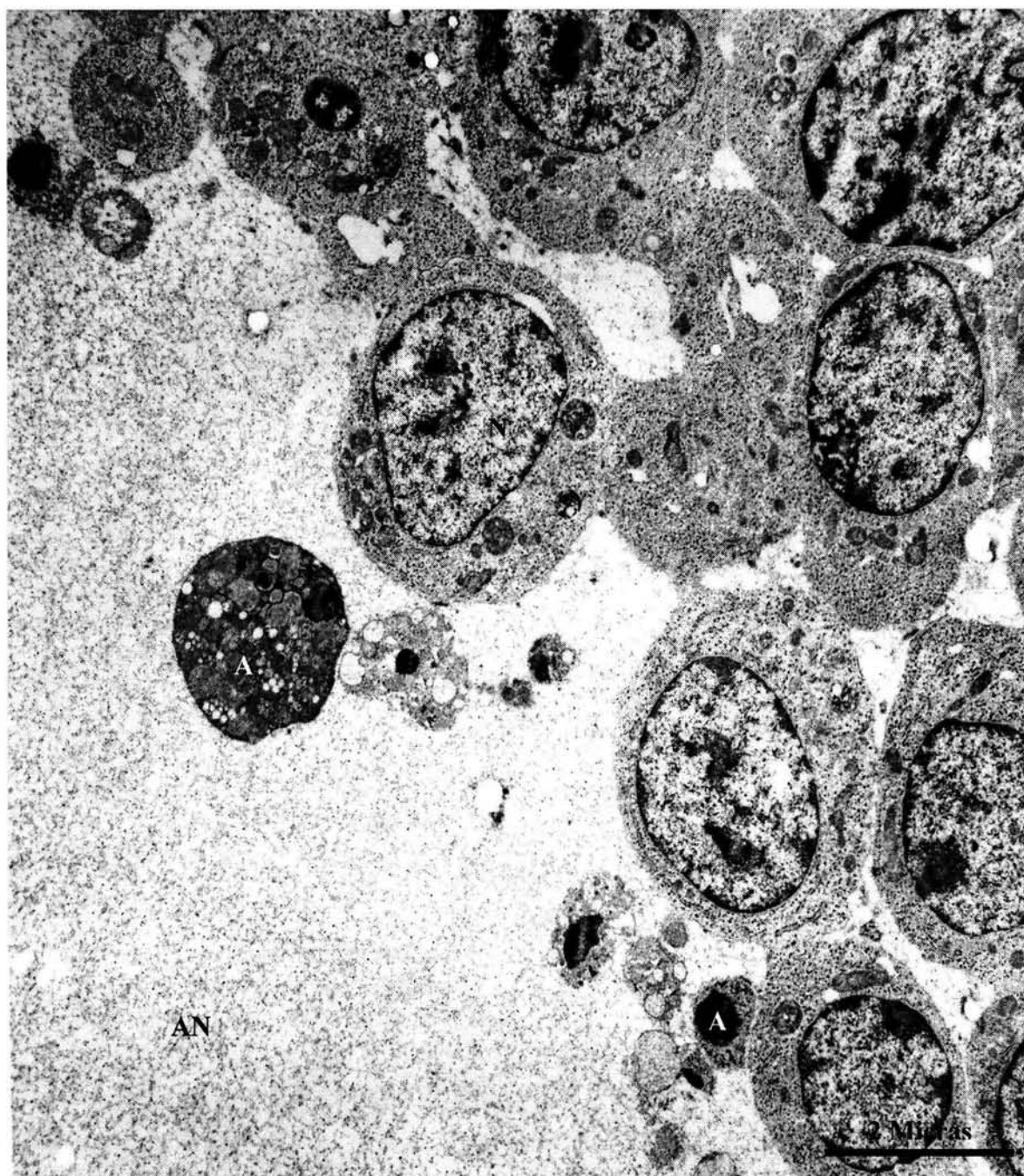


Fig. 14. Vista panorámica de células foliculares de ovario de rata de 28 días de edad. Se observan células foliculares normales (N) y apoptóticas (A). Con antro folicular (AN). Ur-Pb. 7750X.

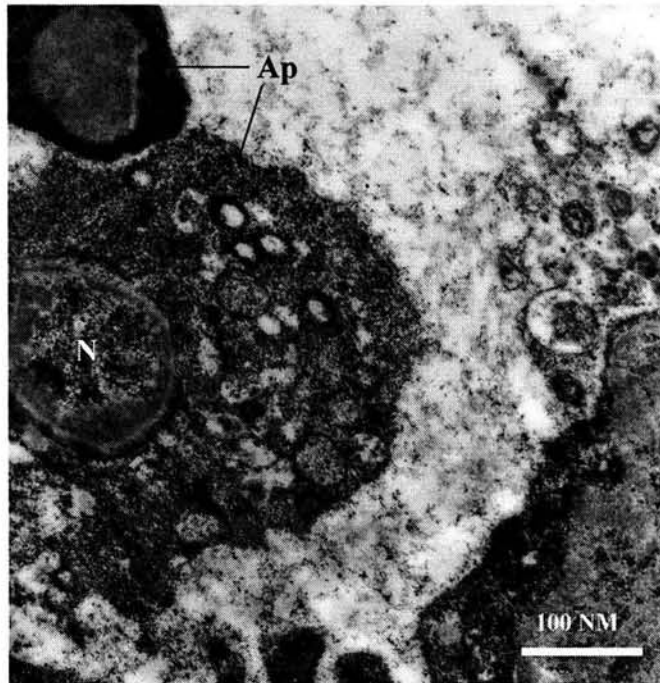


Fig.15. Micrografía electrónica de una célula folicular apoptótica, (Ap) donde se observa la formación de cuerpos apoptóticos. Se observa también la condensación de la cromatina dentro del núcleo (N). EDTA. 22400X

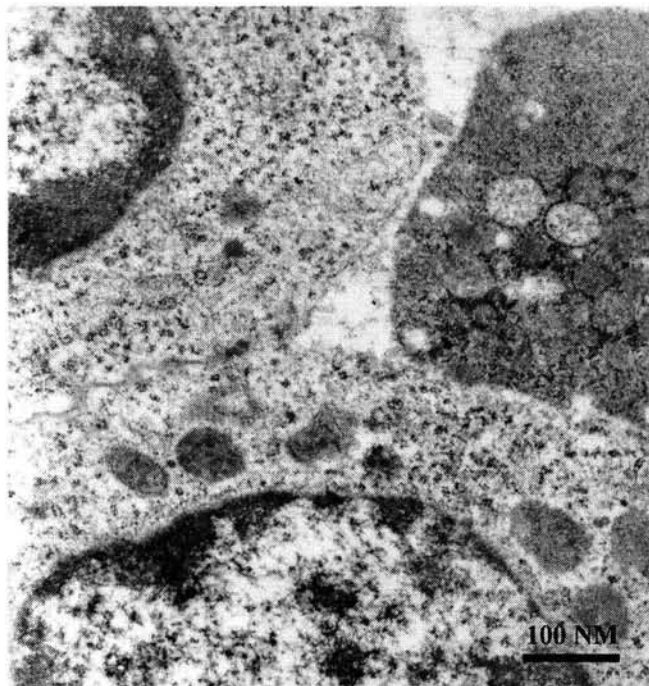


Fig.16. Micrografía electrónica de tres células foliculares con alteraciones distintas en cada una de ellas. Ur-Pb. 33750X.

VI.4 ULTRAESTRUCTURA DE LOS OVOCITOS EN FOLÍCULOS ATRÉSICOS EN DESARROLLO.

Conforme progresa la atresia, las alteraciones ultraestructurales en ovocitos son más evidentes. Los organelos se distribuyen dispersos en el citoplasma, y las microvellosidades se pierden casi totalmente (Fig. 23 y 24). El RER llega a perderse o a ser inidentificable. Además, las mitocondrias se tornan más oscuras y comienzan a perder sus crestas. En algunos ovocitos en degeneración, las laminillas llegan a ser mucho más abundantes que en los ovocitos que parecen sanos (Fig. 21, 24 y 26). Esto fue observado particularmente en los tipos más pequeños de folículos. La segregación del nucleolo en componentes de densidad variable es una característica de apoptosis, la cual no se observó en los ovocitos de folículos atrésicos en ninguna etapa.

VI.4.1 OVOCITOS ATRÉSICOS DE RATA DE 1 A 5 DÍAS DE EDAD.

En los ovarios de un día observamos que los ovocitos sufren varias etapas de degeneración: inicial (Fig. 17), intermedia (Fig. 18) y avanzada (Fig. 19 y 20).

En la etapa inicial el núcleo del ovocito presenta una envoltura nuclear morfológicamente intacta, incluso en algunas ocasiones se observaron poros nucleares abundantes, lo que nos indica un metabolismo muy activo.

En las etapas iniciales la alteración de la cromatina toma un arreglo diferente en la periferia de la envoltura nuclear comenzando a condensarse en pequeñas regiones, perdiendo la forma reticular que presentaban las células normales. *Esta condensación está muy alejada de la condensación típica de la apoptosis.*(Fig. 17). Las ribonucleoproteínas (RNPs) se observaron normales, sin alteraciones visibles en el nucleolo. En el nucleoplasma como el citoplasma comienza la formación de una gran cantidad de vacuolas y aun se observan algunos organelos como ribosomas y mitocondrias todos ellos normales. (Fig. 17).

Se comienza a perder la integridad de la membrana celular y las células de la granulosa permanecen normales. (Fig. 7 y 17).

En etapas intermedias de alteración atrésica se observa un arreglo de la cromatina muy diferente a la etapa normal ya que esta toma una disposición reticulada abarcando todo el núcleo. La estructura del nucleolo permanece normal y en ocasiones se observan restos de cromosomas con indicios del complejo sinaptonémico, el núcleo en general comienza a perder su integridad y no se reconocen algunas estructuras características como gránulos pericromatinianos, fibras pericromatinianas, cuerpos espiralados, fibras intercromatinianas, granulos intercromatinianos, etc. (Fig. 18).

La envoltura nuclear en algunos casos permanece muy bien conservada. Sin embargo el citoplasma comienza a fragmentarse por completo perdiendo la forma y la interacción con las células de la granulosa vecinas. (Fig. 18).

En algunos casos las células vecinas comienzan a rodear o envolver a los ovocitos alterados.

En etapas finales de degeneración se observan solo pequeños restos de lo que una vez fue el ovocito en donde ha perdido toda relación con las demás células pero en su mayoría no existe fagocitosis. (Fig.20).

Existen imágenes en donde podemos observar en un mismo folículo división, muerte y fagocitosis.

Con la técnica específica para ADN (Amina de Osmio) pudimos detectar el arreglo del ADN presente en las células de la granulosa y ovocitos, lo que nos permitió estudiar con mucha mayor precisión las características ultraestructurales del núcleo celular. (Fig. 19)

En las células de la granulosa normales los cúmulos de cromatina compacta son mas abundantes que en los núcleos de los ovocitos. La mayor parte de estos cúmulos se encuentran adosados a la envoltura nuclear. En cuanto a las RNPs, se podían distinguir todas las estructuras típicas como son gránulos pericromatinianos, fibras pericromatinianas, gránulos intercromatinianos, fibras intercromatinianas. etc. En donde los gránulos pericromatinianos se podían observar abundantes y muy cerca al complejo de poro nuclear.

En las células de la granulosa se presenta una distribución de ADN muy parecida a las células de la granulosa normales, pero la cantidad de cromatina compacta presente en las normales es un poco menor. Los núcleos presentan grandes invaginaciones y la célula pierde contacto con sus vecinas, en ningún caso se observó el nucleolo pero al parecer la célula estaba transcripcionalmente inactiva.

Con esta técnica nos pudimos percatar que en etapas finales se podían distinguir dos tipos diferentes de alteraciones: una en donde el núcleo del ovocito degenera por completo pero nunca se entremezcla con el citoplasma y en la que se entremezcla con el citoplasma (Fig. 19 y 20).

Con la técnica de EDTA (ácido etilendiamino tetra-acético) se puede observar con gran facilidad la distribución del ARN y algunas características imperceptibles con la tinción general de Ur-Pb.

Como se observa en la figura 20, el ARN se entremezcla con el citoplasma del ovocito debido a la rotura de la membrana nuclear.

Algo muy importante de señalar es que en núcleos en estado intermedio y avanzados de degeneración ya no observamos el nucleolo en ningún caso. (Fig. 19 y 20).

VI. 4.2 OVOCITOS ATRÉSICOS DE RATA DE 10-20 DÍAS DE EDAD.

Conforme progresa la atresia, las alteraciones ultraestructurales en ovocitos son más evidentes. Los organelos se dispersan a través del citoplasma y las microvellosidades comienzan a perderse casi totalmente. El RER llega a perderse o a ser inidentificable. Además, las mitocondrias se tornan oscuras y comienzan a perder sus crestas (Fig. 21 y 23). En esta etapa de desarrollo las laminillas llegan a ser menos abundantes en los ovocitos que parecen sanos y más abundantes en aquellos que comienzan a tener alteraciones (Fig. 21, 23, 24 y 26). Esto fue observado en todos los tipos de folículos con excepción del antral. En esta etapa, la mayoría de los ovocitos en todas las etapas de desarrollo aparecen con deformaciones severas en su morfología. (Fig. 10 A, 10 B, 22, 24 y 25). Pero estos nunca o casi nunca se fragmentan.

En esta etapa los nucleolos presentan muy pocas alteraciones estructurales observables. La segregación del nucleolo en componentes de densidad variable se observó en los ovocitos de folículos atrésicos en etapas preantrales pero esta característica fue muy rara.

VI. 4.3 OVOCITOS ATRÉSICOS DE RATA DE 22-28 DÍAS DE EDAD.

En los folículos con una etapa avanzadas de atresia, se han removido la mayoría de las células de la granulosa. La degeneración del ovocito es mayor, dividiéndose en segmentos (Fig. 27). El ovocito se divide en múltiples cuerpos redondos los cuales se encuentran en contacto el uno con el otro, descritas como pseudomórulas por Vazqu ez-Nin y Sotelo (1967). Esto fue observado en el 40% de folículos antrales examinados. La zona pelúcida en algunos casos permanece intacta a través del proceso de degeneración. La segmentación del ovocito se puede observar en el microscopio electrónico y a nivel del microscopio óptico. El número y tamaño de vacuolas y de lisosomas secundarios se incrementó, sin embargo, no hay condensación citoplásmica evidente (Fig. 33).

El tamaño del espacio abarcado por la zona pelúcida sigue siendo igual que en los folículos sanos (60-80 μm). Esto sugiere que no hay contracción celular. Mientras que degenera el

ovocito, los segmentos múltiples del ovocito pueden contener en ocasiones diversas partes del núcleo; sin embargo, no hay condensación o agrupación de ADN en ovocitos en ninguna etapa de degeneración.

Los segmentos del ovocito permanecen generalmente en proximidad uno con otro, hasta etapas muy avanzadas de degeneración. Se observa que las microvellosidades están de vez en cuando presentes en la superficie y entre algunos segmentos del ovocito (Fig. 24 y 27). Las células fagocitarias del sistema inmune no fueron encontradas en asociación con los ovocitos en ninguna etapa de degeneración.

Podemos resumir las características presentes en los ovocitos atrésicos en las siguientes tablas, demostrando que las observaciones informadas aquí no se parecen a descripciones clásicas de necrosis ni de apoptosis.

APOPTOSIS	MUERTE DE LOS OVOCITOS	CARACTERÍSTICAS
Marginación y condensación de la cromatina	No	En forma reticulada
Segregación nucleolar	No	El nucleolo permanece aparentemente normal, hasta etapas muy avanzadas de degeneración
Incremento en la densidad electrónica	No	En algunas regiones nucleares
Fragmentación nuclear.	Si, diferente	En la última etapa de degeneración
Contracción Celular	No	No
Vacuolización citoplasmática	Algunos	Ligera
Pérdida de microvellosidades	Si	Muy alteradas
Presencia de organelos intactos	No	Mitocondrias afectadas tempranamente y posterior desintegración de organelos
Formación de cuerpos apoptóticos	No	Lisis celular completa. (1-10 Días) Deformación severa y fragmentación (11-20 Días). Solo en ratas adultas, existe fragmentación celular (Cuerpos pseudomorulares). (25-28)
Fragmentación de DNA	Si	Menor grado

Tabla1: Características degenerativas del ovocito atrésico de rata comparado con la muerte celular por apoptosis.

NECROSIS	MUERTE DE OVOCITOS	CARACTERÍSTICAS
Inflamación en la célula completa	No	Puede llegar haber inflamación solo en el citoplasma de la célula. El núcleo nunca.
Pigmentos con fragmentación nuclear	Si, diferente	En la última etapa de degeneración (lisis)
Fragmentación de DNA (en forma inespecífica)	Si	Menor grado
Hinchazón de los organelos y acuñización	No	Lisis completa
Degeneración de organelos	Algunos	Ligera (citoplasma).
Inflamación aguda	Si	Mitochondrias afectadas temporariamente y posterior destrucción de organelos
Pérdida en la integridad de membranas	No	En ocasiones solo el citoplasma (ligera)
	No	La membrana nuclear intacta hasta etapas tardías

Tabla1: Comparación entre las características degenerativas del ovocito atrésico de rata y la muerte celular por necrosis.

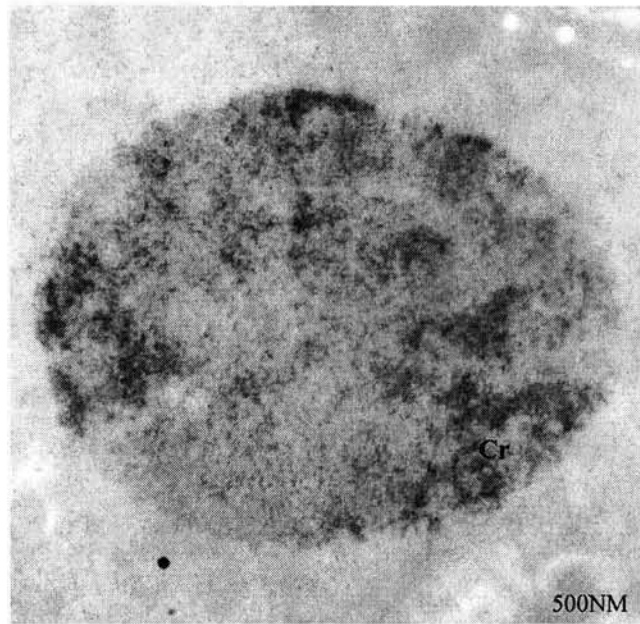


Fig. 17. Se observa degeneración inicial en un ovocito de 1 día de edad, Nótese que la cromatina (Cr) comienza a condensarse en pequeños grumos distribuidos en el nucleoplasma y adosados a la envoltura nuclear. A-O. 20000X.

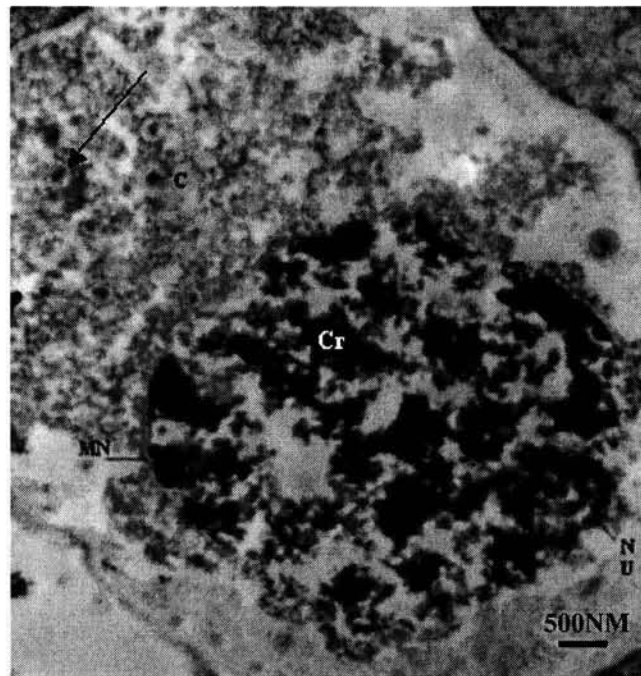


Fig. 18. Ovocito de 1 día de edad. Etapa intermedia de degeneración en donde se puede observar que la cromatina (Cr) presenta una forma reticulada, en este caso todavía se observa una parte del nucleolo normal (Nu) y la envoltura nuclear (MN) se observa sin alteraciones. El citoplasma (C) presenta varias vesículas llenas de algún material que probablemente sean partes celulares (Flecha). Ur-Pb. 15000X.

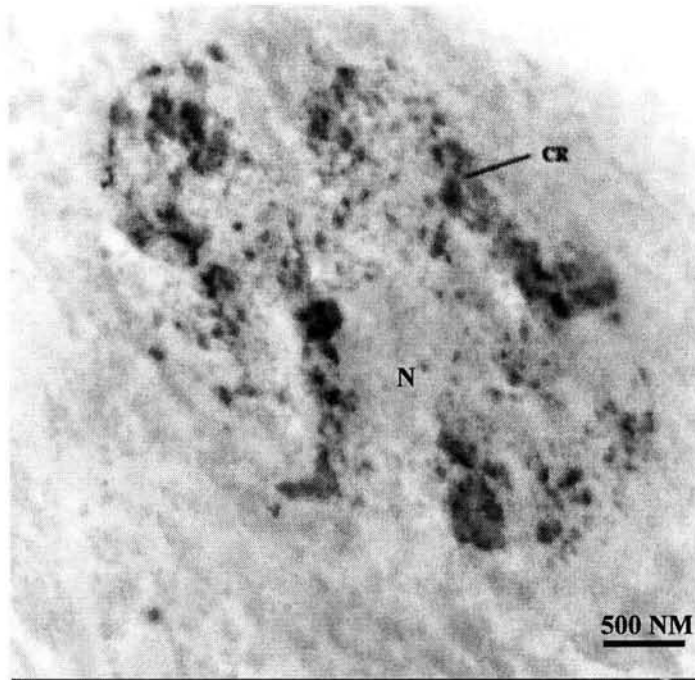


Fig. 19: Ovario de rata de 1 día de edad. Se muestra un ovocito en etapas avanzadas de alteración en donde se observa un arreglo de cromatina compacta (Cr) muy diferente a la normal con grandes cúmulos esparcidos por todo el núcleo (N). Es importante señalar que en esta etapa de degeneración no se encontró el nucleolo en ningún caso. Método de contraste para DNA. 20000X.

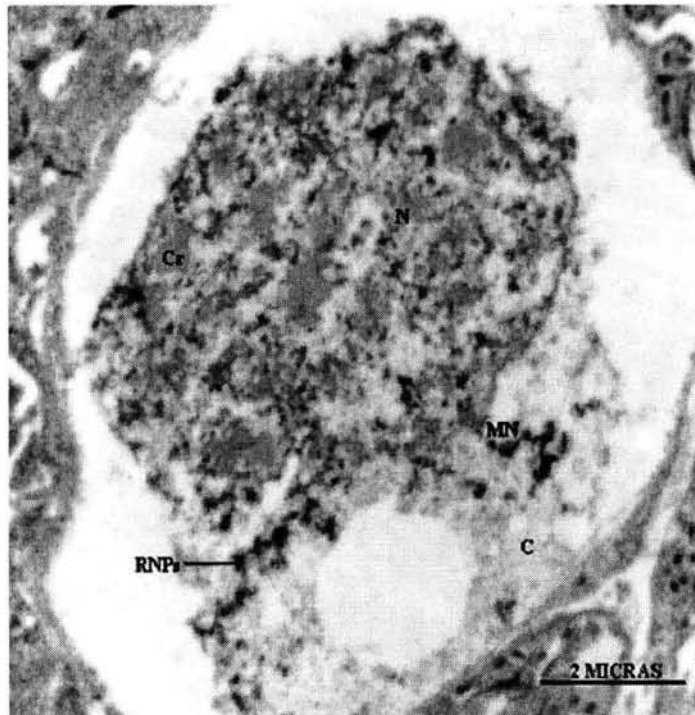


Fig. 20.- Ovario de rata de 1 día de edad. Se muestra un ovocito en etapas avanzadas de degeneración con una técnica específica para RNA con la cual se observa que la distribución de las RNPs nucleares se encuentran en todo el ovocito debido a que la envoltura nuclear (MN) está rota. Parte de su contenido nuclear se encuentra en el citoplasma (C). No se distingue ningún tipo de organelos. EDTA. 12000X.

**ESTA TESIS NO SALE
DE LA BIBLIOTECA**

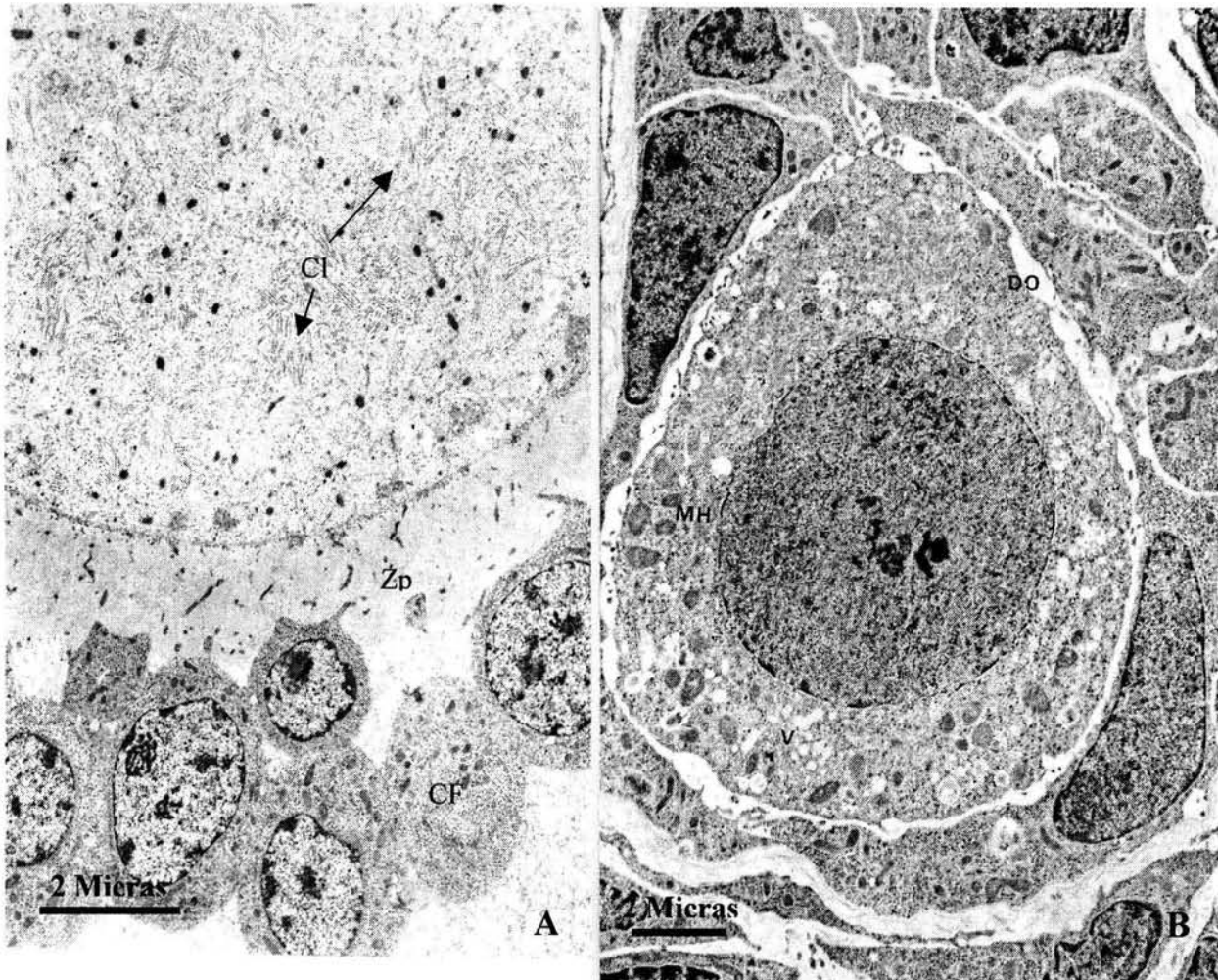


Fig.: 21 y 22. Ovocitos con alteraciones ligeras. En A, se observa un ovocito de 15 Días de edad con pequeñas alteraciones citoplasmáticas y presencia abundante de cuerpos laminares. (Cl). La zona pelúcida (Zp) se encuentra normal y las células foliculares (CF) se comienzan a separar. Ur – Pb 5750X. En B. Un ovocito de 12 días de edad, presenta una deformación inicial (DO) y una pequeña cantidad de vacuolas (V). La zona pelúcida no se desarrolla todavía y las células foliculares son normales. Ur- pb. 8250X

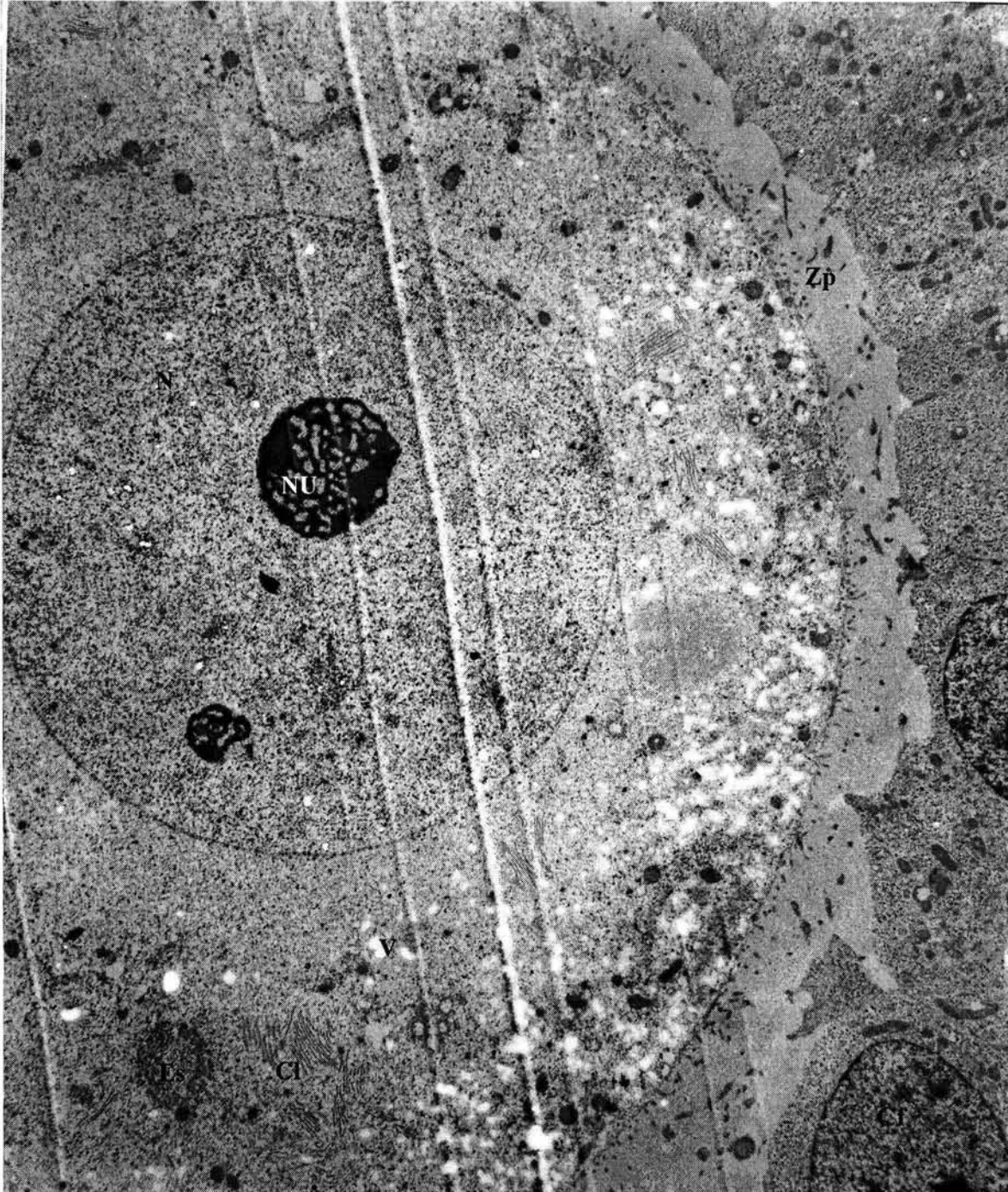


Fig.:23. Se observa un ovocito de 16 días de edad con alteraciones intermedias. Presenta pequeñas alteraciones citoplasmática con una gran vacuolización (V) en la periferia de la membrana celular y presencia abundante de cuerpos laminares (Cl), y algunas estructuras desconocidas (Es). Se observa su núcleo (N) normal con dos nucleolos (Nu). La zona pelucida (Zp) se encuentra normal al igual que las células foliculares (Cf). Ur-Pb.

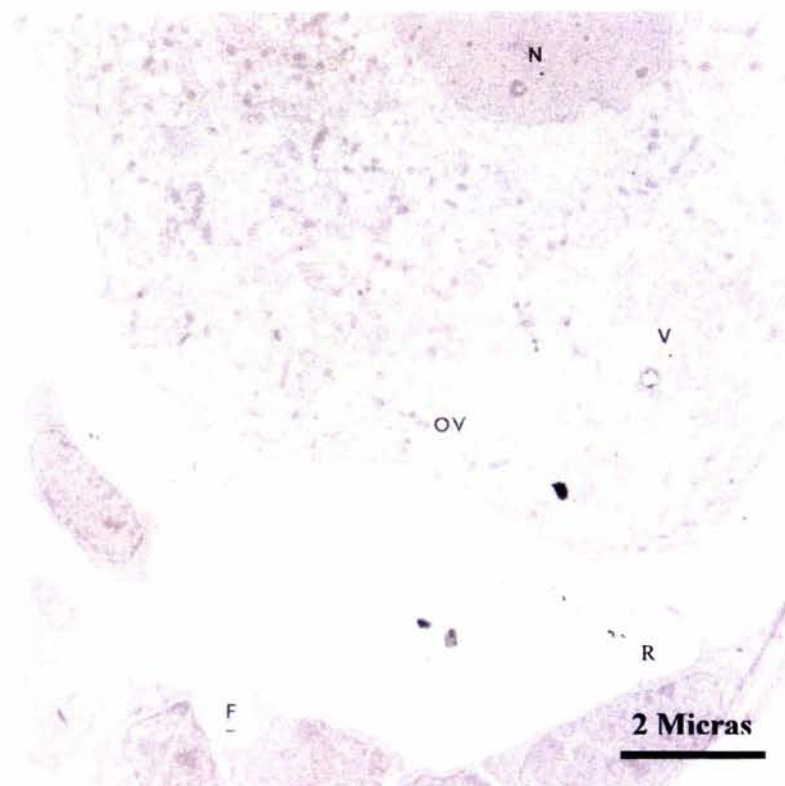


Fig. 24.- Micrografía de ovocito de rata de 15 días de edad en estados avanzados de degeneración. Se observan claramente una gran cantidad de alteraciones. El ovocito (Ov) se encuentra muy deformado, las células foliculares que formaban la corona radiada (R) se han despegado de la pelúcida. El núcleo (N) del ovocito esta deformado, se presenta una gran vacuolización (V) en el citoplasma del ovocito, muy pocos cuerpos laminares . Las células foliculares (F) comienzan a presentar prolongaciones. Ur- Pb. 5750 X.

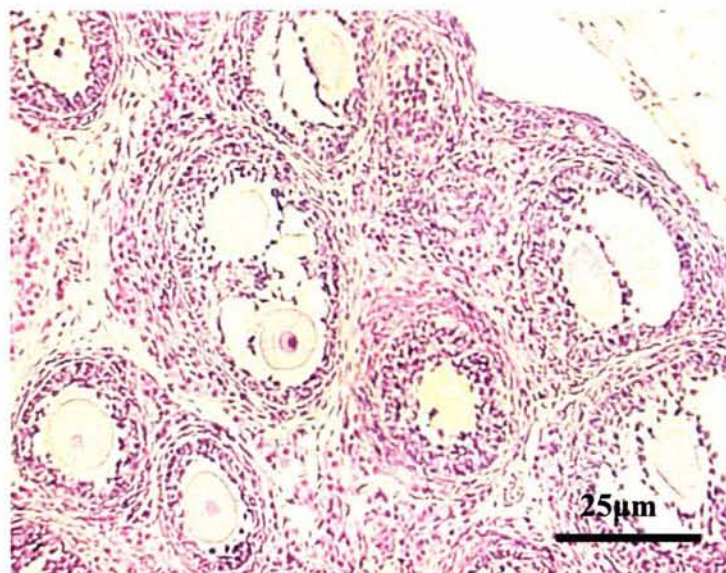


Fig. 25.- Fotografía de ovocito de rata de 15 días de edad en estados avanzados de degeneración. Se observa claramente una deformación en la mayoría de los ovocitos, algunos presentan estrecha relación con la corona radiada , se observa antro folicular en algunos folículos, así como un folículo dos ovocitos. HE.

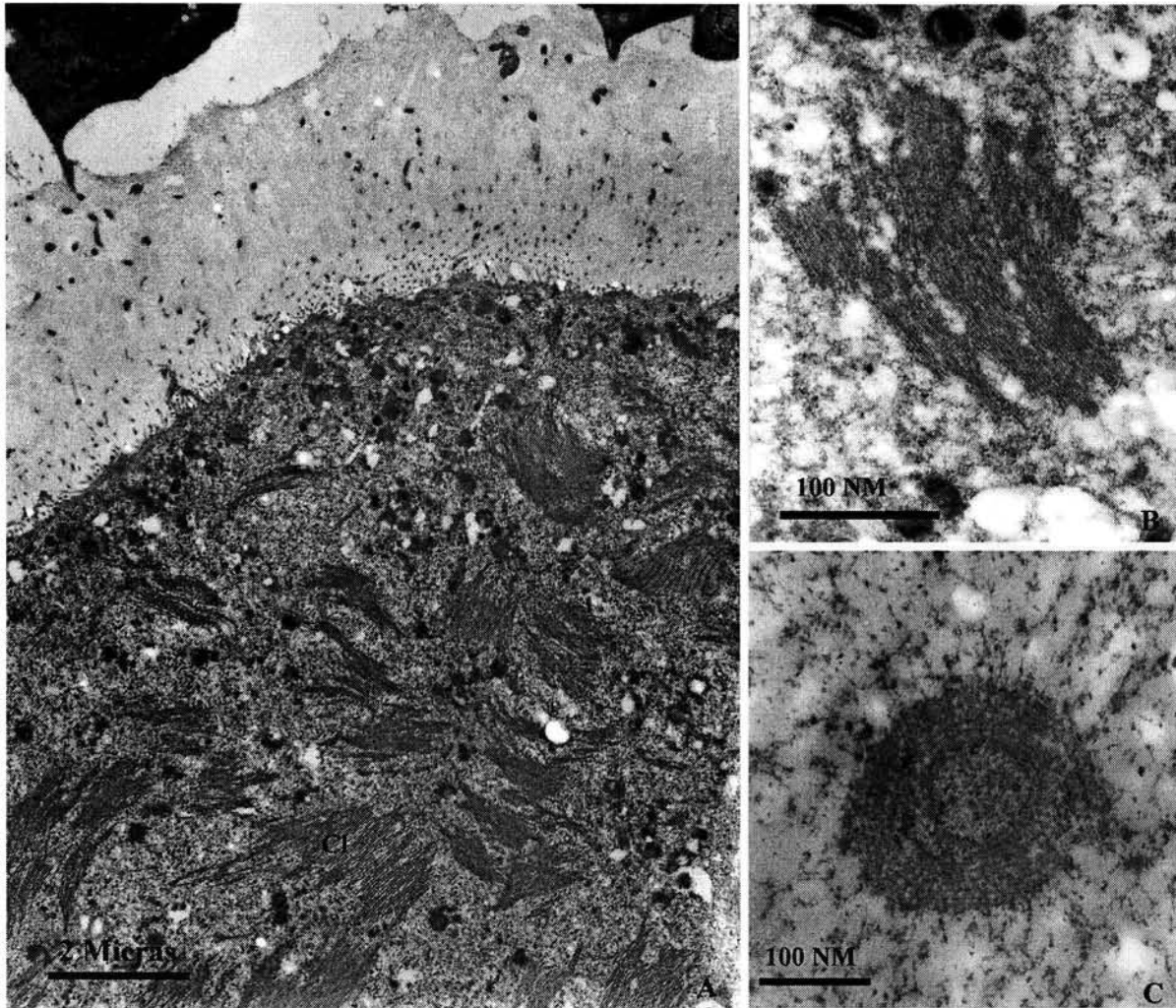


Fig. 26.- Ovocito de rata de 19 días de edad. En (A). se muestra una gran cantidad de cuerpos laminares (Cl) y la pérdida de contacto entre el ovocito y las células foliculares. 5750X. (B). Gran aumento de un conjunto de cuerpos laminares.30000X. En (C). Estructura parecida a los cuerpos laminares, con una distribución diferente que puede ser RER. 42000X. Todas Ur. Pb.

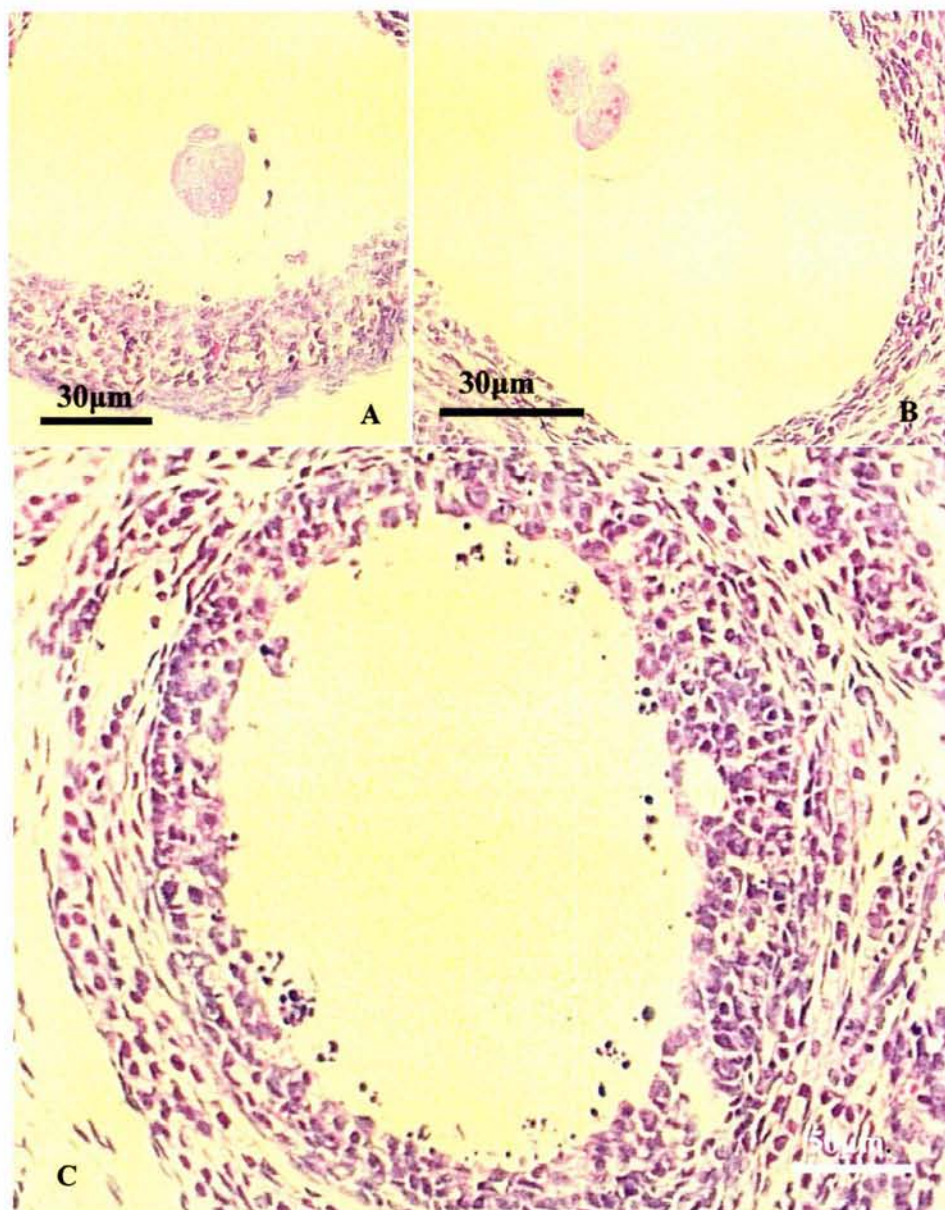


Fig. 27.- Fotografía de ovocito de rata de 28 días de edad en estado avanzado de degeneración. En A, se observa la muerte celular ovocítica por fragmentación, se muestra un antro folicular grande y la ausencia de las células foliculares alrededor del ovocito HE. (B) Ovocito degenerando en donde se muestra la estructura típica pseudomorular de Vázquez Nín y Sotelo. HE. En (C) se distingue claramente una gran cantidad de células foliculares apoptóticas alrededor del antro folicular. HE.

VI. 5 TUNEL

(TERMINAL DEOXYNUCLEOTIDYL TRANSFERASE-MEDIATED DEOXY-UTP NICK END LABELING).

VI.5.1 TUNEL EN OVARIOS DE 1-20 DIAS

En todos los ovarios observados desde 1 hasta 20 días no existía marca abundante en las células de la granulosa, ni en ovocitos alterados.

Los ovocitos, como ya hemos mencionado, dependiendo de la etapa del desarrollo en que se encuentren degeneran de formas distintas, que van desde la condensación, hasta la fragmentación, pero en ningún caso presentan la morfología típica que caracteriza a una célula apoptótica. La técnica de TUNEL no mostró marca abundante como se observa en las células apoptóticas. (Fig. 28, 29 y 31).

En algunos ovocitos alterados se observó poca marca en el núcleo, y solo alguna se encontraba en el espacio citoplasmático ya que parte del material nucleoplásmico se encontraba fuera del núcleo, debido a que la envoltura nuclear del ovocito estaba desintegrada. Aunque la marca no fue abundante cabe señalar que en este tipo de muerte celular podría existir una ligera fragmentación del DNA aunque no es equiparable a la sufrida por las células apoptóticas o tal vez sean algunos fragmentos de DNA normales que se encuentran expuestos en el corte de la célula (Fig. 32). Ya que la mayoría de células, incluyendo las normales presentan un ligero marcado en la cromatina.

VI.5.2 TUNEL EN OVARIOS DE 21-28 DIAS.

En todos los ovarios observados desde 21 hasta 28 días se presentó marca abundante tanto en células de la granulosa como en ovocitos alterados, en comparación a las células en edades tempranas.

En los ovocitos en degeneración avanzada no se observa una condensación de la cromatina sino una fragmentación del ovocito (Fig. 27). Es importante recalcar nuevamente que en ningún caso los ovocitos presentan la morfología típica que caracteriza a una célula apoptótica. La técnica de TUNEL nos mostró que las células de la granulosa, presentan la fragmentación del DNA típica que caracteriza a la apoptosis. (Fig. 33 y 34) ya que la marca de oro en estas células es muy abundante. (Fig. 34).

Además en la Fig. 30 mostramos la reacción de TUNEL con rojo permanente, donde se muestra lo antes mencionado: en los primeros días de desarrollo existen células apoptóticas, principalmente ovocitos. En edades intermedias de degeneración no se encontraron células positivas a TUNEL o estas fueron muy escasas y por el contrario en etapas de madurez sexual o muy cercanas a ésta existe una gran cantidad de células foliculares apoptóticas, pero NO los ovocitos.

APOPTOSIS	MUERTE DE LOS OVOCITOS
Marginación y condensación de la cromatina	NO
Segregación nucleolar	NO
Incremento en la densidad electrónica	NO
Fragmentación nuclear	NO
Contracción Celular	NO
Vacuolización citoplasmática	ALGUNOS
Pérdida de microvellosidades	SI / ALTERADA
Presencia de organelos intactos	NO / MITOCONDRIAS AFECTADAS TEMPRANAMENTE
Formación de cuerpos apoptoticos	NO
Fragmentación de ADN	MUY POCA

Tabla 1. Comparación de las características ultraestructurales de la muerte del ovocito de rata con las alteraciones clásicas asignadas para apoptosis.

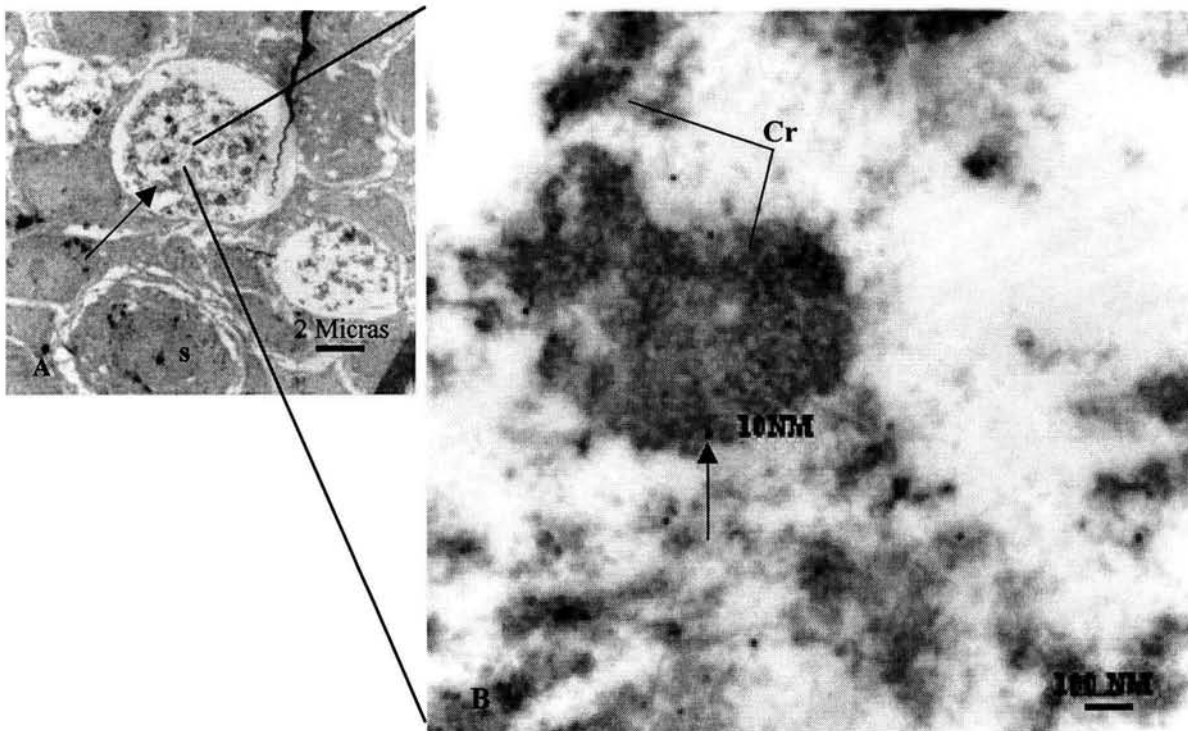


Fig. 28.- Ovario de rata de 1 día de edad. En (A) se muestra una vista panorámica de varios folículos en degeneración avanzada, (—→). Además se observan folículos sanos. (s) TUNEL ME. 5000X. (B) Núcleo de célula folicular alterado de A (Flecha), donde se observa muy poca marca de oro de 10 nm sobre cúmulos de cromatina (Flecha). Cromatina (Cr). TUNEL ME. 80000X.

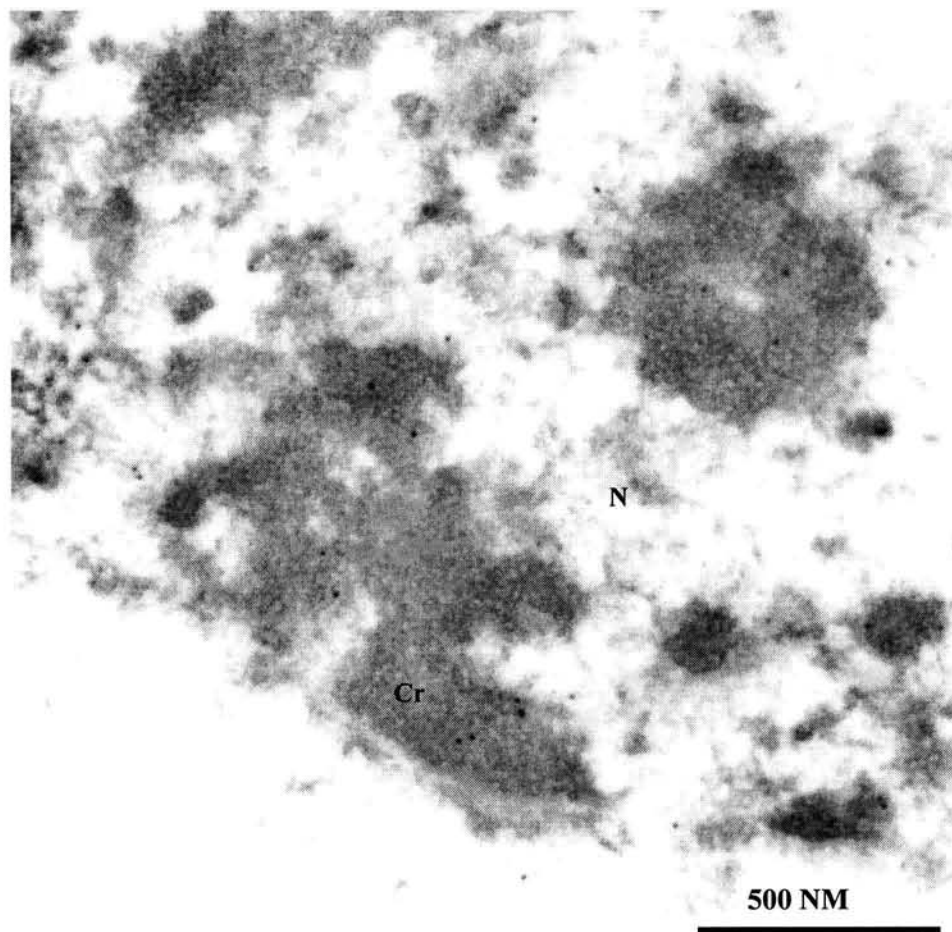


Fig. 29.- Ovario de rata de 5 días de edad. Se observa detalle de un núcleo (N) de ovocito degenerado a gran aumento donde se observa muy poca marca de oro de 10 nm sobre cúmulos de cromatina (Cr). TUNEL ME. 60000X

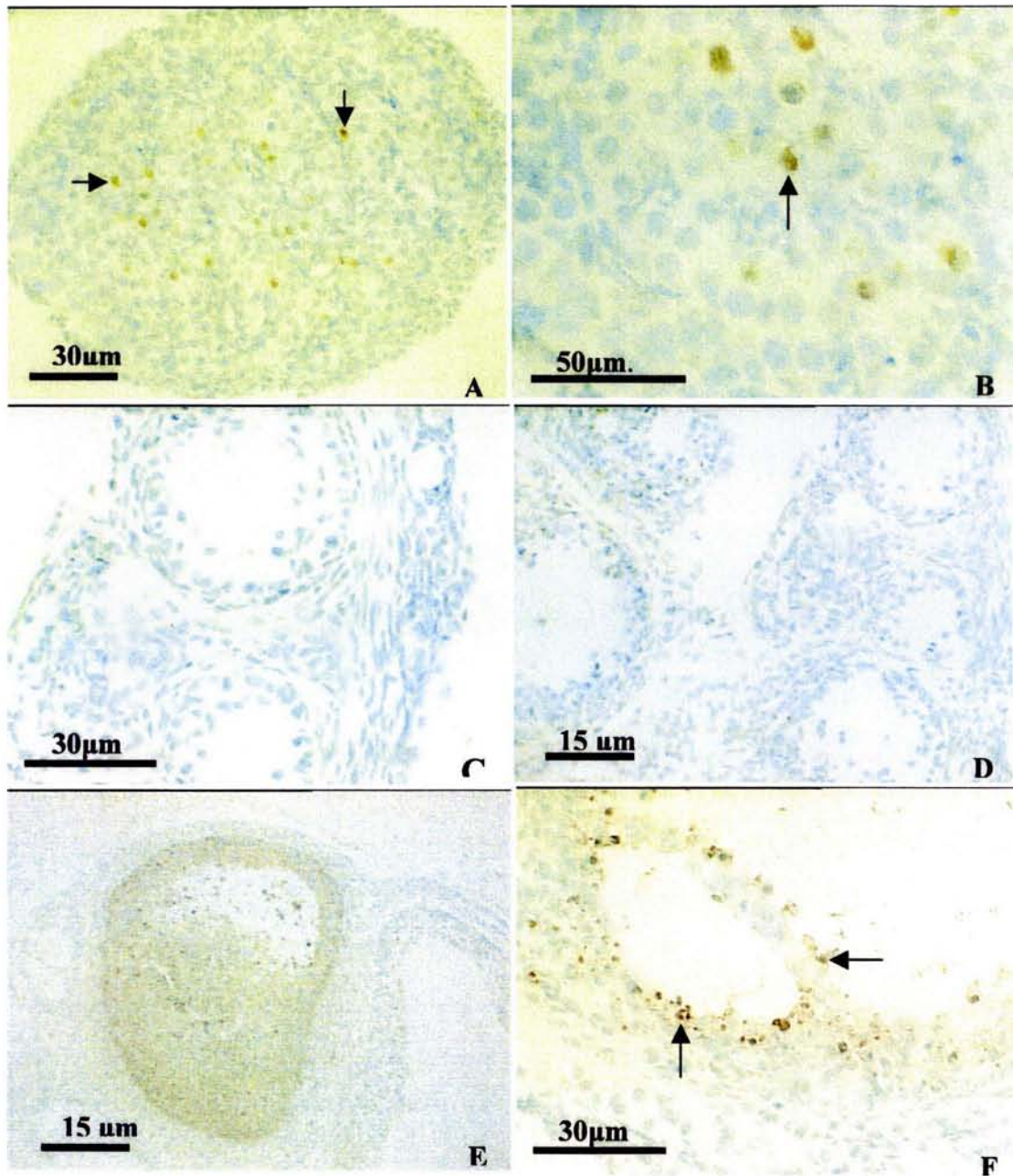


Fig. 30.- (A). Ovario de rata de 1 día de edad, con la técnica de TUNEL, donde se observan claramente las células apoptóticas positivas (Flechas). Verde de Metilo. (B) Mayor aumento de A, observándose claramente la reacción principalmente en ovocitos.

En (C). Ovario de rata de 15 días de edad con TUNEL, donde podemos observar que no existe ninguna célula apoptótica positiva. Verde de Metilo. (D), vista panorámica de otros folículos de 15 días de edad. TUNEL. En (E). Ovario de 25 días de edad, en donde se muestra una gran cantidad de células positivas a TUNEL en folículos antrales. (F). Mayor aumento de folículo positivo a TUNEL de un corte de ovario de 28 días de edad con gran cantidad de células foliculares apoptóticas (flechas).

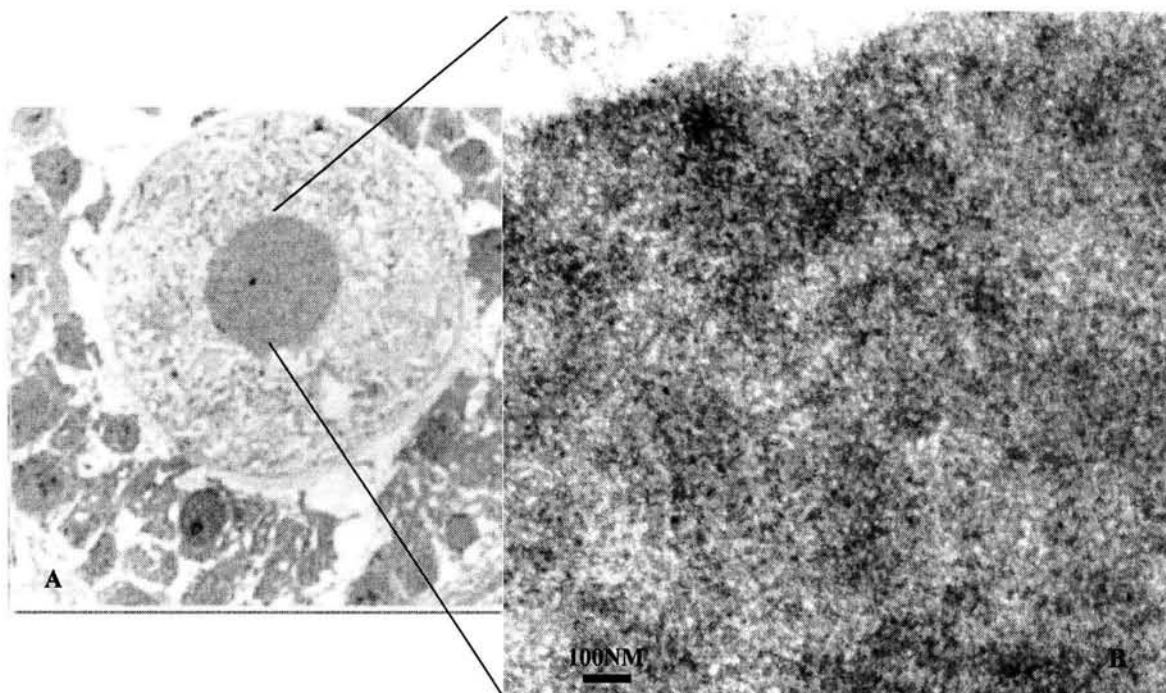


Fig. 31.- (A) Vista general de un folículo de 12 días de edad. Donde podemos percatarnos de que aunque existe degeneración folicular, no existen características típicas de la apoptosis. En (B) se muestra detalle del núcleo del ovocito. Podemos ver muy poca marca. (. A. Ur-Pb. 80000X. B. Ur-Pb 3150X.

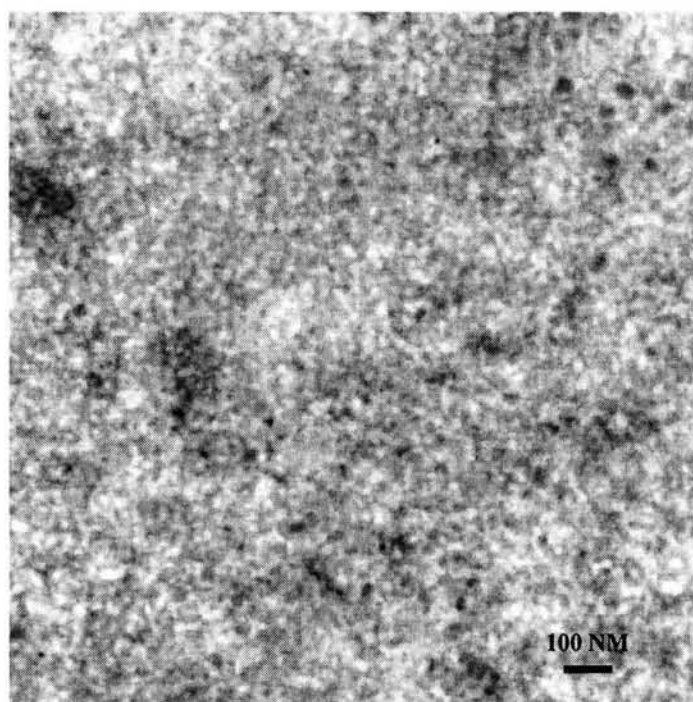


Fig. 32.- Se muestra detalle de un núcleo de ovocito de 17 Días de edad. Podemos ver muy poca marca y no existen características típicas de la apoptosis, TUNEL para ME. Ur-Pb. 80000X.

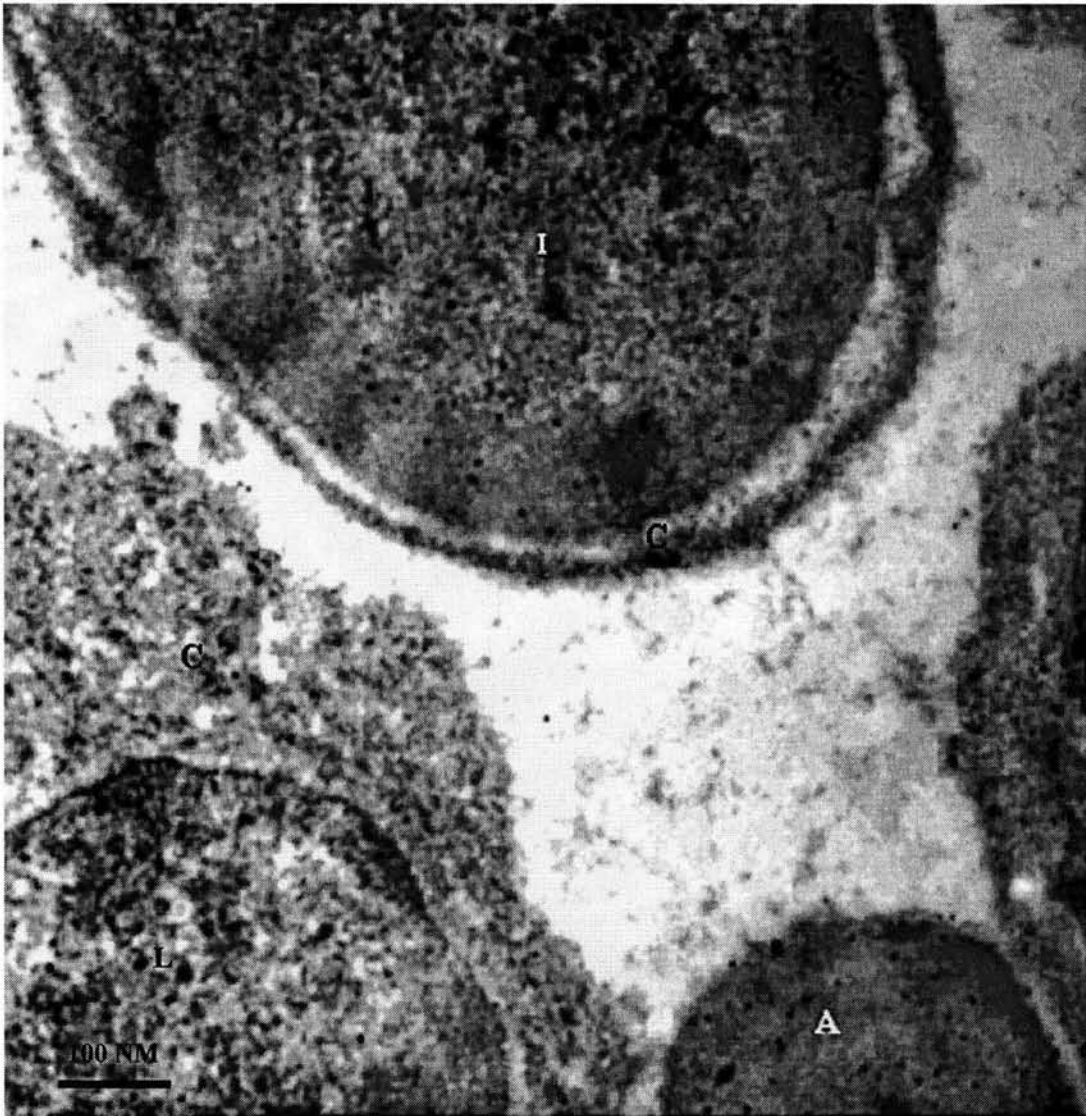


Fig. 33. Células foliculares de 25 días de edad. Se muestran varios estados de degeneración, avanzada (A), donde se observa una condensación muy fuerte y sólo se observa el núcleo; intermedia (I) comienza a compactarse la cromatina y presenta restos de citoplasma (C) e inicial (L) comienza a alterarse el citoplasma, (C) aunque el núcleo no presenta características de degeneración. Ur - Pb. 42500X

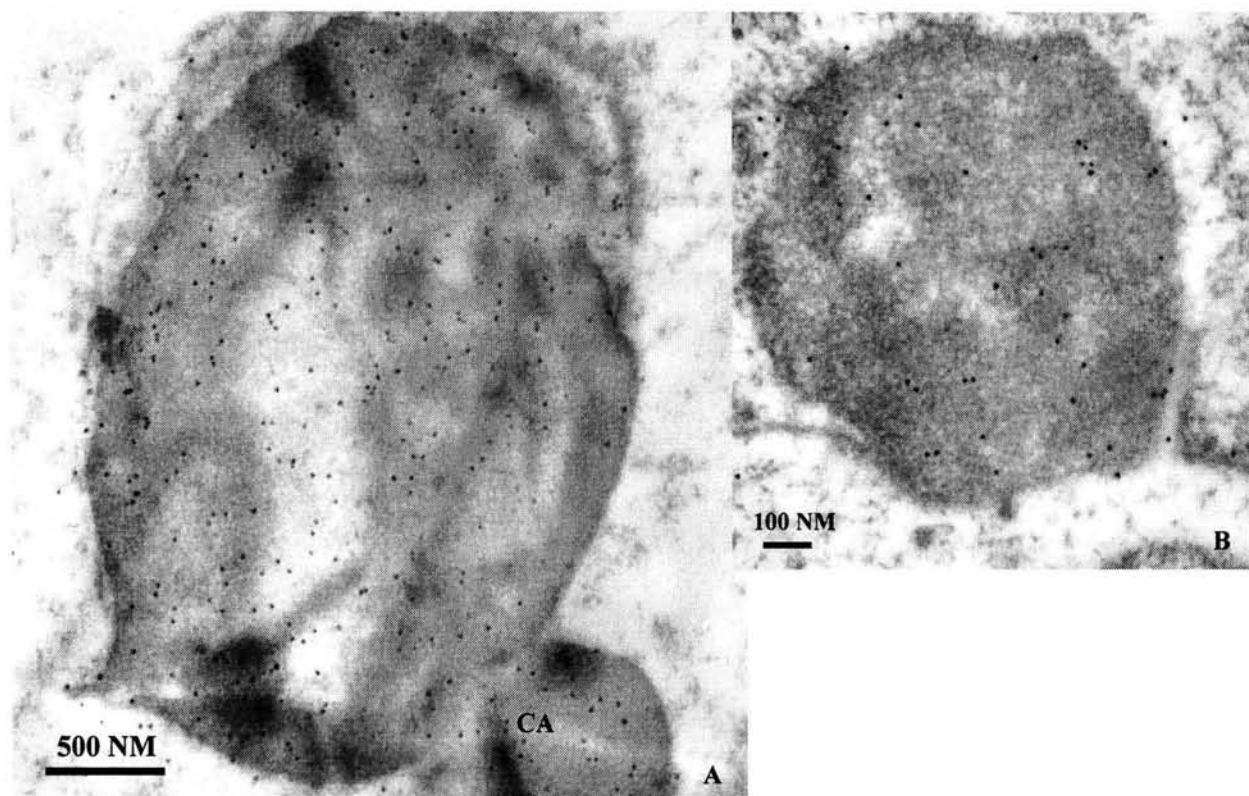


Fig. 34. Células Foliculares de 28 días de edad. Se muestra una abundante marca con la técnica de TUNEL para ME. Nótese que en (A) se muestra la formación de un cuerpo apoptótico (CA). Y no se distinguen los organelos citoplasmáticos de la célula. En B se observa una célula folicular con apoptosis avanzada. TUNEL ME. A. 30000X, B. 40000X.

Si resumimos todas las características presentes en los ovarios de todas las edades obtenemos el siguiente cuadro:

<i>Estado Folicular</i>	TUNEL		TUNEL FLUORESCENCIA		TUNEL ME	
	<i>Ovocito</i>	<i>Células Foliculares</i>	<i>Ovocito</i>	<i>Células Foliculares</i>	<i>Ovocito</i>	<i>Células Foliculares</i>
Primordial	+	+	+	+	+	+
Primario	-	-	-	-	-	-
Preantral Pequeño	-	-	-	-	-	-
Preantral grande	-	++	-	++	-	++
Antral	-	+++	-	+++	-	+++

Tabla 3: Análisis de las características presentes en los ovarios de rata de 1 a 28 días. (-) No presenta reacción, (+) Poca marca, (++) Moderada, (+++) Mucha marca.

Analizando el cuadro anterior podemos decir que existe una degeneración ovocítica distinta ya que las características estructurales aunadas a las de fragmentación del DNA no concuerdan con las descritas para apoptosis. También podemos asegurar que las únicas células que degeneran por apoptosis son las foliculares de folículos preantrales y antrales, aunque estos cuerpos apoptóticos se logran observar esporádicamente en los preantrales pequeños.

Cabe recalcar que las células foliculares en etapas primordiales rara vez degeneran.. Las células de folículos primarios o preantrales pequeños degeneran siempre de una manera distinta a la descrita por apoptosis, en donde las células son fagocitadas aparentemente “normales” por sus vecinas.

LAS RIBONUCLEOPROTEÍNAS EXPERIMENTAN UN IMPORTANTE ARREGLO DURANTE LA APOPTOSIS FOLICULAR EN OVARIO DE RATA.

La morfología ultraestructural de las células foliculares normales, no apoptóticas se muestra en las Figs. 3 y 7. En las muestras contrastadas con EDTA, las estructuras que contienen RNP semejantes a fibras pericromatinianas, gránulos intercromatinianos y gránulos pericromatinianos fueron claramente reconocibles (Fig. 12 y 35).

Las células foliculares con apoptosis temprana muestran una condensación y marginación de la cromatina; Se observó siempre una envoltura nuclear bien preservada, las estructuras nucleares que contienen RNP comienzan a ser segregadas (Fig. 35A). Esto es aún más evidente después de la tinción de EDTA (Fig. 35B). Los diferentes componentes de RNP forman agregados en los que, especialmente, los gránulos intercromatinianos puede ser fácilmente reconocidos (Fig. 35B).

Las fibras pericromatinianas, gránulos intercromatinianos y gránulos pericromatinianos, se identificaron aún en células con fragmentación nuclear (Fig. 36 A y B). Se observan grupos fibrogranulares también fuera de la envoltura nuclear, en el citoplasma. Morfológicamente, estos grupos son reminiscentes de los encontrados en el núcleo y mantienen características de tinción semejantes después de la técnica de EDTA (Fig. 36B y recuadro).

El nucleolo se segrega o separa en masas donde el componente granular (CG) y el componente fibrilar denso son todavía reconocibles (Fig. 36). El CG se puede discriminar todavía de los grupos granulares heterogéneos de RNP de origen nucleoplásmico. En algunos casos algunas estructuras en forma de hilo se encontraron también unidas y agrupadas en el núcleo (Fig. 39 A). En la superficie de células apoptóticas, en las proyecciones citoplásmicas o *blebbs* se encontraron, algunas veces componentes nucleoplásmicos como los gránulos intercromatinianos (Fig. 39 B).

En estados de apoptosis tardía, algunas estructuras densas y de forma espiralada se encuentran asociadas con el núcleo, principalmente con materia amorfa que se parece a restos nucleolares (Fig. 40). Estas estructuras, que han sido raramente observadas y exhiben una similitud con los cuerpos espiralados (coiled bodies). Los desechos citoplásmicos incluyen también organelos tales como mitocondrias y centriolos (Fig. 42 A y B). Los GP son algunas veces observados entre las estructuras de RNP que salen de la célula vía *blebbing* (Fig. 41).

Cabe mencionar que todas estas características, únicamente se presentaron en células foliculares antrales, es decir de 25 a 28 días, donde los cuerpos apoptóticos que se presentan pertenecen a los cuerpos típicos descritos por Kerr (1972).

En células foliculares normales y en degeneración temprana de folículos primordiales y primarios, no se observa en ningún momento una distribución de RNPs, incluso en etapas intermedias no es fácil distinguir a los gránulos intercromatinianos, gránulos pericromatinianos, fibras pericromatinianas, etc. (Fig. 17, 18 y 43)

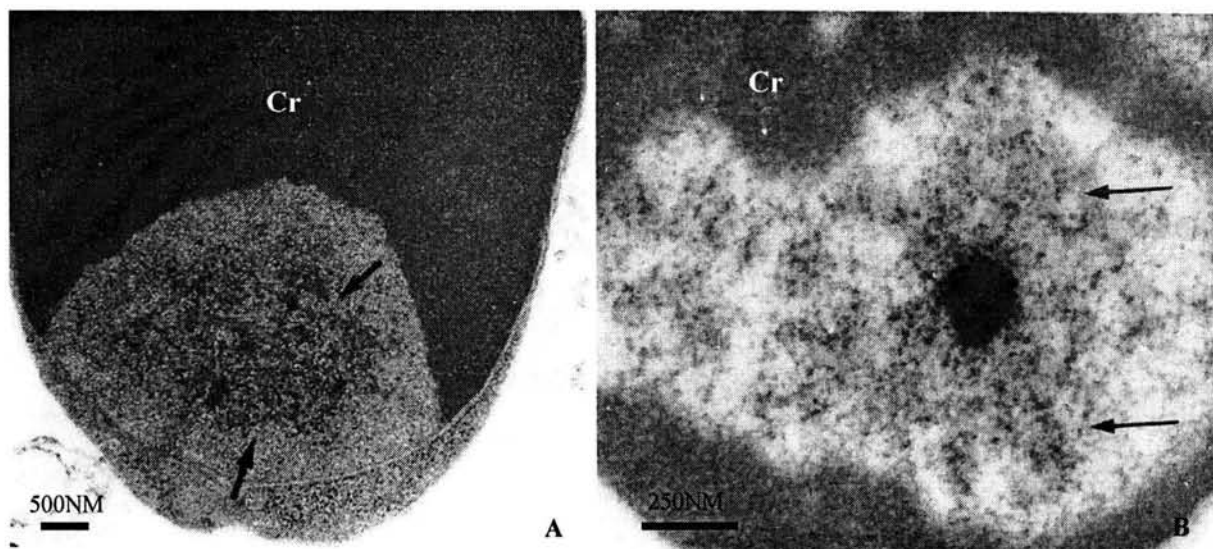


Fig.35 Células foliculares apoptóticas de 25 días de edad. A) La marginación y condensación de la cromatina (Cr) están acompañados de la segregación de las RNPs en una región nuclear formando agregados o pequeñas estructuras (flechas).24 000X. En (B) los grupos de gránulos intercromatinianos (flechas) son aún más aparentes después de la tinción de EDTA. Formándose una masa central, densa y heterogénea de RNP..50 000X

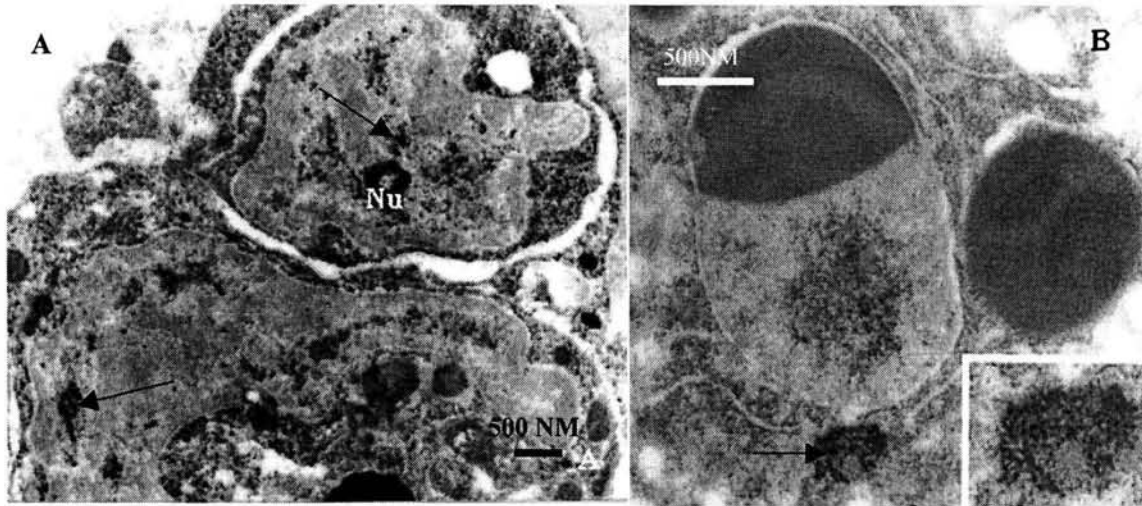


Fig. 36 En (A) se observan células foliculares con grupos de RNPs muy evidentes distribuidas en el núcleo (Flechas). Se observan restos del nucleolo (Nu). EDTA, técnica preferencial para RNPs. 15000X. En (B) además de un grupo heterogéneo grande de RNP dentro del núcleo, otro grupo (flecha) de RNP está presente en el citoplasma. EDTA 25 000X. En el cuadro se observa un aumento mayor de la estructura que se compone de gránulos intercromatinianos. 50 000X.

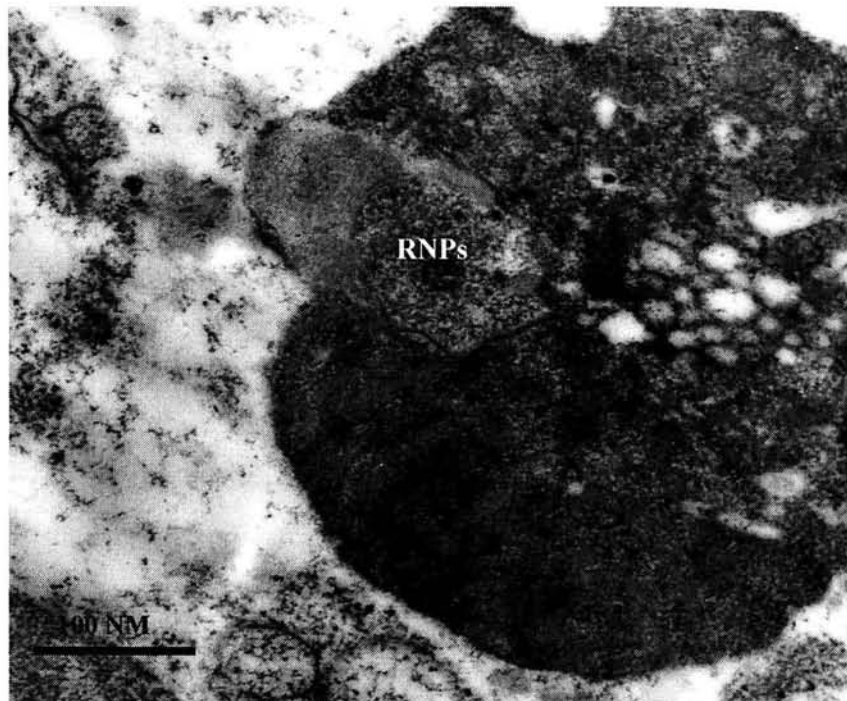


Fig. 37.- Célula folicular apoptótica. Se muestra una región con ribonucleoproteínas (RNPs) condensadas en el centro de lo que queda del núcleo. EDTA. 30000X.

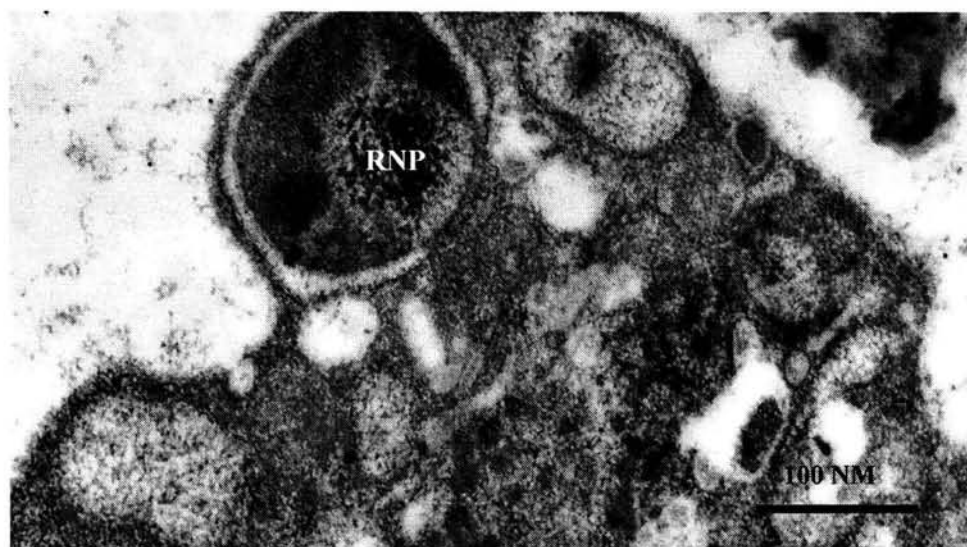


Fig. 38. Célula folicular apoptótica, se muestran estructuras bien definidas, donde resalta una gran cantidad de ribonucleoproteínas (RNPs) . Ur-Pb. 30 000X.

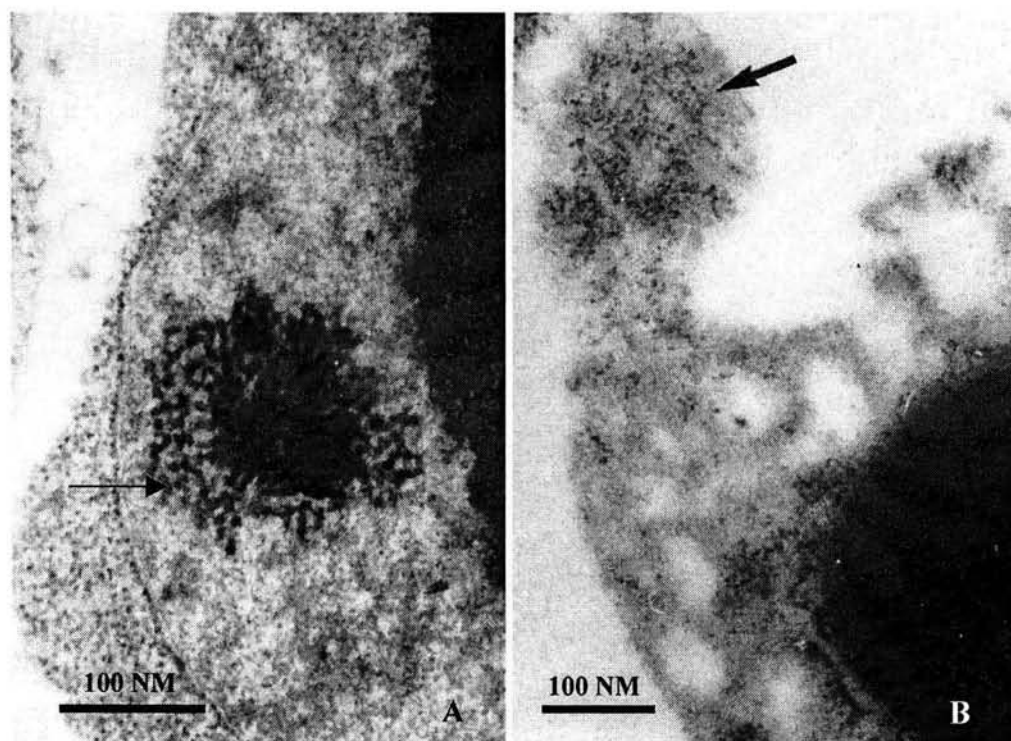


Fig. 39 En A. Células foliculares con componentes ribonucleoproteicos en estructuras en forma de hilos (flecha) 34000X. En B se muestran estructuras similares a gránulos intercromatinianos (flecha) fuera del núcleo y en gran cantidad en el citoplasma. 40000X

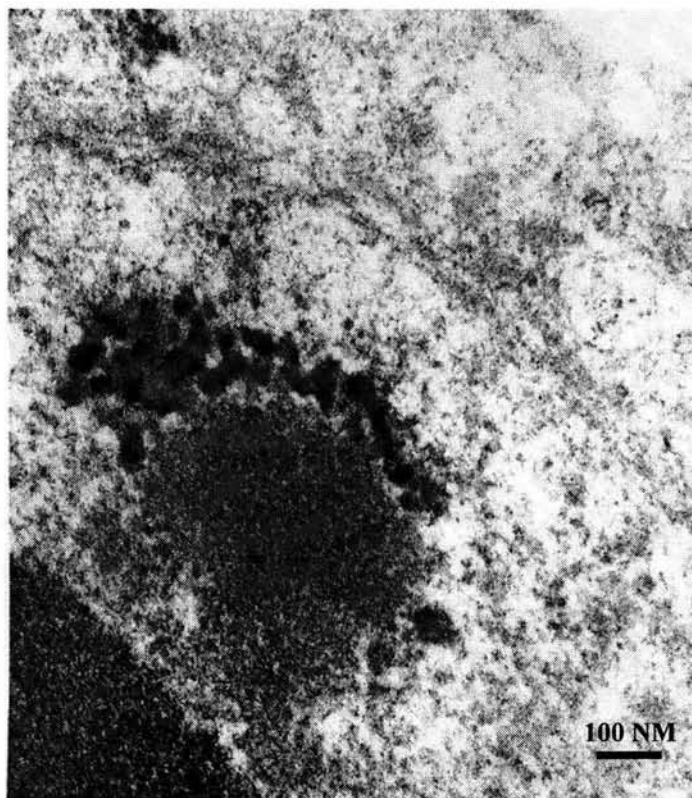


Fig. 40.- Células foliculares donde se muestran estructuras que se parecen a cuerpos espiralados (Coiled bodies). Estos pueden ser vistos asociados con masas de material fibrilar tal vez de origen nucleolar. 75000X.

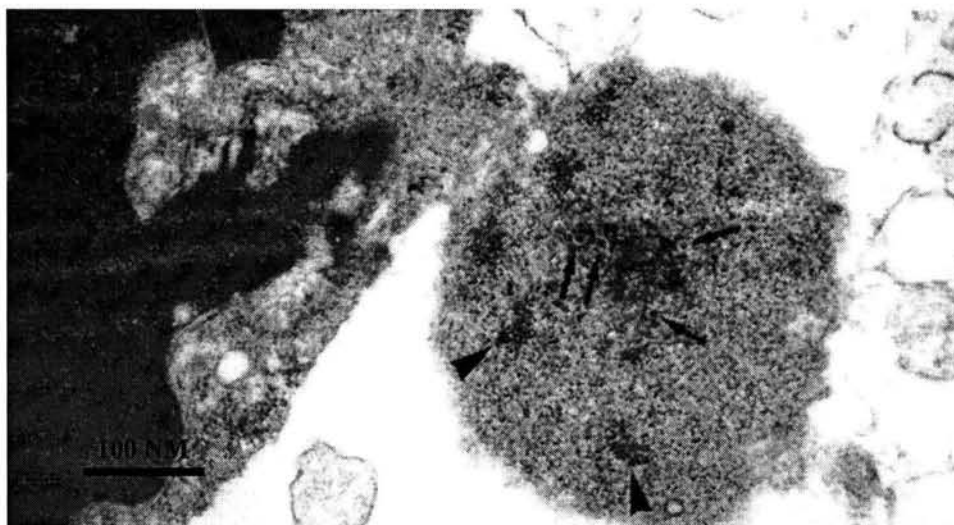


Fig. 41. Célula folicular apoptótica. Se observan agregados de estructuras similares a gránulos intercromatinianos (Cabezas de flechas) y varios GP (flechas) todavía reconocibles, que salen de la célula, junto con los desechos en forma de cuerpos apoptóticos o *blebbing*. 35000X

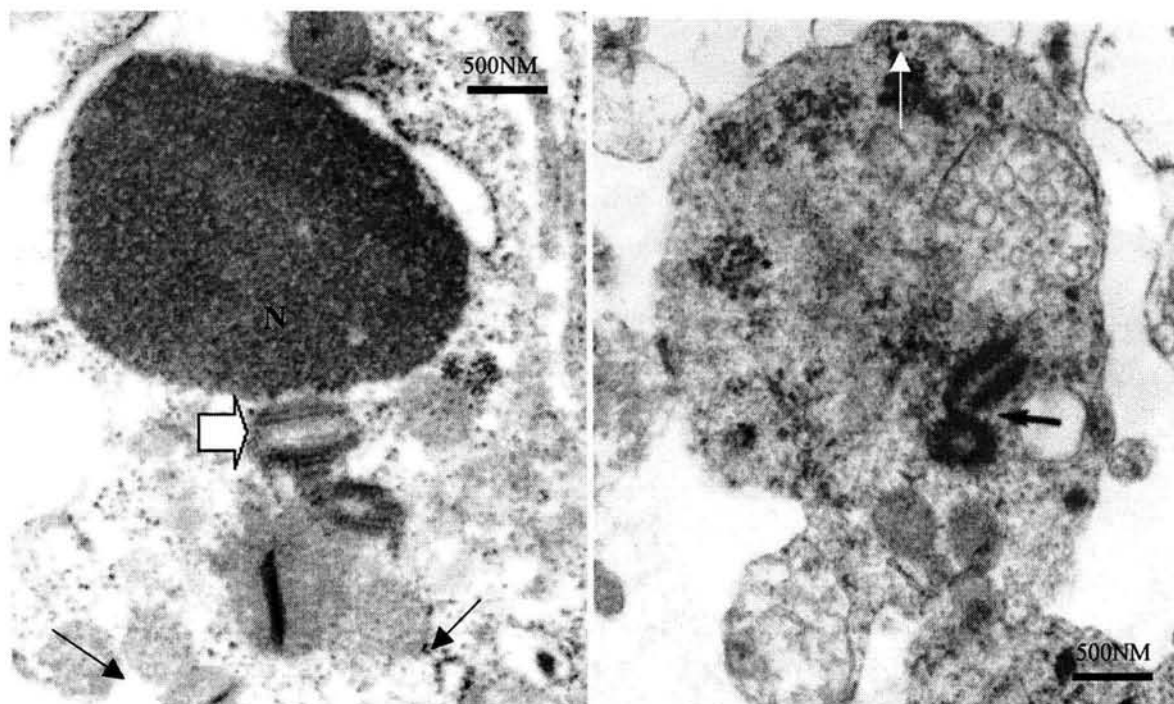


Fig. 42.- Células foliculares. En (A) se muestra el núcleo (N) condensado y una gran cantidad de estructuras inidentificables en el citoplasma (Flechas). Se observan los centriolos (Flecha blanca). En (B) se muestran organelos citoplasmáticos tales como mitocondrias, centriolos (Flecha), y gránulos pericromatinianos (flecha blanca) son a veces liberados a la superficie de la célula. 20 000X

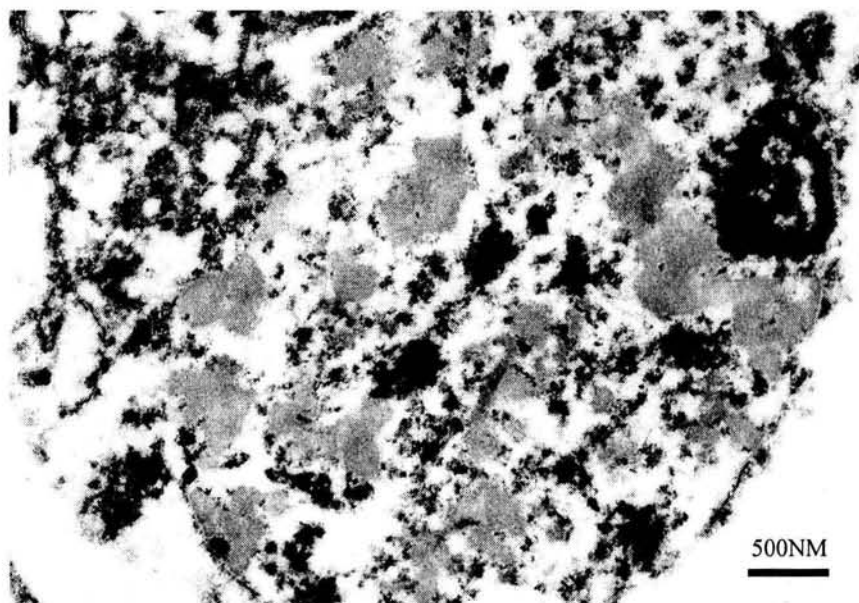


Fig. 43.- Ovario de rata de 5 días de edad. Se muestra un ovocito en etapas de degeneración intermedia no apoptótica con una técnica específica para RNA (EDTA) en la cual se observa que las RNPs están muy condensadas y no se distinguen cúmulos de fibras pericromatinianas, gránulos pericromatinianos o gránulos intercromatinianos. EDTA. 20000X.

VII. DISCUSIÓN

En este estudio, se utilizó una técnica para detectar los fragmentos de ADN en microscopía de luz (ML) y microscopía electrónica (ME) en tejido ovárico incluidas en Parafina y LRW, respectivamente. El método permite la detección de la cadena fragmentada de ADN en las secciones de parafina de 1.5 μm visualizadas con peroxidasa y simultáneamente una detección inmuno-electromicroscópica para la fragmentación del ADN en las secciones de LRW de 90 nm visualizadas con granos de oro de 10 nm.

Por ser una técnica extremadamente sensible el tratamiento de secciones con proteinasa K para la técnica de TUNEL en ME fue omitida porque expone las células no apoptóticas, dando por resultado el etiquetado de un falso-positivo.

Seleccionamos el LRW para esta metodología porque permite cortar semifinos y ultrafinos además de que tiene características hidrofílicas, conveniente para los reactivos intermediarios acuosos usados en el TUNEL.

Usando los cortes ultra y semifinos de LRW podemos demostrar el etiquetado de la fragmentación del ADN a nivel de ML y de ME, respectivamente. El número masivo de las rupturas del ADN que ocurren durante apoptosis ha hecho de este acontecimiento bioquímico un sello común para este tipo de muerte. Nuestros resultados demuestran que la fragmentación del ADN puede ocurrir a un cierto grado durante otro tipo de muerte celular, obtenidos con el uso de la técnica de TUNEL en cortes de parafina.

La fragmentación del ADN se sabe que es un acontecimiento relativamente último durante la apoptosis, y es probable que ciertas células exhiban los suficientes cambios morfológicos para que la célula sea catalogada como apoptótica antes de la fragmentación del ADN, para ello es necesario estudiar detalladamente las características ultraestructurales a nivel de microscopía electrónica (ME).

El porcentaje más alto de células apoptóticas fue encontrado en los datos de ME, debido a la facilidad en la identificación de las características apoptóticas en imágenes de alta resolución.

Una desventaja de poca importancia de usar cortes ultrafinos es que las secciones de materiales incluidos tienen que ser relativamente pequeñas. Por lo tanto, más bloques deben ser cortados para obtener el área de análisis significativa.

VII.1. Comparación de la Muerte Celular del Ovocito con Apoptosis

Desde que Wyllie (Wyllie A, 1972) describió primero las características morfológicas de la muerte fisiológica de la célula o apoptosis, pocos estudios han descrito la ultraestructura del ovocito de folículos atrésicos y a la fecha no se han examinado las etapas tempranas del desarrollo, en la pubertad o en animales adultos. La mayoría de las revisiones de atresia folicular se enfocan en los cambios de las células de la granulosa en folículos de ratones o ratas sexualmente maduras y se iguala el proceso entero con apoptosis. (Kaipia A, et al 1997, Hsueh A., 1996 y Tilly J., 1998).

Análisis bioquímicos de folículos atrésicos que han medido la integridad del ADN (Hughes F., et al 1991 y Boone D., et al 1997) o el aumento en los niveles de factores relacionados con la muerte celular como bax y fas / fas L (Hsueh A., Et al 1994 y Mori T., et al 1997), han confirmado que la apoptosis ocurre en los folículos ováricos antrales.

Porque la caracterización ultraestructural permanece como el método más seguro para la clasificación de la muerte celular como la apoptosis (Payne C., et al. 1995), el presente estudio emprendió una descripción de la sucesión de cambios ultraestructurales que acompañan a la atresia de folículos ováricos de la rata en varias etapas de desarrollo folicular.

Las observaciones informadas aquí no se parecen a descripciones clásicas de necrosis ni de apoptosis. La célula en ocasiones se hincha (degeneración hidrópica) y la disolución de organelos y membrana no tienen lugar, demostrando que la necrosis como tal no ocurre.

Las modificaciones en los ovocitos atrésicos de folículos antrales de rata presentaron la pérdida de células de la granulosa y las microvellosidades de la zona pelúcida, los cambios en los organelos citoplásmicos, el aumento de vacuolas y lisosomas secundarios y finalmente la segmentación del ovocito. La pérdida de microvellosidades y la vacuolización citoplásmicas se parece a la apoptosis, pero otros acontecimientos difieren de los asociados con la apoptosis tradicional. Por ejemplo, la mitocondria no mantiene su apariencia típica durante etapas tempranas de atresia, como ocurre normalmente en la apoptosis. También, la condensación nuclear y citoplásmica, que se refleja por un aumento en la densidad electrónica a nivel ultraestructural, no es observada en ovocitos en degeneración.

La segmentación del ovocito parece ocurrir por un proceso distinto al característico de apoptosis. Los cuerpos tradicionales de apoptosis no tienen microvellosidades presentes en sus superficies, tal como se observa en los fragmentos de los ovocitos. La mayoría de la tan apreciable, condensación de la cromatina nunca se observa en los ovocitos atrésicos en ningún estado folicular. Estas comparaciones sugieren que hay más diferencias que similitudes entre la muerte celular fisiológica del ovocito y la apoptosis.

Otros informes que procuran identificar el mecanismo de la muerte del ovocito no han discutido la posibilidad de una ruta alternativa de muerte celular fisiológica no apoptótica. (Pérez G. et al. 1999). Los estudios ultraestructurales tempranos ocurrieron antes de que la apoptosis se caracterizara (Franchi L. et al 1962 y Vázquez-Nin y Sotelo J. 1967) y los estudios más recientes que utilizan ovocitos no demostraron definitivamente que el mecanismo de la muerte del ovocito es por apoptosis (Van Blerkom J., et al 1998 y Pérez G., et al 1999). Además, porque las observaciones hechas en estudios recientes fueron en su mayoría realizadas en ovocitos incubados *in vitro*.

Por lo que las conclusiones y los resultados obtenidos de folículos ováricos *in situ* quizás reflejen los verdaderos mecanismos de la muerte celular.

VII.2. Las Variaciones en la Muerte Fisiológica Celular del Ovocito

Los folículos parecen experimentar procesos diferentes de degradación dependiendo de la etapa del desarrollo. En los folículos primordiales atrésicos se observó entre muchas otras características, pocos organelos citoplásmicos, las vacuolas y lisosomas se habían acumulado en grandes números y las células de la granulosa no eran afectadas.

Los informes previos de la pérdida fetal de ovogonias y neonatal de ovocitos sugieren que los procesos degenerativos varían también en las ovogonias antes de incorporarse en folículos como ovocitos (Franchi L. et al 1962 y De Pol A, et al 1997). Así, las diferencias en características de muerte celular fisiológica ultraestructural del ovocito sugieren que la maquinaria bioquímica implicada también varía. A favor de esto, Boone, y Tsang, (1997) han informado que la distribución y expresión de la ADNsa I, implicada en la segmentación oligonucleosomal del ADN, es variable entre las células de la granulosa y los ovocitos en diferentes tipos de folículos de ratas adultas. Por lo tanto, parece probable que los ovocitos en ratas postnatales tiene los disparadores de la muerte celular, las rutas de transducción de señales y mecanismos de comparación con otro tipo celular. Tal flexibilidad no se ha descrito para la apoptosis tradicional.

VII.3. Los Aspectos Únicos de Ovocitos

La naturaleza única del ovocito con respecto a otro tipo celular puede ser la causa para esta manera excepcional de muerte celular. Ya que los ovocitos pueden quedarse detenidos en la meiosis durante años, son rodeados por una zona pelúcida acelular no proliferativa y se sabe que dependen de células circundantes o de la granulosa para su sobrevivencia (Hirshfield A. et al. 1991). La apoptosis es un proceso activo a través del cual se protege al organismo de una célula aberrante o no necesaria. Los ovocitos meioticos pueden no requerir la apoptosis, porque ellos no amenazan con una proliferación excesiva o la formación de tumores.

VII.4. Las Variaciones en la Muerte Fisiológica de las células de la granulosa

Las células de la granulosa de folículos antrales (22-28 días) experimentan apoptosis típica, mostrando la condensación de cromatina y el arreglo en forma circular o de media luna. Por otro lado en folículos preantrales (11-21 días) se observa un mecanismo de degeneración folicular donde se implica en su mayoría a la fagocitosis antes de la formación de algún brote potencial del núcleo o condensación de la cromatina. Mientras que los folículos primordiales y primarios (1-10 días) llegan a presentar cuerpos apoptóticos, pero éstos son muy raros. En su lugar las células de la granulosa que degeneran lo hacen por una senda diferente que presenta características estructurales tanto de necrosis como de apoptosis. (Tabla 1)

El estudio de apoptosis en células de la granulosa ha llegado a ser un tema muy popular en los últimos años (Kerr J., 1995). Aunque sorprendentemente, ninguno de los artículos de esta área ha considerado la ultraestructura de estas células *in situ*, dada la importancia de la morfología para definir apoptosis. El TUNEL y técnicas relacionadas han sido utilizadas en estudios previos por Billig et al. (Billig H., 1994) y Chun et al. (Chun S-Y, 1996), y aunque estas técnicas marquen preferentemente las células apoptóticas, estas también pueden marcar a las células necróticas (Ansari B, 1993 y Grasl-Kraupp B., et al 1995).

En el proceso clásico de apoptosis, la condensación nuclear precede la formación de brotes del núcleo y de la célula misma en varios cuerpos apoptóticos pequeños (Kerr J., 1995). En epitelios, estos cuerpos apoptóticos son rápidamente fagocitados por las células colindantes, y así los cuerpos apoptóticos raramente se ven. Sin embargo, es común observar estas vesículas pequeñas una vez que ya han sido fagocitadas. Las observaciones que hemos hecho sugieren que las células de la granulosa de folículos de ratas preantrales (10-20 días) no siguen todos estos procesos clásicos precisamente. Los núcleos alterados encontrados en estas células de la granulosa son semejantes en tamaño a núcleos normales, y presumiblemente no forman brotes. Sin embargo, éstos fueron vistos comúnmente dentro de células de la granulosa que tenían su propio núcleo aparentemente sano, indicando que la célula sana había fagocitado a una célula alterada.

Los estudios actuales no excluyen un papel para la necrosis en etapas avanzadas de atresia folicular, quizás como un mecanismo esparcido por el que la granulosa se destruye últimamente. Sin embargo en el presente estudio ultraestructural de folículos sanos y atrésicos, ninguna célula necrótica se observó en la granulosa.

En el antro nosotros observamos vesículas de ADN y núcleos picnóticos, con frecuencia. Colectivamente a estas estructuras se les ha llamado cuerpos atrésicos. Estos fueron descritos originalmente como la hinchazón de las células en la superficie de la membrana de la granulosa, seguido por la disolución de la membrana celular y posteriormente la membrana nuclear. Algunos de estos núcleos en esta región son uniformemente contrastados por la tinción inespecífica de acetato de uranilo y citrato de plomo, hecho que indica apoptosis por la gran electrón negatividad que se observa. *Sin embargo, obtuvimos la evidencia de que algunas de estas estructuras no experimentan un grado alto de fragmentación del ADN típica de la apoptosis.*

En células preantrales (10-20 días) se observó algo similar a lo descrito anteriormente aunque en mayor proporción, por lo que es posible que la apoptosis de estas células haya sucedido sin fragmentación del ADN. Sin embargo, como no se vio ningún núcleo en forma de medialuna o circular, y no había evidencia de fragmentación de ADN hasta el punto comúnmente esperado con apoptosis, se requiere más evidencia para poder concluir si estos cuerpos atrésicos son o no cuerpos apoptóticos.

Hay que denotar que las células con características necróticas NO se presentaron en folículos primordiales, primarios y pre-antrales y sólo en etapas de degeneración muy avanzadas (antrales) se observan, pero son muy raras.

En su mayoría la ultraestructura de los cuerpos atrésicos no se relacionan con necrosis, en ninguna de las características usuales, como la disolución de las membranas de la célula y lisis de organelos. La alternativa restante es la diferenciación terminal, comparable a la formación de eritrocitos maduros (Castoldi GL, et al 1988) o keratinocitos maduros en la piel (Stenn K. 1983). Los cambios en el ADN durante la diferenciación terminal que tienen como resultado la muerte de la célula, no son entendidos y puede compartir algunos características en común con la apoptosis.

Nosotros no estamos enterados de algún estudio en donde se examine la naturaleza de la degradación del ADN durante la diferenciación terminal en otros órganos. Sin embargo, por contraste a la apoptosis, la diferenciación terminal se asocia con la pérdida celular y a la habilidad de dividirse. Por lo que las características de los cuerpos atrésicos son consistentes con la diferenciación terminal. Pero el concepto de dirigir la diferenciación terminal a la muerte celular no se ha considerado previamente en el contexto de folículos ováricos.

VII.5. TUNEL O (TERMINAL DEOXYNUCLEOTIDYL TRANSFERASE-MEDIATED DEOXY-UTP NICK END LABELING.)

De acuerdo con los resultados de TUNEL, aunados con las características antes mencionadas nos dan cierta seguridad para afirmar que el tipo de muerte celular que se lleva a cabo en ovocitos prepúberes *no antrales* de ratas no es apoptosis, ni necrosis sino otro tipo de muerte celular ya que la mayoría de las características típicas de la apoptosis NO se presentan aquí como son condensación de la cromatina, contracción celular, formación de cuerpos apoptóticos, etc.

Por lo tanto en ningún caso, ya sea células de la granulosa u ovocitos en ratas prepúberes no antrales presentan degeneración por apoptosis. Sin embargo podemos asegurar que muchas células de la granulosa de los folículos con antro, degeneran por apoptosis típica.

Comparado las áreas del corte semifino observadas con el ML en el actual estudio, con las áreas del tejido fino observadas por ME, el análisis era considerablemente pequeño, aunque se tomaron múltiples cortes finos del ovario. Por lo que, no podemos excluir la posibilidad que el análisis de TUNEL por ME pudo haber pasado por alto un número pequeño de células verdaderamente apoptóticas.

La cromatina nuclear fue etiquetada levemente con el immuno-oro en las células granulosas con una ultraestructura normal. Es posible que una cantidad pequeña de ADN segmentado estaba presente incluso en las células normales o que un poco de esta segmentación ocurría como un artefacto durante el proceso del tejido. La incidencia de células ováricas con una acumulación significativa del immuno-oro en los núcleos examinados por TUNEL en ME fue aproximadamente 5 veces más que el de las células ováricas positivas a TUNEL en ML en todas las edades. Esta discrepancia se puede explicar por la diferencia en la sensibilidad a la fragmentación del ADN entre TUNEL para ME y el TUNEL para ML.

VII.6. Arreglo de las ribonucleoproteínas durante la apoptosis.

Como ya hemos mencionado, la apoptosis se describió años atrás como una particular forma de muerte celular (Kerr et al. 1972; Wyllie et al. 1980). La identificación de células apoptóticas fue originalmente basada en características morfológicas estrictas y por microscopía electrónica, permaneciendo todavía como una técnica irremplazable en el estudio de apoptosis.

Ya se sabe muy bien que los cambios nucleares más prominentes de la apoptosis se da en la cromatina, que se condensa inicialmente en la periferia de los núcleos y los agregados en masas granulares discretas; el paso nuclear final es la fragmentación. En paralelo, la condensación citoplasmática y la formación de vesículas ocurren como un estado final de la apoptosis, denominados cuerpos apoptóticos.

Pero hemos encontrado que muy poca atención se le ha dado hasta ahora al destino de ribonucleoproteínas (RNPs) durante la apoptosis. Estos arreglos sorprenden, desde que el contenido total del RNA disminuye como una característica general de la apoptosis.

Muy pocos informes existen actualmente sobre la segregación durante apoptosis, de componentes nucleares en grupos de gránulos y en masas finamente granulares y compactas que se ocultan adyacentes a la cromatina compacta.

Aquí mostramos, basados en técnicas de citoquímica ultraestructural para ADN y RNPs, en células apoptóticas de folículos ováricos, que el ADN se puede detectar únicamente en la cromatina en la periferia del núcleo, cuya porción central parece contener RNPs, a veces en grandes agregados de gránulos.

A fin de aclarar la conducta de estructuras que contienen RNP durante la apoptosis, decidí emprender un análisis ultraestructural de las RNPs en el ovario de rata.

Al seguir el destino de estructuras nucleares que contienen RNP durante la apoptosis del ovario reconocidas por criterios morfológicos y citoquímicos (Fakan et al. 1984; Fakan 1994). Podemos resumir nuestros hallazgos de la siguiente manera: las estructuras que contienen RNP se agruparon primero en la parte central, en donde no existe heterocromatina del núcleo. Aquí, se forman los grupos heterogéneos de gránulos, los cuales contienen gránulos intercromatinianos, gránulos pericromatinianos, fibras pericromatinianas, material de origen nucleolar y (probablemente) cuerpos espiralados.

Los grupos de gránulos son primero expulsados del núcleo hacia el citoplasma y salen eventualmente de la célula dentro de vesículas citoplásmicas rodeadas de membrana o cuerpos apoptóticos. Algunos organelos citoplásmicos, como el centríolo aparentemente ileso y la mitocondria dañada, se pueden liberar también en una manera semejante.

Los estudios de citoquímica ultraestructural muestra una segregación nuclear del ADN y RNPs que ocurre en la apoptosis *in vivo* (Biggiogera et al. 1990). Demostramos aquí que un cambio visible en la organización de RNPs nuclear sucede también durante apoptosis

folicular de ovario de rata de folículos antrales, aunque la base molecular de este fenómeno es todavía desconocida.

Se ha propuesto que la interleucina-1 β en asociación con la enzima (ICE) pueden ser responsables de la mayor parte de los cambios bioquímicos y morfológicos durante apoptosis, que ocurre como resultado de la degradación de sustratos específicos (Kumar 1995; Martin y Green. 1995).

En células no apoptóticas, las estructuras RNP (es decir, GP, FP y GI) que contienen los componentes proteicos responsables del procesamiento de pre-mRNAs (Fakan et al. 1984; Dreyfuss et al. 1993), ocupa regiones específicas en el nucleoplasma (Fakan 1994); su nuevo arreglo o re- arreglo durante la apoptosis puede resultar en un deterioro o un bloqueo de la maduración del RNA, finalmente llevando a un arresto de la síntesis proteica.

Es interesante señalar que una segregación semejante de RNPs nucleares ha sido observada también en espermátidas de diferentes especies de mamíferos (Loir y Courtens 1981; Biggiogera et al. 1993). En ambas situaciones (es decir, apoptosis y espermiogénesis), el arresto de la síntesis proteica podría formar parte del proceso, ya sea de inactivación irrevocable o transitoria del genoma.

Un interesante hallazgo en la presente investigación es que durante la apoptosis, los grupos heterogéneos de gránulos de RNP se expulsan del núcleo y son finalmente liberados en la superficie de la célula. Estos grupos de RNP mantienen su tinción preferencial después de aplicar la técnica de EDTA de Bernhard (1969), aunque estos se encuentren localizados en el citoplasma.

Se debe considerar que las estructuras de RNP (como gránulos intercromatinianos) son sumamente resistentes a las RNasas (Monneron y Bernhard 1969). Estas evidencias se podría tomar como un indicador en la degradación proteolítica de las partículas de ribonucleoproteínas, las cuales sean muy difíciles o posiblemente incompleta su degradación durante la apoptosis.

VIII. CONCLUSIONES

- 1.- El análisis convencional para ME ha revelado que la muerte celular ocurrida en las células ováricas en distintos grados de desarrollo son diferentes a las descritas para apoptosis.
- 2.- Se observó que el mecanismo de degeneración folicular mediado por apoptosis se presenta en etapas post parto muy tempranas (1 y 5 días de edad).
- 3.- En etapas de desarrollo preantral se observa una gran cantidad de folículos alterados, con mucha fagocitosis y no se observan folículos apoptóticos. (10 – 20 días).
- 4.- El mecanismo de muerte celular por apoptosis se presenta nuevamente en etapas cercanas a la madurez sexual de la rata (25 días en adelante) siendo muy abundante y evidente.
- 5.- Existe degeneración folicular severa, sin presencia de cuerpos apoptóticos.
- 6.- El ovocito nunca presenta características relacionadas con apoptosis, ni con necrosis, por lo que se cree que es otro tipo de muerte celular. (Muerte Celular Autofagocítica o Autolisis).
- 7.- Se distinguen morfológicamente dos mecanismos de degeneración celular aparte de la apoptosis.
- 8.- Por lo tanto la atresia folicular puede ocurrir no solo con apoptosis, sino acompañada de otro tipo de muerte celular; incluso diferente a la necrosis.
- 9.- La distribución que sufren las ribonucleoproteínas en las células apoptóticas pueden formar parte de las características únicas que distinguen este tipo de muerte celular.
- 10.- La distribución de RNPs puede ayudarnos a distinguir una muerte celular por apoptosis típica de otro tipo de degeneración celular.

IX. BIBLIOGRAFÍA

1. Aarón J. W. Hsueh and Hakan B. (1994). Ovarian Follicle Atresia: A Hormonally Controlled Apoptotic Process. *Endocrine Reviews* Vol. 15 N.6.
2. Adams, C.C. y Workman J. L., (1993). Nucleosome displacement in transcription. *Cell* 72, 3055-308.
3. Aharoni, D; Meiri I; Atzmon R; Vlodavsky y Amsterdam A. (1997). Differential effect of components of the extracellular matrix on differentiation and apoptosis. *Current Biology* 7(1): 43-51.
4. Alberts B; Bray D; Lewis J; Raff M; Roberts K. and Watson J. (1995). *Molecular Biology of the Cell*. Third edition. Garland publishing, Inc. New York and London.
5. Alonso-Pozos I. (2003). Mechanism of Granulosa cell during follicular atresia depends on follicular size. *Theriogenology* 60. 1071-1081.
6. Andrew W y Hickman P. (1984). *Histology of the vertebrate a comparative text*. The C.V. Mosby company. Saint-Louis.
7. Angus I. y Earnshaw W. (1998). Structure and function in the nucleus. *Science*, 280, 547-553.
8. Ansari B, Coates P, Greenstein B, Hall P (1993) In situ end labelling detects DNA strand breaks in apoptosis and other physiological and pathological states. *J Pathol* 170:1- 8.
9. Austin C. y Short R. (1982). *Hormonas en la reproducción*. Edit. La prensa medica mexicana. México.
10. Beato M. (1989). Gene regulation by steroid hormones. *Cell* 56, 335- 344.
11. Bernhard W. (1969). A new staining procedure for electron microscopical cytology. *Journal of Ultrastructural Research* 27, 250-265.
12. Besnard N. (1992) Proteolytic activity is involved in changes of intrafollicular insulin-like growth factor binding protein levels during growth and atresia of ovine ovarian follicles. *Endocrinology* 137(5): 1599-1607.
13. Billig H, Firuta I, Hsueh AJW. (1994); Gonadotropin-releasing hormone directly induces apoptotic cell death in the rat ovary: biochemical and *in situ* detection of deoxyribonucleic acid fragmentation in granulosa cells. *Endocrinology*; 134:245-252.
14. Boone DL, Carnegie JA, Rippstein PU, Tsang BK. (1997); Induction of apoptosis in equine chorionic gonadotropin (eCG)-primed rat ovaries by anti-eCG antibody. *Biol Reprod*; 57:420-427.
15. Borysenko M. (1985). *Histología funcional*. Editorial limusa, México, pp.227-232.
16. Bosman F.T., et al. (1996). Apoptosis: pathophysiology of programmed cell death. *Path. Res. Pract*, 192,676-683.
17. Budihardjo I. (1999). Biochemical Pathways of caspase activation during apoptosis. *Annu. Rev. Cell. Dev. Biol.* 15:269-290.
18. Busch H. (1977). *Receptors and hormone action*. Edit. O Malley B; Birnbaumer L. Academic Press. N. Y. 1, 32-97.
19. Byskov G. (1978). Follicular atresia. *The vertebrate ovary: comparative Biology and Evolution*. Richard E. Jones. PLENUM. New york.
20. Braw-tal R.. (2002). The initiation of follicle growth. The oocyte or the somatic cells?. *Molecular and cellular endocrinology* 187,11-18.
21. Castoldi GL, Beutler E (1988) Erythrocytes. In: Zucker-Franklin D, Greaves MF, Grossi CE, Marmont AM (eds) *Atlas of Blood Cells: Function and Pathology*, ed 2. Edi Ermes, Milan, pp 47-156.
22. Carambula S.F., et al., (2002). Caspase-3 is a pivotal mediator of apoptosis during regression of the ovarian corpus luteum. *Endocrinology* 143(4): 1495-1501.
23. Cohen J. (1994). Apoptosis: el proceso fisiológico de muerte celular. *Fisiopatología*.
24. Cohen G. M. (1997). Caspases: the executioners of apoptosis. *Biochem. J.* 326,1-16.
25. Chuchten S.V., y Broeck V.D., (2002). Morphological and Biochemical Aspects of Apoptosis, Oncosis and Necrosis. *Anat. Histol. Embryol.* 31, 214-223.
26. Chun SY, Eisenhauer KM, Minami S, Billig H, Perlas E, Hsueh AJW.(1996); Hormonal regulation of apoptosis in early antral follicles: follicle stimulating hormone as a major survival factor. *Endocrinology*; 137:1447-1456.
27. Danilovich N. A., et al., (2000). Ovarian follicle apoptosis in bovine Growth hormone transgenic mice. *Biology of Reproduction* 62, 103-107.
28. Delgado M; Morais C; Neves N. y Jones R; (1995). The influence of B Chromosomes on rDNA organization in rye interphase nuclei. *Chromosome Research* 3, 487-491.
29. D'Herde K, De Pestel G, Roels F, (1994). In situ end labeling of fragmented DNA in induced ovarian atresia. *Biochem Cell Biol.*; 72:573-579.

30. De Pol A, Vaccina F, Forabosco A, Cavazzuti E, Marzona L. (1997). Apoptosis of germ cells during human prenatal oogenesis. *Hum Reprod*; 12:2235–2241.
31. De Pol A, Marzona L, Vaccina F, Negro R, Sena P, Forabosco A. (1998). Apoptosis in different stages of human oogenesis. *Anticancer Res*; 18:3457–3462.
32. De Robertis D. (1991). *Molecular Biology of the Cell*. Second edition. Garland publishing, Inc. New York.
33. Eastman A. (1995). Assays for DNA fragmentation, endonucleases, and intra-cellular pH and Ca²⁺ associated with apoptosis. In Schwartz LM, Os-borne BA, eds. *Methods in cell biology: cell death*. New York: Aca-demic Press; p. 41-55.
34. Earnshaw W. (1995). Nuclear changes in apoptosis. *Current opinion in cell biology*. 7 : 337-343.
35. Echeverría M. y Vázquez Nin G. (1995). El núcleo celular interfásico. *Coordinación de servicios editoriales*. Facultad de Ciencias U.N.A.M.
36. Echeverría M; Zavala G; Benitez A. y Vázquez Nin G. (1980). Changes during estral cycle in de nucleus of endometrial cells of the rat. *Biol. Cellulaire* 39, 139-142.
37. Eisenhauer K; Chun S; Minami S; Billing H. Y Hsueh A. (1996) Mechanisms of Atresia: The Hormonal control of Apoptosis. En *Regulation, Dysfunction and Treatment*. (Series: International Congress. Series 1106 Elsevier Sciences Publ. B:V: Amsterdam Netherlands. pp 103- 112.
38. Eppig J; Wigglesworth K; Pendola F. y Hirao Y. (1997) Murine oocytes supress Expression of Luteinizing Hormone Receptor Messenger Ribonucleic Acid by Granulosa Cells. *Biology of Reproduction* 56: 976- 984.
39. Falcieri E., et al., (1994). Nuclear pores in the apoptotic cell. *Histochemical Journal*. 26,754-763.
40. Fakan S; Puvion E. y Spohr G. (1976). Localization and characterization of newly synthesized nuclear RNA in isolated rat hepatocytes. *Exp. Cell Res*. 99, 155-164.
41. Fenwick M.A. et al. (2002). Immunohistochemical localization of active caspase-3 in the mouse ovary: growth and atresia of small follicles. 124, 659-665.
42. Feulgen, R. And Rossenberck, H. (1924). Mikroskopisch-chemisther nachweis ainer neclensaure. *Zts . physiol. Chem.*, 135: 203-207.
43. Finch, J. T. Y Klug, (1976). Solenoidal model for superstructure in chromatin. *Proc. Nat. Acad. Sci*. 73, 1897-1901.
44. Fournel S; Genestier L; Roualt J; Lizard G; Flacher M; Assossou O. (1995). Apoptosis without decrease of cell DNA content. *FEBS letters* 367; 188-192.
45. Franchi LL, Mandl AM. (1962).The ultrastructure of oogonia and oocytes in the foetal and neonatal rat. *Proc R Soc Lond*; 157:99–114.
46. Frederick L. and Xinbo Z. (1998). Apoptosis: A brief reviews. *Journal of Clinical ligand assay*. 21 (1): 58-61.
47. Gavrieli Y, Sherman Y, Ben-Sasson S. (1992). Identification of programmed cell death in situ via specific labeling of nuclear DNA fragmentation. *J Cell Biol*; 119: 493-501.
48. Garret W. y Guthrie H. (1996). Expression of androgen receptors and steroidogenic enzymes in relation to follicular growth and atresia following ovulation in pigs. *Biology of Reproduction*. 55(5): 949-955.
49. Getzenberg, R. H., Pienta, K.J., Ward, W.S. y Coffey D.S., (1991). Nuclear structure and the tree-dimensional organization of DNA. *J. Cellular Bioch*. 47, 289-299.
50. Gilbert S. (1994). *Developmental Biology*. Fourth Edition. Sinauer Associates, Inc. Publishers. Sunderland Massachusetts. USA.
51. Gondos B. (1982). Ultrastructure of follicular atresia. *Gamete Res*; 5:199–206.
52. Goping G., et al. (1999). Detection of fragmented DNA in apoptotic cells embedded in LR White: A combined histochemical (LM) and ultrastructural (ME) study. *The journal of histochemistry and cytochemistry*. Vol 47(4):561-568.
53. Grasl-Kraupp B, Ruttkay-Nedecky B, Koudelka H, Bukowska K, Bursch W, Schulte-Hermann R (1995) In situ detection of fragmented DNA fails to dis-criminate among apoptosis, necrosis and autolytic cell death: a cautionary note. *Hepatology* 21:1465–1468.
54. Greep O. y Weiss L. (1975). *Histología*. Ateneo. España.
55. Greenwald G. y Terranova P. (1988). Follicular Selection and its control . En *Physiology of Reproduction* . E. Knibill And J. Neil (et al) (Eds) Raven Press, Ltd. New York . PP 387- 445.
56. Gregori C. (1995). apoptosis and the inmune response, Editorial Wiley - liss, E. U. A. , p.p.416.
57. Grete A. (1978) Follicular Atresia. En *The Vertebrate Ovary*. Comparative Biology and Evolution R:E: Jones(Editor). Plenum Press. New York and London . pp 533-4.

58. Grunstein, M., (1992). Histones as regulators a genes. *Sci. Am.* (October) pp.40-47.
59. Guo M; Mori E; Xu J. y Mori, T. (1994) Identification of FAS antigen associated with apoptotic cell death in murine ovary. *Communications* 203(3) 1438-1446.
60. Hakuno N. (1996) FAS/ APO-1/ CD95 System as a mediator of granulosa cell apoptosis in ovarian follicle atresia. *Biochemical and Biophysical Research.* 250 (2) 753-762.
61. Harvey H. (1979). Hormones and reproductive behavior. *Scientific American*, ed. Freeman W. H. and company San Francisco cap. 7, 9. pag. 84-92.
62. Hernández-Verdún P. Russel P. y Junera R. (1993). Proteínas asociadas con las regiones organizadoras nucleolares (NORs) durante la interfase y mitosis. *Progresos en biología celular*, pags. 139-141, Becerra J., Figares J. M., Fernández- Llebreg P. Eds. Universidad de Málaga.
63. Hirsfeld A.N., and Midgley R. Jr. (1978). The role of FSH in the selection of large ovarian follicles in rat. *Biology of reproduction.* 19, 606-611.
64. Hirshfield A.N. (1991). Development of follicles in the mammalian ovary. *Int Rev Cytol*; 124:43-101.
65. Hsueh AJW, Billig H, Tsafirri A.(1994). Ovarian follicle atresia: a hormonally controlled apoptotic process. *Endocr Rev*; 15:707-724.
66. Hsueh A.J., (1994). Ovarian follicle Atresia: A Hormonally Controlled Apoptotic Process. *Endocrine reviews.* Vol 15., No. 6.
67. Hsueh AJW, Eisenhauer K, Chun SY, Hsu SY, Billig H.(1996). Gonadal cell apoptosis. *Recent Prog Horm Res*; 51:433-455.
68. Hughes FM, Gorospe WC.(1991); Biochemical identification of apoptosis (programmed cell death) in granulosa cells: evidence for a potential mechanism underlying follicular atresia. *Endocrinology*; 129:2415-2422.
69. Inaga, S., Osatake, H. y Tanaka K., (1991). SEM images of DNA double helix and nucleosomes observed by ultrahigh-resolution scanning electron microscopy. *J. Electron Microsc.* 40, 181-186.
70. Inoue S., et al. (2000). Elimination of atretic follicles from the mouse ovary: a TEM and immunohistochemical study in mice. *J.Anat.* 196, pp. 103-110.
71. Jacobson M.D., et al., (1997). Programmed Cell Death in Animal Development. *Cell*, vol 88, 347-354.
72. Jiménez García L. (1985). Tesis de Maestría: Evolución nuclear en animales. (Enfoque ultraestructural de las partículas ribonucleoproteicas intranucleares del período interfásico). Facultad de Ciencias.
73. Jiménez García L.F; Elizundia, J. M; Lopez Zamorano, B., Maciel, A., Zavala, G., Echeverría O. M. y Vázquez Nin G. H., (1988). Implications for evolution of nuclear structures of animals, plants, fungi and protoctis . *BioSystems* 22, 103-116.
74. Jiménez García, Segura-Valdez M; Ochs R; Echeverría O; Vázquez Nin G. y Busch H. (1993). Electron microscopic localization of ribosomal DNA in rat liver nucleoli by non-isotopic in situ hybridization. *Exp. Cell Res.* 207, 220-225.
75. Jiménez García y Spector D. (1993). In vivo evidence that transcription and splicing are coordinated by a recruiting mechanism. *Cell* 73, 47-59.
76. Kaipia A; Chung S; Eisenhauer K. y Hsueh A. (1996). Tumor-Necrosis factor alpha and its second messenger ceramide, stimulate apoptosis in cultured ovarian follicles. *Endocrinology* 137(11): 4864-4870.
77. Kaipia A, Hsueh A.J., (1997); Regulation of ovarian follicle atresia. *Annu Rev Physiol*; 59:349-363.
78. Kass G; Eriksson E; Weis M; Orrenius S. y Chow S. (1996). Chromatin Condensation during apoptosis requires ATP. *Biochem J.* 31, 749-752.
79. Kayne, P. Kim, U., Han M., Muller, J., Yoshizaki, F. Y Grunstein, M. (1988). Extremely conserved histone H4 N terminus is dispensible for growth but essential for repressing the silent mating loci in yeast. *Cell* 55, 27-39.
80. Karp G. (1987). *Biología Celular.* Edit . Mc Graw-Hill. México. pp. 425-448.
81. Katzman R. (1997) The aging brain, limitations in our knowledge and future approaches. *Arch Neurol*; 54: 1201.
82. Kerr J., Wyllie A., Currie A. (1972). Apoptosis: a basic biological phenomenon with wide ranging implications in tissue kinetics. *Br J Can-cer*; 26: 239-57.
83. Kerr J., Gobe G., Winterford C., Harmon B. (1995) Anatomical methods in cell death. In Schwartz LM, Osborne BA, eds. *Methods in cell biology: cell death.* New York: Academic Press; p. 1-27.
84. King K. y Cidlowski J. (1995). Cell cycle and apoptosis: Common pathways to life and death *journal of cellular biochemistry* 58: 175-180.
85. Kornberg, R. D. y Klug A., (1981). The nucleosome . *Sci. Am.* 244, 52-64.

86. Lecouer H., (2002). Nuclear Apoptosis detection by flow cytometry: Influence of endogenous endonucleases. *Experimental cell research*. 277,1-14.
87. Lunenfeld B; Kraiem Z. y Eshkol A. (1975). The Function of the Growing Follicle. *J. Reprod. Fert.* 45, 567-574.
88. McConkey D.J. y Orrenius S. (1997). The role of calcium in the regulation of apoptosis. *Biochemical and biophysical research communication*. 239, 357-366.
89. Maillet G., et al. (2003). Involvement of theca cells and steroids in the regulation of granulosa cell apoptosis in rabbit preovulatory follicles. *Reproduction*. 125, 709-716.
90. Majno G. y Joris I., (1995). Apoptosis, Oncosis and Necrosis. An overview of cell death. *American Journal of pathology*, vol 146, 3-15.
91. Makrigiannakis A., et al. (1999). N-cadherin-mediated human granulosa cell Adhesion prevent apoptosis. A role in follicular atresia and luteolysis? *American journal of pathology* . vol 54. N. 5 1391-1406.
92. Malkinson A. (1980). *Acción hormonal cuadernos de biología*, Edit. Omega Barcelona.
93. Maravei D. V., et all., (1997). Cleavage of cytoskeletal proteins by caspases during ovarian cell death: evidence that cell-free systems do not always mimic apoptotic events in intact cells. *Cell Death and Differentiation*. 4, 707-712.
94. Martín B. (1999) Molecular bases of the neurodegenerative disorders. *N Engl J Med*; 340: 1970-80.
95. Massimo de F. (1997). Ovarian Follicular. Atresia: a model for apoptosis. *Cell death and differentiation*, 4, 260-261.
96. Matikainen T. et al. (2001). Caspase-3 Gene Knockout Cell Lineage Specificity for Programmed Cell Death Signaling in the Ovary. *Endocrinology*. Vol 142, N. 6. 2468-2479.
97. Medina F. J; Moreno S; Martín M. y Fernández G. (1989). Intercromatin granules in plant nuclei *Biology of the cell*, 67, 331-339.
98. Melcak I., Raska I. (1996). Structural organization of the pre-mRNA splicing commitment: a hypothesis. *Journal of Structural Biology* 117,189-194
99. Michiya Ohno, (1998); "Apoptotic" Myocytes in Infarct Area in Rabbit Hearts May Be Oncotic Myocytes with DNA Fragmentation . *Circulation*. 98:1422-1430.
100. Milan K; Bagchi; Ming-Jer T; Bert W. y Siphia Y. (1992). Analysis of the mechanism of steroid hormone receptor- dependent gene activation in cell-free systems. *The Endocrine Society* 13, 3, 525-535.
101. Mikkelsen A.L., (2001). Incidence of apoptosis in granulosa cells from immature human follicles. *Reproduction* 122,481-486.
102. Monneron A. y Bernhard W. (1969). Fine structural organization of the interphase nucleus in some mammalian cell. *J. Ultrastructure Research* 27, 266-288.
103. Morales Alcántara Ma. De la Salud, (1983), Estudio histológico del ovario de cuatro vertebrados, Tesis de licenciatura en la facultad de ciencias, México D.F.
104. Mori T, Xu JP, Mori E, Sato E, Saito S, Guo MW. (1997). Expression of Fas-Fas ligand system associated with atresia through apoptosis in murine ovary. *Horm Res*; 48:11-19.
105. Morita Y y Tilly J.L., (1999). Oocyte Apoptosis: Like sand through an hourglass. *Developmental biology* 213, 1-17.
106. Nahum R; Beyth Y; Chun S; Hsueh, A. y Tsafirri A. (1996) Early onset of desoxyribonucleic acid fragmentation during atresia of preovulatory ovarian follicles in rats. *Biology of Reproduction* 55(5): 1075- 1080.
107. Nakano R; Mizano T; Katayama K. y Tojo S. (1975). Growth of ovarian follicles in rats in absence of gonadotrophins. *J. Reprod. Fert.* 45, 545-546.
108. Ohno M. et al. (1998). "Apoptotic " myocytes in infarct area in rabbit hearts may be oncotic myocytes with DNA fragmentation. *Circulation*. 98:1422-1430.
109. Payne CM, Bernstein C, Bernstein H. (1995). Apoptosis overview emphasizing the role of oxidative stress, DNA damage and signal-transduction pathways. *Leuk Lymphoma*; 19:43-93.
110. Patt I. y Patt R. (1979). *Comparative Vertebrate Histology*. Harper and Row Publishers. New York.
111. Pedersen H. G., et al. (2003). Analysis of atresia in equine follicles using histology, fresh granulosa cell morphology and detection of fragmentation. *Reproduction*. 125, 417-423.
112. Perez G.I., Tao X.J., Tilly J.L., (1999); Fragmentation and death (a.k.a. apoptosis) of ovulated oocytes. *Mol Hum Reprod*; 5:414-420.
113. Philips B. (1975). *Development of vertebrate anatomy*. The C.V. Mosby Company. Sait Louis.
114. Pombo A. y Cook P. (1996). The localization of sites containing nascent RNA and splicing factors. *Exp. Cell Res.* 229, 201-203.

115. Puvion E; Viron A. y Xu X. (1984). High resolution autoradiographical detection of RNA in the interchromating granules of DRB treated cells. *Exp. Cell* 43, 147-150
116. Puvion E. y Puvion-Dutilleul F. (1996). Ultrastructure of the nucleus in relation to transcription and splicing: roles of perichromatin fibrils and interchromatin granules. *Exp. Cell Res.* 229, 217-225.
117. Puvion E. y Moyne G. (1978). Intranuclear migración of newly synthesized extranucleolar ribonucleoproteins. *Exp. Cell Res.* 115, 79-88.
118. Pru J. K and Tilly J.L. (2001). Programmed Cell Death in the Ovary: Insights and Future Prospects Using Genetic Technologies. *Molecular Endocrinology* 15(6): 845-853.
119. Richards Joanne and Midgley R. Jr. (1976). Protein Hormone Action: A key to Understanding Ovarian Follicular and Luteal Cell Development. *Biology of Reproduction* 14, 82-94.
120. Romer A. (1981). Anatomía Comparada. Interamericana. México.
121. Ross M; Romrell L. y Kaye G. (1998). Histología; texto y atlas color, Editorial Panamericana, Tercera edición, México D.F., p.p. 817.
122. Salgado R. (2001). Estudio citoquímico del núcleo de ovocitos y células foliculares durante la atresia en rata. Tesis de licenciatura. Facultad de Ciencias.
123. Sang-Young C., et al. (1996). Hormonal regulation of apoptosis in early antral follicles: follicle-stimulating hormone as a major survival factor. *Endocrinology*. vol. 137, N. 4. 1147-1456.
124. Shaw P. (1995). The Nucleolus. *Ann. Rev. Cell Dev. Biol.* 11, 93-121.
125. Spector D. (1993). Macromolecular domains within the cell nucleus. *Cell Biol.* 9, 265-315.
126. Stenn K., (1983) The skin. In: Weiss L (ed) *Histology: Cell and Tissue Biology*, ed 5. Elsevier, New York, pp 569-606
127. Swift H. (1959). Studies on nuclear fine structure. *Brookhaven Symp. Biol.* 12, 134.
128. Tilly JL, Kowalski KI, Johnson AL, Hsueh AJW. (1991). Involvement of apoptosis in ovarian follicular atresia and post-ovulatory regression. *Endocrinology*; 129:2799-2801.
129. Tilly J.L. (1996). Apoptosis and ovarian function. *Reviews of Reproduction* 1, 162-172.
130. Tilly J.L. (1997). The genes of cell death and cellular susceptibility to apoptosis in the ovary : a hypothesis. *Cell death and differentiation*. 4, 180-187.
131. Tilly JL. (1998); Molecular and genetic basis of normal and toxicant-induced apoptosis in female germ cells. *Toxicol Lett*; 102-3:497-501.
132. Thiry M. y Daneholt B., (1998). Evaluation of sensitivity of the terminal Deoxynucleotidyl Transferase-immunogold technique on Balbiani Ring Genes. *The Journal of histochemistry and cytochemistry*. 46 (3): 345-351.
133. Tounekti O. Belehradec J. y Mir L. (1995). Relationships between DNA fragmentation, chromatin condensation and changes in flow cytometry profiles detected during apoptosis. *Current opinion in cell biology*. 8: 506-516.
134. Van Blerkom J, Davis PW. (1998). DNA strand breaks and phosphatidylserine redistribution in newly ovulated and cultured mouse and human oo-cytes: occurrence and relationship to apoptosis. *Hum Reprod*; 13:1317-1324.
135. Van Wezel IL, Dharmarajan AM, Lavranos TC, Rodgers RJ. (1999); Evidence for alternative pathways of granulosa cell death in healthy and slightly atretic bovine antral follicles. *Endocrinology*; 140:2602-2612.
136. Vaux D.L. and Korsmeyer S.J., (1999). *Cell Death in Development*. Cell, vol 96, 245-254.
137. Vazquez-Nin GH, Sotello JR. (1967); Electron microscope study of the atretic oocytes of the rat. *Z Zellforsch Mikrosk Anat*; 80:518-533.
138. Vázquez Nin G. y Bernhard W. (1971). Comparative ultrastructural study of perichromatin and Balbiani ring granules. *J. Ultrastruct. Res.* 36, 842-859.
139. Vázquez Nin G; Echeverría O; Molina E. y Fragoso J. (1978). Effects of ovariectomy and estradiol injection on nuclear structures of endometrial epithelial cells. *Acta Anat* 102, 308-318.
140. Vázquez Nin G; Echeverría O. y Pedron J. (1979). Effects of estradiol on the ribonucleoprotein constituents of the nucleus of cultured endometrial epithelial. *Cells. Biol. Cell.* 35, 221-228
141. Vázquez Nin G. Jiménez García L. y Echeverría O. (1993). Relaciones entre morfología y funciones nucleolares. Estudio de hibridación in situ y morfometría. *Progresos en biología celular*, págs. 135 - 138 eds. Becerra J., Pérez J. M., Figares, Fernández P., Lebrez L. Universidad de Málaga.
142. Vazquez-Nin G.H., Biggiogera M., Echeverría O.M. (1995). Activation of osmium ammine by SO₂-generating chemicals for electron microscopy Feulgen-type staining of DNA. *European Journal of histochemistry* 39, 101-106.

143. Vázquez Nin G. y Echeverría O. (1996). The polytene in nucleus in morphological, cytochemical, and functional studies of messenger RNA transcription, processing, and transportation. *Eur. J. Histochem.* 40, 7-16.
144. Vendola K. A., et al. (1998). Androgens stimulate early stages of follicular growth in the primate ovary. *Vol 101, num 12.* 2622-2629.
145. Ventura G. J., et al. (1999). Caspasas: una cascada de proteasas implicadas en la muerte celular por apoptosis. *BEB.* 18(4): 153-165.
146. Yasser Helmy M. (2003). Role of apoptosis in eyelid development. *Experimental Eye Research* 76:115-123.
147. Yuan Y. M., y Rajamahendran R. (2000). Morphological and biochemical identification of apoptosis in small, medium, and large bovine follicles and the effects of follicle-stimulating hormone and insulin-like growth factor-I on spontaneous apoptosis in cultured bovine granulosa cells. *Biology of reproduction* 62,1209-1217.
148. Yuan W. Y Giudice L. (1997). Programmed cell death in human ovary is a function of follicle and corpus luteum status. *Journal and clinical endocrinology and metabolism.* Vol 82, N.9: 3148-3155.
149. Wijsman JH, Jonker RR, Keijer R, Van de Velde CJH, Cornelisse CJ, Van Dierendonck JH. (1993). A new method to detect apoptosis in paraffin sections: in situ end labeling of fragmented DNA. *J Histochem Cytochem;* 41: 7-12.
150. Wyllie A; Kerr J. y Currie A. (1972). Cell Death: The Significance of Apoptosis. *International Reviews of cytology.* Vol 68: 251-306.
151. Zackrisson U; Mikuni M; Wallin A; Delbro D; Hedin L y Brannstrom. (1996) Cell specific localization of nitric oxide synthetases in the rat ovary during follicular development and ovulation. *Human Reproduction (Oxford)* 11(12): 2667-2673.
152. Zachow K; Weitsman S. y Magoffin D. (1997) Hepatocyte growth factor regulates ovarian thecal-interstitial cell differentiation and androgen production. *Endocrinology* 138(2): 691-697.
153. Zucker R. M., et al (2000). Confocal laser scanning microscopy of rat follicle development. *The journal of histochemistry and cytochemistry.* 48(6):781-791.
154. Zwain I. Y Amato P.(2000). Clusterin granulosa cells from apoptotic cell death during Follicular Atresia. *Experimental cell research.* 257,101-110.

AGRADECIMIENTOS

Al Dr. Gerardo Hebert Vázquez Nin, quien ha sido un paciente maestro y me ha apoyado a lo largo de estos años de estudio, siendo un tutor excepcional que me ha mostrado ser un científico extraordinario.

A la Dra. Olga Margarita Echeverría Martínez, por toda su experiencia y enseñanza durante todo este trabajo y por sus valiosos consejos para la correcta elaboración del escrito.

Al Dr. Enrique Antonio Pedernera Asteguiano. Por ser parte de mi comité tutorial, colaborar con sus comentarios en el desarrollo del trabajo y haberme enriquecido con su opinión todo este tiempo.

A la Dra. Teresa I. Fortoul Van Der Goes. Por aceptar formar parte de mi jurado y por la revisión crítica del manuscrito.

Al Dr. Juan Arcadio Molina Guarneros, por aceptar ser parte de mi jurado y por las correcciones pertinentes para la elaboración del escrito.

A la Dra. Rosario Ortiz Hernández por tener toda la disposición y paciencia al enseñarme todo lo relacionado con la metodología de la inmunohistoquímica, además de su apoyo técnico durante esta investigación.

A la M. En C. Ernestina Ubaldo Pérez, por la disponibilidad ofrecida durante todo este tiempo y el apoyo académico y técnico ofrecido.

Al M.V.Z. Mario Soriano Bautista por proporcionarme el material biológico empleado en esta investigación.

A mis amigos Cristian, Abraham, Tere, Gaby, Silvia y Margarita con quienes compartí mis dudas y recibí su apoyo incondicional.

A cada uno de mis compañeros del laboratorio de Microscopia Electrónica por apoyarme durante el desarrollo de este trabajo.

A CONACYT y la DGEP por el apoyo recibido durante mis estudios de maestría.

XI. DEDICATORIA

A mi padre

Con profunda gratitud y respeto, por su amor, comprensión y ayuda siempre incondicional a lo largo de mi trayectoria

A mi madre

Por todo su cuidado, amor y atención cariñosa siempre oportuna.

A mis hermanos

Por su ayuda y amor.

A Ana María

Por ser la compañera que me apoyo y me dio animo en todo momento.

XII. LISTA DE ABREVIATURAS.

ADN	Ácido desoxiribonucleico
ARN	Ácido ribonucleico
EDTA	Ácido etilendiamino tetra-acético
RNP	Ribonucleoproteínas
TUNEL	Terminal deoxynucleotidyl transferase-mediated deoxy-utp nick end labeling
LH	Hormona luteinizante
FSH	Hormona folículo estimulante
FGF	Factor de crecimiento de fibroblastos
EGF	Factor de crecimiento epidermal
TGF β	Factor de crecimiento transformante beta
TNF α	Factor de necrosis tumoral alfa
CA	Cuerpos apoptoticos
TdT	Deoxinucleotidil Transferasa Terminal
ISEL	In Situ End Labeling
GPC	Gránulos pericromatinianos
GIC	Gránulos intercromatinianos
FPC	Fibras pericromatinianas
T.A.	Temperatura ambiente
dH ₂ O	Agua desionizada
ME	Microscopía Electrónica
Ur-Pb	Urani-Plomo
A-O	Amina de osmio.