



UNIVERSIDAD NACIONAL AUTONOMA
DE MEXICO

FACULTAD DE CIENCIAS

EFFECTO DE LOS ESTROGENOS SOBRE LA EXPRESION GENICA
EN CELULAS DEL EPITELIO ENDOMETRIAL DE RATA

T E S I S

Que para obtener el Titulo de
B I O L O G O
p r e s e n t a

JOSE ANTONIO FRAGOSO REYES



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 está 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.

INDICE.

I. RESUMEN.

II. INTRODUCCION.

III. ENFOQUE.

IV. ANTECEDENTES.

1. Las hormonas esteroides y su acción.
2. Algunos estudios bioquímicos acerca de la acción de los estrógenos sobre las células del útero de rata.
3. Núcleo Interfasico.
 - A.Membrana nuclear.
 - B.Cromatina.
 - C.Partículas Ribonucleoproteicas intranucleares.
 - a)Granulos pericromatinianos.
 - b)Granulos intercromatinianos.
 - c)Fibras pericromatinianas.
 - d)Cuerpos espiralados.
 - e)Cuerpos nucleares..

V. OBJETIVO.

VI. MATERIAL Y METODOS.

1. Condiciones experimentales
2. Procedimientos preparativos.
3. Deshidratación.
4. Inclusión.
5. Microtomía.
6. Tinción (Contraste).
7. Procedimientos estereológicos.

VII. RESULTADOS.

1. Morfología.
2. Estereología.

VIII. DISCUSION.

IX. CONCLUSIONES.

X. REFERENCIAS BIBLIOGRAFICAS.

RESUMEN.

La interrelación que existe entre las hormonas esteroides y sus células blanco se ha estudiado en trabajos anteriores, bajo enfoques citológicos y bioquímicos, quedándose rezagados los aspectos estructurales.

Las sustancias estrogénicas estimulan un sinnúmero de fenómenos metabólicos y biosintéticos, los que se asocian a eventos ultraestructurales en el núcleo interfásico. Los estrógenos actúan sobre la síntesis de los ácidos nucleicos modificando la expresión génica durante la interfase celular, mediante un mecanismo complejo cuyo efecto principal sobre el núcleo, es estimular la transcripción de ARNs mensajeros específicos.

En el presente trabajo se estudiaron y cuantificaron los efectos del 17β estradiol sobre las estructuras ribonucleoproteicas intranucleares tales como: granulos pericromatinianos e intercromatinianos, fibras intercromatinianas y el nucleolo, en las células del epitelio luminal del útero de rata.

El propósito de este estudio fué el de establecer un paralelo entre las observaciones morfológicas de imágenes del microscopio electrónico, con algunas evidencias y hallazgos bioquímicos, que permitan obtener una idea de la significación citofisiológica de dichas estructuras o complejos ultraestructurales, que como partes extracromosómicas del genoma, son una manifestación de la expresión génica.

Se emplearon para este fin tres grupos de ratas: normales en estro, ovariectomizadas y ovariectomizadas-inyectadas con 20 mg. de 17β estradiol a intervalos de 0.5, 1, 2, 12 y 24 hrs., las muestras del útero fueron procesadas por métodos usuales en microscopía electrónica y contrastadas con la técnica preferencial del EDTA (ácido etilendiamino tetracético) de Bernhard 1969 para estructuras ribonucleoproteicas.

Los resultados indican que la castración disminuye el volumen nucleolar relativo, recuperándose significativamente a las 12hrs. después de la inyección, pasando por una fase de disminución en la primera media hora.

Los gránulos pericromatinianos aumentan con la castración y desaparecen a la 1/2 hora de la inyección, lo que se puede explicar como un posible efecto postranscripcional del estradiol y que consiste en el aumento de la velocidad de transporte de estas partículas hacia el citoplasma, explicándose así la transitoria disminución del volumen relativo del nucleolo.

Las fibras intercromatinianas aumentan mientras que los gránulos disminuyen en número como respuesta a la ovariectomía, por lo cual, parece ser que ambas estructuras son conformaciones de una misma partícula.

INTRODUCCION.

A principios del siglo XIX, la célula es considerada la estructura elemental de todo ser vivo, desde el más simple hasta el más complejo y en cuya estructura microscópica, constituida por un gel transparente, se haya un corpúsculo esférico, el núcleo celular. Desde 1850 se acepta la presencia de núcleo en las células, sin embargo sus funciones son hasta el presente, procesos por definir con exactitud.

Al respecto, son importantes las observaciones llevadas a cabo por Leeuwenhoek 1770, Fontana 1781, Cavolini 1787, Branca y Verne; 1956. Fontana en 1831 descubre el nucleolo sin determinar su naturaleza ni constancia. Fueron Brown y Mirbel quienes entre 1831-1833 lo describen como una "vesícula transparente" y reconocen como una entidad constante de la célula, conocimiento ratificado poco después por Schleiden y Schwann en 1839 en las células vegetales y animales; desde 1850 se considera presente en las células superiores. Las observaciones de Nageli, Von Mohl y Flemming permitieron describir la desaparición del núcleo durante la mitosis, en el curso de la cual una parte de la sustancia nuclear, la cromatina, se condensa en cromosomas cuyo número es constante para cada tipo celular. Miescher y col. en 1897, hacen los primeros trabajos sobre el aislamiento de una sustancia fosfatada particular del núcleo denominada "nucleína" que más tarde se reconocerá como los ácidos nucleicos

En experiencias de microdissección, Chambers en 1917, describe el núcleo como un gel elástico y viscoso, sin embargo es con Behrens entre 1932 - 1938 cuando se logra separar los componentes nucleares de la célula y de las fracciones citoplasmáticas Chevremont 1956.

Feulgen y Rossenbeck en 1924 demuestran citológicamente en el núcleo la presencia de los ácidos nucleicos y del azúcar desoxiribosa, mediante una reacción particular del ADN. Los trabajos de Casper

son y Brachet en 1940, independientemente ponen de manifiesto por un lado que el ADN es a la cromatina durante la interfase tal como lo es a los cromosomas en la mitosis; y por otro lado, demuestran citoquímicamente, que el nucleolo y diversos elementos citoplasmáticos contienen ARN. Los trabajos de Mirsky y Pollister en 1946 establecen que el ARN intranuclear conforma complejos ribonucleoproteicos . DuPraw señala que estos trabajos fueron complementados en 1960 por Frenster y col., que demostraron síntesis específica relacionada con partículas ribonucleoproteicas activas in vivo e in vitro Zavala (1980).

Monneron y Bernhard en 1969, usando la técnica de contraste preferencial de Bernhard para estructuras ribonucleoproteicas y sobre diversos tipos de células de mamíferos, esclarecen la imagen del núcleo y de varios de sus componentes ultraestructurales

Miescher, Balbiani, Waldeyer y Kossel citados por Puvion 1967 afirman que el núcleo desempeña un papel central en las actividades celulares, apoyándose en sus descubrimientos de que los factores genéticos se encuentran localizados dentro del núcleo tanto dentro como fuera de los cromosomas, paralelamente Beadle y Tatum; Avery y Brachet, llegaron también a concluir que el material nuclear está relacionado con la herencia. Gracias a estos progresos y a los de la bioquímica, la imagen del núcleo descubierto por los microanatomistas es una mezcla cada vez más comprensible.

ENFOQUE.

Es necesario por el enfoque de este trabajo referirnos a continuación hacia aspectos más particulares, como la expresión génica.

Los genes que controlan la herencia y las actividades de una célula se distribuyen a lo largo de los cromosomas, que durante la interfase se forman estructuras e intervienen en procesos que están íntimamente relacionados con la expresión génica.

Cuando se habla acerca de la información génica se piensa en el orden y secuencia de nucleótidos del ADN, del mismo modo la transferencia de información se refiere a los posibles mecanismos por medio de los cuales las instrucciones codificadas en secuencias de nucleótidos del ADN, son transportadas a otros sitios de la célula, por lo mismo, la expresión genica podría ser el significado de una secuencia particular del ADN (gene) que llega a tener sentido al manifestarse en algún aspecto del metabolismo celular

La expresión génica y su regulación en células eucariontes evolucionadas incluye indudablemente fenómenos y mecanismos más complejos y amplios que los propuestos por Jacob y Monod en (1961), para las procariontes, ya que en los eucariontes a diferencia de los procariontes, el ADN está separado del resto de la célula por un sistema membranoso o envoltura nuclear cuyo significado topológico es el separar en ambientes diferentes el núcleo y el citoplasma. Esta diferencia posee un significado profundo, ya que separa a los organismos vivientes en las dos clases mencionadas, lo que a su vez está acompañado de un aumento en la cantidad de información; en los eucariontes, por ejemplo en una célula humana existe ADN con un peso molecular de aproximadamente 3.6×10^{12} daltones, mientras que en la bacteria *E. coli* el ADN tiene un peso molecular de 2.6×10^9 daltones esta diferencia hace que los sistemas simples de regulación que son suficientemente efectivos para las bacterias, no lo sean así para

la maquinaria eucarionte, tan compleja metabólica como estructuralmente. En los procariontes la regulación se efectúa a un nivel el de la transcripción, a diferencia de lo que sucede en los eucariontes los que utilizan una parte importante de la energía celular en el control cuantitativo de la información en los niveles transcripcional y postranscripcional que se presenta como avance suficiente para su selección en el curso de la evolución. Así mismo en los procariontes la transcripción y la traducción son simultáneas, en tanto que en los eucariontes la transcripción está relacionada con la producción de moléculas de ARN heterogéneo nuclear (ARN hn.) del que sólo una parte migra en forma de mensajero hacia el citoplasma en donde se utiliza para traducir la información genica, el resto es degradado dentro del núcleo lo que indica la existencia de regulación de la expresión génica a este nivel, la cual también se ejerce entre la transcripción y la traducción o sea en el curso del transporte del ARN a través de la membrana nuclear.

Sin embargo el control de la expresión génica en eucariontes parece ser ejecutado por lo menos en parte, a través de la transcripción y/o el control selectivos. Evidencias citológicas y bioquímicas indican que la síntesis de ARNs, en loci discretos está asociada con formaciones estructurales definidas en los cromosomas del núcleo interfásico. Esta asociación es punto de interés originario para describir el comportamiento de la morfología ultraestructural de la célula y en particular para estudiar morfométricamente las estructuras ribonucleoproteicas relacionadas con la expresión génica, tales como el nucleolo, los gránulos pericromatinianos, fibras y gránulos intercromatinianos, para tratar de determinar su posible papel citofisiológico.

La efectividad selectiva de los diversos mecanismos reguladores, tuvo su origen hace 1400 a 1500 millones de años durante el Precámbrico, periodo geológico que marca la aparición de las células en las que el material genético se haya reunido dentro de un núcleo bien definido, rodeado por una doble membrana y por lo tanto con una mayor organización. Es en estos sistemas celulares que se alcanza un grado tal de complejidad que sólo recurriendo a modelos como el que se ocupa en este trabajo, es posible explicar las manifestaciones morfofisiológicas estructurales del metabolismo celular, así como los efectos observados bajo tratamientos experimentales.

Como vía de explicación general hay modelos de regulación de la síntesis proteica que conforman un marco básico para entender los fenómenos observados a nivel ultraestructural, en dichos modelos se interpreta que la regulación de la transcripción del ADN, puede operar por la variación de un locus génico o por el número de genes activos (loci).

Uno de los focos de atención es el mecanismo de la expresión específica la cual permite la síntesis de ARN en algunos genes, como los observados bajo tratamientos experimentales por Wilson 1963 Hamilton y col 1965 Cohen y col 1975 y Szego 1965 en los que se dilucida que la síntesis de ARN es uno de los primeros efectos de la inyección de estrógenos en úteros de rata ovariectomizada o inmadura. Por otra parte también se ha demostrado por Gorski 1964 que los estrógenos estimulan in vivo la acción de la ARN polimerasa, en este sentido O'Malley y Mc Guirre 1969 encontraron una diversificación cualitativa de los tipos de ARN luego de la inyección de estrógenos, así mismo se sabe que la administración de estrógenos in vitro causa en pocos minutos incrementos de la velocidad de incorporación de precursores radioactivos en diversas partículas ribonucleoproteicas, en células de

útero de rata. Por lo anterior se piensa que tales células son un buen modelo experimental para observar y cuantificar a nivel ultraestructural los efectos del estradiol sobre la frecuencia relativa de estructuras y partículas ribonucleoproteicas intranucleares, tales como el nucleolo, gránulos pericromatinianos, fibras y gránulos inter-cromatinianos y su variación como resultado de la expresión génica.

ANTECEDENTES.

Las hormonas esteroideas y su acción.

El término estrógeno se aplica a aquellas sustancias que producen cornificación del epitelio vaginal del ratón, en forma similar a los efectos de la fase de estro.

Hay una gran variedad de sustancias que producen dicho efecto, algunas son naturales como el estrógeno o el estradiol y otras que son sintéticas, no presentes en los mamíferos como el estilbestrol. Sin embargo es el estradiol el estrógeno más potente que se presenta en la naturaleza.

Bajo condiciones normales, es el ovario el centro de producción de estrógenos, algunos componentes de este órgano parecen ser capaces de producir la hormona, aunque se considera que son la teca o pared exterior del folículo de Von Graaf, así como la teca de los folículos atrésicos, sus centros productores más importantes, aparte de estos, otros tejidos pueden producirlo, por ejemplo la corteza adrenal, que produce poco y la placenta que lo hace en grandes cantidades Streyer (1975)

La acción de los estrógenos sobre los tejidos de mamíferos se identifica en respuestas en el tracto reproductivo de las hembras, incluyendo genitales externos e internos, los cuales dependen de un continuo aporte de aquellos para su crecimiento y manutención. La administración de estrógenos a hembras inmaduras es seguido por cambios en el crecimiento y función de varios tejidos e incluyen: el engrosamiento y cornificación del epitelio vaginal y cambios en el desarrollo de las mamas, siendo estos últimos difíciles de apreciar en las diferentes especies de mamíferos, de especie a especie en las diversas variedades de animales Clegg (1969).

El desarrollo del útero y las trompas de Falopio depende del estrógeno, que provoca cambios muy notorios en las paredes musculares y en las mucosas que recubren estos órganos.

Las respuestas metabólicas a los estrógenos en útero de rata ovariectomizada han sido estudiados por diversos autores. Según Szego las modificaciones más tempranas en la composición de este órgano son: a una hora del tratamiento; se observa una marcada transferencia de materiales como los monosacáridos y la urea, así como de albúmina marcada con ^{131}I , incrementos de fosfolípidos y ARN marcados con ^{32}P . Un poco más tarde entre 2 - 3 hrs., la acumulación de agua y sodio, así como la estimulación de la incorporación de aminoácidos marcados con ^{14}C a las proteínas uterinas. A las 4 hrs. se ha observado incremento de la actividad matriz del ARN y de la glucólisis Szego (1965) Es también notable el cambio en la actividad de ciertas enzimas oxidativas que requieren de un prolongado tiempo de inducción de hasta 10 hrs. Un poco más tarde, se observan evidencias de crecimiento verdadero, que incluyen incrementos de nucleótidos de purinas y pirimidinas, de ARN ribosomal, de ADN, y un incremento generalizado de la actividad mitótica y de las reacciones sintéticas

Uno de los primeros efectos del estrógenos, en las células uterinas, es el notable aumento en la tasa de síntesis de ARN, esto ocurre, en menos de 30 minutos, después de la administración de la hormona. Al inicio hay un aumento de ARN mensajero y de transferencia seguida del aumento de aparición del ARN ribosomal. Poco antes de la aparición del ARN se presenta actividad de las enzimas ARN polimerasas involucradas en la transcripción.

Estos efectos en la síntesis de ARN, conducen en última instancia a incrementos en varias proteínas celulares, esta secuencia de eventos es la que cabría esperar, si los estrógenos, provocan cambios en la célula por la acción primaria sobre el genoma.

Luego entonces, el efecto primario de las hormonas esteroideas, como el estradiol, progesterona y cortisona es sobre la expresión

génica, tanto en la actividad enzimática (trascricpción) como en los procesos de transporte.

El primer paso en la estimulación del crecimiento uterino por 17 beta estradiol, es la unión de esta hormona a un receptor específico, en el citoplasma de las células blanco (epitelio luminal, glandular, o muscular), la unión es muy débil ($k_2 = 10^{-9}$ M), después el receptor adquiere una segunda subunidad, éste complejo bivalente hormona-receptor migra entonces al núcleo de la célula, en donde posee una marcada afinidad por el ADN, no es conocido aún si el sitio de unión Toft 1972, Alberga y col. 1971, del receptor del estradiol en el ADN, es especificado por la secuencia de bases, o por las proteínas cromosomales del tipo no histonas pero se sabe que el complejo dimérico del receptor hormona, es específico de las fracciones AP₃ de no histonas, así como también se puede decir que posee efectos sobre la activación selectiva de tal vez un grupo de genes, semejante a aquellos sistemas estudiados para probar, la activación de genes por la progesterona en el oviducto e hígado de gallina, los cuales portan información para la formación de fosfovitelina o lipovitelina, y a los de ecdysona estudiados en las larvas de dípteros (Drosophila, Chironomus) donde los anillos de Balbiani representan áreas de actividad génica Harris, 1970.

Algunos estudios bioquímicos acerca de la acción de los estrógenos sobre las células del útero de rata.

Las sustancias estrogénicas estimulan fenómenos metabólicos y biosintéticos que conducen a la hipertrofia e hiperplasia de las células blanco (Clark y Peck 1979, Szego y col 1971). La acción de los estrógenos está determinada por la unión con la cromatina (genoma) donde causan alteraciones en la maquinaria transcripcional que controla la síntesis de ARN, influenciando de este modo la expresión génica.

Las hormonas esteroides como el estradiol, se unen específicamente a un receptor proteico en el citoplasma de las células blanco, para después ser transportados al núcleo donde activan la transcripción del ARN. En el útero estos eventos causan la inducción del ciclo de crecimiento y desarrollo que preparan al tejido para la implantación del óvulo fecundado.

En los órganos blanco tales como el útero de rata (Toft y Gorski 1966) el estradiol se une primariamente a un receptor citoplasmático específico. Muchas comunicaciones indican que el complejo citoplasmático receptor-estradiol se transforma en el complejo nuclear al ser transportado hacia el núcleo, en donde se une a los sitios aceptores específicos de esa estructura (Hamilton 1971) y que la cromatina de las células blanco poseen (Toft 1972; Rochefort y col 1972; Giannopoulos y Gorski 1971).

La estimulación inicial de la síntesis de ARN., que precede y es requisito para el crecimiento uterino ocurren en 3 fases o respuestas: una respuesta temprana que ocurre entre los primeros 30 min. después de haber administrado 17β estradiol a ratas inmaduras y que corresponde a la estimulación primaria de la síntesis de ARN heterogéneo nuclear uterino (Knowler y Smellie 1973). Subsecuentemente entre 1 - 2 hrs. después del tratamiento y debido a la translocación al núcleo del receptor nuclear estrogénico se estimula la síntesis

tesis de ARN de transferencia y ARN ribosomal, que llega hasta un máximo de 10 a 12 veces más sobre el valor del control a las 2 - 4 hrs. Así como las respuestas tardías entre 6 a 24 hrs. asociadas a la unión de un segundo receptor nuclear, tanto como a la retención del receptor estrogénico en el núcleo y que posibilita que ocurra la fase de crecimiento uterino efectivo (Azis y Knowler 1978; Luck y Hamilton 1972). También se sabe que las acciones tempranas de estas sustancias influyen tanto a la transcripción génica como a la translación al citoplasma de sus productos como se esperaría para la siguiente secuencia hipotética: hormona-genoma -ARN- proteínas. Se ha comunicado que los estrógenos estimulan en ratas castradas, preferencialmente la síntesis de ARN ribosomal durante su acción temprana (Hamilton y Col 1965; 1968; Billing 1969; Teng y Hamilton 1965 citado por Miller 1972).

Los efectos fisiológicos de los estrógenos en el útero de mamíferos determinan el incremento en la síntesis de diversas especies de ARN, la que provoca un aumento en la síntesis de proteínas. Estos efectos son consistentes con la hipótesis de que las hormonas esteroideas actúan al nivel del gene Hamilton 1968 y provoca cambios en la expresión génica (O'Malley y Means 1974).

Los efectos de los estrógenos y en particular del 17 β estradiol han sido apreciados por estudios de la actividad de las ARN polimerasas (Arnaud col. 1971), al parecer el estradiol incrementa la tasa de actividad tanto como la cantidad absoluta de esta enzima

Muchos investigadores han demostrado que este tipo de hormonas, actúan en el núcleo de sus células blanco, acelerando la formación de ribosomas (Hamilton 1971; Tata 1968 citado por Luck y Hamilton 1972). Por ejemplo Moore y Hamilton (1964) encontraron que los estrógenos incrementan la concentración citoplasmática de los ribosomas en el útero de ratas ovariectomizadas.

Este es el resultado de la aceleración de la tasa de formación de ARN 45 S que subsecuentemente es procesado para convertirse en -- los ARNs 18S y 28S.

Estudios sobre la administración de estrógenos in vitro demuestran que causan en pocos minutos, incrementos de la velocidad de incorporación de precursores radioactivos en diversas partículas ribonucleoproteicas de células de útero de rata (Vázquez-Min y col 1979). Así mismo se sabe por datos bioquímicos que existe un incremento significativo de la síntesis de ARN nuclear que va de minutos hasta las 24 hrs. después de la inyección de estradiol a ratas inmaduras y que la incorporación de uridina tritiada en el ARN nuclear de marcado r₃ pido es más del 500%, 20 minutos después de administrar estradiol -- (Hamilton 1968).

Núcleo Interfásico.

Las células que se dividen en forma regular, presentan un período de tiempo entre dos divisiones celulares sucesivas, durante el - cual se dice que la célula se halla en interfase, un estado de actividad que depende de su edad, tipo y estado físico.

En las células de organismos superiores, el genoma posee una estructura compleja formada por 5 a 10 millones de genes, en los que - intervienen histonas y otras proteínas que garantizan una mejor homeostasis de las funciones genéticas. En estos sistemas celulares la cromatina permanece aislada en un compartimento separado del resto - del citoplasma, denominado núcleo celular, en el que se llevan a cabo fenómenos relativos tanto a la herencia como a la expresión génica.

El núcleo es el organelo más conspicuo en las células en interfase y los fenómenos estructurales asociados al metabolismo transcurren en un orden regular a lo largo de esa fase lo que hace que la - célula, de acuerdo con su estado vital, mantenga su aspecto característico. El estudio de la estructura fina u organización ultraestructural, provee del punto de vista topológico, para el estudio de las actividades celulares, de tal manera que cualquier exploración de la estructura fina nuclear aparece como una esperanza en el estudios del sustrato de los genes, como su tamaño o su longitud y de su expresión génica en los sitios de transcripción, procesamiento y transporte de complejos químicos, visibles con el microscopio electrónico.

Los métodos citoquímicos de contraste o "tinción" preferencial, el uso de varios procedimientos enzimáticos y químicos de extracción, así como la autoradiografía de alta resolución, han sido técnicas valiosas en la investigación de estructuras nucleares tanto en su composición química como en su fisiología.

Hace ya algunos años se publicaron excelentes descripciones de la ultraestructura del núcleo interfásico (Monneron y Bernhard 1969; Bernhard 1971) y del nucleolo (Bernhard y Granboulan 1968; Bush y Smetana 1970; Bouteille 1972), a partir de las cuales se ha podido conformar la imagen ideal del núcleo y su nucleolo, así como de las partículas ribonucleoproteicas extranucleolares: gránulos, fibras y cuerpos nucleares que contienen ARN. La imagen del núcleo en materiales contrastados con uranilo y citrato de plomo es una mezcla casi inexplicable de desoxirribonucleoproteínas y ribonucleoproteínas que merced a las técnicas de contraste preferencial del EDTA de Bernhard y del ácido fosfotúngstico (PTA) de Vázquez-Nin y col., se han podido diferenciar y estudiar a lo largo de experimentos que abarcan un ciclo biológico o bien de diversos estados fisiológicos de una célula. Aparte de estas estructuras, la arquitectura nuclear incluye otros componentes, que juegan importantes papeles citofisiológicos y que a continuación describiré brevemente.

Envoltura nuclear y componentes anexos.

Como se ha dicho anteriormente en las células eucarióntes el núcleo está separado del citoplasma por la envoltura nuclear Stevens y André (1969), Bouteille y col. La microscopía clásica no permitió determinar la estructura de la membrana nuclear con la certeza con que lo ha hecho la microscopía electrónica. Se trata de un conjunto formado por dos unidades de membrana; lo que justifica plenamente el término especial de envoltura nuclear.

Esta envoltura está constituida por tres distintos elementos ultraestructurales: la membrana nuclear propiamente dicha, los poros que comunican el nucleoplasma con el citoplasma que desempeñan un papel regulador de sus intercambios y la lámina interna o densa; la estrecha integración ultraestructural de estos tres componentes refleja

Cromatina.

La microscopía electrónica ha revelado que la cromatina está formada de fibras de diámetro muy variable y discutible, y que éste depende de los métodos de inclusión, así como de la composición del fijador usados para su estimación. Sin embargo se admite en general que la organización íntima del material genético, esta constituida por un conjunto heterogéneo de fibras de 250 Å de diámetro, con un gran número de fibras unitarias de un diámetro de 30 Å que pueden encontrarse agregadas y enrolladas. La composición química de estas fibras muestra que están esencialmente formadas de ADN asociado a histonas, pequeñas cantidades de ARN y proteínas ácidas. Las histonas son proteínas básicas que se unen a los grupos ácidos del ADN, y que llevan a cabo funciones específicas. La estructura molecular de la cromatina, muestra que está formada por subunidades, llamadas nucleosomas de 135 Å de diámetro y 55 Å de espesor que no son entidades estáticas, ya que sufren cambios con la transcripción y la replicación cromosómica. Mediante digestión enzimática suave del ADN de estas partículas, se obtienen las histonas H2A, H2B, H3, y H4, así como 140 pares de bases de ADN.,

La distribución intranuclear de la cromatina, presenta una organización precisa y se piensa que topológicamente está definida dentro del núcleo interfásico; este orden está sugerido por los acúmulos de heterocromatina o cromatina condensada localizados en posiciones periféricas o marginales adyacentes a la membrana nuclear y por la cromatina perinucleolar e intranucleolar, la que tiene codificado el ARN ribosomal u organizador nucleolar. Se ha mostrado a través de la técnica de reconstrucción tridimensional de cortes seriados de eritrocitos inmaduros que el número de áreas de cromatina condensada asociadas a la membrana, es muy cercana al número de cromosomas metafásicos:-

cos, lo que es compatible con la idea de que cada uno representa un elemento derivado de un cromosoma mitótico el cual es conservado durante la interfase (Murray y Davies 1979, citado por Hancock 1982). Por ejemplo el cromosoma X inactivo (cuerpo de Barr o cromatina sexual) permanece, durante la interfase en íntimo contacto con la lámina de la superficie interna de la envoltura nuclear.

Se ha sugerido que el nucleolo también está en contacto con la membrana nuclear durante la interfase, así mismo se sabe que los cromosomas politénicos y todos los cromosomas meióticos están en contacto con la superficie interna de la membrana nuclear por sus extremidades

Por otro lado, estructuralmente la heterocromatina y la eucromatina no se distinguen a nivel nucleosomal, sino que la compactación de la primera, se produce a un nivel de organización supranucleosomal, también se han podido observar diferencias muy conspicuas en el tamaño de los acúmulos de heterocromatina, que dependen del estado de condensación o dispersión de las fibras.

En muchas células la fibras de cromatina están condensadas y únicamente del 10% al 20% están desenrolladas y dispersas constituyendo la eucromatina (cromatina laxa o no condensada).

La microscopía electrónica ha confirmado la existencia simultánea de la heterocromatina y la eucromatina se diferencian por sus respectivas velocidades de duplicación del ADN ya que la eucromatina la realiza más rápidamente. En la transcripción del ARN, la heterocromatina representa una forma inactiva en tanto que la eucromatina es activa. La relación entre eucromatina y heterocromatina se asocia a la diferenciación y/o maduración celular, este cociente es alto en células indiferenciadas, como las células bastoides embrionarias y muchas células de tumores y usualmente en células cultivadas in vitro y es

relativamente baja en células diferenciadas, en células embrionarias tales como las neuronas y las células plasmáticas y es muy baja en células en reposo, tales como pequeños linfocitos y eritrocitos de ave, donde el núcleo ha cesado la duplicación del ADN y la transcripción del ARN. Sin embargo las neuronas y las células musculares estriadas son células altamente diferenciadas con núcleos claros, vesiculosos, que contienen gran cantidad de cromatina extendida (laxa) y muy poca de compacta. Ese cociente se relaciona más con la actividad transcripcional, que con la diferenciación celular.

La eucromatina es aquella parte del genoma donde puede haber transcripción de ARN en tanto que la heterocromatina es inactiva para tal. Existen dos tipos de heterocromatina, una formada exclusivamente por secuencias altamente repetitivas presentes en el mismo locus de ambos cromosomas homólogos en todas las células de una misma especie y que jamás se expresa, llamada heterocromatina constitutiva y la otra formada por ADN con secuencias indiferenciables del resto del genoma, presentes en uno de los dos homólogos, variable en los diferentes tipos celulares de un organismo, la que por lo tanto puede ser activa en un tejido y en otro no, llamada heterocromatina facultativa. Trabajos recientes acerca de propiedades específicas de la eucromatina sugieren que la histona H 1 está ausente, o bien presente en niveles relativamente bajos, que en vista del papel que lleva a cabo dicha cromatina en la formación de estructuras de agrupación nucleosomales, sea plausible que su ausencia provoque el que las fibras nucleosomales no se desenrollen para la transcripción.

Los ARN mensajeros son procesados en las células eucariontes en forma compleja en la que intervienen diversas estructuras ribonucleo proteicas. Estos fenómenos pueden intervenir en la regulación de la

probablemente una importante interacción funcional in vivo. Hancock y Boulikas (1982).

La membrana nuclear sensu strictu, aparece en cortes al M.E. formada por dos hojas constituidas por la típica unidad de membrana bilaminal de 5 a 7.5 nm de grosor después de la fijación. Ambas unidades se fusionan en la periferia de los poros. El contenido de lípidos es relativamente bajo en comparación con otras membranas celulares, 60 al 85 por ciento son fosfolípidos, y el patrón lipídico recuerda al de las membranas del retículo endoplasmático, excepto por los niveles altos de colesterol esterificado que presenta esta estructura

. Estas características por sí solas no parecen definir un tipo especial de membrana, sin embargo se sabe que el contenido de colesterol tiene importantes efectos en sus propiedades dinámicas; también el contenido proteico, abundante en glicoproteínas difiere entre la envoltura nuclear y el retículo endoplásmico. Así mismo se ha observado que la envoltura nuclear deriva del retículo endoplásmico, formándose a partir de sus cisternas durante la mitosis.

Los poros nucleares son estructuras complejas incluidas y espaciadas entre las hojas de la membrana nuclear y cuyo díametro externo, al observarse en secciones finas, por congelamiento-fractura (freeze-fracturing) y por tinciones negativas, es cercano a 10nm.

La lámina densa es un componente ubicuo de la membrana nuclear de células somáticas, su observación depende del procedimiento de fijación y varía mucho en diferentes tipos celulares, ya que las condiciones óptimas para que reacciones con los fijadores y colorantes de la microscopía electrónica no han sido establecidos con claridad. Por medio de la citoquímica ultraestructural y de los efectos de los tratamientos con enzimas digestivas, se ha determinado su composición proteica

Hancock y Boulikas 1982

expresión génica, acelerando, retardando y aún deteniendo el transporte del ARN al citoplasma, lo que en parte puede explicar la gran flexibilidad y diversidad de reacciones de la célula frente a los cambios del medio.

La tercera parte del núcleo está formada por espacios intercromatinianos desprovistos de heterocromatina y de componentes nucleolares, en los 100 a 150 nm. más cercanos a la heterocromatina, de esta zona, los ARN mensajeros son transcritos sobre la eucromatina. Esta parte del espacio intercromatiniano se denomina zona pericromatina Moyné y Puvion 1976. Probablemente la ARN polimerasa y los complejos enzimáticos de duplicación del ADN sean excluidos de la heterocromatina, solamente por su tamaño y la decompactación sea condición previa a la transcripción y a la duplicación.

Con la introducción de la técnica de contraste preferencial del EDTA para estructuras ribonucleoproteicas, desarrollada por Bernhard en 1969, se abrieron nuevas posibilidades de estudio ultraestructural del núcleo interfásico y se realizaron muchas investigaciones sobre el tema. Este procedimiento de coloración regresiva - se basa en el uso del EDTA (ácido etilendiaminotetraacético) como agente quelante, por medio del cual se blanquea la cromatina y se mantiene el contraste de estructuras que se sabe contienen ARN y de la cual se han presentado pruebas de su confiabilidad en el ámbito nuclear (Fakan y Bernhard 1971). Con ella Monneron y Bernhard describieron la distribución y la estructura fina o ultraestructura de varios componentes del núcleo interfásico de algunas células de mamíferos, complementándola con métodos citoquímicos de extracción química y enzimática como procedimientos comparativos.

Las evidencias directas e indirectas son compatibles con la idea de que la lámina representa al componente más importante del esqueleto nuclear, al cual el ADN cromosomal se adhiere durante la interfase.

Las actividades funcionales de la membrana nuclear, se derivan de la similitud de sus elementos con los de las membranas celulares en general, lo cual ha permitido sugerir que ofrece una barrera de permeabilidad para iones y macromoléculas. Los espacios entre las dos láminas de la membrana, forman un compartimiento discreto, llamado cisterna perinuclear, en ella se ha demostrado por métodos citofímicos la existencia de actividad de la enzima glucosa 6 fosfatasa, así mismo en o cerca de, la lámina se detecta actividad de la nucleósido trifosfatasa, que puede desempeñar un posible papel en el transporte de ARN del núcleo al citoplasma. In vivo hay una gran especificidad del transporte vectorial de muchas macromoléculas, que incluyen: partículas ribonucleoproteicas y sus componentes proteicos, histonas, proteínas reguladoras y receptores hormonales libres y unidos. La ultraestructura de los poros sugiere que forman un canal de cierto diámetro a través de la membrana por el cual hay paso de ácidos nucleicos, de genomas de virus que se replican en el núcleo y que pueden pasar en ambas direcciones, así como de partículas virales intactas y de partículas de envolturas nucleoproteicas. Sin embargo la introducción de microelectrodos en núcleos gigantes como los que contienen cromosomas politénicos en las glándulas salivales de dípteros, demuestran diferencias de potencial eléctrico entre el compartimiento nuclear y citoplasmático; estas diferencias sólo se pueden mantener si la comunicación entre ellos, a nivel de los poros, no es completamente abierta. Por otra parte los ARN procesados que ya han salido del núcleo o vuelven a él, todo lo cual habla de la alta selectividad de la envoltura nuclear.

Gránulos pericromatinianos.

Se encuentran en el núcleo de las células animales en cantidades variables, son mucho más raros que los gránulos intercromatinianos y su diámetro es de 400 a 600 Å., rodeados de un halo claro de 250 Å, se encuentran en la periferia de los acúmulos de cromatina condensada y algunas veces aislados en las áreas intercromatinianas, también se les puede observar en los canales de la cromatina cercanos a los poros nucleares pero no en ellos. Son densos al haz electrónico y su contraste es mayor al emplear el método del EDTA que ha revelado con mayor claridad su estructura fina; la cual consiste de fibras torcidas de aproximadamente 30 a 50 Å de diámetro en una matriz proteínica. Se ha observado que estas fibras emergen y tienen contacto con la cromatina y en las regiones intercromatinianas con otros gránulos y fibrillas pericromatinianas.

A pesar de que que Watson en 1962, quien las describió por primera vez pensó que se trataba de partículas virales de ARN., los resultados obtenidos por Monneron y Bernhard confirmaron que consisten de partículas ribonucleoproteicas cuyo material fibrilar se origina de la cromatina. Así mismo se ha sugerido que tienen un posible papel en el transporte de información de los genes hacia el citoplasma, ya que se desintegran al llegar a los poros y salen del núcleo en forma de fibras delgadas. Su número puede variar de acuerdo a diferentes estados fisiológicos de una misma célula, durante el desarrollo embrionario y después de la administración de hormonas, como la cortisona y los estrógenos. También varía en diferentes tipos celulares de una misma especie y entre células homólogas de diversas especies. El número de gránulos pericromatinianos cambia rápidamente al suministrar drogas que afectan varios pasos del metabolismo celular, e inhiben sobre todo el procesamiento postranscripcional. En algunos casos

se ha observado que se encuentran en gran cantidad en la superficie de la cromatina y son raros en la vecindad de los poros, por lo que se ha supuesto que son especies de ARN mensajeros acumulados y que posiblemente no sean transportados al citoplasma. Las autorradiografías de alta resolución realizadas en células incubadas con uridina marcada han permitido localizar los sitios precisos de transcripción en el espacio o región pericromatiniana. La secuencia ultraestructural de la transcripción y de los fenómenos postranscripcionales sería la siguiente: cromatina-fibras pericromatinianas - gránulos pericromatinianos - fibras ribonucleoproteicas - poros nucleares. En las células eucariontes la expresión genética se efectúa en dos espacios celulares diferentes, el núcleo y el citoplasma, lo cual determina etapas suplementarias necesarias para la síntesis de proteínas, también llamados procesos postranscripcionales, tales como el procesamiento, almacenaje y transporte hacia el citoplasma del ARN ribosomales y de ARN mensajeros y/o de los complejos de ARN heterogéneo nuclear. Posiblemente dichos fenómenos se puedan relacionar con estas estructuras, como lo demuestran los estudios de su morfogénesis en los puffs de *Chironomus*, en donde los granulos de los anillos de Balbiani homólogos de los gránulos pericromatinianos de mamíferos, representan hipotéticamente partículas de almacenamiento y/o transporte del sistema ARN hn mensajero. Por otra parte, al analizar su significado citofisiológico y en particular su comportamiento frente a algunas drogas que aumentan el número de granulos pericromatinianos y que producen acumulos de estos alrededor del nucleolo, se ha sugerido la existencia de dos tipos de granulos, cuya diferencia citofisiológica subyace a su semejanza morfológica, ya que algunos presentan un contenido de ARN preribosomal en tanto que otros contienen ARN heteronuclear o mensajero.

Gránulos intercromatinianos.

Aparecen en todas las células animales, como partículas, distribuidas en la cariolinfa, su diámetro promedio de 200 a 250 Å. Poseen un contraste prominente con el EDTA., están interconectados con fibrillas que aparecen encadenas en forma de un retículo. Son diferentes de los polisomas citoplasmáticos y al juntarse algunas veces forman pequeños bastones del mismo diámetro y contraste. No se ha encontrado ninguna relación topográfica entre estos y el nucleolo o los poros nucleares. Se ha demostrado que presentan resistencia al tratamiento enzimático con ADNasa, ARNasa y pronasa y citoquímicamente se sabe que están formados de ARN y proteínas, de lo que se deduce que son una clase especial de ribonucleoproteínas en las cuales el ARN está especialmente bien protegido. No sufren cambios ultraestructurales, ni en aspecto o localización, bajo diferentes cambios fisiológicos, aunque su número parece ser, se incrementa bajo la acción de varios antimetabolitos o durante las infecciones virales. Su distribución en el núcleo no ha dado indicación alguna de su significado biológico, el que permanece sin determinarse. Los gránulos aislados han sido descritos por algunos autores, como "ribosomas nucleares", sin haber presentado similitudes morfológicas ni bioquímicas convincentes con los ribosomas citoplasmáticos. Así los "polisomas nucleares" aislados por Sadowski y Howden 1968 (Monneron y Bernhard op.cit) no se han podido relacionar con las fibras de mensajeros o con los gránulos, además las cadenas de gránulos interconectados son bastante distintas de los polisomas citoplasmáticos.

Smetana y col 1963 y Shankar Narayan y col 1967, mostraron que los retículos densos de RNP formados por fibras y partículas están relacionados con los gránulos intercromatinianos y sugirieron que posiblemente representen la vía metabólica del ARN nucleolar migrando

al citoplasma. Estos autores propusieron que los gránulos intercromatinianos están relacionados con la síntesis del ARN 18S.

Moulé y Chauveau 1968 aislaron de núcleos de células hepáticas una clase de ARN 40 S que contienen 10% en peso de ARN de marcado rápido que sedimenta a 3.4 S. Al estudiarlos citoquímica y ultraestructuralmente llegaron a la conclusión de que se trataban probablemente de gránulos intercromatinianos. Estas partículas aisladas, son generalmente esféricas con un diámetro de 200 a 300 Å, poseen un núcleo resistente o envoltura proteica protectora que representa el 90% del peso de la partícula lo cual explica la resistencia a los tratamientos enzimáticos y extractivos de los gránulos intercromatinianos. Fibras pericromatinianas.

Esta clase de componentes ribonucleoproteicos, se observan diferenciados de las demás estructuras intranucleares sólo al emplear el método de uranilo -EDTA- plomo. Se sabe que en algunos casos tienen relación espacial con los gránulos pericromatinianos. Representan el primer producto de la transcripción que se observa en el núcleo y se acepta que son la expresión morfológica de la transcripción a lo largo de sitios desreprimidos del genoma. Topográficamente están esparcidos, por el nucleoplasma, y con una mayor abundancia en la región pericromatiniana o sea la frontera entre la heterocromatina y el nucleoplasma. (Monneron y Bernhard 1969). Su número representa, junto con el arreglo de la cromatina dispersa la mejor idea de la actividad funcional del núcleo. Pueden ser identificadas como un material fibrilar, o acúmulos contrastados, en la periferia de muchas áreas de cromatina desteñidas. Están formadas por fibrillas cuyo diámetro varía entre 30 a 50 Å y que aparecen en algunos casos como acúmulos irregulares. Algunas veces son continuas con gránulos intercromatinianos en transición visible y en otros casos se ha observado con-

xi6n o continuidad estructural entre las fibras y los gránulos pericromatinianos.

Es en esta regi6n pericromatiniana, donde existen los sitios de sntesis de ARN extranucleolar mäs importantes y donde se pueden apreciar los cambios debidos a manipulaciones experimentales como por ejemplo: en el núcleo de hígado sometido a inanición- realimentaci6n (Petrov y Bernhard 1971) o bajo el efecto del cortisol o la alfa - amanitina (Petrov y Sekeris 1971). Así mismo las fibras pericromatinianas pueden constituir un sistema excelente, para estudiar las ribonucleoproteínas extranucleolares bajo diferentes procesos experimentales con base fisiológica como las respuestas de los núcleos de células blanco a la estimulaci6n hormonal. Estudios de comparaci6n entre los gránulos pericromatinianos y los gránulos de los anillos de Balbiani llevados a cabo por Vázquez-Nin y Bernhard 1971, mostraron una clara relaci6n estructural entre ambos tipos de gránulos y las fibras.

Cuerpos Espiralados.

Las estructuras llamadas cuerpos espiralados se han mostrado ocasionalmente en las áreas de intercromatina de los núcleos de células de hígado, páncreas, nerviosas de la corteza adrenal y las Hela, mediante el método de contraste del EDTA. Los cuerpos espiralados tienen de $0.3 \pm 0.5 \mu\text{m}$ de diámetro, están compuestos por hilos enrollados cuyo grosor varía entre 400 a 600 Å. A mayores aumentos estos aparecen como paquetes de fibras delgadas de 50 Å de grosor, que están torcidos a lo largo del eje del filamento. No se ha observado más de una de estas inclusiones por corte de los materiales referidos.

Estas estructuras parecen no tener ninguna relaci6n topológica con el nucleolo, pero algunas veces es posible encontrar contigüidad con la cromatina blanqueada o descontrastada (Monneron y Bernhard 1969).

Se presentan como entidades morfológicas diferentes a otros elementos estructurales tales como los cuerpos nucleares y granulares nucleares, pues aparecen en el núcleo de células normales, desconociéndose su significado biológico.

Cuerpos nucleares.

Hay una diversidad de los llamados cuerpos nucleares que se presentan como inclusiones y de los cuales se desconoce su papel en el metabolismo nuclear. Sin embargo dichos cuerpos, que tienen una cápsula proteica contienen ARN y miden de 0.2 a 1.2 μm . de diámetro, son vistos como componentes nucleares dinámicos y candidatos a ser inclusiones nucleares. Se clasifican en general en simples y complejas los primeros están formados por agregados proteicos filamentosos de 0.2 a 0.5 μm ., que constituyen componentes de los núcleos normales y que a su vez son precursores de los filamentosos. Los cuerpos nucleares complejos (cuerpos nucleares fibrosos o granulares-fibrosos) varían en tamaño de 0.2 a 1.2 μm de diámetro y están constituidos por una cápsula de proteína filamentosa que rodea a un núcleo central de gránulos de diferentes tamaños de constitución ribonucleoproteica.

Funcionalmente se han asociado a crecimiento celular, particularmente con hipertrófia e hipermetabolismo, esta generalización se origina de su prevalencia en células tumorales en células con infecciones virales y en los experimentos de tipo endocrinológico.

El número y la clase de los cuerpos nucleares se asocia al sistema de estimulación y/o variación trófica. Su variación en número, tamaño y tipo aparece como un indicador funcional de la clase y grado de estimulación hormonal, en los núcleos de células blanco de hormonas esteroides : Padykula H. y J. Clark 1981.

Nucleolo.

Muchas revisiones exhaustivas han sido dedicadas al nucleolo, Busch y col 1965; Perry 1962, 1965, 1967; Bernhard y Granboulan 1966; Miller y Beatty 1969; Busch y Smetana 1970; Smetana y Busch 1974;

El nucleolo tiene tres grandes componentes: fibrillas de 50 a 100 Å de grosor; gránulos de 150-200 Å de diámetro y la parte difusa o matriz amorfa y que están íntimamente empaquetados y organizados con un aspecto más o menos reticular (Bernhard y Granboulan 1968). El nucleolonema observado al microscopio fotónico (Estable y Sotelo 1951), corresponde a las regiones fibro-granulares en tanto que el componente difuso constituye la pars amorfa. Así mismo en muchos tipos celulares, existen zonas fibrilares claras llamadas en general centros fibrilares (Recher y col 1969). Se ha demostrado mediante diversos estudios citoquímicos, enzimáticos y autorradiográficos, que el ARN nucleolar está contenido en las fibras y en los gránulos que componen la mayor parte del nucleolo, en tanto que el ADN activo está disperso en los centros fibrilares. Estos filamentos de cromatina intranucleolar constituyen el organizador nucleolar y están en continuidad con la cromatina perinucleolar (Bernhard y Granboulan 1968; Granboulan y Granboulan 1965). A grandes aumentos se ha observado que los gránulos están formados de fibras densamente empaquetadas y también (Marinozzi 1966), la transición del componente fibroso al granular. El anillo de cromatina Feulgen positiva que rodea al nucleolo, representa las porciones heterocromáticas del o los cromosomas asociados a éste. Los componentes fibrilar y granular difieren en su distribución de acuerdo con el tipo celular, así en las células vegetales y en las células de las glándulas salivales de dípteros se ha observado que la parte central del nucleolo es fibrilar en tanto que el componente granular se localiza en la periferia mientras

que en las células de mamíferos ambos componentes están mezclados. La estructura nucleolar, puede variar con los estados funcionales de las células en un mismo tejido, compactándose y perdiendo su disposición nucleolonemal en las células endometriales de rata castrada, recuperando su disposición laxa con la inyección de estradiol, (Vázquez-Nin 1978, 1979). Así mismo el nucleolo en los primeros estadios de su desarrollo (telofase y principios de G-1), presenta esta configuración compacta no nucleolonemal encontrada frecuentemente dentro de las células en activa proliferación (Brinkel 1985; Hay 1968 Smetana y col 1974, 1970; Stevens 1966, 1970)

En muchas células cancerosas, linfosarcomas indiferenciados, las del tumor de Ehrlich o en células tratadas con sustancias que alteran la transcripción y/o el procesamiento postranscripcional del ARN existen también nucleolos de este tipo de configuración compacta (Busch y Smetana 1970). Por el contrario en las células cuya actividad de síntesis de ARN es baja como el ovocito maduro (Sotelo y Porter 1959, y los linfocitos circulantes (Smetana y Busch 1974), el nucleolo adquiere la forma de una esfera hueca y sus componentes ultraestructurales son fundamentalmente granulares y generalmente se les llama "Nucleolos anulares" o en anillo. Algunos de estos estudios nos revelan que la morfología del nucleolo está determinada por un balance entre la síntesis del ARN precursor ribosomal y la migración de las partículas ribonucleoproteicas finales hacia el citoplasma (Studzinski y Gierthi 1972). Esta relación entre la morfología y el equilibrio funcional existente entre transcripción y la migración al citoplasma de los productos procesados unidos al componente proteico, presentes en el nucleolo, se encuentra también en el caso de los gránulos pericromatinianos y el sistema ARN hn - ARNm (Vázquez-Nin y col 1978, 1979).

La aplicación de la técnica de autorradiografía en microscopía electrónica y la combinación con el método de tinción de ribonucleoo proteínas de Bernhard, permitió relacionar el estudio de la ultrae estructura y de la función del nucleolo con los sitios de síntesis de ARN nucleolar y las estructuras involucradas en el procesamiento del ARN, llegando a concluir que el nucleolo incluye las regiones del genoma responsables de la transcripción de ARN prerribosomal, junto con sus productos.

En 1965 Granboulan y Granboulan fueron los primeros en demostrar que después de 5 min. de incubación con uridina tritiada la ra dioactividad se acumula preferencialmente dentro del nucleolo sobre el componente fibrilar localizado en contacto con el ADN intranucleolar. Cuando los pulsos radiactivos se prolongan por 10 min., las fibras son marcadas fuertemente y algunos gránulos de plata se observan sobre el componente granular, en tanto que a los 30 min. de incubación el cuerpo nucleolar posee un marcado homogéneo. Estas observaciones tempranas fueron confirmadas en una variedad de células (Unuma y col 1968; Fakan y Bernhard 1971; Fakan , 1976; Fakan 1980) . Estos estudios arrojaron dos conclusiones esenciales: 1) La síntesis de ARN nucleolar se lleva a cabo sobre la cromatina intranucleolar y el componente fibrilar es la expresión morfológica del producto transcrito unido a proteínas (Fakan y Bernhard 1971) y 2) Las fibrillas son los precursores morfológicos de los gránulos y su transformación en gránulos coincide con el procesamiento del ARN nucleolar. Lo anterior fué apoyado por Marinozzi y Bernhard al mostrar que los gránulos y fibrillas nucleolares, contienen básicamente ARN conformando ribonucleoproteínas. El tránsito de fibras a gránulos, evidencia el procesamiento y el empaquetamiento de los ARN ribosomales. Como lo mostró en 1963 K. Scherrer y col. el ADN nucleolar es transcrito

en forma de una molécula grande de ARN (45 S) que se asocia inmediatamente a proteínas y forman las fibrillas. Los eventos moleculares del procesamiento de este precursor en los ARNs 28S y 18S se refleja en la transformación del componente fibrilar en granular que corresponde a la maduración molecular del ARN ribosomal. El empleo de inhibidores de la síntesis de ARN y en especial de ARN r como la actinomicina D ha confirmado el papel del nucleolo en la maduración del ARN ribosomal, este antibiótico provoca una reorganización estructural del nucleolo caracterizada por la separación de sus constituyentes, denominada segregación, que permite apreciar autorradiográficamente su evolución.

OBJETIVO.

Las variaciones de la transcripción, en el útero de mamíferos han sido estudiadas desde el punto de vista bioquímico, encontrándose que la administración de estrógenos causa un gran aumento de la síntesis del ARN nuclear. Este se incrementa hasta en un 40% sobre el control 2 minutos después de la inyección (Hamilton 1968; O'Malley y Means 1974; Means y Hamilton 1966.) y hasta un 500% a los 20 min (Hamilton 1968). Tal intensidad y velocidad de cambios, provee de un sistema experimental apropiado para el estudio de la variación en el número de partículas ribonucleoproteicas (RNP) con el microscopio electrónico (M. E.)

Los cambios en la tasa de síntesis de ARN de las células del epitelio luminal de rata producidos por la castración y la inyección de estradiol se pueden relacionar con las variaciones del tamaño y el número de las estructuras ribonucleoproteicas intranucleares. Estas variaciones pueden ser apreciadas y cuantificadas por procedimientos estereológicos bien conocidos de la morfometría cuantitativa.

Tal modelo experimental ofrece un sistema en el cual podemos observar y cuantificar las variaciones reversibles de la expresión génica en respuesta a efectos hormonales en imágenes ultraestructurales del núcleo de células blancas, en donde las estructuras ribonucleoproteicas intranucleares tales como las fibras pericromatinianas, gránulos pericromatinianos e intercromatinianos y el nucleolo, que representan partes extracromosómicas del genoma, constituyen el resultado de la expresión génica.

En este trabajo se observaron y cuantificaron los efectos del 17β estradiol sobre las estructuras ribonucleoproteicas asociadas a la expresión génica de las células del epitelio luminal del útero de rata normal y castrada. Las variaciones de estas estructuras se determinaron mediante análisis cuantitativo de la imagen para el cual se

valoró la diferencia entre control (normal) y tratados (experimental) por procedimientos estadísticos, en un intento por obtener mayor información de la significación citofisiológica de tales partículas.

MATERIAL Y METODOS.

Condiciones experimentales.

Fueron empleadas 30 ratas adultas (100 días y 200 g.de peso) vírgenes, de la línea Wistar, proporcionadas por el bioterio de la Facultad de Medicina UNAM. a las que se les determinó la fase estral (estro) mediante la observación microscópica de frotis vaginales frescos al microscopio de contraste de fases, las ratas que tenían un ciclo regular se separaron en tres grupos:

1. Normales en estro.
2. Castradas
3. Castradas- inyectadas a intervalos de 0.25, 0.5, 1, 2, 12 y 24 hrs. con una solución que contenía 20mg. de Hemisuccinato de 17 β estradiól.

Se les mantuvo en jaulas separadas en condiciones higiénicas apropiadas, suministrándoles alimento y agua ad libitum.

Procedimientos preparativos.

A 29 ratas se les ovariectomizó bilateralmente en condiciones de asepsia, utilizando eter etílico como anestésico, tres semanas despues de la operación, las muestras de utero de 11 ratas, fueron fijadas, en tanto que 18 restantes fueron inyectadas con la solución de estradiol y las muestras de sus úteros se fijaron a los intervalos señalados. La restante fué sacrificada, en estro, donde se encuentran altas concentraciones de estrógeno endogeno en condiciones normales.

Se obtuvieron muestras anulares transversales con respecto al eje principal de los cuernos uterinos, las cuales fueron procesadas para microscopía electrónica de la siguiente manera:

Fijación.

Las muestras fueron cortadas en fragmentos de aproximadamente 1mm. y sumergidas en glutaraldehído al 2.5% más paraformaldehído al 4% diluí

dos en amortiguador de cacodialatos al 0.19 M a pH 7.2 - 7.4
Las muestras se separaron en dos grupos, unas que fueron post-fijas en tetraóxido de osmio al 2% y otras que fueron deshidratadas sin post-fijación.

Deshidratación.

Los cortes se deshidrataron pasándolos por alcoholes graduales; de 70% (dos cambios de 10 min), 80% (un cambio de 20 min), 96% (un cambio de 20 min) y 100% (dos cambios de 20 min. c/u), para después introducirlos en óxido de propileno, como intermediario de la deshidratación-preinclusión (dos cambios uno de 30 y otro de 20 min.).

Las muestras se preincluyeron en una mezcla de inclusión disuelta en óxido de propileno a concentraciones crecientes, quedando durante 12 a 24 horas en una solución de preinclusión compuesta por 50% de óxido de propileno y 50% de la mezcla epóxica de inclusión.

Inclusión.

Se introdujo el material en la mezcla epóxica de inclusión usando cápsulas de gelatina o un molde de hule para polimerizarlo (endurecerlo) a 60°C. en una estufa.

Microtomía.

Los bloques de material incluido fueron cortados con un ultramicrotomo Porter Blum MTL de operación manual y cuchilla de vidrio, seleccionando los cortes semifinos (gruesos) de color púrpura -azul de aproximadamente 500 μm de grosor para observaciones de microscopía óptica, para lo cual fueron teñidas con azul de toluidina, en tanto que los cortes finos de color plateado o dorado claro de 60 a 90 μm de espesor se montaron en rejillas de cobre a las que previamente se les colocó una membrana de formvar como sostén.

Tinción (Contraste).

Algunas preparaciones con posfijación con tetraóxido de osmio se

contrastaron por métodos de tinción general con acetato de uranilo y citrato de plomo, en tanto que los procedimientos de tinción preferencial con EDTA (ácido etiléndiaminotetraacético) para RNPs fueron realizados de acuerdo con Bernhard de la siguiente manera:

Se flotan las rejillas en una sol. de acetato de uranilo al 4% durante 1 min. después de lo cual se lavan en agua bidestilada y se secan. Se ponen sobre una gota de EDTA .2 M a pH aprox. 7 de 18 a 25 min. Se lavan y secan; finalmente se flotan las rejillas sobre una gota de citrato de plomo 0.02% según Venable durante 2 min. al cual se le coloca en un recipiente que contiene lentejas de sosa y un algodón con agua, que proporcionan una atmósfera húmeda.

Procedimientos estereológicos.

Las imágenes de los cortes ultrafinos se observaron con un microscopio electrónico EM-9 Carl Zeiss, con el cual se obtuvieron micrografías electrónicas a un aumento entre 7000 a 8000 las que fueron amplificadas 2.5 y 2.1 veces respectivamente. Estas fotografías en papel se emplearon para el análisis morfométrico tomando las siguientes precauciones: fueron micrografiadados los núcleos de las células del epitelio superficial (endometrial), cuyo diámetro no fuera menor que dos tercios de la media de clase del diámetro, para evitar los cortes tangenciales en los cuales existe más cromatina y son más abundantes, por esta razón, las estructuras pericromatinianas y menos frecuentes los gránulos intercromatinianos. Los cortes nucleares tomados al azar producirían un incremento de la dispersión de valores y sería necesario un gran número de observaciones. Para evitar medir un núcleo más de una vez, fueron desechados 20 cortes de 1 μ m entre una rejilla y otra. Las técnicas de análisis estereológico empleadas permiten obtener datos que se utilizaron para correlacionar cuantitativamente los cambios del nucleolo de las fi-

bras, gránulos intercromatinianos y pericromatinianos debido al tratamiento con estrógenos exógenos.

Las estructuras antedichas fueron estudiadas en imágenes micrográficas impresas en papel, usando métodos adecuados para estimar la fracción ocupada por la estructura en estudio, del volumen nuclear total. Se utilizó el método de la fracción de puntos para gránulos intercromatinianos y fibras pericromatinianas, superponiendo a la imagen impresa, una mica transparente punteada regularmente. Se cuantificó el número total de intersecciones que coinciden con estos elementos y el número de intersecciones en el área nuclear utilizando el cociente del primero entre el segundo como estimación relativa de frecuencia. Se tomaron como criterios operacionales para diferenciar y así contar los gránulos intercromatinianos: 1) que son más pequeños que los gránulos pericromatinianos; 2) que no tienen el halo claro característico de estos; 3) que se agrupan en acúmulos.

Para las fibras pericromatinianas se utilizaron los criterios siguientes: 1) que son elementos o estructuras fibrilares; 2) son extranucleolares; 3) son indiferentemente pericromatinianas o intercromatinianas

El número total de gránulos pericromatinianos en cada corte fue determinado en relación con el área nuclear para obtener su densidad numérica. Se tomaron precauciones para estandarizar el grosor de los cortes, con lo cual no se necesitó hacer ninguna corrección para estudiar su variación relativa en número.

Los resultados del experimento fueron sometidos al análisis estadístico por medio de la prueba "t" de Student y la desviación estándar.

RESULTADOS.

Morfología.

La figura 1 se muestra una imagen de un núcleo de útero normal teñido con la técnica del EDTA de Bernhard, en el cual se observan los elementos que se cuantificaron. En general el núcleo presenta un ambiente fibrogranular que se extiende en la mayor parte del ámbito nuclear en donde existen pocas áreas de cromatina compacta adherida a la membrana nuclear, el nucleolo presenta una estructura nucleololemal o de hilo (fibras) nucleolares que se ha perdido en cierta medida entre las cuales quedan partes claras que corresponden a la llamada parte amorfa y tiene una estructura granular prominente, puede haber uno o dos por célula. Es un nucleolo que evidencia alta actividad de síntesis de ARN ya que es grande y con muchos espacios claros dentro.

En la región central del núcleo se observan gránulos pericromatinianos de forma esférica característica y más grandes que los intercromatinianos, con un halo claro característico y que son bastante abundantes en estas preparaciones, la cromatina compacta está dispuesta sobre la membrana nuclear, que en esta técnica no se distingue, sino como un área gris, dado que no demuestra desoxiribonucleoproteínas.

En la zona pericromatiniana se observan áreas de gránulos mezclados con fibras que se agrupan en esta zona tanto como en la zona intercromatiniana, este núcleo tiene abundantes ribonucleoproteínas y en su citoplasma se advierten polisomas más o menos distribuidos a lo largo de la membrana, aunque no todos están adheridos a su hoja externa.

La figura 2 muestra el núcleo de una rata castrada en la que se ha producido una marcada disminución del volumen nucleolar, así como decaimiento vertiginoso de los gránulos pericromatinial

nos y del ambiente fibrilar y la reducción de las áreas ocupadas por gránulos intercromatinianos en general muestra una escasez de RNP. Los gránulos pericromatinianos existen generalmente dispersos, cuando son numerosos se les encuentra agrupados en acúmulos que no tienen ninguna relación con el nucleolo. También se observa una marcada disminución del volumen nucleolar, que no presenta el aspecto nucleolemal que se observa en la normal y por el contrario aparece como una esfera. Se presentan algunos gránulos intercromatinianos y escasas fibras así como estructuras RNP intermedias que son mezclas o continuidades de fibras y gránulos intercromatinianos. Las fibras pericromatinianas son más abundantes alrededor de la cromatina más de lo que lo son en las áreas pericromatinianas.

Después de 15 min. de la inyección de estradiol el cambio más sobresaliente es la casi total desaparición de los acúmulos de gránulos prericromatinianos. A los 30 min. después de la inyección de estradiol es frecuente observar gránulos solitarios. Los gránulos pericromatinianos son escasos y el nucleolo sin embargo es pequeño y fibrilar. Las fibras pericromatinianas son abundantes alrededor de la cromatina densa y en los espacios intercromatinianos (figura 3). Una hora después de la inyección las partículas ribonucleicas estudiadas están igualmente distribuidas y ocupan mucho del espacio nuclear. Los gránulos pericromatinianos se encuentran frecuentemente en pequeños grupos.

Después de 2 horas de tratamiento, el nucleolo aparece tan grande como en los animales castrados, las ribonucleoproteínas permanecen con una disposición similar al estado precedente.

En la figura 4 se muestra que después de 12 a 24 hrs. el nucleolo incrementa su tamaño y sus áreas granulares llegan a ser evidentes. La frecuencia de gránulos pericromatinianos se incrementa, aunque no

están particularmente agrupados alrededor del nucleolo. Los granulos intercromatinianos y las fibras pericromatinianas ocupan los espacios intercromatinianos.

Estereología.

De los diámetros nucleares medidos en cortes delgados por medio de un microscópio de luz y micrómetro se obtuvo el diámetro promedio de cada clase, que fué estimado de la media de los diámetros de acuerdo con la ecuación de De Hoff 1966, para estimar comparativamente el efecto del tratamiento, sobre el tamaño nuclear, se calculó la desviación estandar de la media, los resultados de éstos calculos se muestran en la tabla I, en la que se aprecia una pequeña pero insignificante diferencia que no se relaciona con el tratamiento, quizás debida a variables no controladas (intervinientes) en los procedimientos preparativos.

Castración. La castración como se muestra en la tabla II produce cambios importantes, de los que destacan, el decaimiento del volumen nucleolar relativo, cuantificado en fracción de área, así como el incremento del número de gránulos pericromatinianos. Las fibras pericromatinianas y los gránulos intercromatinianos presentan pequeños cambios recíprocos.

Inyección con 17 β estradiól. El tratamiento con estradiol a tiempos cortos de 15 min. de tratamiento, muestra que el número de gránulos pericromatinianos por unidad de área nuclear disminuye significativamente, permaneciendo así hasta los 30 min., incrementándose a niveles del normal, entre 1 y 12 hrs. despues del tratamiento con estradiól (grafica A de la fig. 5) y se aproxima en número a los niveles de castración, 24 hrs. despues de la administración del estradiol.

La media del diámetro o promedio de estos granulos no cambia sig--

nificativamente entre el control, el castrado y los grupos experimentales estudiados de 0.5 a 24 hrs. después del tratamiento con 17β estradiol.

En la gráfica de la figura 5-C se puede apreciar que la fracción de área nuclear aumento a las 2 hrs. La fracción de área nuclear se incrementa a las 2hrs., después de la inyección, alcanzando a las 24 hrs. un nivel significativamente mayor que en los normales.

En las gráficas de la figura 5-B y 5-D se muestra que los gránulos intercromatinianos y las fibras pericromatinianas presentan pequeños cambios con el tratamiento.

DISCUSION.

Los resultados del estudio de la variación de las estructuras nucleares relacionadas con la expresión génica, a lo largo de este experimento, nos muestra que la supresión de las hormonas esteroides con la castración provoca cambios nucleares que el tratamiento con 17β estradiol, no llega a compensar, para producir un estado normal.

Es necesario advertir, que deben ser estudiados los efectos de tratamientos crónicos con dosis bajas de estradiol con la administración simultánea de progesterona.

Se ha mostrado que la ovariectomía inhibe la síntesis de ARN nuclear uterino (Hamilton y col., 1968). Así mismo al medir la actividad de la ARN polimerasa II dependiente de Mg^{2+} , que es responsable de la síntesis de ARN heterogéneo nuclear, y la incorporación de uridina tritiada al ARN, Hamilton encontró que los valores más bajos de ambos parámetros se encuentran a los 21 días después de la castración.

El aumento de los granulos pericromatinianos encontrados en la presente investigación en animales tratados en la misma forma sugiere que estos granulos, son un compartimiento de almacenaje intranuclear de ARN extranucleolar. Entonces el número de granulos pericromatinianos esta en equilibrio entre la velocidad de formación, es decir la rapidez de transformación de las fibrillas pericromatinianas en gránulos pericromatinianos, y la velocidad de desaparición de éstos por migración del ARN hacia el citoplasma.

Esta suposición está apoyada por resultados experimentales de interpretación menos clara, en donde se encuentran incrementos similares bloqueando la síntesis de ARN y el procesamiento, con un choque hipotérmico (Puvión y col., 1977.), así como los experimentos de Moyne y col. (1977) utilizando cicloheximida, la cual dificulta tanto la síntesis como el procesamiento del ARN y las proteínas.

Al asociar las observaciones llevadas a cabo en le presente trabajo a las tres semanas despues de la castración, con la disminución de la tasa de síntesis de ARN (Hamilton y col., 1968) se puede asumir que el número de granulos pericromatinianos, está en un estado estable en el que la tasa de síntesis iguala a la tasa de procesamiento-transporte. Tal incremento de los gránulos pericromatinianos puede ser interpretado como debido a que la ovariectomía produce una disminución mayor en el transporte que en la síntesis de ARN.

El rápido decremento del número de gránulos pericromatinianos que sigue al tratamiento hormonal demuestra un efecto postranscripcional muy temprano del estradiól, que consistiría en un aumento drástico de la velocidad del transporte del ARN del núcleo al citoplasma.

Sin embargo a 1 hr. después de la administración de estradiol, la tasa de síntesis se incrementa y contraresta la pérdida, por lo que el número de gránulos aumenta.

En el material estudiado el incremento en el número de granulos pericromatinianos se produce en diversas áreas nucleares, a excepción de la región nucleolar. Esto sugiere que estos gránulos están relacionados con la síntesis de ARN de algunos genes estructurales especiales cuya tasa de transcripción es regulada independientemente de aquellos que están situados en la cromatina nucleolar. Fenómeno similar a lo que ocurre en los puffs y en los anillos de Balbiani de cromosomas politénicos (Vázquez-Nin y Bernhard 1971).

Sin embargo en las condiciones experimentales extremas que comprometen seriamente la viabilidad de las células, otros autores (Nash y col., 1975; Puvión y col., 1977) distinguen dos tipos funcionalmente diferentes de granulos pericromatinianos: nucleolares y extranucleolares. Cabe señalar que el tipo nucleolar no se ha observado en células normales.

El volumen relativo del nucleolo disminuye con la castración a partir de las 2hrs. en adelante hasta el final del experimento. Estos hallazgos son consistentes con los cambios de la actividad de la ARN polimerasa activada con Mg^{2+} producidos en la misma especie biológica por ovariectomía, así como en las tratadas con la misma dosis de estradiol (Hamilton y col. 1968).

Se ha comunicado los efectos de los estrogénos sobre la estructura fina del nucleolo de las células del epitelio endometrial y del estroma (Tachi y col. 1974). En estos estudios no se han echo determinaciones cuantitativas, sin embargo se puede observar que en las células del músculo liso y del epitelio endometrial hay una diversificación de sus elementos ultraestructurales y presuntivamente un incremento en el volumen nucleolar.

El estradiol induce aumentos muy importantes en la incorporación de uridina tritiada al ARN nuclear de marcado rápido (Hamilton y col. 1968). Esta actividad específica, se presenta por encima del control despues de 2 min y prosigue así hasta las 24 hrs despues del tratamiento hormonal. Dado que Bachellerie y col. (1975) detectan ARN hn en las fibras pericromatinianas la observación de que la frecuencia de dichas fibras no cambia demasiado durante el experimento, no está de acuerdo con los mencionados datos bioquímicos, ni con el trabajo de Nash y col. (1975) que detecta aumentos de las mencionadas fibras durante reactivaciones súbitas de la trascripción total de hepatocitos en cultivo.

La ausencia de cambios sistemáticos en el volumen nuclear, contrasta con el muy bien conocido aumento que tiene lugar en los linfocitos activados con fitohemaglutinina (Milner y Hyhoe 1968), quizás esto sea debido a que en este experimento existen cambios de la velo-

..

cidad de la expresión genica en las células diferenciadas, en dife-
rentes estados metabólicos, mientras que en las transformaciones de
los linfocitos pueden considerarse como alteraciones aún más drásti-
cas que posiblemente impliquen cambios del estado de diferenciación
celular.

CONCLUSIONES.

El decremento del volumen nucleolar observado después de la ovariectomía, es producido por la consecuente inhibición de la síntesis de ARN.

La acumulación de granulos pericromatinianos extranucleolares, indica un almacenaje debido a una dificultad en el transporte.

El estradiol estimula independientemente la síntesis y el transporte de ARNs al citoplasma.

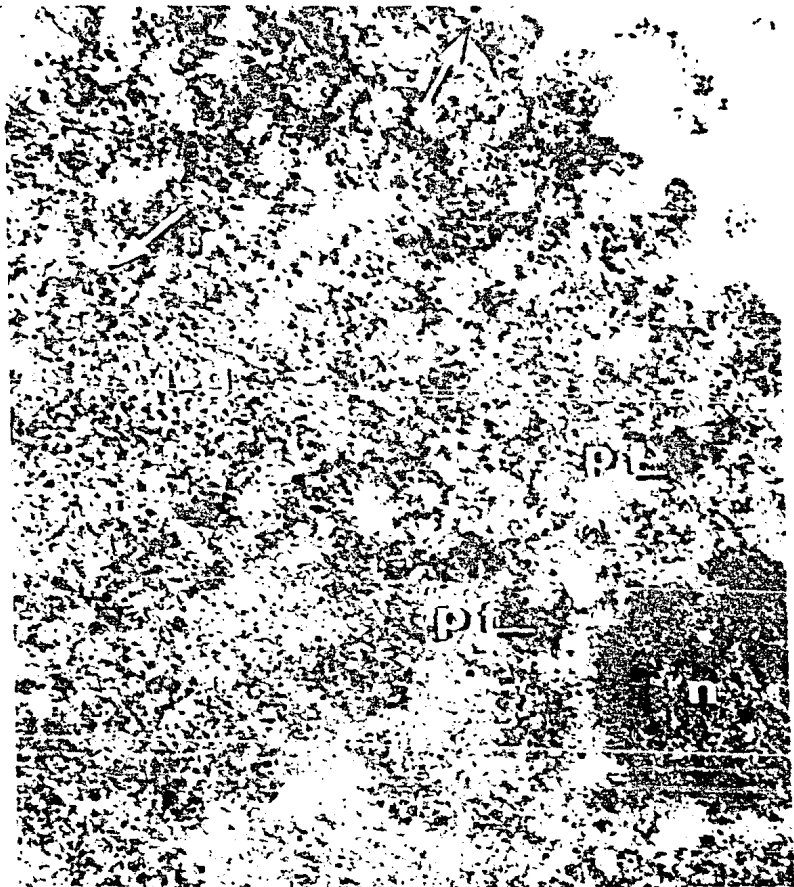


FIGURA 1, Núcleo de célula del epitelio endometrial de útero de rata normal en estro. Contraste con uranilo-EDTA-plomo. Las estructuras ribonucleoproteicas son abundantes y uniformemente distribuidas. El nucleolo (n) está compuesto por fibras y granulos entremezclados. Los gránulos intercromatinianos (icg) forman grandes acúmulos. Los gránulos pericromatinianos (flechas) aparecen aislados o en pequeños grupos. Las fibras pericromatinianas (pf) son abundantes y estan por todo el nucleoplasma. 34 000 X.

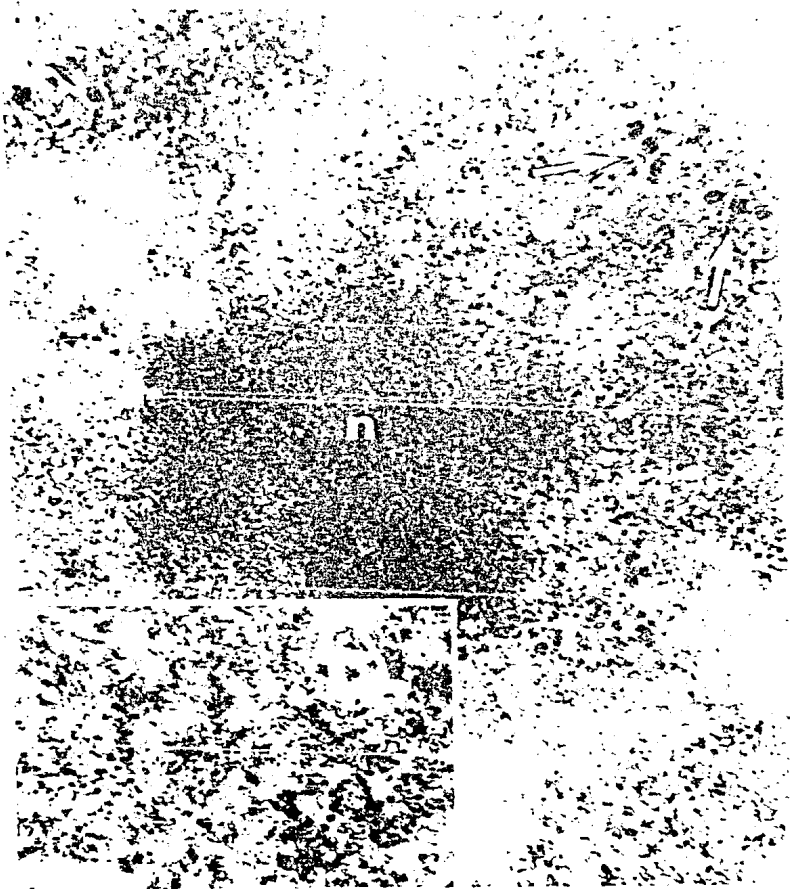


FIGURA 2, Núcleo de célula del epitelio endometrial de útero de rata castrada . Contraste con uranilo-EDTA-plomo. Se observan acumulos de gránulos pericromatinianos (flechas). Las fibras pericromatinianas son abundantes alrededor de la cromatina compacta decolorada por el EDTA. El nucleolo (n) es compacto y está formado principalmente por fibras. 42 000 X. En el recuadro se aprecian grandes grupos de gránulos pericromatinianos. 19 000 X.



FIGURA 3, Núcleo de célula del epitelio endometrial de útero de rata castrada- inyectada 30 min. despues con estradiol. Contraste con uranilo-EDTA-plomo. Se observan escasos gránulos pericromatinianos y las fibras pericromatinianas rodeando la cromatina compacta que deja espacios intercromatinianos claros. El nucleolo (n) está formado por fibras. 43 000 X.

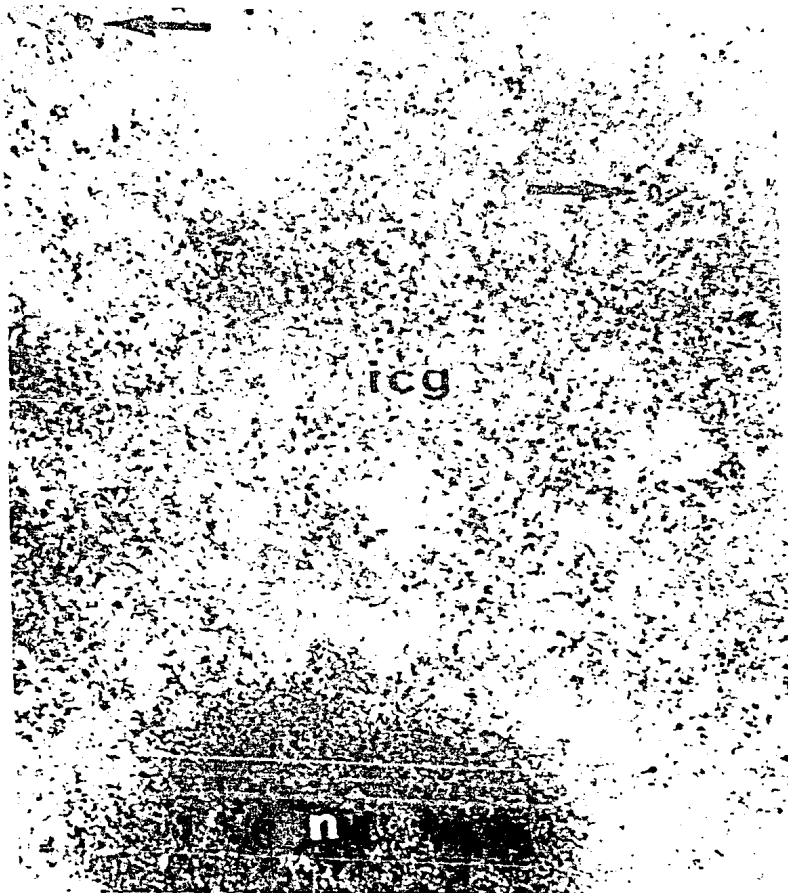


FIGURA 4. Nucleo de célula del epitelio endometrial de útero de rata castrada -inyectada 24 hrs. despues con estradiol. Contraste con uranilo-EDTA-plomo. Los gránulos pericromatinianos (flechas) observados son abundantes y no forman grupos. Los gránulos interchromatinianos (icg) y las fibras pericromatinianas ocupan el espacio interchromatiniano. El nucleolo (n) es grande y está formado por elementos granulares y fibrilares. 41 000 X.

TABLA I

DIAMETRO NUCLEAR.

	No. de mediciones	Media	Desviación Estandar
Control	184	4.2	0.6
Castrado	138	3.7	0.6
Tiempo despues de la inyección.			
15 min.	160	4.6	0.9
30 min.	136	3.5	0.5
1 h.	160	3.8	0.6
12 h.	152	3.8	0.4
24 h.	153	4.1	0.5

TABLA II.
EFECTOS DE LA CASTRACION SOBRE LAS ESTRUCTURAS RIBONUCLEOPROTEICAS.

	Control	Tratado	$\Delta \%$
Nucleolo			
N	47	40	
\bar{F}_a	0.105	0.038	-63.81
DS	0.043	0.011	
P		0.001	
Granulos pericromatinianos			
N	40	57	
\bar{N}_a	1.642	2.835	+72.66
DS	0.550	0.534	
P		0.001	
Granulos intercromatinianos			
N	20	37	
\bar{P}_p	0.094	0.074	-21.28
DS	0.035	0.030	
P		0.05	
Fibras pericromatinianas			
N	20	37	
\bar{P}_p	0.376	0.437	+16.22
P		0.05	

N= número de mediciones.
 DS= desviación estandar.
 p= probabilidad de que las diferencias ocurran por el cambio.
 \bar{F}_a = fracción de área; promedio del área del corte del nucleolo por unidad de área nuclear.
 —
 \bar{N}_a = promedio del número de granulos pericromatinianos por unidad de área nuclear; el grosor de los cortes no correctos se estandarizó.
 \bar{P}_p = promedio del número de puntos que caen sobre un componente ribonucleoproteico, dividido por el número total de puntos de prueba.
 $\Delta\%$ = porcentaje de cambio definido como:

$$\frac{X_{\text{tratados}} - X_{\text{control}}}{X_{\text{control}}} \times 100$$

Alberga, A.N. Massol, J.P. Raynaud and E.E. Baulieu (1971) Estradiol binding of exceptionally high affinity by non histone chromatin protein fraction. Biochemistry 10:3835-3842.

Arnaud, M., Y Beziat., J-C Guilleux et Mousseron-Canet, M. (1971) - Les RNA polymérasas dans L'endomètre utérin de genisse stimulation de la RNA polymérase nucléolaire par le complexe cytoplasmique 5 S estradiol C.R. Acad. Sc. Paris 272: 635-638.

Azis, S., y Knowler., J.T., (1978). Characterization of uterine Heterogeneous nuclear Ribonucleic Acid and the effect of estradiol 17 Beta on its Synthesis Biochem. J. 172: 587-593.

Bachelierie, J.P., E. Puvion et P. Zalta (1975). Eur. J. Biochem. 58:327.

Barbosa-Salazar, F.R. (1984). Variaciones en el volumen nuclear y nucleolar en células endometriales de rata (Rattus rattus) durante los primeros días de la preñez. Tesis Facultad de Ciencias de la U.N.A.M.

Bernhard, W. and N. Granboulan (1968). The Nucleus. Eds. Dalton, A.J. y Hagueneau F. Academic Press N.Y.

Bernhard, W. (1969). A new Staining procedure for electron Microscopical cytology. J. Ultrastructure Research,: 27 ; 266-288.

Bernhard, W. (1971). Proceedings of 10th International Cancer Congress. Year book Pub. Co.

Billing. R.J., B. Barbiroli, y R.M.S. Smellie (1969). Biochim Biophys Acta 190: 60.

Busch, H. Ballal, N.R., Ro-Choi T. S. and Rothblum, L.I. (1965). International Symposia "The nucleolus Structure and function " 18-19.

Busch, H. and K. Smetana (1970). The nucleolus Academic Press, N.Y.

- Bouteille, M. (1972). Ultrastructural localization of proteins and nucleoproteins in the interphase nucleus. Karolinska Symposia on Research Methods. 5th Symposium Gene Transcription in Reproductive Tissue: 11-33.
- Boutille, M., Laval, M. y Dupuy-Coin, A.M. (1974). Localization of ultrastructural autoradiography and cytochemistry. In the Cell Nucleus., Busch H. ed. Academic Press, New York: 13-71.
- Branca, A. et. Verne, J. (1956). Précis D' Histologie. Libraires de L'Académie de Medecine, Paris.
- Brinkley, B.R. (1965). J.Cell Biol 65: 411.
- Clark, J. H., y Peck, E.J.Jr. (1979). "Female Sex, steroids receptors and function." Monographs on Endocrinology. Springer Verlag. N.Y.
- Clegg, P.C. (1969). Introduction to Mechanisms of Hormone action. W. Heinemann Medical Book L d. London P 71-80.
- Cohen, M.E. y Hamilton, T.H. (1975). Effect of estradiol 17 beta on the synthesis of specific uterine non histone chromosomal proteins Proc. Nat. Acad. Sci. 72: 4346-4350.
- Chevrenont, M. (1956). Notions de Cytologie et Histologie. Edicions De Soer-Liége Paris.
- De Hoff, R.T. (1968). Measurement of number and average size in volumen; en De Hoff and Rhines, Quantitative microscopy. 128-148 Mcgraw-Hill. New York.
- Estable, C. y Sotelo, J.R. (1951). Rev. Inst.Invest.Ciencias Biol. Monte video 1-105.
- Fakan, S. (1976). Localization of paternal genome in early mouse embryos by electron microscope autoradiography. J. Microscop. B., 27:19-24
- Fakan, S. y Bernhard, W., (1971). Localization of rapidly and slowly labelled nuclear RNA as visualized by high resolution autoradgraphy Exp. Cell. Res., 67; 129-141.

- Fakan S. (1980). Ultrastructural visualization of transcription at the cellular and molecular level. Biol. Cell., 39: 113-116.
- G. Giannopoulos & J. Golski (1971). Estrogen receptors: Quantitative studies on transfer of estradiol from cytoplasmic to nuclear binding sites. J. Biol. Chem. 246: 2524-2529
- Gorsski, J. (1964). Early estrogen effects on the activity of uterine ribonucleic acid polymerase. J. Biol. Chem. 239: 889-892.
- Granboulan, N. and Granboulan, Ph. (1965). Cytochimie ultrastructurale du nucléole II. Etude des sites de synthèse de RNA dans le nucléole et le noyau. Exptl. Cell. Res., 38: 604.
- Hamilton, T.H. Windell, C.C. and Tata, J.P., (1965). Sequential stimulation by estrogens of nuclear RNA synthesis and DNA dependent RNA polymerase activities in rat uterus. Biochem. Biophys. Acta., 108: 168-172.
- Hamilton, T. H. (1968). Control by Estrogen of genetic transcription and translation. Science 161: 649.
- Hamilton, T.H. (1971). In the Biochemistry of Steroid Hormone Action, ed. Smellie, R.M.S.: 49-34 Academic Press. London.
- Hancock, R. and Boulikas, T. (1982). Functional organization in the Nucleus., International Review of Cytology. 79.
- Harris, H. (1970). Nucleus and Cytoplasm Clarendon Press. Oxford. 80-99.
- Hay, E.D. (1968). The Nucleolus Academic Press. N.Y. 1-79.
- Jacob, F. and Monod, J. (1961). Genetic regulatory mechanisms in the synthesis of proteins. J. Mol. Biol. 3: 318-356.
- Knoelner, J.T. and Smellie, R.M.S. (1973). Biochem. J. 131: 689-697.
- Luck, D.N. and Hamilton, T.H., (1972). Early estrogen action: stimulation of the metabolism of high molecular weight and ribosomal RNA's Proc. Nat. Acad. Sci. U.S.A. 69: 157-161.
- Marinozzi, V., (1966). Sperimentale 116: 381.
- Means, A.R. and Hamilton, T.H. (1966). Early estrogen action: concomitant stimulations within two minutes of nuclear RNA synthesis of nuclear RNA synthesis and uptake of RNA precursors by the uterus. Proc. Nat. Acad. Sci. 56: 1594-1598.

- Petrov, P. and Bernhard, W. (1971). Experimentally induced changes of extra nucleolar ribonucleoprotein components of the interphase nucleus J. Ultrastruct. Res., 35: 386-402.
- Perry, R.P. (1962). Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A. 48: 2179
- Perry, R.P. (1965). The nucleolus and the synthesis of ribosomes. Nat Cancer Inst. Monograph 18: 325.
- Perry, R.P. (1967). The Nucleolus in Cell metabolism Ann.Rev. Plant. Physiol., 18: 25.
- Puvion, E. et Moyne, G. (1967). Le noyau cellulaire La Recherche, 7:225,
- Puvion, E., Viron, A., and Bernhard, W. (1977). Unusual accumulation of ribonucleus of cultured rat liver cells after hyperthermic shock. Biol.Cell. 29: 81-88.
- Sadowski, P.D. and Howden, J.A. (1968). J. Cell Biol. 37: 163.
- Shankar-Narayan, K., Steele, W.J., Smetana, K. and Busch (1967). Ultrastructural aspects of ribonucleoprotein network in the nuclei of tumor and rat liver. Exp. Cell. Res., 46: 65-77.
- Scherrer, K. Latham, H. and Darnell, J.E. (1963). Demonstration of an unstable RNA and of a precursor to ribosomal RNA in HeLa Cells. Proc. Natl. Acad. Sci., 49: 240.
- Smetana, K. and Busch, H. (1974). The nucleolus and the nucleolar DNA In The Cell Nucleus. Academic Press. N.Y.
- Sotelo, J.R. & Porter, K.J. (1959). Biophys Biochem Cytol. 5: 327.
- Stevens, B.J. and Swift, H.J. (1966). RNA transport from nucleus to cytoplasm in Chironomus salivary glands. J. Cell. Biol., 31: 55-77.
- Stevens, B.J. and J. André (1969). Handbook of Molecular Cytology Ed. Lima de Faria A. North Holland. Publ. Co. Amsterdam 837-871.
- Stevens, B.J. (1970). Proc. 7th Int. Cong. Electron Microscopy 242.
- Stryer, L. (1975). Biochemistry W.H. Freeman and Co. San Francisco.
- Studzinski, G.P. and Gierthy, J.F. (1972). Acta Cytologica, 16: 245.
- Szego, C.M. (1965). Role of Histamine in mediation of hormone action Federation Proc., 24: 1343-1352.
- Szego, C.M. et al. (1971). Biochem.J., 123: 523-538.

- Milner, G.R. and Hayhoe, F.G.J. (1968). Ultrastructural localization of nucleic acid synthesis in human blood cells. Nature London, 218: 785-787.
- Miller, O.L. and Beatty, B. (1969). Genetics Suppl. 61: 1
- Miller, B.G., and B. Baggett (1972). Effects of 17 beta estradiol on the incorporation of pyrimidine nucleotide precursors into nucleotide pools and RNA in the mouse uterus. Endocrinology 90: 645-656.
- Monneron, A. and Bernhard, W. (1969). Fine structural organization of mammalian cells. J. Ultr. Res. 27: 266-288.
- Moore, R.J. and Hamilton, T.H. (1964). Proc. Nat. Acad. Sci. U.S.A. 52: 439-446.
- Moulé and Chauveau, J., (1968). J. Mol. Biol., 33: 465.
- Moyne, G. and E. Puvion (1976). Visualization of Transcriptional Activity in the cell Nucleus. Sixth European Congress on Electron Microscopy 14-34. Jerusalem.
- Moyne, G. Nash, R.E. and Puvion, E. (1977). Perichromatin granules in isolated hepatocytes treated with cortisol and cycloheximide. Biol. Cell. 30: 5-16.
- Nash, R.E., Puvion, E. and Bernhard, W. (1975). Perichromatin fibrils as components of rapidly labeled extranucleolar RNA J. Ultrastruct. Res. 53: 395-405.
- O'Malley, B.W., Mc Quirre, W. L. Kohter, P.O. and Korenman, S.G. (1969). Studies on the mechanism of steroid hormone regulation of synthesis of specific proteins. Rec. Progr. Horm. Res., 25: 105-160.
- O'Malley, B.W. and Means, A.R., (1974). Femal Steroid hormones and target cell nuclei. ; Science ., 183: 610-619.
- Recher, L. Whitescarver, J. and Briggs, L.J. (1969). Ultrastruct. Res. 29: 1
- Rocheffort, F. Lignon and F. Capony (1972). Formation of estrogen nuclear reespor in uterus e ect of androgens estrone and nafoxidine. Biochem. Biophys. Res. Commun. 47: 662-670.
- Padykula, H.A. and Clark, J.H. (1981). Nuclear bodies as Funcitional indicators in the farget cells of set steroid Hormones. In: The Cell Nucleus, Busch H. ed. Academic. Press, N.Y. : 309-339.
- Petrov, P., and Sekeris, C.E. (1971). Exp. Cell. Res. 69: 393-401.

- Tachi, C., Tachi, S., and Linder, H.R. (1974). Effects of ovarian hormones upon nucleolar ultrastructure in endometrial stromal cells of the rat. Biol. Reprod. 10: 404-413.
- Tata, J.R. (1968). Nature 219: 331-337.
- Teng, C.S. and T.H. Hamilton (1964). Biochem. J. 105: 1101.
- Toff, D. and Gorski, J. (1966). A receptor molecule for estrogens; isolation from the rat uterus and preliminary characterization Proc. Nat. Acad. Sci. U.S.A. 55: 1574.
- Toff, D. (1972). The interaction of uterine estrogen receptors with DNA J. Steroid. Biochem 3: 515-522.
- Unuma, T. and Busch, H. (1967). Cancer Res. 27: 1232.
- Vázquez-Nin, G.H., and Bernhard, W. (1971). Comparative ultrastructural study of perichromatin and Balbiani Ring granules. J. Ultrastruct. Res. 36: 842-866.
- Vázquez-Nin, G.H. Chávez, B. y Tomas Martin, C. (1973). A preferential staining method for chromatin in electron microscopy. J. Microscopie 16:246.
- Vázquez-Nin, G. H., Echeverría, O.M., Molina, E. and Fragoso, J. (1978). Effects of ovariectomy and estradiol injection on nuclear structures of endometrial epithelial cells. Acta. Anatómica 102: 308-318.
- Vázquez-Nin, G.H., Echeverría, O.M., and Pedron, J. (1979). Effects of estradiol on the ribonucleoprotein constituents of the nucleus of cultured endometrial epithelial cells. Biol. Cells. 35: 221.
- Watson, M.L., (1972). Observations a granule associated with chromatin in the nuclei of cells of rat and mouse. J. Cell. Biol. 14: 162-167.
- Wilson, J.D. (1963). Proc. Nat. Acad. Sci. 50: 93.
- Zavala-Padilla, G.T. (1980). Cambios en las partículas ribonucleo - proteicas intranucleares de las células epiteliales endometriales durante el ciclo estral de rata. Tesis Licenciatura, Biología, Facultad de Ciencias, U.N.A.M. México.