



UNIVERSIDAD NACIONAL AUTÓNOMA DE
MÉXICO

FACULTAD DE CIENCIAS

Cambios morfológicos en los núcleos de las células de
la granulosa durante la atresia folicular en ratas.

T E S I S

QUE PARA OBTENER EL TÍTULO DE:

BIÓLOGA

PRESENTA:

Aracely Ortiz Delgado

DIRECTORA DE TESIS:

Dra. María Luisa Escobar Sánchez

2016

Ciudad Universitaria, CDMX





Universidad Nacional
Autónoma de México



UNAM – Dirección General de Bibliotecas
Tesis Digitales
Restricciones de uso

DERECHOS RESERVADOS ©
PROHIBIDA SU REPRODUCCIÓN TOTAL O PARCIAL

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

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

Agradecimientos

Al laboratorio de Microscopía Electrónica de la Facultad de Ciencias de la Universidad Nacional Autónoma de México, en donde lleve a cabo este trabajo de tesis.

Al Dr. Gerardo Hebert Vázquez-Nin y a la Dra. Olga Echeverría por abrirme las puertas del laboratorio, por su confianza y apoyo.

A mi asesora la Dra. María Luisa Escobar, quien me guió y corrigió a lo largo del proyecto y por todo lo que aprendí de ella.

A la Dra. Rosario Ortiz por su apoyo, comprensión, cariño y por formar parte de mi jurado.

A las maestras Silvia Juárez y Ernestina Ubaldo por su apoyo técnico y ayuda en el laboratorio.

A la Dra. Maricela y a la Dra. Concepción por las correcciones que hicieron al escrito de este trabajo.

A CONACyT 180526

A Ángel Armando Dámazo Hernández por ser mi compañero, amigo y parte importante durante la elaboración de este trabajo, por enseñarme a valorar los pequeños detalles.

A mis compañeros del laboratorio que se convirtieron en amigos, los cuales siempre me ayudaron, enseñaron y compartieron momentos inolvidables conmigo (Omar, Yunuen, Gerardo, Gethsemany, Gloria, Jesús, Diego, Viri, Max e Itzel) de ustedes aprendí mucho.

A la Dra. Nayeli Torres por todos sus consejos, apoyo, enseñanza y principalmente por su amistad.

A mi familia: mis padres Ricardo Ortiz y Elsa Flor Delgado por ser mi ejemplo de vida, por siempre luchar por nosotros, por todo su amor, apoyo y consejos, pero sobre todo por ser mis amigos; a mis hermanos Flor Ariadna y Ricardo por ser mis amigos y compañeros de vida, porque siempre están conmigo, los amo.

A mis amigos (Norma, Valeria, Sandra, Claudia, Zaira, Yazmin, Sara, Zavala) por su cariño.

Índice

Resumen	1
Abstract.....	3
Abreviaturas.....	4
Introducción.....	6
Ovario	6
Atresia folicular	10
Muerte celular	11
Núcleo celular	14
Envoltura nuclear	15
Matriz nuclear	16
Lámina nuclear.....	17
Cromatina	18
Metabolismo intranuclear del RNA	20
Partículas ribonucleoproteicas no nucleolares.....	23
-Gránulos pericromatinianos (GPC).....	23
-Gránulos intercromatinianos (GIC).....	24
-Fibras pericromatinianas (FPC)	24
-Cuerpos espiralados.....	26
-Cuerpos nucleares	26
-Nucleolo.....	26
Antecedentes	27
Objetivos e Hipótesis.....	27
Material y métodos.....	27

Resultados.....	27
Discusión	27
Conclusiones	27
Referencias	27

Resumen

El ovario de los mamíferos posee una alta tasa de eliminación celular mediante un proceso fisiológico normal conocido como atresia folicular, el cual es un evento que tiene como objetivo eliminar los folículos que no cumplen con las características necesarias para ser seleccionados para la ovulación. La muerte celular que tiene mayor incidencia durante la atresia, es la apoptosis, la cual se caracteriza por una secuencia de cambios morfológicos y de reacciones bioquímicas.

Se han realizado diversos estudios experimentales relacionados con los cambios morfológicos del núcleo celular en diferentes procesos fisiológicos; sin embargo, pocos son los trabajos que se han descrito con relación a la apoptosis en condiciones fisiológicas normales.

Durante el presente trabajo se analizaron los cambios morfológicos que ocurren en los núcleos de las células de la granulosa durante la muerte celular tipo apoptosis en folículos atrésicos de ovarios de rata adulta. Para poder identificar los componentes nucleares en la misma célula, se realizaron cortes seriados. Se emplearon diferentes técnicas preferenciales y/o específicas para identificar a los componentes ribonucleoproteicos y el DNA a nivel de microscopía óptica y electrónica, lo que permitió una detallada observación de los cambios nucleares que ocurren durante el proceso de apoptosis. Se identificaron diversas células con contracción celular que conduce a la pérdida de contacto célula-célula, así como a una fuerte compactación del núcleo, características clásicas de la apoptosis. Se logró definir que el DNA y RNA sufren compactaciones con el avance de la muerte y se distribuye en diferentes regiones del espacio nuclear.

Los resultados evidenciaron que durante la apoptosis de las células de la granulosa, existen diversas modificaciones morfológicas que concluyen en la formación de los denominados cuerpos apoptóticos. Así mismo, se evidenció que la última fase del proceso final de eliminación de estas células, se caracteriza por la formación de estructuras que poseen una naturaleza que incluye no sólo un DNA fuertemente condensado, sino que también están constituidas por otros elementos nucleares igualmente compactados de naturaleza ribonucleoproteica. Las técnicas

preferenciales permitieron definir que ambos elementos nucleares se excluyen al distribuirse diferencialmente en el núcleo con respecto al avance de la muerte, en donde las ribonucleoproteínas terminan siendo rodeadas por el DNA.

Abstract

In mammals the ovary has a high rate of cell elimination, by means a normal physiological process called follicular atresia. This is a process to eliminate the follicles that are not selectable to the ovulation event. During the follicular atresia, the apoptosis is the cell death route with the higher incidence. The apoptosis cell death is characterized by a sequence of morphological changes and ordered biochemical reactions.

There are several experimental studies related to morphological changes of the cell nucleus in different processes, however, few studies have been reported related to the apoptosis process in normal physiological conditions.

During this study, the morphological changes occurring in the nuclei of granulosa cells during the cell death type apoptosis, in ovaries of adult rat atretic follicles were evaluated. In order to identify nuclear components in the same cell, serial sections were made. To identify the ribonucleoproteic components as well as the DNA to optical and electron microscopy level, preferential and / or specific techniques were used. Our results evidenced the presence of cells with cytoplasmic contraction promoting the loss of cell-cell contacts, as well as a strong nuclear compaction, demonstrating the classic features of apoptosis. It was possible to define the both the DNA and the RNA components, were under a compaction process, which was more severe according with the advance of the cell death. Nuclear components were distributed in different regions of the nuclear space, the RNA is distributed in the center of the nuclear body and the DNA is rounding it.

The results showed that along the progress of the apoptosis in granulosa cells, there are diverse morphological modifications, which conduce toward the conformation of the apoptotic bodies. Likewise the final phases of the apoptosis in granulosa cells are characterized by condensed structures conformed not only by DNA strongly compacted, but also of ribonucleoproteins highly condensed. The preferential techniques allowed defining that both elements are distributed differentially in the nucleus in a progressive manner, finally the ribonucleoproteins are rounded by DNA.

Abreviaturas

GnRh	Hormona liberadora de gonadotropinas
LH	Hormona luteinizante
FSH	Hormona folículo estimulante
IGF-I	Factor de crecimiento insulínico tipo I
IGF-II	Factor de crecimiento insulínico tipo II
VEGF	Factor de crecimiento del endotelio vascular
FCE	Factor de crecimiento epidérmico
IMO	Inhibidor de maduración del ovocito
TNF	Factor de necrosis tumoral
ROS	Especies reactivas de oxígeno
DNA	Ácido desoxirribonucleico
RNA	Ácido ribonucleico
rRNA	Ácido ribonucleico ribosomal
tRNA	Ácido ribonucleico de transferencia
hnRNA	Ácido ribonucleico heterogéneo nuclear
mRNA	Ácido ribonucleico mensajero
snRNA	Ácido ribonucleico pequeño nuclear
GPC	Gránulos pericromatinianos

GIC	Gránulos intercromatinianos
FPC	Fibras pericromatinianas
NOR	Regiones organizadoras del nucléolo
RNP	Ribonucleoproteína
AAA	Azul de toluidina ácido-alcohólico
DAPI	4', 6-diamidino-2-fenilindol diclorhidrato
Ur-Pb	Urnilo-Plomo
EDTA	acetato de urnilo 4% - ácido etilen diamino tetracético - citrato de plomo 3%
PTA	Ácido fosfotungstico

Introducción

El aparato reproductor femenino de mamíferos está compuesto por ovarios, tubas uterinas, útero, vagina y vulva. Los ovarios son órganos pares ovalados encargados de liberar a los óvulos, los cuales viajan hacia el útero a través de dos conductos conocidos como tubas uterinas, el útero es el órgano que recibe y contiene el huevo fecundado. La vagina y la vulva en conjunto interviene en la cópula (Gartner y Hiatt, 2002).

Ovario

El ovario tiene dos funciones: la producción de gametos o gametogénesis (donde los gametos en desarrollo se llaman ovocitos y los gametos maduros se denominan óvulos) y la esteroidogénesis que consiste en la producción de estrógenos y progesterágenos.

En el ovario se presentan dos regiones diferenciadas: una central o medular y una cortical o corteza (figura 1).

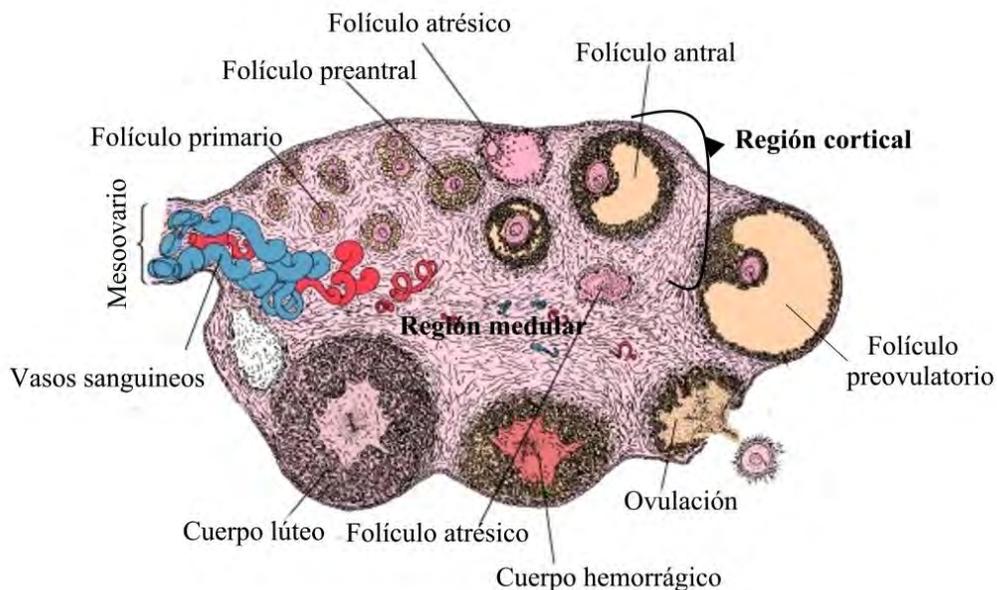


Figura 1. Esquema de un corte de ovario (Ross y cols, 2007).

La región medular es la porción central del ovario que contiene vasos sanguíneos, vasos linfáticos y nervios (Ross y cols., 2007). La corteza se encuentra en la periferia, rodeando a la médula, en el estroma de esta región se distribuyen los folículos ováricos, los cuales representan la unidad funcional básica del órgano, cada uno consta de un ovocito rodeado de células foliculares y de la teca; recubriendo el ovario se encuentra el epitelio germinativo (Gartner y Hiatt, 2002).

El crecimiento folicular llamado foliculogénesis es regulado de manera coordinada por factores endocrinos e intraováricos (figura 2). La acción endocrina está mediada por el sistema hipotálamo-hipófisis-ovario. En este sistema, a partir de una hormona liberadora de gonadotropinas (GnRh), el hipotálamo envía una señal que es recibida en la hipófisis, produciendo la liberación de la hormona luteinizante (LH) y/o la hormona folículo estimulante (FSH) que actúan sobre el ovario. Por otro lado los factores intraováricos pueden inhibir o potenciar la foliculogénesis por medio de esteroides como estrógenos, andrógenos y progesterona, o de péptidos como inhibina, activina, factor de crecimiento insulínico tipo I y II (IGF- I y II), folistatina y factor de crecimiento del endotelio vascular (VEGF), entre otros (Alam, 1998).

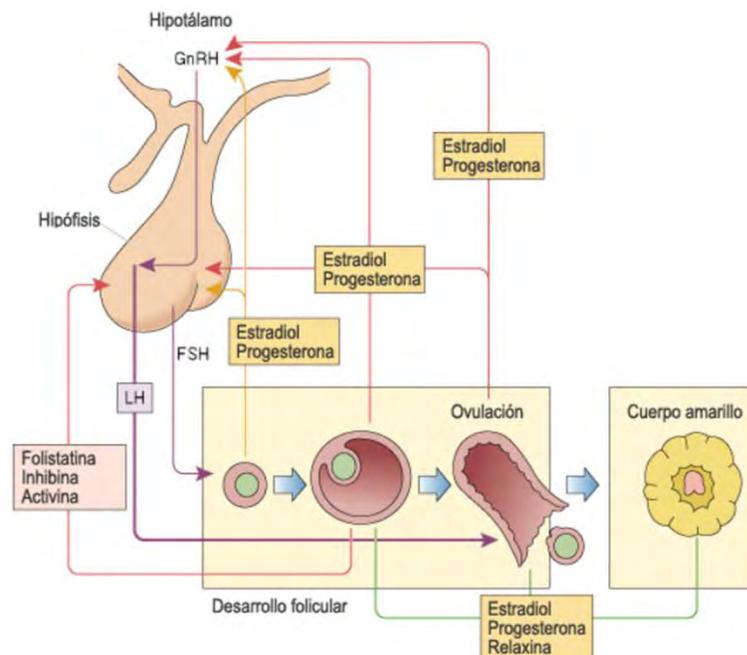


Figura 2. Esquema que ilustra las interacciones hormonales entre el eje hipotálamo-hipófisis-ovario. Hormona folículo estimulante (FSH), hormona liberadora de gonadotropina (GnRH), hormona luteinizante (LH) (Saunders, 2002)

El inicio de la foliculogénesis es controlada principalmente por los reguladores intraováricos y no requiere de gonadotropinas para el crecimiento hasta la transición de la etapa preantral a antral temprana, así como para las fases de selección y de ovulación (Craig y cols., 2007). Además, las interacciones bidireccionales entre los ovocitos y las células somáticas que lo rodean a través de uniones y señalización paracrina son fundamentales en el mantenimiento del crecimiento y desarrollo de ambos tipos de células durante la foliculogénesis (Li y cols., 2008).

De acuerdo a la etapa de desarrollo y dependencia de gonadotropina (Li y cols., 2008), el desarrollo folicular es clasificado en fase primordial, primaria, secundaria y antral (figura 3).

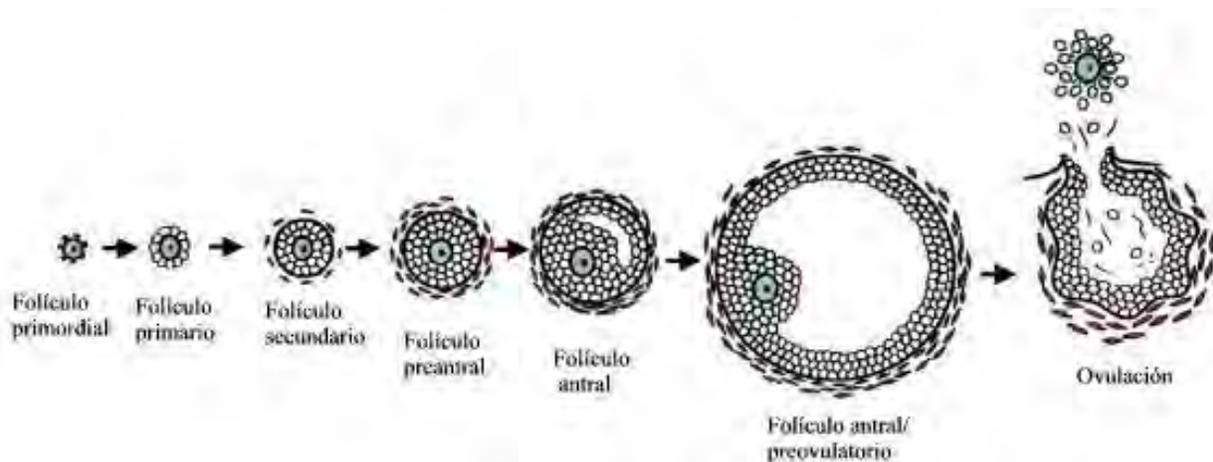


Figura 3. Foliculogénesis según la clasificación de Craig y cols., 2007.

Los folículos primordiales están formados por el ovocito el cual se encuentra rodeado por una única capa de células foliculares planas denominadas de la pre-granulosa, posee un gran núcleo excéntrico que contiene cromatina fina y dispersa, uno o más nucléolos grandes.

Los folículos en crecimiento se subdividen en primarios y secundarios, los cuales requieren varios factores como la hormona FSH, el factor de crecimiento epidérmico (FCE), el factor de crecimiento insulínico tipo I (IGF -I) e Iones de calcio (Ca^{2+}) (Ross y cols., 2007).

En el folículo primario las células foliculares aplanadas proliferan y se tornan cúbicas, al ir creciendo el ovocito secreta una capa gelatinosa rica en glucosaminoglucanos y glucoproteínas que forman una capa gelatinosa entre éste y las células adyacentes, denominada zona pelúcida.

En el folículo secundario las células foliculares se identifican como células de la granulosa estas proyectan finas prolongaciones hasta el ovocito. A medida que proliferan, las células estromales que rodean al folículo forman una capa de células de tejido conectivo, conocida como teca folicular, ésta se subdivide en dos capas: la interna y la externa. La teca interna posee abundantes receptores para la LH, sintetizando y secretando los andrógenos precursores del estrógeno, se encuentra rodeada de haces de colágena y de una rica red de vasos de calibre pequeño. La teca externa está formada por células de tejido conectivo, células musculares lisas y haces de fibras colágenas. Las células de la granulosa proyectan finas prolongaciones hasta el ovocito, que se entrecruzan entre ellos (Ross y cols., 2007).

El folículo antral se forma cuando las capas de la granulosa alcanzan un espesor de 6-12 capas celulares (en humanos), entre estas células comienzan a surgir cavidades llenas de líquido, rico en ácido hialurónico, finalmente se forma una única cavidad con forma de semiluna denominada antro folicular. El ovocito es excéntrico y cesa su crecimiento debido a la presencia de un inhibidor de la maduración del ovocito (IMO), las capas de las células de la granulosa tienen un espesor relativamente regular, excepto en la región asociada al ovocito, donde se forma un montículo grueso, el *cumulus oofuros*, a estas células que rodean al ovocito y permanecen unidos a él durante la ovulación se les conoce como corona radiada (Peluffo, 2002; Ross y cols., 2007).

La última fase es la del folículo pre-ovulatorio, en donde las capas de la granulosa pueden hacerse más delgadas conforme aumenta el tamaño del antro. Mientras crecen los espacios entre las células de la granulosa hay una separación gradual con el ovocito, como fase de preparación para la ovulación. Al mismo tiempo las capas tecaes se hacen más prominentes (Gartner y Hiatt, 2002).

Antes de la ovulación se produce un aumento drástico de la liberación de LH, los receptores hormonales específicos de las células de la granulosa son inhibidos (desensibilizados) y se dejan de sintetizar estrógenos. En respuesta a este proceso, se desencadena el término de la primera división meiótica del ovocito, que se encontraba en el estadio de diplonema de la profase meiótica y se forma el primer cuerpo polar, deteniéndose en la metafase de la segunda división

meiótica y se completa sólo si el ovocito es penetrado por un espermatozoide formándose el segundo cuerpo polar (Ross y cols., 2007).

Después de la ovulación, el folículo colapsa y sufre una reorganización de las células de la teca y de las células de la granulosa para formar el cuerpo lúteo o glándula lútea. El cuerpo lúteo es un órgano endócrino transitorio formado por las células foliculares remanentes del folículo que han liberado al ovocito. Su principal función es la de secretar progesterona, la cual tiene numerosas funciones, entre ellas, el acondicionamiento del útero para el período de preñez y la regulación de las contracciones del oviducto para el transporte del óvulo al útero (Knobil y Neill, 1994).

Atresia folicular

En el ovario de mamífero, muy pocos de los folículos que comienzan su diferenciación están destinados a completar su maduración y llegar a la fase ovulatoria, la mayor parte de ellos degeneran y son eliminados por un proceso denominado atresia folicular. Este proceso de eliminación inicia desde la etapa embrionaria y continúa a lo largo de la vida de los organismos.

Un folículo puede sufrir atresia en cualquier estadio de su maduración, esto juega un papel importante en la eliminación de las células germinales y somáticas en todas las etapas de la ovogénesis e incluso después de la ovulación. Más de 99% de las células germinales del ovario se eliminan a través de distintos tipos de muerte celular, mientras que menos del 1% culmina en oogonios (Tiwari y cols., 2015). En la atresia folicular se observan cambios degenerativos de la pared folicular, que incluyen el cese de la mitosis, expresión de endonucleasas y enzimas hidrolíticas en las células de la granulosa, invasión de neutrófilos y macrófagos, cordones de tejido conectivo vascularizado, se presenta un desplazamiento de éstas células hacia el interior del antro folicular y se presenta una hipertrofia de las células de la teca interna (Ross y cols., 2007).

La atresia folicular se observa inicialmente en la capa de células de la granulosa, seguido por las células de la teca (Tilly y cols., 1991), la muerte de las células de la granulosa y / o la retirada

prematura de éstas privan a los ovocitos de factores de crecimiento y de supervivencia, así como nutrientes que pueden conducirlo a la muerte (Tiwari y cols., 2015).

Muerte celular

La muerte celular programada es un proceso de eliminación intracelularmente controlado, que ocurre de manera fisiológica durante la morfogénesis, así como durante la renovación y eliminación de células anormales, no funcionales, o perjudiciales para la homeostasis del tejido (Jacobson y cols., 1997). Un tipo de muerte celular que adoptan las células es la apoptosis, que se caracteriza por una secuencia de cambios morfológicos y de reacciones bioquímicas.

A nivel morfológico, en las células en apoptosis se observa un encogimiento del citoplasma, las células afectadas pierden la unión y conexión con sus vecinas, se presenta una condensación nuclear, las mitocondrias son modificadas a nivel de la membrana externa (figura 4). Los fragmentos de las células resultantes, son llamados cuerpos apoptóticos, éstos muestran un segundo conjunto de cambios, para su degradación, hay una pérdida progresiva de su arquitectura hasta que presentan una apariencia como la de un gran lisosoma secundario, al final del proceso, la célula apoptótica o sus fragmentos son fagocitados por células vecinas o por macrófagos sin inducir una respuesta inflamatoria (Wyllie y cols., 1981).

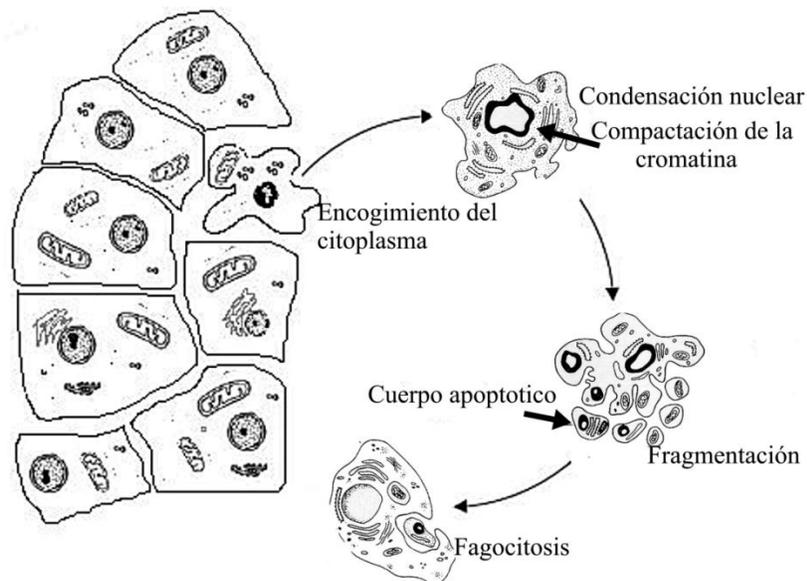


Figura 4. Representación esquemática de los cambios morfológicos que ocurren en una célula durante el proceso de muerte celular tipo apoptosis.

Bioquímicamente hablando, es un proceso dependiente de energía, existe una fragmentación del DNA, se da la participación de proteasas denominadas caspasas. Hasta la fecha, se han identificado 14 caspasas en mamífero, de las cuales 7 intervienen en la apoptosis, todas ellas se expresan como proenzimas inactivas que son activadas proteolíticamente para formar un complejo catalítico tetramérico (figura 5).

Las caspasas cortan diferentes proteínas celulares en un proceso de proteólisis limitada, éstas son capaces de activar a otras de manera jerárquica. Se considera que existen caspasas activadoras, encargadas de poner en marcha la cascada proteolítica que termina en el corte y activación de otras conocidas como caspasas efectoras. La conexión entre el estímulo de muerte y las cascadas proteolíticas está asegurada por proteínas adaptadoras. Estas caspasas se autoasocian en respuesta a un estímulo apoptótico mediante la unión de un predominio N-terminal largo presente sólo en las caspasas iniciadoras, acto seguido se oligomerizan y activan a la primera proteasa en la cascada.

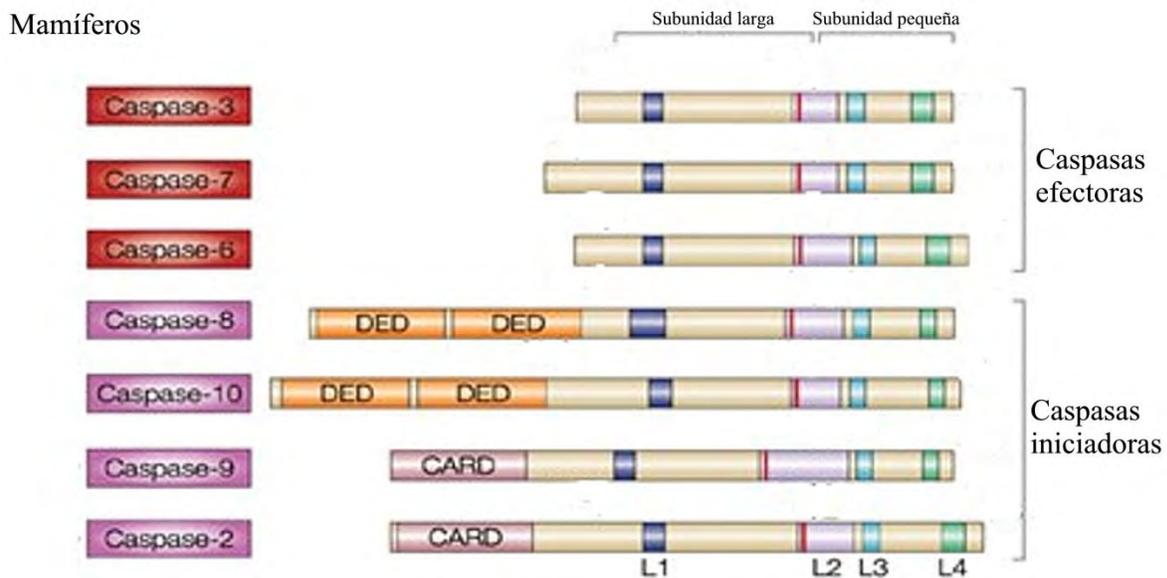


Figura 5. Clasificación de los dos grupos de caspasas que participan en la apoptosis (Stefan y cols., 2004).

La apoptosis puede activarse a través de una vía extrínseca (por un receptor denominado de muerte) o por medio de una vía intrínseca (Jin y El-Deiry., 2005) (Figura 6).

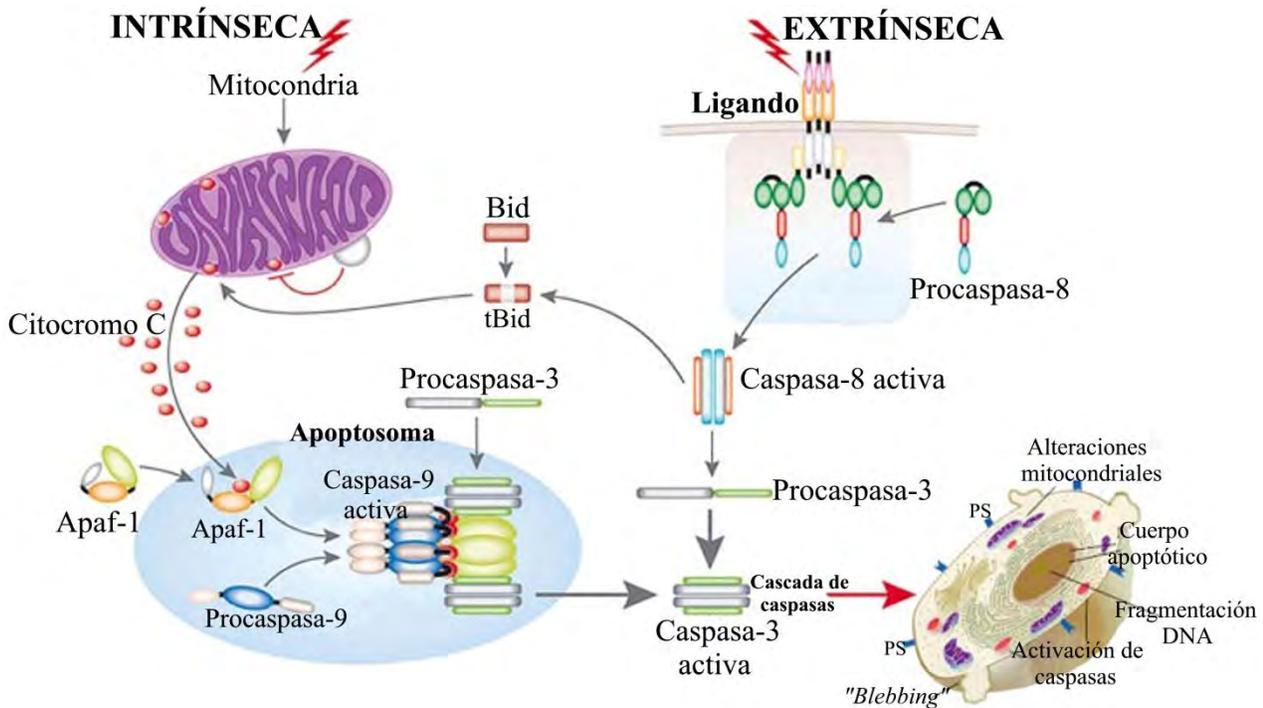


Figura 6. Rutas de activación de la apoptosis (Calvino y Parra, 2010).

La vía del receptor de muerte se activa cuando éste se une a su ligando. Los ligandos de muerte incluyen miembros de la familia TNF y Fas. La activación del receptor provoca que la caspasa-8 (iniciadora) se oligomerice activándose a través de autocatálisis (figura 6); posteriormente, tiene la capacidad de activar a la caspasa-3, ésta escinde proteínas estructurales y reguladoras que dan lugar a la fragmentación del DNA en la región internucleosomal, produciéndose segmentos de 180 a 200 pares de bases y sus múltiplos (Tiwari y cols., 2015) lo que conduce a la muerte de la célula (Jiang y cols., 2003). La vía intrínseca se activa desde el interior de la célula por medio de la mitocondria (figura 6); se caracteriza por la permeabilización de la membrana mitocondrial externa, lo que permite la liberación de factores pro-apoptóticos (por ejemplo, citocromo C, Smac, OMI) al citosol, y la pérdida de las funciones mitocondriales necesarias para la supervivencia celular (Danial y Korsmeyer, 2004). Por otro lado, la caspasa iniciadora (caspasa-8) tiene la capacidad de cortar a la proteína citosólica Bid/CAF, que actúa sobre la mitocondria para la liberación de citocromo C y otras proteínas desde el espacio intermembranal, Bid requiere a Bax (una proteína de la familia Bcl-2 proapoptótica) para su acción en la mitocondria. El citocromo C en presencia de ATP induce un cambio conformacional de la proteína adaptadora Apaf-1, quien posteriormente se une a la caspasa-9 y la dimeriza, lo que permite la yuxtaposición

de dos procaspasas-9, dando origen al complejo proteico denominado apoptosoma. Las caspasas presentes en el apoptosoma, también tienen la capacidad de activar a las caspasas efectoras 3 y 7 que actúan sobre muchos sustratos que afectan a la integridad del citoesqueleto, a la estructura de la lámina nuclear y al DNA, entre otros. Por otro lado, se puede desencadenar la apoptosis cuando el TNF- α dispara el aumento de producción de especies reactivas de oxígeno (ROS) en la mitocondria, lo que ocasiona un estrés oxidativo, estas moléculas causan la liberación de citocromo C, ocasionando la activación de caspasas efectoras (Jin y El-Deiry, 2005).

Núcleo celular

La presencia o ausencia del núcleo es la característica principal que se ha utilizado para definir dos grandes grupos de seres vivos, los procariontes que son organismos que no presentan núcleo, éstos aparecieron antes que los eucariontes sobre la tierra y es a partir de ellos que se originan los eucariontes que ya presentan un núcleo.

Existen dos teorías sobre la forma en que se originó el núcleo, una propone que se formó a partir de la invaginación de la membrana celular de procariontes ancestrales y la otra es que se originó de una endosimbiosis entre dos procariontes muy diferentes, en donde el citoplasma y el núcleo tendrían diferentes antecesores (Gray, 1992; Sogin, 1994)

El núcleo es un compartimento celular limitado por una cisterna interrumpida por poros (figura 7), que contiene al material genético constituido por el ácido desoxirribonucleico (DNA), y los componentes necesarios para la transcripción de la información genética en ácido ribonucleico (RNA), para el procesamiento del RNA y para continuar con la duplicación del DNA (Jiménez y Merchant, 2003)

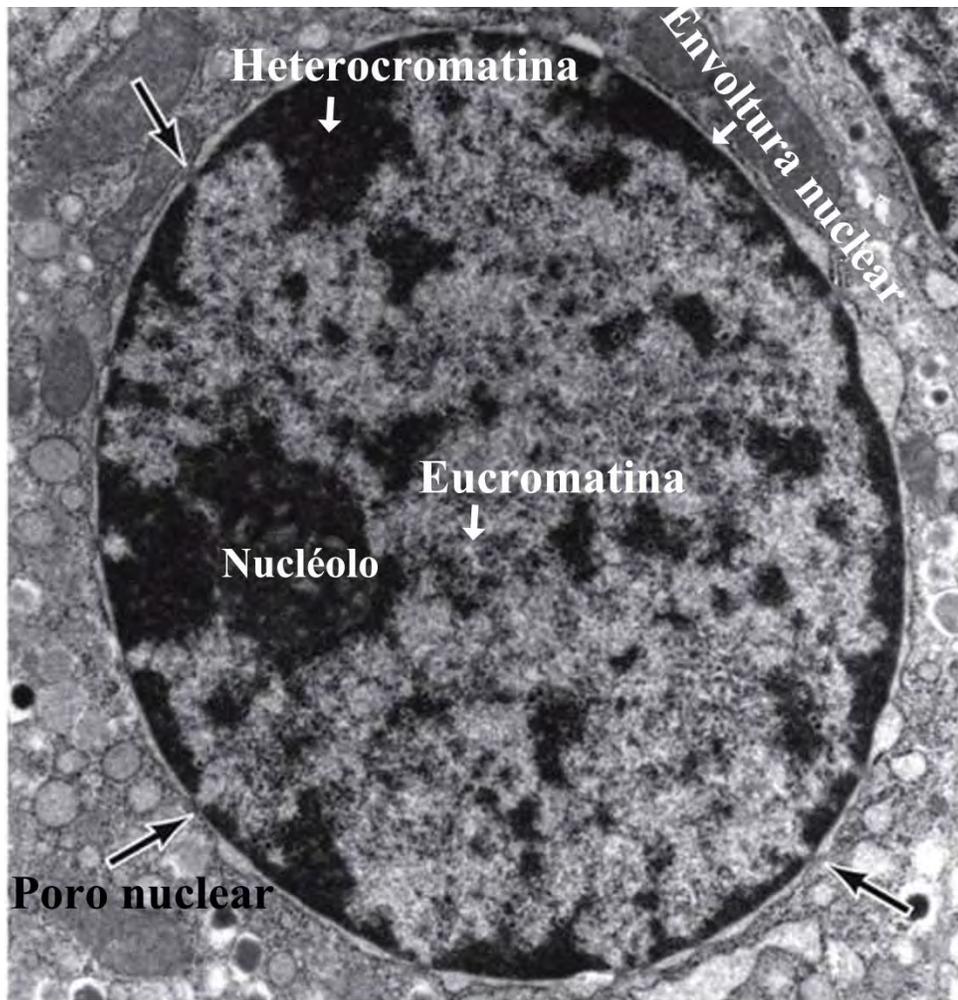


Figura 7. Micrografía electrónica del núcleo de una célula sana, la cual muestra sus componentes (THE CELL 5e., 2009).

Envoltura nuclear

Es una cisterna constituida por dobles capas de fosfolípidos y proteínas. La envoltura nuclear es también llamada cisterna perinuclear y es a menudo continua con cisternas comunes del retículo endoplásmico rugoso, además cuenta con perforaciones de poros que permiten el tránsito de moléculas entre el citosol y el nucleoplasma.

La envoltura nuclear tiene 5 componentes ultraestructurales:

-La membrana interna tiene algunas proteínas que no existen en otras membranas, alberga la mayoría del contenido de inositol en la envoltura nuclear.

-La membrana externa se le pueden adherir ribosomas que sintetizan proteínas no citosólicas, entre ellas, proteínas de secreción, debido al directo intercambio de material con la membrana del retículo endoplasmático, la membrana nuclear puede expandirse y contraerse rápidamente.

-Las cisternas perinucleares que encierran la membrana nuclear interna y la externa, se encuentran separadas del citoplasma y del nucleoplasma.

-Los complejos del poro son estructuras supramoleculares, con una simetría rotacional octagonal de 125 nm de diámetro, con un peso de 120 megadaltones (MDa). Esta formado por una cestilla de fibras nucleares, glucoproteínas que atraviesan la membrana y probablemente sirvan de anclaje, y por alrededor de 100 polipéptidos llamados nucleoporinas, una lámina proteica que forma parte de la matriz nuclear y que se une al complejo del poro.

-La lámina es una red fibrilar proteica unida fuertemente a los complejos del poro y a la cara nucleoplasmática de la membrana nuclear interna, tiene el papel de mantener la estabilidad de la envoltura nuclear (Echeverría y Ontiveros, 2001).

Matriz nuclear

Es un componente dinámico de soporte estructural con funciones relacionadas al genoma, de orden superior e identificable en las estructuras nucleares *in situ*, compuesto de proteínas discretas principalmente matrininas que muestran un patrón fibro-granular y RNA.

El nombre de matriz nuclear fue acuñado en 1974 por Berezney y Coffeyen. Es un sitio de organización de la replicación, transcripción y del proceso post-transcripcional. Está compuesta por dos elementos: uno periférico formado por el conjunto de lámina-complejos de poro, además de nucléolos residuales y otro formado por una serie de estructuras fibro-granulares que ocupan buena parte del volumen nuclear llamados red interna o matriz interna (figura 8). Generalmente contiene proteínas que se unen al RNA mensajero y pre-mensajero, así como a los RNAs de bajo peso molecular ricos en uridina y restos de éstos; además contiene la enzima topoisomerasa II, que cataliza cambios de conformación del DNA, así como una proteína de 95 kDa que reconoce secuencias de bases específicas en el DNA, llamadas secuencias MARs. Las funciones que realiza la matriz interna, al menos parcialmente, son: la duplicación del DNA, la

transcripción no nucleolar y el procesamiento post-transcripcional del pre-mRNA se encarga de la distribución tridimensional de las estructuras y funciones nucleares en forma no homogénea, ocupando regiones diferentes dentro del espacio intercromatiniano, es usada para formar el aparato mitótico (Jiménez y Merchant, 2003; Echeverría y Ontiveros, 2001).

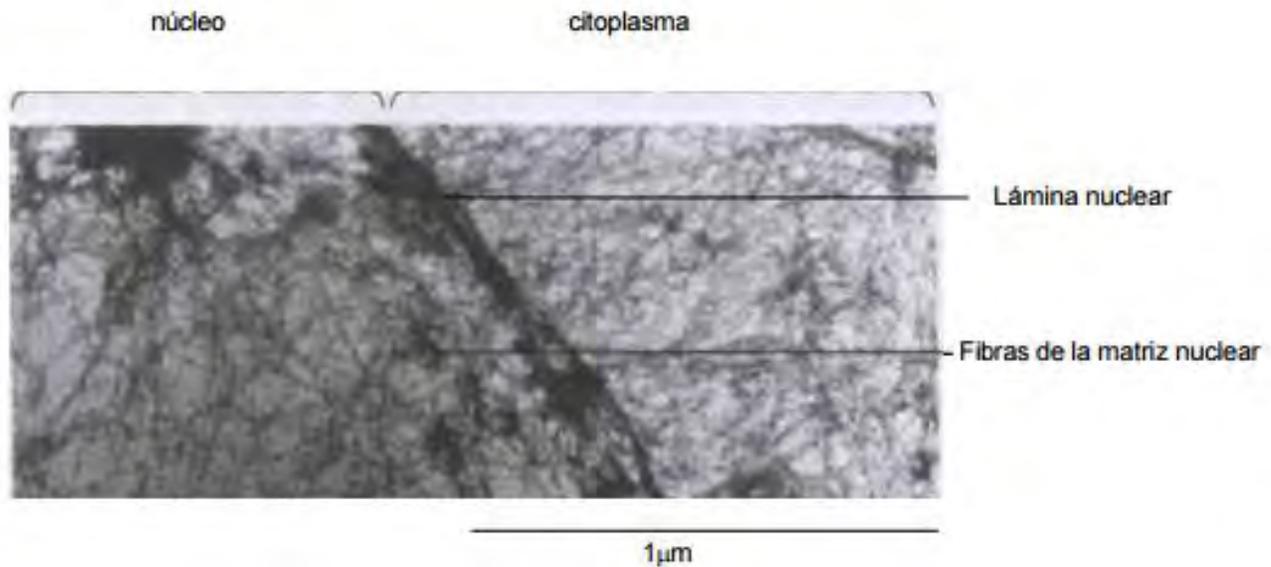


Figura 8. Unión de las fibras de la matriz nuclear a la lámina nuclear (Becker y cols., 2007).

Lámina nuclear

Es una densa red proteica delgada que limita la superficie interna de la envoltura nuclear en las células eucariontes, presenta un grosor de 10 a 20 nm de diámetro, adosada a la cara interna de la membrana nuclear en forma continua, salvo las interrupciones en el borde de los poros nucleares. Está formada por un número variable de fibrillas compuestas por polipéptidos llamadas laminas (figura 8), que son filamentos intermedios, existen tres en mamíferos, dos en aves y cuatro en anfibios. La función de las láminas parece ser la de anclar la cromatina a la envoltura nuclear para estabilizar mecánicamente el núcleo (Brasch, 1990). Actualmente se tiene evidencia de que tienen un papel en la replicación del DNA, la organización de la cromatina, el

arreglo espacial de los complejos del poro nuclear, el crecimiento nuclear y anclaje de las proteínas de la envoltura nuclear (Echeverría y Ontiveros 2001).

Cromatina

La molécula de DNA está constituida por una doble cadena de nucleótidos en la que cada una de sus hebras está formada por uniones covalentes sucesivas entre un azúcar (desoxirribosa) y una molécula de fosfato. Cada azúcar de las dos cadenas está unida a una de las 4 bases nitrogenadas adenina (A), guanina (G), citosina (C) y timina (T). Estas 4 bases tienen distintas posibilidades de unión entre ellas a través de puentes de hidrógeno. Así, la A y la T, tienen 2 puentes de hidrógeno, mientras que la G y la C, tienen 3 puentes de hidrógeno. En el DNA los dos extremos de las dos cadenas complementarias terminan en un grupo fosfato, denominado extremo 5' y un hidroxilo de azúcar en el otro extremo, al que se le denomina extremo 3'. El DNA codifica la información genética mediante combinaciones de las bases, de forma que cada secuencia correlativa de 3 bases (triplete), que se denomina codón, codifica un aminoácido (Martínez, 2010).

Las células eucariotas empaquetan su información genética en la cromatina, constituida por el DNA y una mezcla de proteínas estructurales y reguladoras. Las proteínas que se unen al DNA se clasifican en dos grupos: las histonas y las proteínas cromosómicas no histónicas, las histonas están cargadas positivamente, contienen grandes cantidades de lisina y arginina, éstas se unen directamente a la fibra de DNA por fuerzas no covalentes entre las interacciones electrostáticas de los residuos y fosfatos de DNA (Luger y cols., 1997), las histonas del núcleo están relacionadas con la replicación, la síntesis e incorporación del material genético. La unidad fundamental de la cromatina es el nucleosoma, que a su vez se empaqueta en fibras de 30 nm (Jiménez y Merchant, 2003).

La fibra de cromatina es dinámica; la descondensación y la remodelación de ésta influyen en la accesibilidad de la fibra a factores de proteínas implicadas en la transcripción, replicación y reparación del DNA. En el núcleo, las colas N-terminales de las histonas están sujetas a modificaciones post-traduccionales incluyendo acetilación, metilación, fosforilación, mientras

que la ubiquitinación se produce en la cola C-terminal. Estas modificaciones se cree que influyen en la estructura de la fibra de cromatina (Wang, 2001;Wolffe, 1999) mediante la alteración de la carga electrostática de las histonas y/o a través de la creación de sitios de unión para proteínas no histónicas asociadas a la cromatina.

Durante la interfase los procesos de transcripción y duplicación del DNA están activos. Se pueden visualizar cúmulos de cromatina de diferente tamaño (figura 9) y disposición a la que se le conoce también como heterocromatina, dependiendo del estado de compactación del material cromosómico, éste varía en las diferentes estirpes celulares y no toda la cromatina de cada núcleo existe en el mismo estado de compactación. El resto del material cromosómico está en forma extendida constituyendo la eucromatina, se encuentran situados aquí los genes que son potencialmente expresables y que se transcriben en su copia en RNA, mientras que los genes que se encuentran en la cromatina compacta no se expresan (Jiménez y Merchant, 2003).

En una célula en interfase, aproximadamente el 10% del genoma se encuentra empaquetado en heterocromatina, esta cromatina es inactiva, mientras que la eucromatina se encuentra en forma de cromatina activa (Echeverría y Ontiveros 2001).

En la mayoría de los núcleos interfásicos, la cromatina compacta se distribuye en grumos adosados a la envoltura nuclear, rodeando al nucléolo y distribuidos en el nucleoplasma. La eucromatina forma asas en la periferia de los cúmulos. Esta disposición de la región que rodea los grumos heterocromáticos es donde radica la transcripción más activa, evidenciada por una rápida incorporación de uridina triada (Fakan y Bernhard, 1971). En la década de 1880 se sugirió por Rabl y Boveri que los cromosomas conservan una estructura y distribución específica durante el ciclo celular.

El grado de descondensación es dependiente de la cantidad de transcrito de RNA que se produce, lo que sugiere que la alteración en la estructura de la cromatina de orden superior depende de la transcripción (Gilbert y cols., 2005).

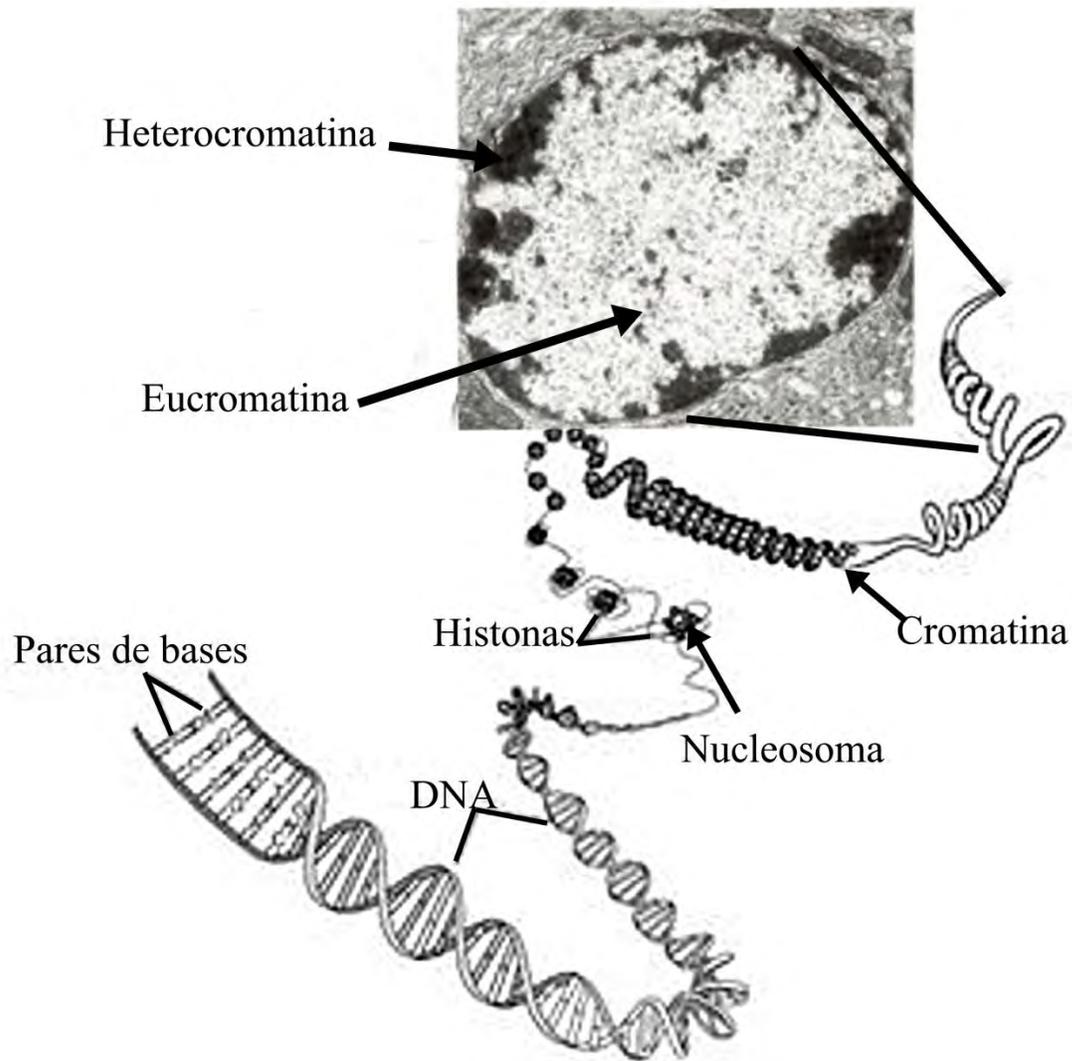


Figura 9. Representación esquemática de la estructura de la cromatina.

Metabolismo intranuclear del RNA

Los ácidos ribonucleicos son polímeros de ribonucleótidos que están unidos por enlaces fosfodiéster, mantienen un arreglo lineal de bases heterocíclicas unidas por moléculas de ribosa fosforilada, las bases heterocíclicas son esencialmente las mismas que en el DNA, pero la timina (T) es substituida por el uracilo (U), contiene bases menores que son modificaciones de las bases nitrogenadas normales, no presenta una distribución equimolar de las purinas y las pirimidinas debido a que la molécula es de una sola cadena (Echeverría y Ontiveros, 2001).

Las moléculas de RNA en los eucariontes son sintetizadas en el núcleo y se encuentran tanto en éste como en el citoplasma, 80% del RNA celular es rRNA (ribosomal), 10% es tRNA (transferencia), y el 10% restante son hnRNA (heterogéneo nuclear), mRNA (mensajero), snRNA (pequeño nuclear) y RNA asociado a organelos. Cada uno de los diferentes tipos de RNA cumple una función celular específica.

Algunos de los snRNA en asociación a ciertas proteínas, están implicadas en la maduración del RNA durante el *splicing* del pre-mRNA, además participan en las reacciones de corte que generan los extremos 3' de algunos RNA de síntesis recientes, los rRNA sirven como componentes estructurales de los ribosomas para la síntesis de proteínas, los tRNA son moléculas pequeñas 80 a 90 bases que funcionan como adaptadores en la síntesis de proteínas, dirigiendo el correcto alineamiento de los aminoácidos en la cadena peptídica en formación (Alberts y cols., 1996).

La transcripción es la primera fase en la síntesis del RNA (figura 10a), los tres aspectos básicos en este proceso son: el ensamblaje del proceso de preiniciación, la formación del complejo de apertura del DNA y la liberación del operón. En los eucariontes hay tres tipos de RNA polimerasas que transcriben diferentes clases de RNA. La RNA polimerasa II sintetiza todos los RNA que son moldes para proteínas los mRNA; las otras dos RNA polimerasas sintetizan las moléculas de RNA que desempeñan papeles estructurales o catalíticos (Echeverría y Ontiveros, 2001).

Los genes tienen una estructura que consiste en segmentos denominados exones e intrones; siendo los exones los que llevan el mensaje para la formación de la proteína. Las dos cadenas del DNA se separan en la zona que codifica el tipo y orden de los aminoácidos de esa proteína (el gen correspondiente). Ese mensaje va codificado en una de las dos cadenas, para transcribir al mRNA, que se trasladará al citoplasma para formar la proteína que codifica ese gen. La cadena contraria a la que lleva el sentido de los aminoácidos de la proteína es la que se copia, manteniéndose así el orden adecuado (el sentido) de los aminoácidos en el mRNA para formar la proteína. Cuando la RNA polimerasa se pone en contacto con el cromosoma, se une fuertemente al encontrar una secuencia específica del DNA llamada promotor, dando lugar a la iniciación de la síntesis. La RNA polimerasa abre una región localizada en la doble hélice, una de estas cadenas

actúa como secuencia patrón para el apareamiento, en el lugar activo de la enzima, se forma una doble hélice RNA-DNA, que es la copia completa del gen (con los exones e intrones) formando un pre-mRNA (figura 10b), al término de la síntesis, se vuelve a formar la doble hélice DNA-DNA que desplaza a la cadena de RNA recién formada dejándola libre. Posteriormente, se produce una separación de los intrones quedando sólo los exones, formando así el mRNA (figura 10c). El proceso de separación de los exones y de los intrones y la posterior unión de los exones se denomina en inglés *splicing*, que significa unión (Martinez, 2010), tiene como resultado que el mRNA mensajero sea traducido por los ribosomas en secuencias de ácidos aminados, para continuar con la maduración del mensajero, se agrega una capucha (cap) en el extremo 5' del RNA naciente y la adición de 100 a 200 unidades de ácido adenílico (poli-A) al extremo 3'. La guanina de capucha deriva del GTP y se une con su extremo 5' al extremo 5' del RNA, luego es metilada. Esta adición da estabilidad a la molécula, impidiendo su pronta degradación por las RNAsas (Jiménez y Merchant, 2003). También es necesaria la fosforilación de las proteínas para el ensamble del *spliceosoma* (Hardford y Morris, 1997), éste asegura el apareamiento correcto en los sitios de corte. Se ha observado que la conformación tridimensional de las secuencias de intrones y exones es importante en el transcrito de RNA (Alberts y cols., 1996).

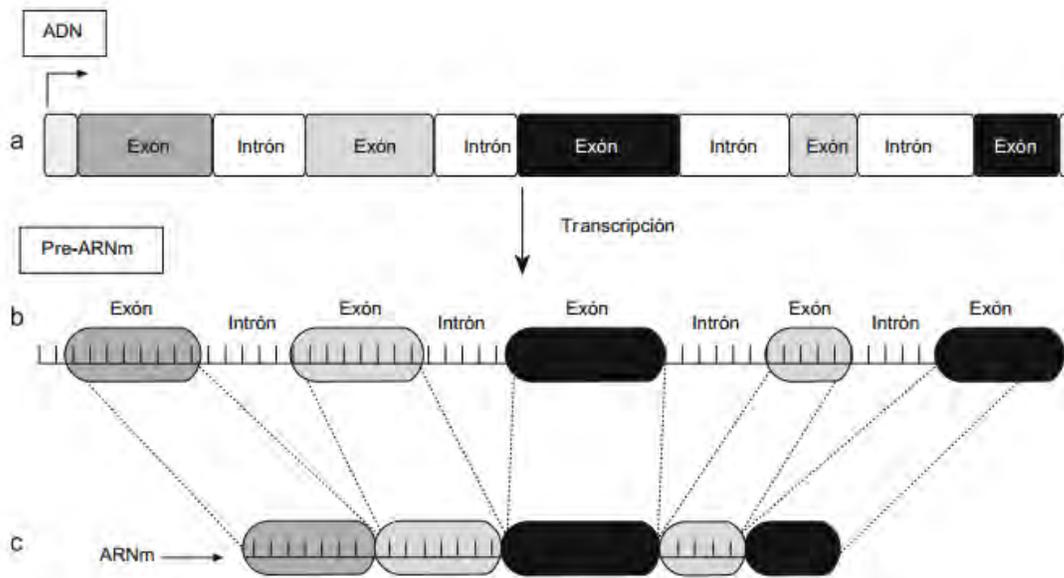


Figura 10. (a) En la transcripción se copia todo el DNA formando un pre-mRNA. (b) Se separan los intrones para permitir la unión de los exones (*splicing*). (c) Formación del RNA mensajero que dará lugar a una proteína (Martínez, 2010).

Hasta finales del siglo pasado se consideraba que un gen codificaba una proteína y como el número de proteínas conocido era de unas 100,000, se pensaba que ese era el número de genes de los seres humanos. Sin embargo, los avances que se produjeron en los últimos años del siglo XX en la tecnología molecular, llevaron al desciframiento del genoma humano, se estableció que el número de genes era de unos 25,000. Uno de los procesos conocidos que explican esa divergencia, es un mecanismo que se denomina transcripción alternativa o unión alternativa, este tipo de transcripción permite que un mismo gen pueda dar lugar a diferentes proteínas mediante la formación de distintos mRNA, a través de distintas combinaciones de los exones en la transcripción.

Partículas ribonucleoproteicas no nucleolares

Existen varios componentes nucleares de naturaleza ribonucleoproteica en el núcleo interfásico como son: el nucléolo, las fibras pericromatinianas, gránulos pericromatinianos, gránulos intercromatinianos, cuerpos espiralados, cuerpos nucleares y polipartículas, éstas presentan diferente distribución y funciones citofisiológicas.

Las partículas ribonucleoproteicas que no forman parte del nucléolo están relacionadas principalmente con el mRNA, desde la transcripción hasta el *splicing*, mientras que en el nucléolo se lleva a cabo el procesamiento de rRNA (Echeverría y Ontiveros, 2001).

-Gránulos pericromatinianos (GPC)

Los gránulos pericromatinianos fueron descritos por primera vez por Watson (1962), son cuerpos esféricos de 30 a 50 nm de diámetro rodeados de un halo claro de 20 a 25 nm (figura 11), dentro de los GPCs se distribuye en forma de fibrillas de 2 a 3 nm el RNA (Vázquez Nin y cols., 1996), existe un ciclo de formación y maduración de estos gránulos, son originados por el plegamiento de las fibras pericromatinianas (Vázquez Nin y Bernhard, 1971; Vázquez Nin y cols., 1996).

Monneron y Bernhard (1969) postularon que los gránulos se relacionan con el transporte de información del núcleo al citoplasma, es un almacén intranuclear de mensajeros maduros, los GPC están en equilibrio entre la síntesis de RNA mensajero y su salida al citoplasma, se ha observado que altos niveles hormonales aumentan la velocidad de salida de moléculas de RNA al citoplasma, por lo que el estradiol tiene un efecto post-transcripcional sobre la expresión genética modulando la velocidad de salida de los mRNAs del núcleo al citoplasma (Vázquez Nin y cols, 1979).

Las zonas transcripcionales están situadas en el borde de la cromatina compacta o en la región intercromatiniana, de manera que el movimiento de las partículas que contienen los mRNAs se lleva a cabo en forma de dispersión por este espacio y luego a lo largo de los canales que desembocan en los poros que existen entre la cromatina compacta adosada a la envoltura nuclear.

-Gránulos intercromatinianos (GIC)

Los GIC están compuestos de RNA y proteínas, son gránulos de 20 a 25 nm de diámetro, polimorfos (figura 11), a veces continuos con fibrillas (Monneron y Bernhard, 1969), el RNA de estos gránulos es de vida media larga (Fakan y Bernhard, 1971), son RNAs de bajo peso molecular ricos en uridina (RNAbpmU). Los cúmulos de GIC son almacenes de la maquinaria de *splicing*, están involucrados en el almacenamiento y/o ensamblaje del *spliceosoma*, posiblemente participan en la regulación del envío y/o coordinación del transporte de todos los RNAs nucleares, carecen de RNA pre-mensajeros, y se localizan en el espacio intercromatiniano. Los GICs existen en plantas, animales y hongos y son muy abundantes en las células de vertebrados (Jiménez y Merchant, 2003).

-Fibras pericromatinianas (FPC)

Fueron descubiertas por Monneron y Bernhard (1969), son fibras de RNP de 3 a 5 nm de diámetro situadas preferencialmente en la periferia de algunos grumos de cromatina compacta

(figura 11), aunque también se encuentran en el nucleoplasma, siempre están altamente enrolladas e irregularmente entre mezcladas, son la expresión morfológica de los transcritos nacientes, así como las estructuras sobre las cuales ocurre el *splicing* de los pre-mRNA (Echeverría y Ontiveros, 2001), éstos llamados heterogéneos nucleares (hnRNA).

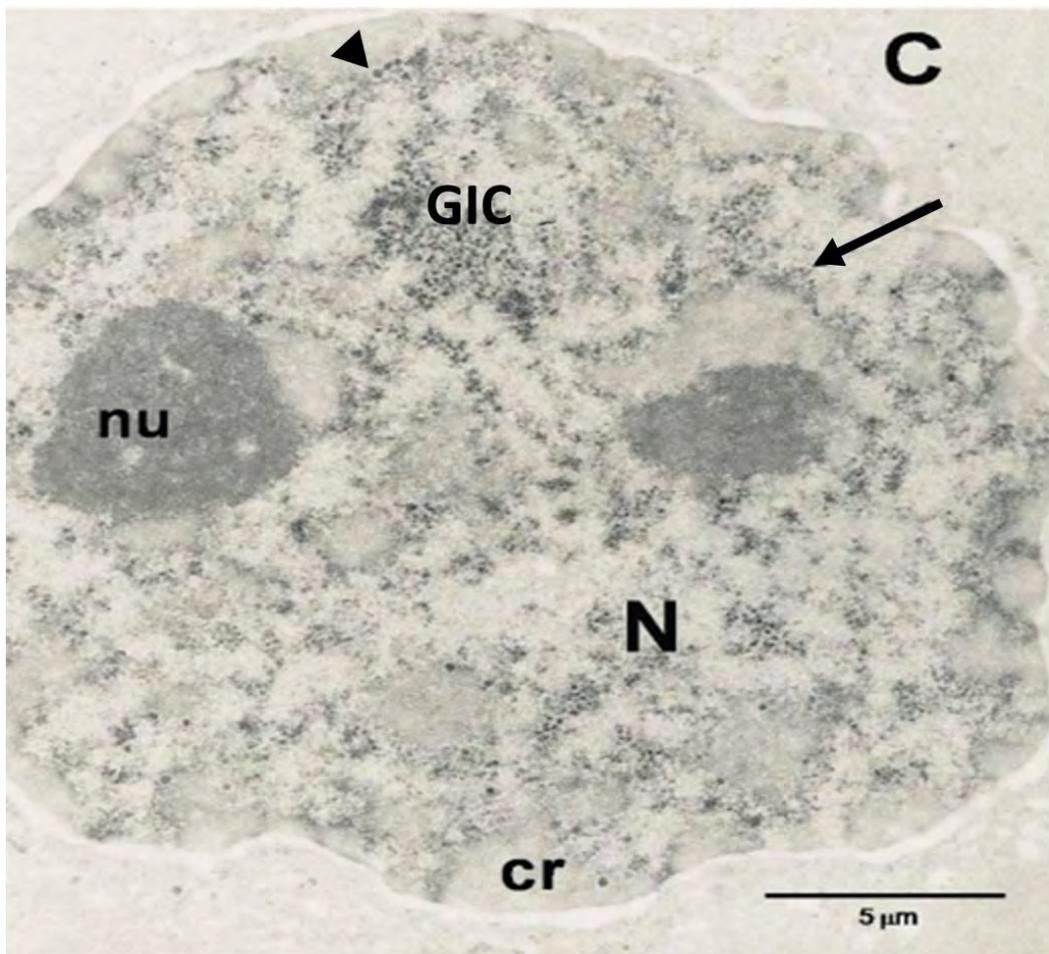


Figura 11. Micrografía electrónica de un núcleo en interfase contrastado con el método de Bernhard para ribonucleoproteínas. Cromatina (cr) la cual se ve con un contraste claro. El nucleolo (nu), los gránulos intercromatinianos (GIC), fibras pericromatinianas (flecha) y los granulos pericromatinianos (cabeza de flecha) que se encuentran formados por RNPs. (Jiménez y cols., 2007).

-Cuerpos de Cajal.

Son agregados esféricos de 0.3 a 0.5 μm de diámetro, formados por fibras espiraladas de 40 a 60 nm de espesor, además de estructuras granulares, están situados en la región intercromatiniana cerca del nucléolo (Monneron y Bernhard, 1969) por lo que se les llamó cuerpo accesorio al nucléolo. Los cuerpos espiralados desaparecen durante la mitosis y se forman en G1 después del reinicio de la transcripción (Lamond y Earnshaw, 1998).

Están formados de componentes relacionados con los factores de *splicing*, como proteínas nucleolares, entre estas están los RNAbpmU (U1, U2, U4, U5 y U6) y sus proteínas asociadas (Carou y cols., 2014). También U3, U7 y fibrilarina (Ochs y cols., 1994; Lamond y Earnshaw, 1998), la proteína de 80 kDa llamada p80-coilina es considerada propia de los cuerpos espiralados, estos cuerpos tienen un papel en el reciclamiento de snRNP, metabolismo de intrones y pueden estar involucrados en el transporte de RNA del nucleoplasma al nucléolo.

Los cuerpos espiralados son estructuras muy antiguas y conservadas por la evolución y han sido encontrados en plantas y animales.

-Cuerpos nucleares

Están constituidos por estructuras esferoides de 0.5 a 2 μm de diámetro compuestas por fibrillas dispuestas en forma circular concéntrica, fibrillas en remolinos o por fibrillas periféricas y gránulos o glóbulos densos centrales. Tratamientos con proteasa y ribonucleasa demuestran la presencia de RNP en estos cuerpos (Luck y Lafontaine, 1982), el papel funcional de estos cuerpos es desconocido, se sugiere una posible relación con los estados de hiperactividad celular (Bouteille y cols., 1967).

-Nucléolo.

Brown, en 1833 describe la existencia de una “areola” dentro del núcleo, en 1836 Valentín introdujo el término de nucléolo, que significa nuececilla (figura 12). En procariontes, la transcripción de los genes ribosomales se encuentra separada en siete regiones distintas a lo

largo del genoma, en cambio, los genes ribosomales en eucariontes se encuentran en tándem y sólo en el núcleo (Echeverría y Ontiveros 2001). En eucariontes, el ribosoma está constituido por dos subunidades, la 40s y la 60s, cada subunidad está formada por rRNA y proteínas.

Es el sitio de síntesis y procesamiento del pre-rRNA y del ensamblado de las subunidades del ribosoma, ultraestructuralmente consta de centros fibrilares, de un componente fibrilar denso y un componente granular, así como por espacios nucleolares (figura 12).

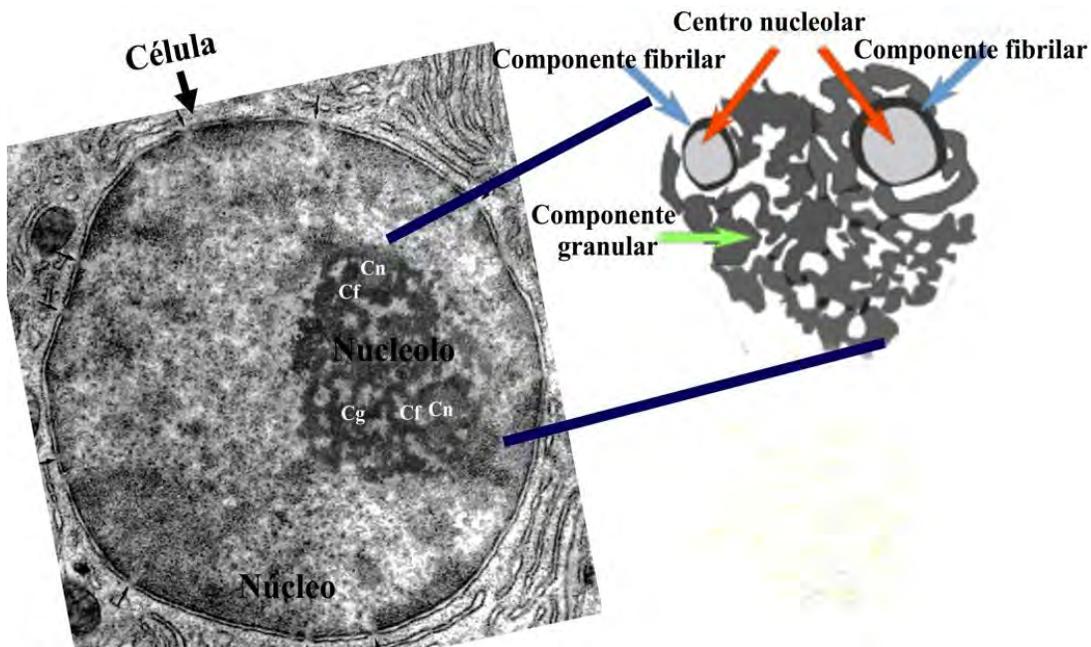


Figura 12. Micrografía electrónica de un núcleo interfásico y representación esquemática de los componentes nucleolares de una célula sana (por Kroustrup)

Está constituido por los genes rDNA, proteínas, rRNA y sus precursores y diferentes UsnoRNA. Durante la mitosis el nucléolo se disgrega y se reorganiza en telofase alrededor de las regiones organizadoras del nucléolo (NOR), a este proceso de reconstrucción nucleolar se le denomina nucleogénesis, puede ocupar hasta un 25% del volumen del núcleo, se encuentra rodeado por cromatina perinucleolar (compacta), a diferencia de los organelos citoplasmáticos, éste carece de membrana que lo delimite, se encuentra constituido por una estructura en forma de red.

Antecedentes

Para transcribir los genes, crecer y dividirse, el núcleo tiene que ser dinámico y prepararse para responder a su entorno, Nielsen y colaboradores (2001) observaron que existen cambios entre la heterocromatina y euromatina, lo que sugiere que existe un mecanismo de unión el cual se puede alterar dependiendo de su entorno nuclear (Gilbert y cols., 2005).

Se han descrito algunos estudios relacionados con los cambios morfológicos del núcleo en las células, en diferentes procesos como son la hibernación y el envejecimiento celular (Malatesta y cols., 2010, 2011), analizando diferentes órganos como el timo (Biggiogera y cols., 1997), el testículo de rata (Courtens y cols., 1991), el cerebelo (Biggiogera y cols., 1990), el hígado (Malatesta y cols., 2010), así como la retina (Segovia, 2015). La mayoría de los estudios que se han realizado con respecto a los cambios morfológicos del núcleo han sido en células HeLa (Biggiogera y cols., 2004). Sin embargo, pocos son los trabajos que se han descrito en relación con la apoptosis. Durante este proceso la arquitectura del núcleo de las células es profundamente afectada, existen informes sobre la segregación de los componentes nucleolares durante la apoptosis en grupos de gránulos compactados, hasta formarse masas finamente granulares adyacentes a la cromatina compacta (Wyllie y cols., 1981).

Los eventos nucleares durante la apoptosis espontánea e inducida por fármacos, han sido documentados con especial referencia a los cambios en la organización y distribución de la cromatina (Falcieri y cols., 1994; Earnshaw, 1995). Sin embargo, no se ha prestado mucha atención a los cambios de distribución de las partículas ribonucleoproteicas (RNPs). La identificación de células apoptóticas fue originalmente basada en características morfológicas, en el cual los signos nucleares más prominentes son los arreglos que adopta la cromatina, condensándose inicialmente en la periferia del núcleo y luego se agrega en una masa granular discreta, el paso final es la fragmentación nuclear (también llamado *cariorrexis*). Una vez que se ha condensado la cromatina completamente, todas las funciones nucleares se ven alteradas. En paralelo, se condensa el citoplasma y se produce la formación de proyecciones citoplasmáticas, formándose cuerpos apoptóticos (Biggiogera y cols., 2004).

Estudios analizados por Biggiogera y su grupo en células bajo condiciones experimentales (inducción de la apoptosis), evidencian que en células del timo no sólo existe una degradación del DNA, sino que también se ven alterados los componentes ribonucleoproteicos. Observaron una clara separación entre los componentes de la cromatina y las estructuras nucleares que contienen RNPs durante la apoptosis (Biggiogera y cols., 1990). En timocitos (Biggiogera y cols., 2004) observaron que existe una disminución en el contenido total de RNA, además que se requería de la síntesis *novo* de RNA para que se llevara a cabo el proceso de muerte. Detectaron que el DNA sólo se encontraba dentro de la cromatina y que ésta se localizaba en la periferia del núcleo, cuya porción central parecía contener RNPs, en ocasiones en forma de grandes agregados de gránulos (Biggiogera y cols., 1997; Pellicciari y cols., 2000).

Biggiogera y su equipo proponen la hipótesis de que las proteínas RNP pueden ser al menos parcialmente degradadas por proteasas en el curso de la apoptosis, esto es apoyado por la evidencia de que la proteína 70-kDa componente de la U1 snRNP se separa durante la apoptosis inducida en células HeLa (Casciola y cols., 1994).

En los mamíferos la atresia de los folículos ováricos se inicia por la apoptosis de las células de la granulosa; ésta puede ser espontánea (durante el desarrollo embrionario o en el control de la homeostasis del tejido) o inducida por estímulos exógenos (mediante la administración de fármacos antitumorales) (Biggiogera y cols., 2004). Las células de la granulosa son las principales productoras de las hormonas sexuales responsables de la función cíclica del ovario. La muerte celular programada en el ovario tiene un papel crucial limitando el número de folículos que pueden ovular y así evitar el desarrollo de más embriones de los que pueden completarse con éxito. Por ello, solamente una pequeña proporción de folículos escapa de la muerte celular programada. Durante el desarrollo embrionario, el número de células germinales disminuye bruscamente por apoptosis al iniciar la meiosis (Frago y cols., 2001), este proceso de eliminación celular, continúa en la etapa post-natal hasta que se agota la reserva de ovocitos que posee cada individuo, de tal forma que existe una muerte celular constante en el ovario. Lo anterior, hace del ovario un órgano interesante para estudiar el comportamiento morfológico de los componentes ribonucleoproteicos durante el proceso de apoptosis, del cual no se tienen estudios descritos hasta el momento.

Objetivos e Hipótesis

Objetivo General

Describir la disposición de los componentes ribonucleoproteicos y del DNA con respecto al avance de la muerte celular en células de la granulosa de folículos atrésicos de rata de 2 ½ meses de edad.

Objetivos Particulares

- Describir las características morfológicas de los folículos atrésicos en ovarios de rata adulta a nivel de microscopía óptica.
- Identificar la distribución de los componentes nucleares (RNA y DNA) en células de la granulosa a nivel de microscopía óptica teñidos con azul de toluidina.
- Analizar la ultraestructura de las células de la granulosa en proceso de muerte celular tipo apoptosis en cortes ultrafinos contrastados con Ur/Pb.
- Identificar la distribución de las partículas ribonucleoproteicas (PRNP) utilizando el contraste preferencial para RNPs (EDTA).
- Describir la distribución del DNA en diferentes etapas de la muerte celular, utilizando el contraste preferencial para cromatina (PTA).

Hipótesis

Se ha observado que durante el proceso de apoptosis las células sufren cambios morfológicos, en los que existe un reacomodo de los componentes nucleares, por lo que esperaríamos que además de observar una fuerte compactación de la cromatina la cual es evidente en los cuerpos apoptóticos, se observarán modificaciones en la distribución de los componentes ribonucleoproteicos que conduce a su posterior eliminación.

Material y métodos

Se utilizaron ratas Wistar hembras adultas de 2 ½ meses de edad vírgenes (*Rattus norvegicus*), la manipulación de los animales se realizó siguiendo los lineamientos éticos de acuerdo a la Norma Oficial Mexicana NOM-062-ZOO-1999 “Especificaciones técnicas para la producción, cuidado y uso de animales de laboratorio” (SAGARPA, 2015).

Las ratas se anestesiaron en una cámara saturada con gases de éter y se colocaron en una bandeja de disección, sujetando las cuatro extremidades, se les hizo una incisión en forma de ojal en la parte baja del abdomen, se descubrió la cavidad abdominal, se identificaron los ovarios y se extrajeron.

Los ovarios se procesaron para microscopía electrónica y se incluyeron en resinas epoxica (Epón) y acrílica (Lowicryl).

-Inclusión en Lowicryl K4M

Una vez extraídos los ovarios fueron fijados con paraformaldehído al 4% y glutaraldehído al 2.5% en buffer de fosfatos salino (PBS) pH 7.2, durante 2 horas. Transcurrido el tiempo, se realizaron 3 lavados con PBS de 10 minutos cada uno, prosiguiendo a una deshidratación con alcoholes graduales por periodos de 60 minutos, empezando por etanol al 30%, después 50%, 70%, 95%, y 2 cambios de etanol 100%. Posteriormente se pre-incluyó en una mezcla volumen-volumen de resina-etanol en diferentes concentraciones: 1 volumen de resina: 1 volumen de etanol; 2 volúmenes de resina: 1 volumen de etanol y finalmente resina pura. Cada cambio con un tiempo de 50 minutos. Se realizó un último cambio de resina pura en el cual se dejó el material toda la noche. Se incluyó con Lowicryl K4M en cápsulas de gelatina, se dejaron polimerizar las muestras en una cámara de luz UV durante 3 días. Todo el procesamiento se llevó a cabo a -20°C.

El material procesado en resina Lowicryl fue utilizado para los diferentes tratamientos de microscopía óptica (Azul de toluidina, ATAA y DAPI) y para electrónica (Ur/Pb y PTA)

-Inclusión en Epón

Extraídos los ovarios fueron fijados con paraformaldehído al 4% y glutaraldehído al 2.5% en PBS pH 7.2, durante 2 horas, se realizaron 3 lavados con PBS de 10 minutos cada uno, se hizo una deshidratación con alcoholes graduales de 10 minutos cada cambio, empezando por etanol al 30%, después 40%, 50%, 60%, 70%, 80%, 90%, 2 cambios de etanol 100% y 2 de óxido de propileno durante 20 minutos. Posteriormente se realizó la infiltración del material biológico con mezclas volumen-volumen de óxido de propileno y resina EPON en las proporciones 2:1, 1:1, y 1:2, cada uno con un tiempo de 12 horas. Se incluyó con resina EPON pura en moldes de plástico, se dejaron polimerizar las muestras a 60°C durante 2 días.

El material procesado en resina EPÓN fue utilizado para los contrastes de microscopía electrónica (Ur/Pb y EDTA).

Microscopía óptica

-Tinciones

En cortes seriados de aproximadamente 750 nm del material incluido en Lowicryl K4M se llevaron a cabo tres tinciones:

a) Azul de toluidina para observar la morfología general. Se colocó un corte semifino sobre un portaobjetos, con la ayuda de un asa, se secó con calor para extender el corte sobre el vidrio y se le colocó una gota de azul de toluidina. Se calentó unos segundos hasta la aparición de un halo plateado alrededor de la gota del colorante, se dejó enfriar y se procedió a lavados con H₂O destilada, se dejó secar y se observaron.

b) Azul de toluidina ácido-alcohólico- AAA (pH 5.2) tiñe preferentemente los componentes ribonucleoproteicos (Smetana, 1967). En una cámara húmeda se colocó el portaobjetos con el corte semifino ya montado, se le agrego una gota de AAA durante 40 minutos, se montó con un medio de montaje acuoso (DAKO), y se observó.

c) DAPI (4', 6-diamidino-2-fenilindol diclorhidrato) colorante que emite fluorescencia azul tras unirse al DNA. Se preparó una cámara húmeda en la que se colocó un portaobjetos con el corte semifino ya montado, se le agregó 20µl de DAPI sobre el corte. La muestra se incubó por 1 minuto con el colorante y se protegió de la luz. Se realizaron 3 lavados con PBS y se montó con un medio para conservar la fluorescencia (vectashield) para DNA y se observó.

Las preparaciones se observaron en un microscopio Nikon Eclipse E600, con un objetivo de 100x, las imágenes fueron tomadas con una cámara digital Nikon DXM1200F.

Se hizo el empalme de las células teñidas con AAA y con DAPI para identificar la distribución de las partículas ribonucleoproteicas y del DNA. Las imágenes obtenidas con la tinción de azul de toluidina ácido-alcohólico, fueron procesadas con el programa Microsoft PhotoDraw versión 2 para obtener una imagen fluorescente con fondo oscuro y de esta manera lograr una sobreposición de las dos técnicas.

Microscopia electrónica de transmisión

-Contrastes

Se realizaron cortes ultrafinos seriados de 60-80nm de folículos atrésicos y se colocaron de forma individual y consecutiva en rejillas de níquel de malla de 60, se llevaron a cabo tres técnicas de contraste, con las cuales se destacó la distribución del DNA y de las partículas ribonucleoproteicas. Para evidenciar al DNA, se utilizó el material incluido en resina Lowicryl K4M y los cortes se contrastaron con ácido fosfotúngstico (PTA) y el material procesado en resina EPÓN para la técnica de contraste ácido etilen diamino tetracético (EDTA) para ribonucleoproteínas, para cada una de éstas, se llevó a cabo un control con un contraste general.

a) Contraste Uranilo-Plomo para observar la morfología general. En cámaras húmedas se colocó una gota de acetato de uranilo al 4%, protegido de la luz y se dejó la rejilla durante 10 minutos, se realizó un lavado con H₂O miliQ. Posteriormente la rejilla se incubó con citrato de plomo 3%

durante 5 minutos en una cámara húmeda provista de un contenedor con lentejas de NaOH para atrapar el CO₂.

b) Contraste PTA preferencial para DNA. Se preparó el ácido fosfotungstico (PTA) 3% de la marca Monterrey, ajustándolo a un pH de 2.5 con hidróxido de sodio; se puso 10 µl de PTA sobre una cámara húmeda, se dejó la rejilla sobre la gota de PTA del lado de los cortes durante 30 min, se hicieron lavados con agua miliQ y se observaron.

c) Contraste preferencial para ribonucleoproteínas con acetato de uranilo 4% - ácido etileno diamino tetracético - citrato de plomo 3% (EDTA). Se prepararon tres cámaras húmedas, en la primera se colocó una gota de acetato de uranilo 4% y se dejó sobre esta la rejilla 1 min, protegiéndola de la luz, en la segunda cámara se puso una gota de EDTA, dejando la rejilla 18 min y por último en la tercera cámara se le colocó un poco de NaOH para atrapar el CO₂ y del otro lado de la cámara una gota de citrato de plomo 4% dejando la rejilla durante 2 min. Entre cada cambio de contrastante se le hizo un lavado a la rejilla con H₂O miliQ.

Las observaciones se llevaron a cabo con un microscopio electrónico de transmisión (JEM 1010, Jeol). Las imágenes se registraron con una cámara digital (CCD-300-RC, MT 1) acoplada al microscopio con el programa Scion Image.

Resultados

Se empleó una tinción con azul de toluidina, permitiendo una observación de las características presentes en folículos sanos, así como alterados. La morfología perteneciente a un folículo sano, indica que las células de la granulosa deben estar en estrecho contacto entre sí y con el ovocito, de esta manera se lleva a cabo el intercambio de nutrientes y de diferentes factores necesarios para un adecuado desarrollo y funcionamiento de la estructura. En la figura 13a, se muestra un folículo antral con características normales, evidenciando un ovocito simétrico que presenta una zona pelúcida conservada. Se observa que existe una interacción entre el ovocito y las células de la granulosa, así mismo, las células de la granulosa también presentan un contacto entre ellas ya que se mantienen unidas, separándose sólo en la cavidad antral. Un folículo en atresia (Figura 13b), pierde todas las interacciones descritas previamente, debido a la separación entre las células, dentro del folículo se pueden encontrar células en diferentes etapas de muerte, desde las sanas hasta cuerpos apoptóticos. Una vez comenzada la muerte celular en las células de la granulosa, ocurre la muerte del ovocito, ya que no hay comunicación entre éstos, el ovocito pierde su forma simétrica (Figura 13b).

Después de realizar las observaciones de la morfología general de las células de la granulosa, se buscó identificar la distribución de los principales componentes nucleares (DNA y RNA) de las células de la granulosa normales y en los diferentes grados de avance de la apoptosis. Para lograr esto, se hicieron cortes semifinos seriados con un espesor aproximado de 750 nm para asegurar de esta forma que se evaluara la misma célula. En el corte 1 como control se realizó un azul de toluidina para observar la morfología general. En el corte 2 se utilizó una tinción para microscopía de fluorescencia que tiñe únicamente al DNA (DAPI). En el corte 3 para identificar al RNA se empleó el azul de toluidina ácido-alcohólico que preferencialmente tiñe a estos elementos. Los resultados indican que dentro de los folículos en atresia, se pueden encontrar células somáticas foliculares con diversas características que incluyen a las sanas, a las que presentan los cambios iniciales de la apoptosis como es el encogimiento del citoplasma e incluso se logran identificar aquellas que ya están en una fase muy avanzada del evento reconocidas como cuerpos apoptóticos (Figura 15a).

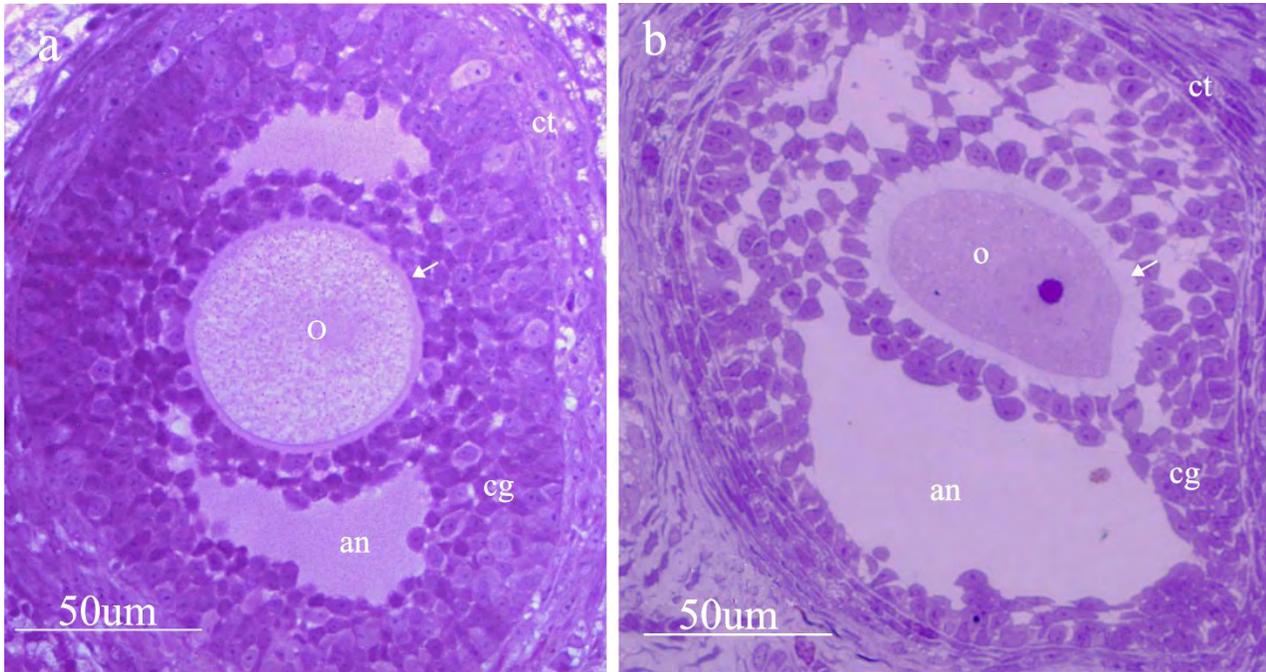


Figura 13. Fotomicrografías de ovario de rata teñidos con azul de toluidina. Ambas imágenes muestran folículos antrales. En a, se observa un folículo sano. El ovocito (O) presenta una forma regular, zona pelúcida conservada (flecha), cavidad antral en ambos polos del ovocito (an) y las células de la granulosa (cg) manteniendo su contacto entre ellas. En b, un folículo atrésico cuya forma ovoide del ovocito (O) indica un proceso de muerte que ya ha empezado. La zona pelúcida que rodea al ovocito (flecha), presenta signos de degradación. Las células de la granulosa han perdido el contacto entre ellas, indicando que se encuentran en proceso de muerte.

El empleo de DAPI hizo posible discriminar la disposición y compactación de la cromatina, excluyendo los sitios correspondientes al nucléolo y/o a otros componentes ribonucleoproteícos (Figura 14b), los que pudieron observarse por medio de la tinción con azul de toluidina ácido-alcohólico (Figura 14c). Es importante mencionar que las imágenes obtenidas con la tinción de azul de toluidina ácido-alcohólico, fueron procesadas para lograr una sobreposición de las dos técnicas usadas, lo anterior permitió que se pudiera hacer un empalme de las tinciones en la que claramente se observa que ambos componentes nucleares se excluyen (Figura 14d).

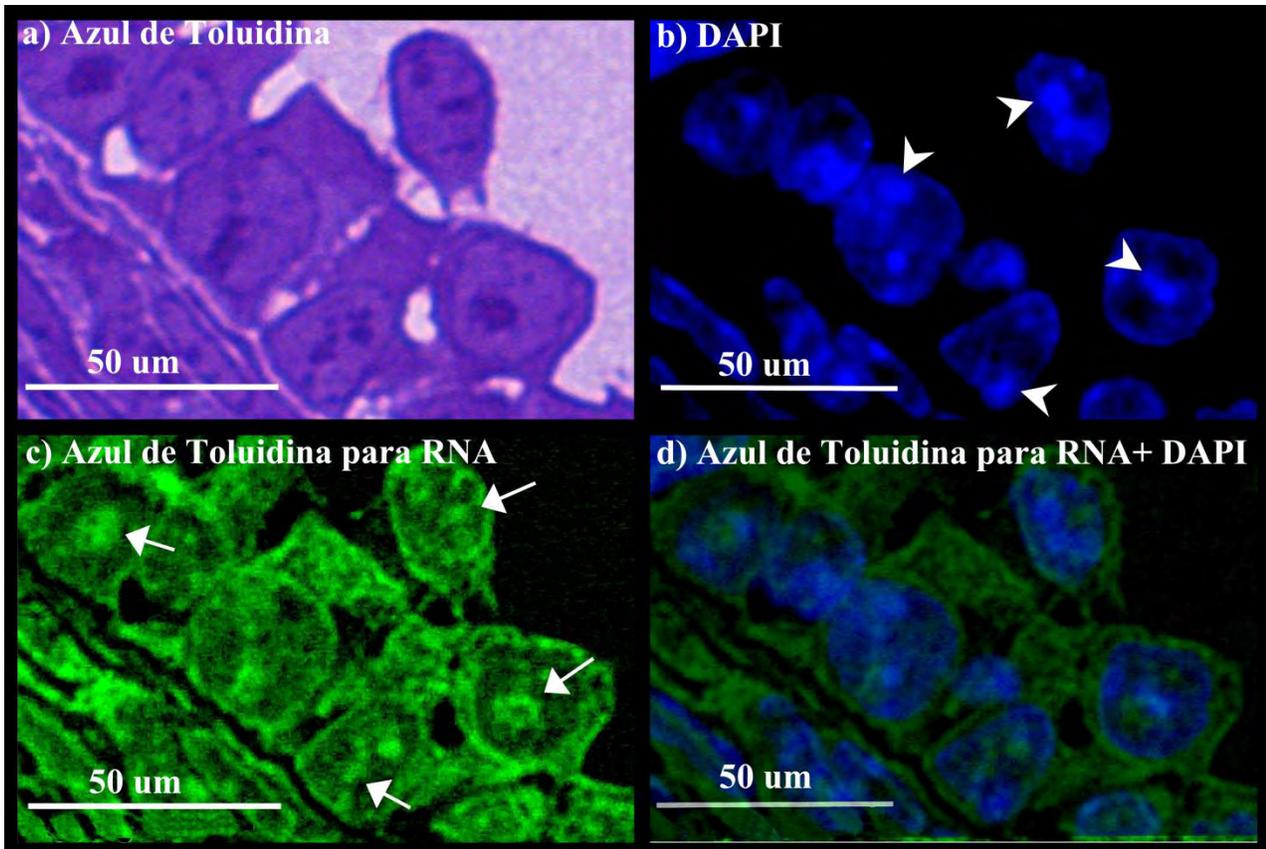


Figura 14. Fotomicrografías con diferentes tinciones de células de la granulosa en un folículo antral. Con tinción de azul de toluidina (a) se muestra la morfología general de las células de un folículo en atresia. La tinción fluorescente DAPI (b) permite observar la distribución de la cromatina (cabeza de flechas) y la tinción con azul de toluidina para RNA (c) la de las ribonucleoproteínas tanto en el núcleo (flecha) como en el citoplasma. En la sobre posición de DAPI con azul de toluidina para RNA (d) se aprecian las zonas de exclusión de DAPI que corresponden a los sitios de localización del nucléolo y de las ribonucleoproteínas.

En células sanas la cromatina se encuentra distribuida en el volumen nuclear, se pueden observar zonas con mayor intensidad de tinción, evidenciando a la cromatina en forma más compacta. Las regiones verde fluorescente corresponden al nucléolo. También se pudo observar algunos cuerpos apoptóticos que se identificaron por una fuerte concentración del colorante (Figura 15). La tinción preferencial para ribonucleoproteínas permitió distinguir la forma y la distribución del nucléolo en diferentes etapas del avance de la apoptosis, debido a los ribosomas adheridos al retículo endoplásmico rugoso se logró observar el lado citoplasmático y por lo tanto la positividad de la técnica. En células normales los nucléolos se encuentran concéntricos, de tamaño grande con respecto al núcleo, las regiones sin teñir evidencian los espacios que son

ocupados por DNA. Las células alteradas muestran una regionalización de los componentes ribonucleoproteicos, estas son más evidentes en las etapas avanzadas de eliminación celular (Figura 15d), lo cual puede ser claramente observado en la imagen de sobreposición. Dentro de los núcleos apoptóticos se observó que además de que la cromatina está fuertemente compactada, las ribonucleoproteínas también sufren procesos de agrupación. En las etapas finales, los cuerpos apoptóticos se encuentran formados por una región central de ribonucleoproteínas rodeada por cromatina (Figura 15). En conjunto, estas tinciones permitieron en primer lugar observar el encogimiento que presentan las células que inician el proceso de muerte, provocando la separación entre éstas, y el acomodo de los componentes nucleares en los llamados cuerpos apoptóticos (Figura 15).

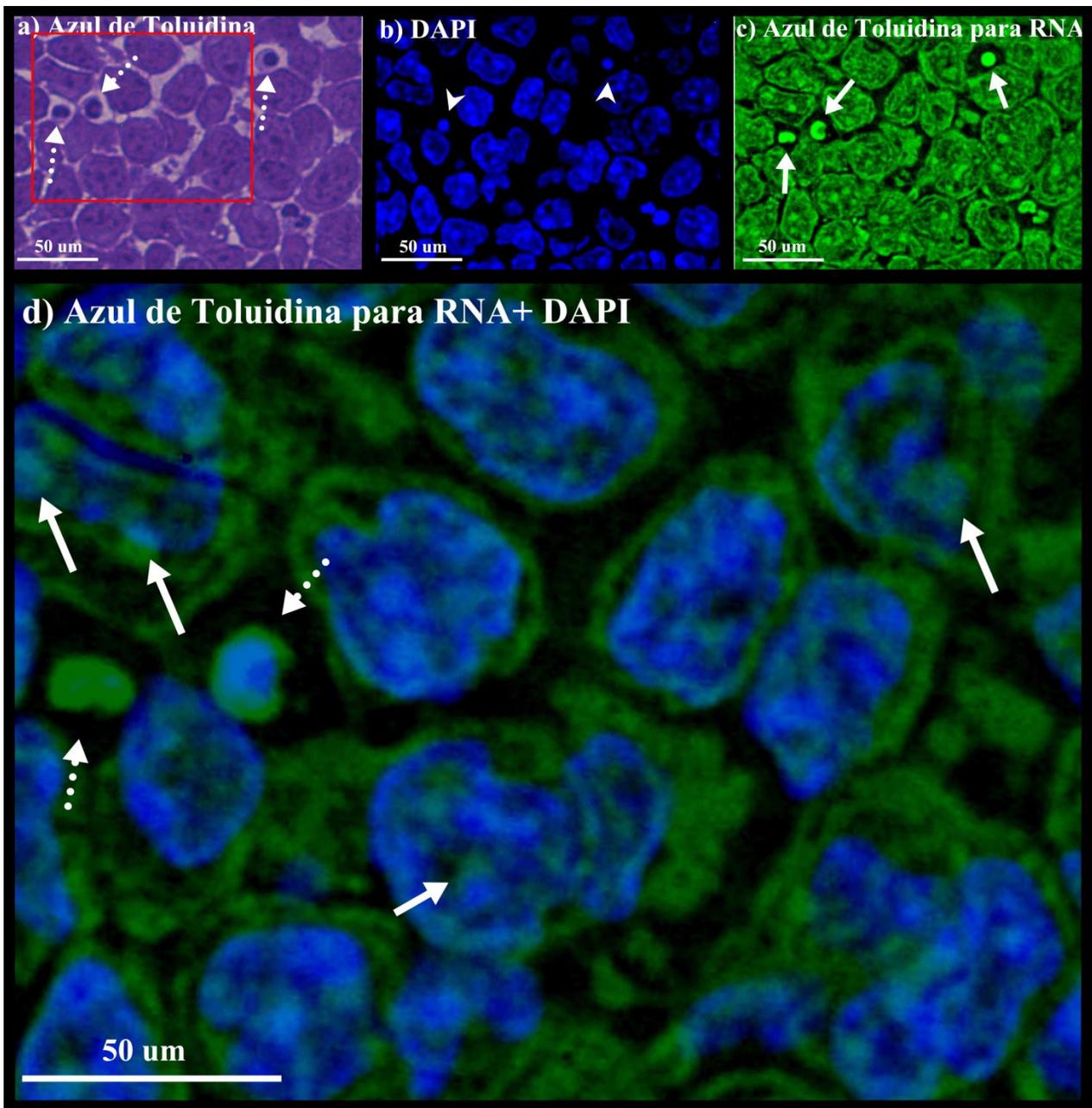


Figura 15. Fotomicrografías de células foliculares de un folículo atrésico. Con tinción de azul de toluidina (a) se muestra la morfología general de las células de un folículo en atresia, las células separadas debido al encogimiento de los citoplasmas, algunos cuerpos apoptóticos (flechas punteadas) evidencian las fases avanzadas de la muerte celular. La tinción fluorescente DAPI (b) permite observar la distribución de la cromatina (punta de flecha) y la tinción con azul de toluidina ácido-alcohólica (c) las ribonucleoproteínas (flechas). En la sobreposición de DAPI con azul de toluidina para RNA (d) se aprecian las zonas de exclusión de DAPI que corresponden a los sitios de localización del nucléolo y de las ribonucleoproteínas (flecha), así mismo, se puede observar que tales componentes se regionalizan con el avance de la compactación de la célula (flechas punteadas).

Una vez que se identificaron a nivel de microscopía óptica los diferentes componentes nucleares de las células de la granulosa en diferentes avances de apoptosis, se buscó describir tales elementos a nivel ultraestructural para obtener mayor detalle de los cambios que conlleva la apoptosis en estas células y de los elementos ribonucleoproteicos que no se pueden distinguir a nivel de microscopía óptica.

Inicialmente se utilizó un contraste general con acetato de uranilo y citrato de plomo para observar las diferentes características ultraestructurales de las células normales y de las alteradas. Es importante aclarar que se emplearon cortes contiguos para realizar las diferentes técnicas de contraste y de esta forma, lograr observar los diferentes componentes nucleares en la misma célula. Las células normales se evidencian por poseer una forma cúbica, con citoplasmas extendidos de tal manera que mantiene un estrecho contacto con las células que la rodean, lo que permite que se encuentren comunicadas. Un cambio importante de las células que inician el proceso de apoptosis en los folículos en proceso degenerativo es precisamente la pérdida de contacto lo cual indica una contracción celular (Figura 16).

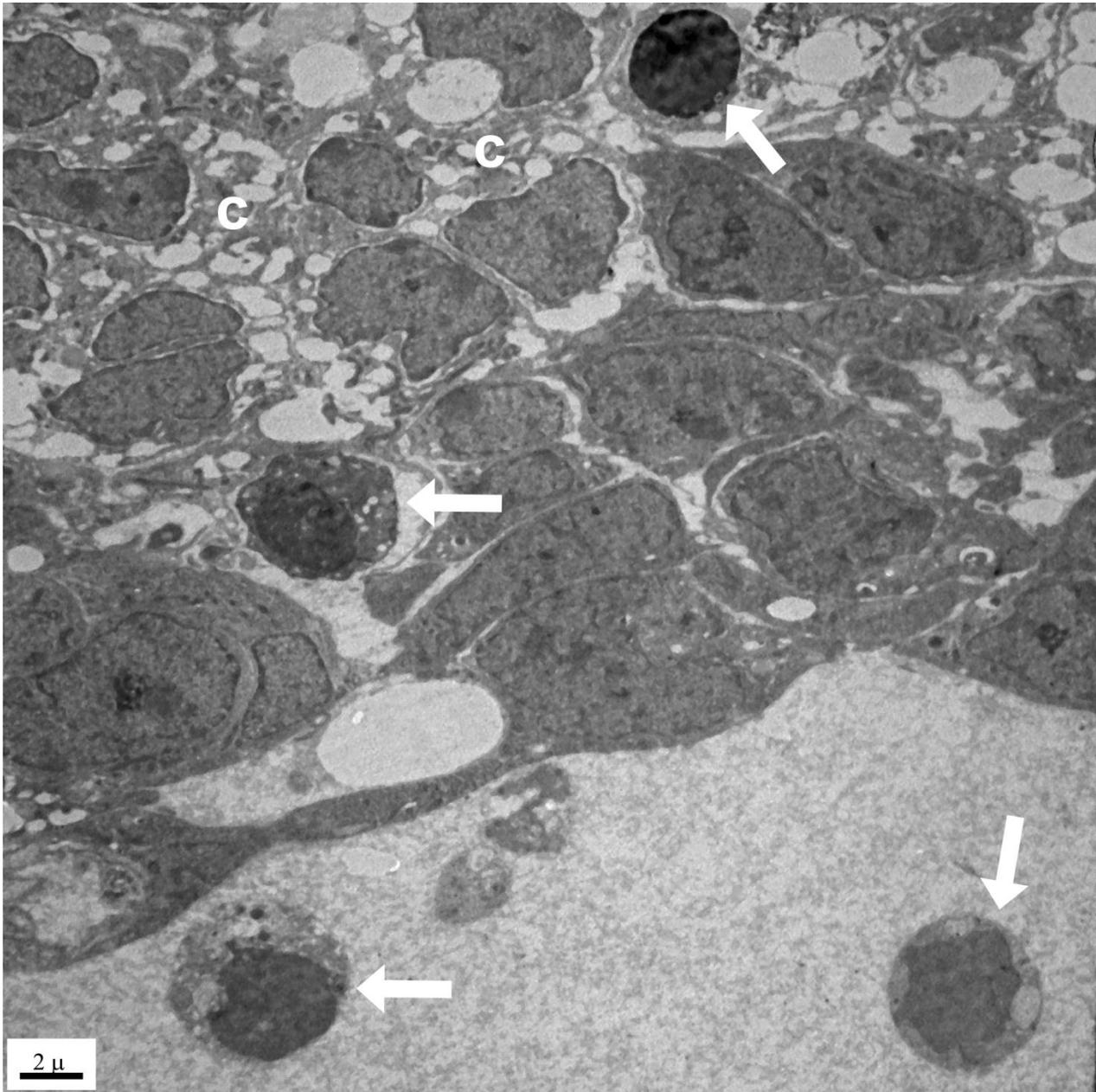


Figura 16. Micrografía electrónica de una región de un folículo antral atrésico contrastado con Ur/Pb. Se observa la pérdida de contacto de las células de la granulosa debido al encogimiento citoplasmático, el citoplasma de algunas células se encuentra con una gran cantidad de vacuolas (c), hay presencia de cuerpos apoptóticos (flechas).

Posteriormente, en cortes contiguos se utilizó la técnica de contraste general Ur-Pb para el corte 1 y para el corte 2 una solución preferencial para DNA ácido fosfotúngstico (PTA); por otro lado, nuevamente al corte 1 se le hizo un contraste general y al corte 2 un contraste regresivo para ribonucleoproteínas (EDTA). Lo anterior permitió discriminar tanto al DNA como a los diferentes componentes ribonucleoproteicos respectivamente, de esta manera se observó de forma más específica a los componentes nucleares y su distribución durante la apoptosis.

Los resultados evidencian los diferentes grados de compactación de la cromatina, así como el reacomodo de la misma en el avance del proceso de eliminación. Las técnicas que permitieron identificar al RNA (EDTA) hicieron posible determinar que las modificaciones nucleares no sólo se deben a los cambios en la cromatina, sino también de los componentes ribonucleoproteicos.

En las células normales de la granulosa (sanas) se observó a la cromatina en sus diferentes niveles de organización, en estas células la cromatina compacta (heterocromatina) adosada a la envoltura nuclear generalmente es poca, la cromatina laxa (eucromatina) se encuentra distribuida en el nucleoplasma (Figura 17). En la región citoplasmática, el contraste es bajo, pero se puede apreciar la estrecha relación entre las células vecinas. Las regiones claras en el núcleo de la imagen con el contraste preferencial para DNA (PTA) demuestran que posee componentes de diferente naturaleza a la cromatina que podrían corresponder a ribonucleoproteínas ya que se observa un gran ambiente fibro-granular y un nucléolo reticulado (Figura 17).

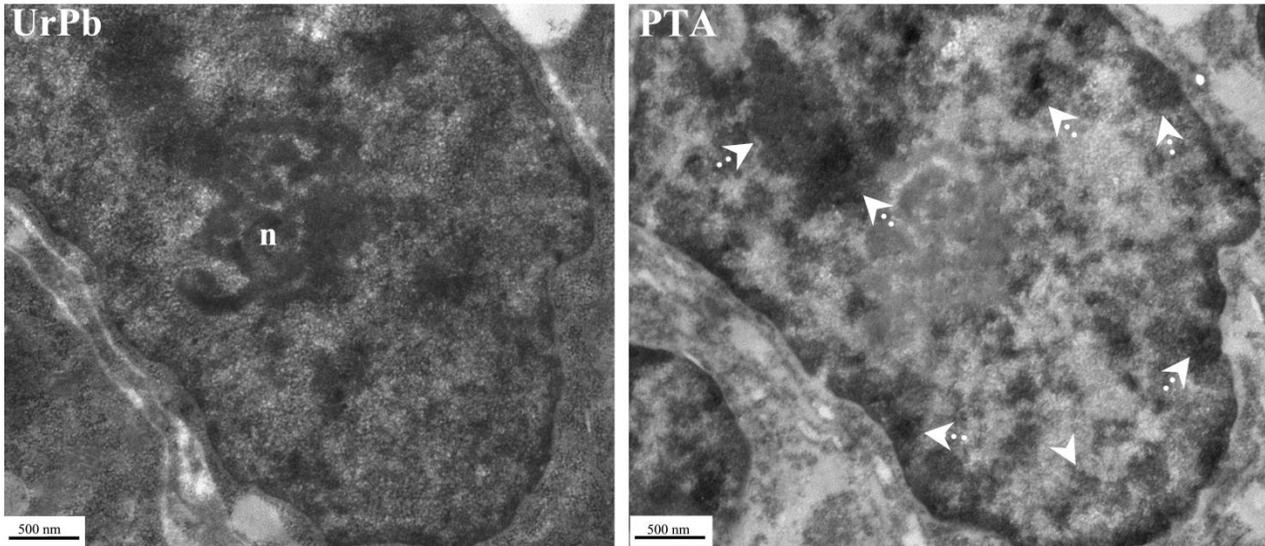


Figura 17. Micrografías electrónicas de cortes contiguos de una célula de la granulosa sana con un contraste general Ur/Pb (izquierda), se distinguen cúmulos de cromatina compacta y un nucléolo en el centro (n). En el corte contiguo un contraste preferencial para DNA (PTA), muestra cúmulos de cromatina compacta adosada a la envoltura nuclear y en el nucleoplasma (flecha punteada), cromatina laxa distribuida en el núcleo (cabeza de flecha).

En las células que inician el proceso de muerte, se logra observar el encogimiento citoplasmático con alteraciones, así como una contracción nuclear. Los cambios morfológicos dados por la redistribución y compactación de la cromatina son claramente observables cuando las células son contrastadas con la técnica de PTA, en donde se puede apreciar que comienza una agrupación de toda la cromatina a la periferia del núcleo (Figura 18).

Las regiones claras observadas en las células contrastadas con PTA, corresponden a diferentes componentes ribonucleoproteicos.

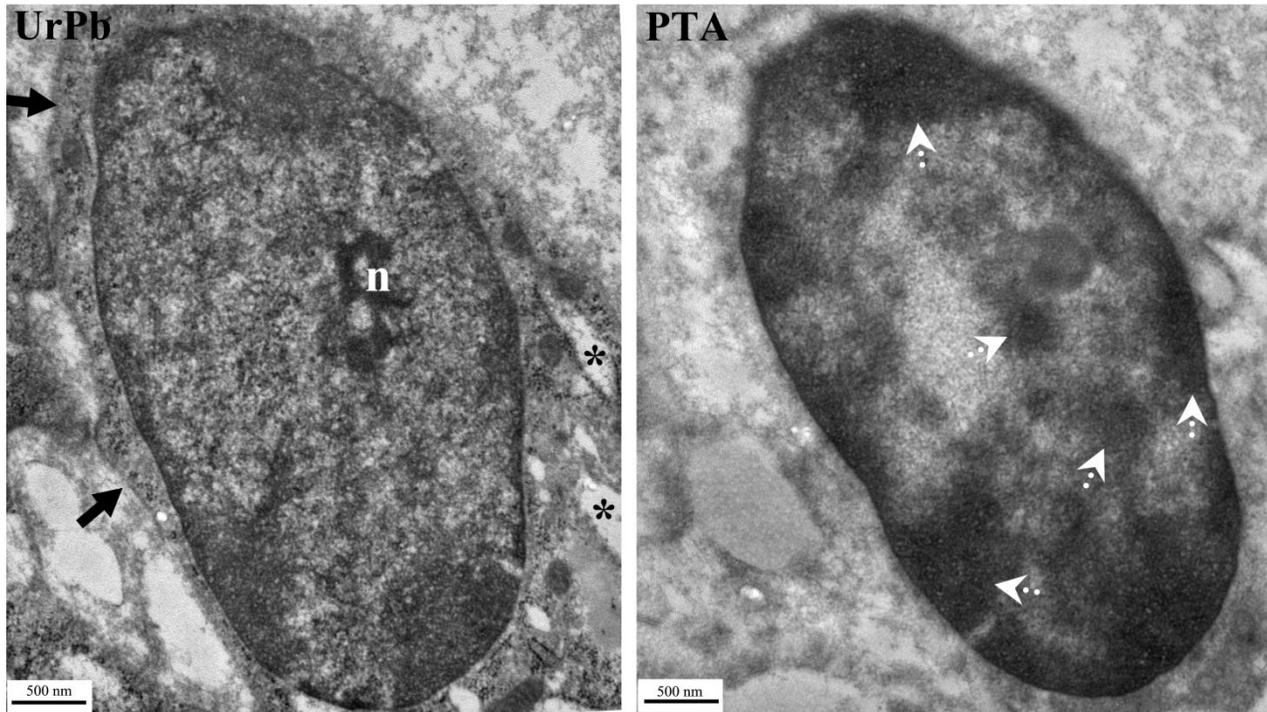


Figura 18. Micrografías electrónicas de cortes contiguos de una célula de la granulosa al inicio del proceso de muerte. En el contraste general con Ur-Pb (izquierda) se logran apreciar alteraciones en el citoplasma, como su encogimiento (flecha negra), la presencia de algunas vesículas (asterisco). En el núcleo se observa un gran ambiente fibro-granular y una pequeña sección del nucléolo (n). En el corte contiguo un contraste con PTA que muestra los cúmulos de cromatina compacta a la periferia del núcleo (flecha punteada) y una amplia distribución de cromatina laxa en el núcleo.

Las observaciones realizadas permitieron que se pudieran identificar diferentes grados de avance de la apoptosis, de tal forma que se logró identificar distintos arreglos ultraestructurales a lo largo del proceso, en donde la compactación de la célula y de la cromatina cada vez es mayor. La figura 19 muestra dos cortes contiguos de una célula alterada, el contraste con Ur-Pb permite apreciar que el citoplasma se encuentra fuertemente alterado, muy compactado y la envoltura nuclear dilatada. En la región nuclear se pueden ver diferentes componentes nucleares en donde los cúmulos de cromatina compacta se ubican en la periferia del núcleo, así como en el espacio intranuclear. El contraste con PTA permite discriminar al DNA y con éste se logra definir que el

arreglo predominante de la cromatina es el compacto; de igual forma, se observan grandes espacios claros que corresponderían a componentes ribonucleoproteicos.

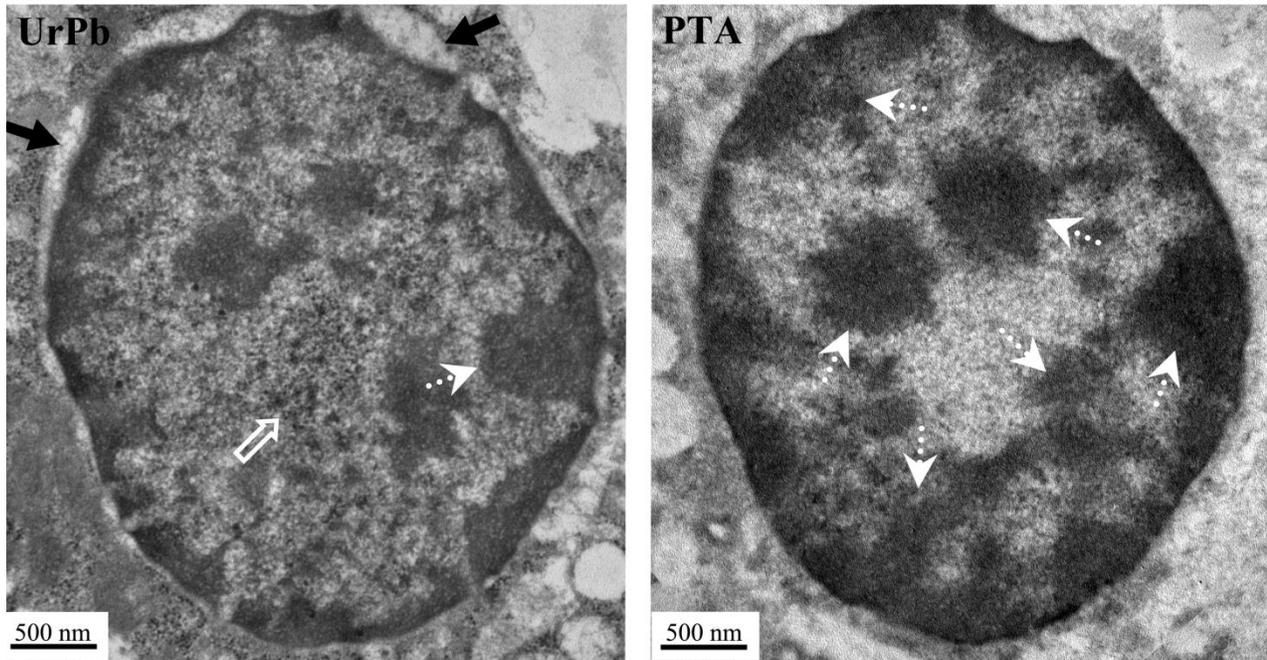


Figura 19. Micrografías electrónicas de cortes contiguos de una célula de la granulosa en proceso de muerte. Los cortes fueron contrastados con Ur/Pb (izquierda), se puede observar la dilatación de la envoltura nuclear (flecha negra) la distribución de la cromatina compacta (flecha punteada), entre los cúmulos de la cromatina hacia el centro del núcleo se observa un cúmulo de ribonucleoproteinas (contorno de flecha). En el corte contiguo un contraste con PTA evidencia la distribución de la cromatina (flecha punteada) y como ésta se encuentra fuertemente compactada dentro de todo el núcleo con una aparente organización a la periferia del núcleo.

En las células que se encuentran en un proceso avanzado de apoptosis, toda la cromatina compacta está regionalizada en la periferia y el volumen nuclear es mucho menor que en una célula normal. La intensa compactación del DNA, no permite identificar otros elementos nucleares de forma clara y todo parece indicar que en el centro del núcleo no hay cromatina. Lo anterior es corroborado con las observaciones en material contrastado con PTA, en donde se

logra observar cromatina compacta fuertemente contrastada con un arreglo perinuclear y el centro nuclear claro (Figura 20).

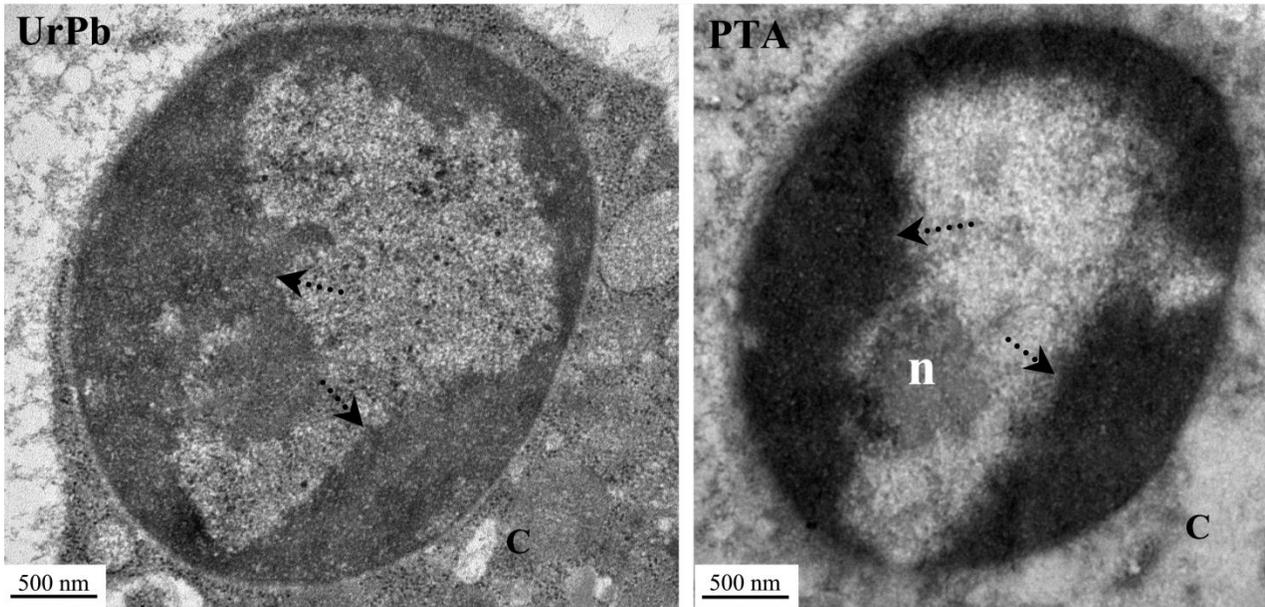


Figura 20. Micrografías electrónicas de una célula apoptótica con un contraste general (Ur/Pb), se muestran alteraciones como la contracción del citoplasma (c), la fuerte compactación de la cromatina (flecha punteada). En el corte contiguo un contraste con PTA, el cual muestra únicamente la distribución de la cromatina fuertemente compactada, adosada a la envoltura nuclear (flecha punteada), se observa una estructura gris claro que sugiere la localización del nucléolo (n) y los componentes citoplasmáticos no han sido contrastados.

En un cuerpo apoptótico que es la fase final del proceso de muerte, la cromatina está fuertemente compactada, con pequeños espacios conteniendo algunos componentes ribonucleoproteicos (Figura 21).

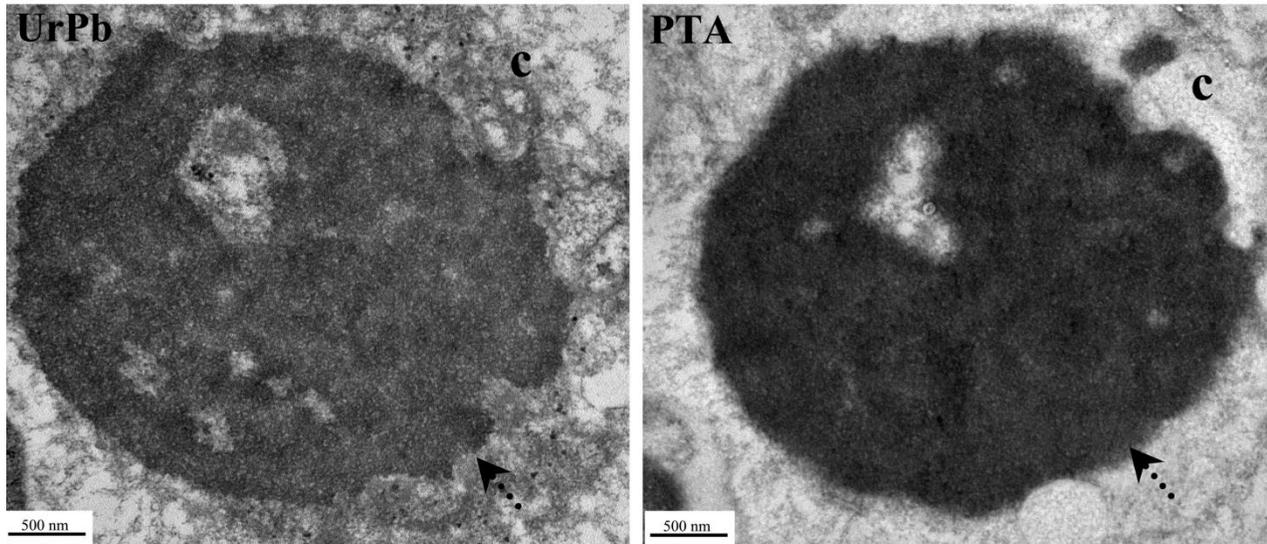


Figura 21. Micrografías electrónicas de una célula apoptótica con un contraste general Ur/Pb (izquierda), se observan alteraciones como la contracción del citoplasma (c), la fuerte compactación de la cromatina (flecha punteada) y algunas regiones claras en el núcleo que sugieren otros componentes nucleares. El corte contiguo con un contraste con PTA muestra únicamente la distribución de la cromatina fuertemente compactada (flecha punteada) formando un gran cúmulo y el mismo espacio claro que se observó con el contraste general, indicando que podrían ser componentes ribonucleoproteicos.

La distribución ultraestructural de los componentes ribonucleoproteicos identificados con el contraste de EDTA en una célula de la granulosa no apoptótica, muestran al nucléolo como el principal componente con esta naturaleza, ya que posee un gran tamaño con respecto al núcleo, con este contraste se logró observar no sólo este componente, sino también otros como fibrillas pericromatinianas, gránulos intercromatinianos y gránulos pericromatinianos que con una tinción general no se logran distinguir, éstos se encuentran distribuidos en todo el núcleo, en algunas regiones como cúmulos y en otras como pequeños gránulos. La envoltura nuclear se observó bien conservada (Figura 22). En la región citoplasmática es posible apreciar un arreglo continuo de estructuras contrastadas que indican ribosomas unidos al retículo endoplásmico rugoso.

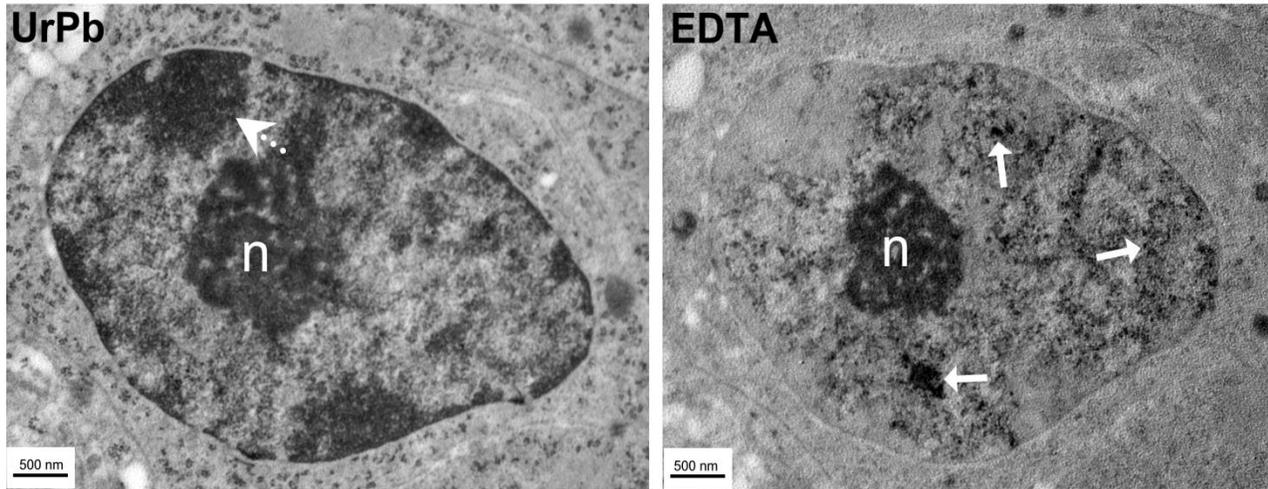


Figura 22. Micrografías electrónicas de una célula de la granulosa sana con un contraste general Ur/Pb (izquierda), se observa un núcleo con algunos cúmulos de cromatina compacta (flecha punteada) a la periferia de este, nucléolo (n) y diversos componentes intranucleares. En el corte contiguo un contraste preferencial con EDTA, permite observar diferentes componentes ribonucleoproteicos (flechas) y el nucléolo (n).

En el interior del núcleo la cromatina empieza a agruparse mientras que las partículas ribonucleoproteicas parecieran tener una distribución normal (Figura 23). En las imágenes con el contraste EDTA, es posible observar las regiones negativas al EDTA que corresponden al DNA y todo el material fuertemente contrastado indica a los RNPs.

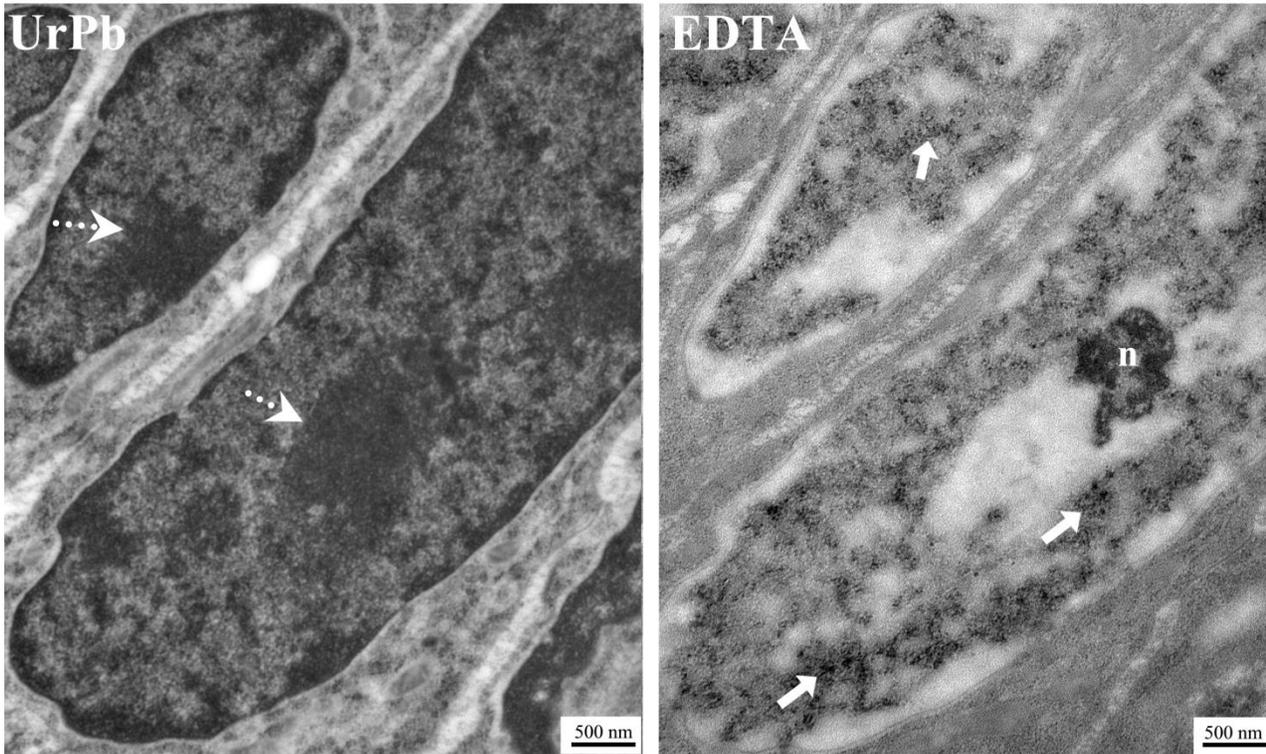


Figura 23. Micrografías electrónicas de una célula de la granulosa en un proceso inicial de muerte con un contraste general Ur/Pb (izquierda), se observa un núcleo con una distribución de cúmulos de cromatina compacta distribuidos en todo el nucleoplasma (flecha punteada). En el corte contiguo un contraste preferencial con EDTA, permite observar diferentes componentes ribonucleoproteicos que con una técnica general no son evidentes, el nucléolo (n) y algunos agregados de componentes ribonucleoproteicos (flechas). Las regiones claras con ésta técnica corresponden a cúmulos de la cromatina compacta.

Los resultados muestran que conforme avanza el proceso de apoptosis, las ribonucleoproteínas evidenciadas con el contraste de EDTA comienzan a agruparse formando grandes cúmulos. En la Figura 24, se muestran cortes contiguos de una célula alterada. El contraste general permite observar que existe una contracción citoplasmática y nuclear, en el núcleo se observa un gran ambiente fibro-granular, un nucléolo reticulado y cúmulos de cromatina compacta adosados a la envoltura nuclear. Por otro lado, el contraste con EDTA, permite identificar que en el espacio nuclear están presentes el nucléolo y una gran cantidad de partículas ribonucleoproteicas que

parecen formar grandes agrupaciones, constituidas principalmente por cúmulos de gránulos intercromatinianos.

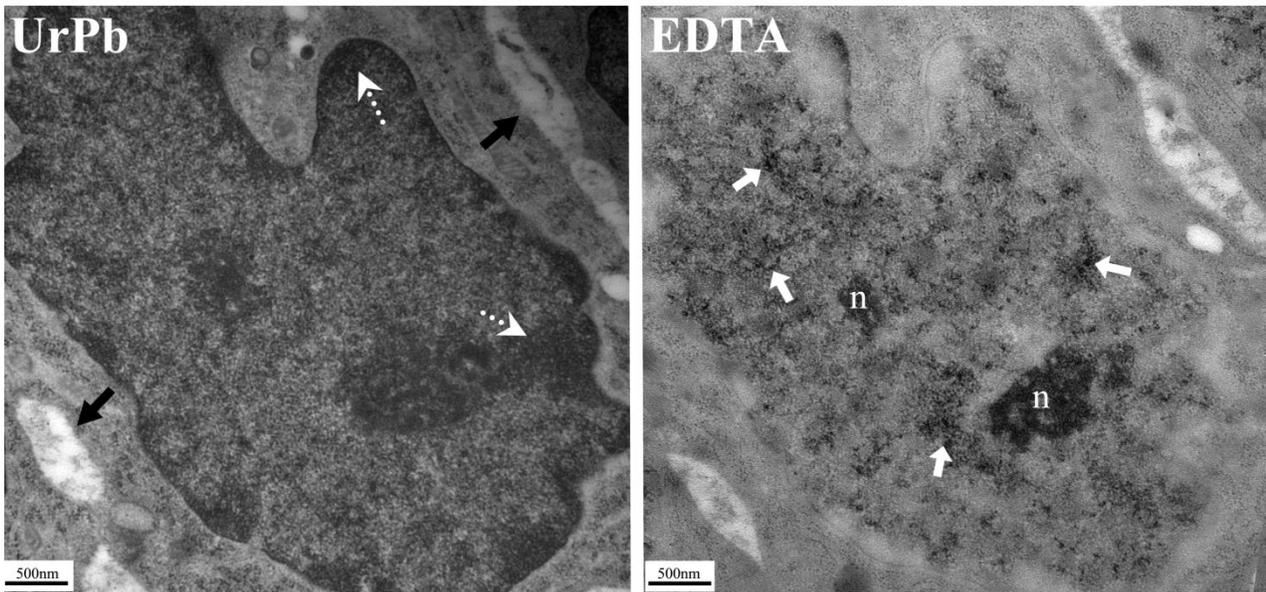


Figura 24. Micrografías electrónicas de una célula de la granulosa en proceso de muerte con un contraste general Ur/Pb (izquierda), se observa la separación de la célula con sus adyacentes (flecha negra), el núcleo con una distribución de cromatina compacta adosada a la periferia (flecha punteada). En el corte contiguo un contraste preferencial de EDTA, se identifican componentes ribonucleoproteicos como el nucléolo (n) y algunos agregados de componentes ribonucleoproteicos (flechas).

Ya en etapas muy avanzadas, se observó una fuerte compactación tanto de las ribonucleoproteínas como de la cromatina. Se logró identificar diferentes formas de distribución tanto de las ribonucleoproteínas como del DNA. En algunos casos se logró observar un gran cúmulo de cromatina compacta el cual está rodeado de ribonucleoproteínas también muy compactadas (Figura 25). Otra distribución identificada mostró que la cromatina fuertemente compactada se encontraba hacia la periferia del núcleo y hacia el centro componentes ribonucleoproteicos (Figura 26).

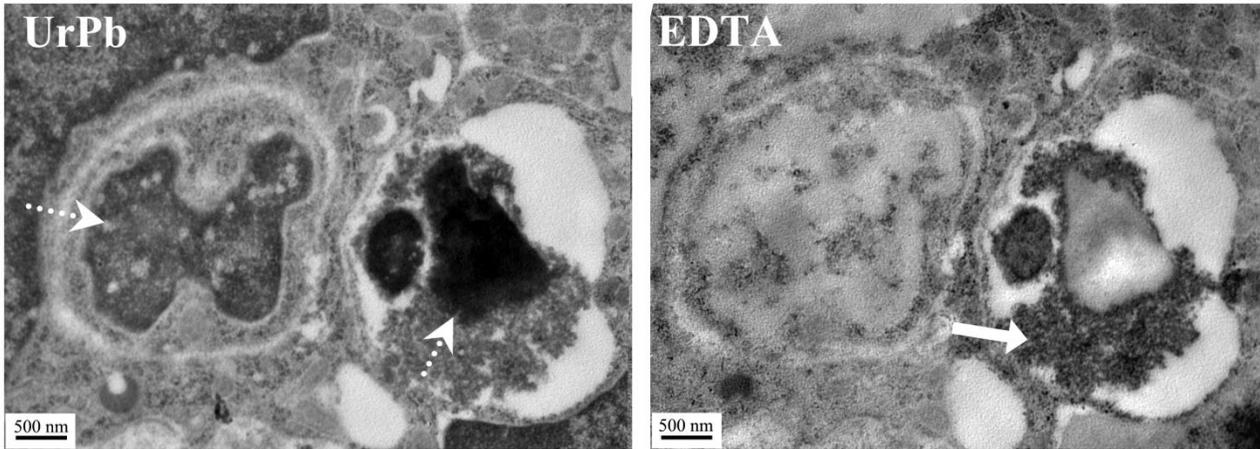


Figura 25. Micrografías electrónicas de cuerpos apoptóticos con un contraste general Ur/Pb (izquierda), se observa la fuerte compactación de la cromatina (flecha punteada). En el corte contiguo un contraste preferencial de EDTA, se muestra la gran agrupación de los componentes ribonucleoproteicos (flecha) que rodean el cúmulo de cromatina.

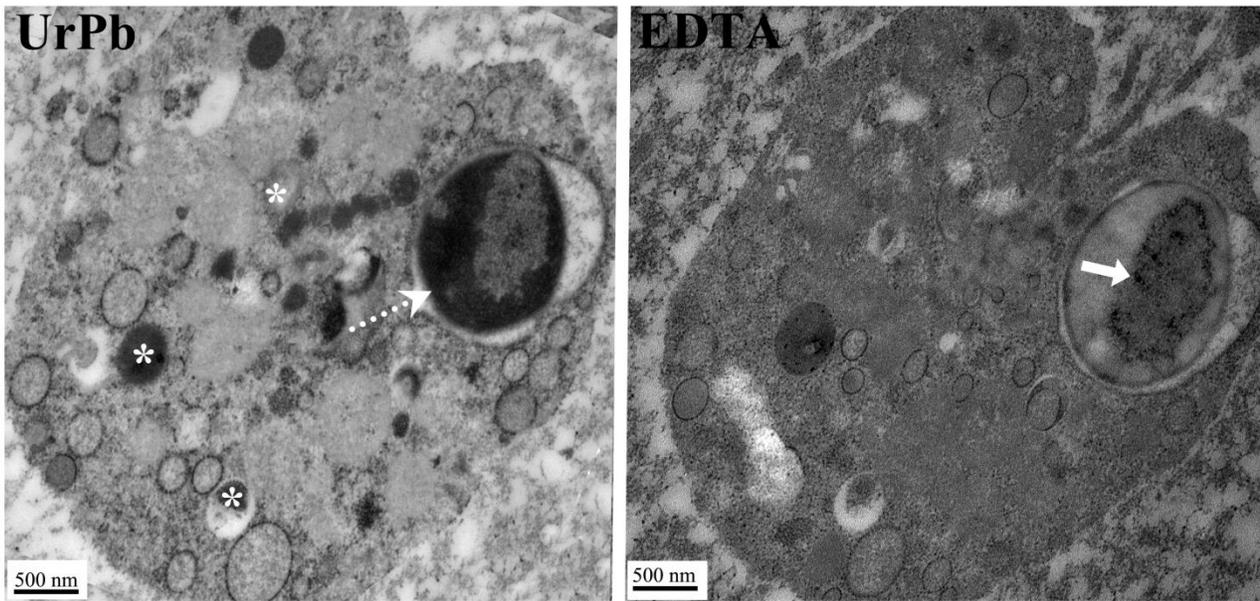


Figura 26. Micrografías electrónicas de un cuerpo apoptótico con un contraste general Ur/Pb (izquierda), se observan vesículas en el citoplasma (asterisco), la cromatina del núcleo está fuertemente compactada hacia la periferia de este (flecha punteada). En el corte contiguo un contraste preferencial de EDTA, se identifican componentes ribonucleoproteicos (flecha) en el centro.

El análisis ultraestructural y el empleo de técnicas específicas, permite observar componentes celulares que se alteran durante el proceso de muerte y sobre todo en las etapas finales del evento. Una de estas alteraciones se muestra en la figura 27, en donde se observa una célula con contraste general que muestra un grupo de partículas adyacentes al núcleo, este parece estar formado por muy pequeños y más grandes gránulos que se encuentran fuertemente compactados, en la imagen obtenida con el contraste de PTA ya no está presente, sugiriendo que podrían ser de naturaleza ribonucleoproteica.

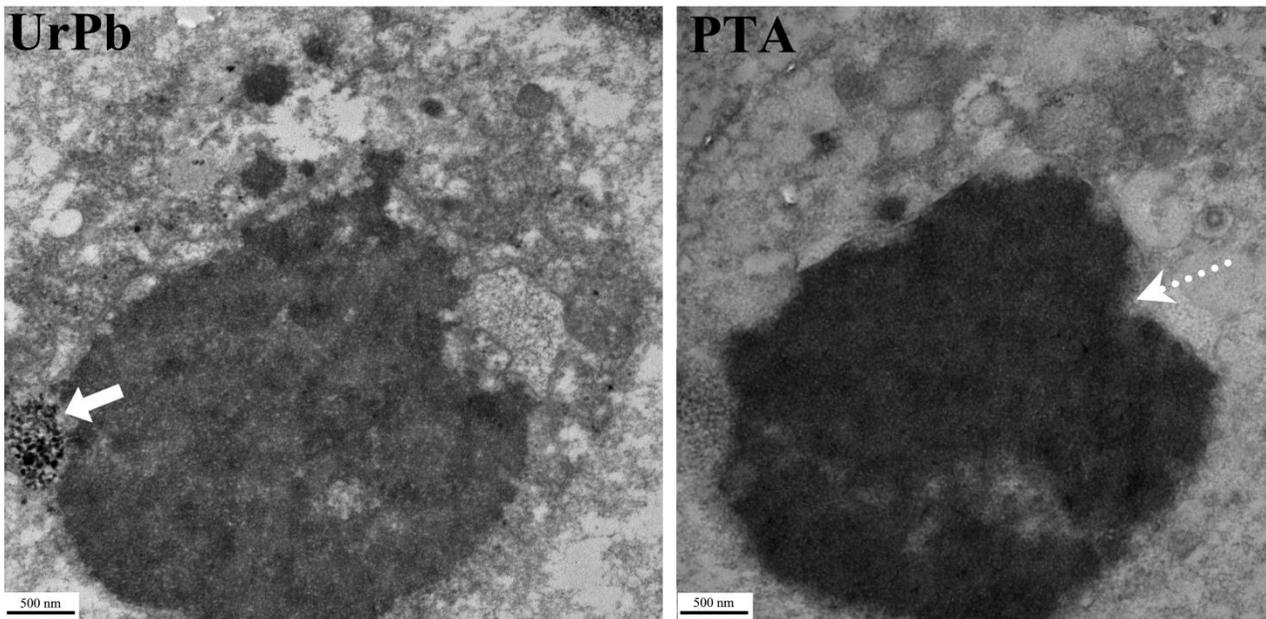


Figura 27. Micrografías electrónicas de una célula apoptótica con un contraste general Ur/Pb (izquierda), se observa un grupo de partículas compactadas adyacentes al núcleo (flecha). En el corte contiguo un contraste con PTA, se muestra la cromatina fuertemente compactada (flecha punteada) sin la presencia de este cúmulo.

Discusión

El empleo de diferentes técnicas a nivel de microscopía óptica y electrónica, permitió una detallada observación de los cambios morfológicos que ocurren durante el proceso de apoptosis, en un proceso normal como es la atresia folicular en ovarios de rata adulta. La atresia folicular es un evento que tiene como objeto eliminar los folículos que no tienen la capacidad o no cumplen con las características necesarias para ser seleccionados para la ovulación (McGee y Hsueh, 2000). La muerte celular que se ha investigado que tiene mayor incidencia durante la atresia, es la apoptosis (Kerr y cols, 1972; Tsafirri y Braw, 1984; Hirshfield, 1991; Tilly, 1996; Jin y El-Deiry, 2005). El empleo de ovarios para evaluar a la muerte celular se basa en que es un sistema que como ya se mencionó, posee una alta tasa de eliminación de forma natural, sin que exista una necesidad de inducir al proceso, de tal forma que se evalúa una condición fisiológica natural.

En los ovarios de rata adulta que se analizaron durante el presente trabajo, se lograron identificar diversos folículos atrésicos, cuyas alteraciones coinciden con previas observaciones (Tilly, 1996; Wyllie, 1997) e incluyen una alta tasa de mortalidad en las células de la granulosa. Se identificaron diversas células con las características morfológicas clásicas que corresponden al proceso de apoptosis, como es la contracción celular que conduce a la pérdida de contacto célula-célula, así como una fuerte compactación del núcleo. Las tinciones preferenciales y/o específicas de los componentes ribonucleoproteicos y del DNA a nivel de microscopía óptica utilizando cortes de 750 nanómetros, evidenciaron que las estructuras denominadas cuerpos apoptóticos, tienen una naturaleza que incluye no sólo un DNA fuertemente compactado, sino que también están constituidos por otros elementos nucleares que igualmente se han compactado en extremo. Estas observaciones permitieron una primera descripción de las características de estos elementos, identificando regiones en las cuales se distribuye el DNA y el RNA.

Aunque los primeros resultados que se obtuvieron a nivel de microscopía óptica en este trabajo muestran que los componentes nucleares se distribuyen de forma regionalizada, consideramos importante demostrar de forma detallada la conformación y la constricción química de los

elementos nucleares en las células que inician la apoptosis así como de las que se encuentran en las fases más avanzadas de muerte, ya que el proceso de eliminación de los componentes nucleares de manera natural no habían sido estudiados hasta el momento.

El análisis ultraestructural de las de células de la granulosa no alteradas se caracterizaron por poseer un citoplasma extendido y por conservar una estrecha relación célula-célula; el núcleo posee un gran ambiente fibro-granular, así como nucléolos de gran tamaño con respecto al núcleo. Con el contraste preferencial para DNA, se observó un patrón ordenado de la disposición de la cromatina, la cual se muestra continua a lo largo de la membrana interna de la envoltura nuclear, únicamente interrumpida por los sitios en los que se presume están localizados los poros nucleares, se pudo apreciar una distribución de la cromatina asociada al nucléolo y cúmulos dispersos en el nucleoplasma. Es conocido que durante la apoptosis las células sufren diferentes cambios, siendo la modificación de la morfología nuclear la más evidente. En células de hígado se ha observado que la apoptosis trae consigo alteraciones de la distribución de la cromatina, formándose una gran compactación (Esquivel y cols., 1989). Los resultados de las observaciones ultraestructurales durante el presente trabajo, muestran que los núcleos que inician el proceso de apoptosis, tienden a presentar grandes grumos de cromatina compacta adosada a la envoltura nuclear; con el progreso del proceso de muerte celular, la cromatina incrementa su compactación, para conformar a lo que en las etapas finales del evento se conoce como cuerpos apoptóticos. Es evidente a nivel ultraestructural que los componentes nucleares modifican su distribución conforme avanza la muerte celular.

En células no apoptóticas, las estructuras que contienen RNPs son las responsables del procesamiento de los pre-RNAm (Fakan y cols., 1984; Dreyfuss y cols., 1993), éstos ocupan regiones específicas en el nucleoplasma (Fakan, 1994); Observaciones realizadas en modelos experimentales en células hepáticas y en timocitos, bajo condiciones *in vitro*, indican que durante una apoptosis inducida, además de la degradación del DNA, siempre se encuentra una clara separación entre los componentes de la cromatina y de las estructuras nucleares que contienen ribonucleoproteínas (Biggiogera y cols., 1990). En el presente trabajo hemos utilizado

células de la granulosa de ovarios de rata, a las que no se les ha inducido de forma artificial hacia la muerte, lo cual no se había hecho. Se encontró que también se segregan los diferentes componentes nucleares, los cuales van adoptando diferentes disposiciones con respecto al avance de la apoptosis. En una gran cantidad de cuerpos apoptóticos se mostró que al igual que la fuerte compactación de la cromatina existía una fuerte agrupación de componentes ribonucleoproteicos; al respecto se ha propuesto que esta reorganización durante la apoptosis puede resultar de un deterioro o incluso de un bloqueo de la maduración del RNA, que finalmente conducen a una detención de la síntesis de proteínas (Biggiogera y cols., 1997; Pellicciari y cols., 2000).

Biggiogera y cols. (1998) reportaron la formación de agrupaciones de ribonucleoproteínas en las primeras etapas de la apoptosis y que al final de la apoptosis estos agregados son exportados al citoplasma (Biggiogera y cols., 2004) y posteriormente a la superficie celular dentro de vesículas, fenómeno denominado como HERDS (Heterogeneous Ectopic RNP-Derived Structures). En las células de la granulosa que se estudiaron en el presente trabajo eventualmente se observaron grupos de ribonucleoproteínas en el lado citoplasmático, cercanos al núcleo, los que se pudieron identificar como tal gracias al empleo de la tinción preferencial con PTA. Esta evidencia podría indicar que la degradación proteolítica de partículas que contienen RNP es un proceso difícil y posiblemente sea incompleto durante apoptosis (Monneron y Bernhard 1969).

Los resultados obtenidos a lo largo del presente trabajo, indican que durante la apoptosis las células de la granulosa presentan diferentes cambios morfológicos descritos por otros autores, que incluyen contracción del citoplasma, pérdida de contacto entre las células y una compactación de la cromatina. Con las técnicas de tinción y de contraste específico y/o preferenciales, se logró identificar que los cambios estructurales y ultraestructurales que muestra el núcleo, no sólo corresponden a una fuerte compactación de la cromatina, sino también a los componentes ribonucleoproteicos, lo cual no había sido descrito en células sin inductor de muerte, como se estudió en este trabajo, se observó que la cromatina es el primer componente que sufre cambios, esta se compacta a la periferia y es hasta etapas avanzadas que se observan alteraciones en los componentes ribonucleoproteicos, estos comienzan agrupándose en el centro del núcleo, hasta su compactación total, en algunas células este

cúmulo se localiza en el centro rodeado por la cromatina, mientras que en otras la agrupación de la cromatina se encuentra en el centro rodeada por las RNPs para su posterior eliminación.

Conclusiones

- En los folículos atrésicos las células de la granulosa presentan diferentes grados de avance de eliminación.
- Los cambios iniciales del proceso de muerte en las células de la granulosa implican una contracción del citoplasma, provocando una separación entre las células.
- El avance de la apoptosis implica una fuerte compactación de la cromatina y su asociación de forma preferente a la periferia del núcleo.
- Los elementos RNPs se distribuyen preferentemente hacia el centro del núcleo.
- Los cuerpos apoptóticos están constituidos de DNA y RNPs en un grado de compactación muy elevado.

Referencias

- Alberts, B. (1996). *Molecular Biology of the cell* (3ra ed., p. 1387) New York:Garland Pubs.
- Becker, W. M., Kleinsmith, L.J., & Hardin Jeff. (2007). *El mundo de la célula*. (6ta ed., p. 939) Editorial Pearson-Addison Westey.
- Biggiogera, M., Scherini, E., & Mares, V.(1990). Ultrastructural cytochemistry of cis-dichlorodiammine platinum II induced apoptosis in immature rat cerebellum. *Acta Histochemica Cytochemistry*, 23, 831-839.
- Biggiogera, M., Bottone, M. G., & Pellicciari, C. (1997). Nuclear ribonucleoprotein-containing structures undergo severe rearrangement during spontaneous thymocyte apoptosis. A morphological study by electron microscopy. *Histochemistry and Cell Biology*, 107, 331–336.
- Biggiogera, M., Bottone, M.G., & Pellicciari, C. (1998). Nuclear RNA is extruded from apoptotic cells. *Journal of Histochemmistry and Cytochemistry*, 46, 999–1005
- Biggiogera, M., Bottone, M.G., Scovassi A.I., Soldani, C., Vecchio, L., & Pellicciari,C. (2004). Rearrangement of nuclear ribonucleoprotein (RNP)-containing structures during apoptosis end transcriptional arrest. *Biology of the Cell*, 96, 603-615.
- Bird, P.A., & Wolffe, P.A. (1999). Methylation- Induced Repression- Belts, Braces, and Chromatin. *Cell*, 99, 451-454.
- Brasch, K. (1990). Drug and metabolite-induced perturbations in nuclear structure and function: a review. *Biochemistry and Cell Biology*. 68, 408-426.
- Calvino, F.M., & Parra, C. (2010). H. *pylori* and mitochondrial changes in epithelial cells. The role of oxidative stress. *Revista Española de enfermedades digestivas*, 102, 41-50.
- Carou, M.C., Cruzans, P. R., Maruri, A., Stockert, J. C., & Lombardo, D. M. (2014). Apoptosis in ovarian granulosa cells of cattle: morphological features and clearance by homologous phagocytosis. *Acta Histochemica*, 117, 92–103.
- Casciola, R.L.A., Miller, D.K., Anhalt, G.J., & Rosen, A. (1994). Specific cleavage of the 70-kDa protein component of the U1 small nuclear ribonucleoprotein is a characteristic biochemical feature of apoptotic cell death. *Journal of Biological Chemistry*, 269, 30757–30760.

Craig, J., Orisaka, M., Wang, H., Orisaka, S., Thompson, W., Zhu, C., Kotsuji, F., & Tsang, B. K. (2007). Gonadotropin and intra-ovarian signals regulating follicle development and atresia: the delicate balance between life and death. *Frontiers in Bioscience*, 12, 3628-3639.

Courtens, J.L., Biggiogera, M., & Fakan, S. (1991). A cytochemical and immunocytochemical study of DNA distribution in spermatid nuclei of mouse, rabbit, and bull. *Cell and Tissue Research*, 265, 517-525.

Danial, N., & Korsmeyer, S.J. (2004). Cell Death Critical Control Points. *Cell*, 116, 205–219.

Earnshaw, W. C. (1995). Nuclear changes in apoptosis. *Current Opinion in Cell Biology*, 7, 337-343.

Echeverría, O.M., & Ontiveros, L. F. (2001). *Biología del núcleo celular* (1ra ed., p.126). México: Las prensas de ciencias.

Esquivel, C., Vázquez -Nin, G.H., & Echeverria, O.(1989). Evidence of repetitive patterns of chromatin distribution in cell nuclei of rat liver. *Acta Anatomica*, 136, 94-98.

Fakan, S., & Bernhard, W. (1971). Localization of rapidly and slowly labelled nuclear RNA as visualized by high resolution autoradiography. *Experimental Cell Research*, 67, 129-141.

Fakan, S., Leser, G., & Martin, T.E. (1984). Ultrastructural distribution of nuclear ribonucleoproteins as visualized by immunocytochemistry on thin sections. *The Journal of Cell Biology*, 98, 358–363.

Fakan, S. (1994). Perichromatin fibrils are in situ forms of nascent transcripts. *Trends in Cell Biology*, 4, 86–90

Falcieri, E., Zamai, L., Santi, S., Cinti, C., Gobbi, P., Bosco, D., Cataldi, A., Betts, C., & Vitale, M. (1994). The behaviour of nuclear domains in the course of apoptosis. *Histochemistry*, 102, 221-231.

Frago, L., Arroba, A., & Chowen, J. (2001). Fundamentos de la apoptosis celular: interés en endocrinología. *Endocrinología y Nutrición*, 48, 272–280.

Gartner, L., & Hiatt, J. (2002). Sistema Reproductor Femenino. *En Texto Atlas de Histología* (2da ed., p. 539). México: McGraw-Hill.

Gilbert, N., Gilchrist, S., & Bickmore, W. A. (2005). Chromatin organization in the mammalian nucleus. *International Review of Cytology*, 242, 283–336.

Gray, M.W. (1992). The endosymbiont hypothesis revisited. *International Review Cytology*, 141, 233-357.

Hirshfield, A.N. (1991). Development of follicles in the mammalian ovary. *International Review of Cytology*, 124, 43–101.

Jacobson, M. D., Weil, M., & Raff, M.C. (1997). Programmed cell death in animal development. *Cell*, 88, 347-354

Jiang, J. Y., Cheung, C. K. M., Wang, Y., & Tsang, B. K. (2003). Regulation of cell death and cell survival gene expression during ovarian follicular development and atresia. *Frontiers in Bioscience : A Journal and Virtual Library*, 8, 222–237.

Jiménez, G. L. F., & Merchant, L. H. (2003). El núcleo interfásico, morfología y función. *Biología celular y molecular* (1ra ed., p.912) Cap. 12 El núcleo interfásico, morfología y función. México: Person Educacion.

Jiménez, G.L.F., Martínez, L.R., Gil, C.I., Zamora, C.A.L., Salcedo, A.M., Agredano, M.L.T., Moncayo, S.J.J., & Segura, V.M.L. (2007). Biología celular del splicing. *Mensaje Bioquímico*, 31, 141-156.

Jin, Z., & El-Deiry, W. S. (2005). Overview of cell death signaling pathways. *Cancer Biology & Therapy*, 4, 139–163.

Kerr, J.F., Wyllie, A.H., & Currie, A.R.(1972). Apoptosis: A basic biological phenomenon with wide-ranging implications in tissue kinetics. *British Journal of Cancer*, 26, 239-57.

Knobil, E., & Neill, J.D. (1994). *The Physiology of Reproduction* (2da ed., p 3,302). New York: Raven Press.

Lamond, A.I., & Earnshaw, W.C., (1998). Structure and function in the nucleus. *Science*, 280, 547-553.

Li, Q., McKenzie, L.J., & Matzuk, M.M. (2008). Revisiting oocyte-somatic cell interactions: in search of novel intrafollicular predictors and regulators of oocyte developmental competence. *Molecular Human Reproduction*, 14, 673–678.

Luger, K., Rechsteiner, J.T., Flaus, J.A., Wayne, Y.M.M., & Richmond, J.T. (1997). Characterization of nucleosome core particles containing histone proteins made in bacteria. *Journal of Molecular Biology*, 272,301-311.

Malatesta, M., Biggiogera, M., Cisterna, B., Baliotti, M., Freddari, B.C., & Fattoretti, P. (2010). Perichromatin Fibrils Accumulation in Hepatocyte Nuclei Reveals Alterations of Pre-mRNA Processing During Aging. *DNA and Cell Biology*, 29, 49-57.

- Malatesta, M., Zancanaro, C., & Biggiogera, M. (2011). Immunoelectron Microscopic Characterization of Nucleolus- Associated Domains During Hibernation. *Microscopy research and technique*, 74, 47-53.
- Martínez, F. L. (2010). Estructura y función del ADN y de los genes. I Tipos de alteraciones de la función del gen por mutaciones. *SEMERGEN-Medicina de Familia*, 36, 273–277.
- McGee, E.A., & Hsueh, A.J.W. (2000). Initial and cyclic recruitment of ovarian follicles. *Endocrine Reviews*, 21, 200-214.
- Monneron, A., & Bernhard. (1969). Fine structural organization of the interphase nucleus in some mammalian cells. *Journal of Ultrastructure Research*, 27, 266-288.
- Nielsen, J.S., Schneider, R., Bauer, M.U., Bannister, J.A., Morrison, A., O'Carroll, D., Firestein, R., Cleary, M., Jenuwein, T., Herrera, E.R., & Kouzarides, T. (2001). Rb targets histone H3 methylation and HP1 to promoters. *Macmillan Magazines Ltd*, 412, 561-565.
- Ochs, R., Stein, T.W., & Tan, E.M. (1994). Coiled bodies in the nucleolus of breast cancer cells. *Journal of Cell Science*, 107, 385-399.
- Pellicciari, C., Bottone, M.G., Scovassi, A.I., Martin, T.E., & Biggiogera, M.(2000). Rearrangement of nuclear ribonucleoproteins and extrusion of nucleolus-like bodies during apoptosis induced by hypertonic stress. *European Journal of Histochemistry*, 44, 247–254.
- Peluffo, M. (2002). TESINA: Efectos de gonadotrofinas y un análogo de la hormona liberadora. (p. 36) Belgrano: *Facultad de Ciencias Exactas y Naturales*.
- Ross, H.M., Romrell L.J., & Kaye, I.G. (2007). Histología Texto y Atlas Color (5ta ed., p. 816) Cap. 23 Aparato genital femenino, p. 828-868. México: *Médica Panamericana*.
- SAGARPA (México). SENASICA [en línea]: NOM-062-ZOO-1999. Especificaciones técnicas para la producción, cuidado y uso de los animales de laboratorio. [fecha de consulta: 2015]. Disponible desde <http://www.sagarpa.gob.mx/Paginas/default.aspx>
- Segovia, Y. (2015). Apoptosis durante el desarrollo embrionario de la retina de tortuga (*Trachemys scripta elegans*). *Int. J. Morphol*, 33,119-129.
- Smetana, K. (1967). Basic histochemical and cytochemical methods, in: *Methods in Cancer Research*. Vol II, Academic Press, New York.
- Sogin, M.L. (1994). The origin of eukaryotes and evolution into major kingdoms. *Early Life on Earth*, Bengtson, S., ed., Columbia University Press, Nueva York, 181-192

Stefan, J., Riedl, & Yigong, Shi. (2004). Molecular mechanisms of caspase regulation during apoptosis. *Molecular Cell Biology*, 5, 897-907.

Tilly, J. L., Kowalski, K.I., Johnson, A.L., & Hsueh, A.J. (1991). Involvement of apoptosis in ovarian follicular atresia and postovulatory regression. *Endocrinology*, 129, 2799-2801.

Tilly, J.L. (1996). Apoptosis and ovarian function. *Reviews of Reproduction*, 1, 162-172.

Tiwari, M., Prasad, S., Tripathi, A., Pandey, A. N., Ali, I., Singh, A. K., & Chaube, S.K. (2015). Apoptosis in mammalian oocytes: a review. *Apoptosis*, 20, 1019–1025.

Tsafiriri, A., & Braw, R.H. (1984) Experimental approaches to atresia in mammals. *Reviews of Reproductive Biology*, 6, 226–265

Vázquez Nin, G.H., & Bernhard, W. (1971). Comparative ultrastructural study of perichromatin and Balbiani ring granules. *Journal of Ultrastructure*, 36,842-860.

Vázquez Nin, G.H., Echeverría , O.M., & Pedron, J. (1979). Effects of estradiol on the ribonucleoprotein constituents of the nucleus of cultured endometrial epithelial cells. *Biology of the Cell*, 35, 221-228.

Vázquez Nin, G.H., Abolhassani, D.S., Echeverría, O.M., Boutinard, R.R.V., & Fakan , S., (1996). Phosphorus distribution in perichromatin granules and surrounding nucleoplasm as visualized by electron spectroscopic imaging, *Biology of the Cell*, 87, 171-177.

Wyllie, A. H., Beattie, G. J., & Hargreaves, A. D. (1981). Chromatin changes in apoptosis. *The Histochemical Journal*, 13, 681–692.

Wyllie, A.H. (1997). Apoptosis: an overview. *British Medical Bulletin*, 53, 451–465.