



0034/ 1
UNIVERSIDAD NACIONAL AUTONOMA DE MEXICO ²⁰

FACULTAD DE CIENCIAS

EFFECTO DE LA AFLATOXINA B1 EN NUCLEOS
INTERFASICOS DE CELULAS HEPATICAS
DE RATON

T E S I S A
PARA OBTENER EL GRADO DE:
ESPECIALISTA EN MICROSCOPIA ELECTRONICA
APLICADA A LAS CIENCIAS BIOLOGICAS
P R E S E N T A
BIO. MARCO ANTONIO GONZALEZ JIMENEZ

TEJIS CON
FALLA DE ORIGEN

MEXICO, D. F.

1991





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 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

II.1.- Antecedentes históricos del núcleo

II.2.- Componentes estructurales del núcleo

II.2.a.- Cromatina

II.2.b.- Partículas ribonucleoproteicas

II.2.b.1.- Extranucleolares

II.2.b.2.- Nucleolo

II.2.c.- Nucleoplasma y matriz nuclear

II.3.- Procesamiento postranscripcional de los ARNs no
solubles

III.- ANTECEDENTES

IV.- OBJETIVOS

V.- MATERIAL Y METODO

VI.- RESULTADOS

VII.- DISCUSION

VIII.- CONCLUSIONES

IX.- REFERENCIAS

I.- RESUMEN

Se ha observado que la aflatoxina produce aumento en el número de gránulos pericromatinianos (GPC) en núcleos de hepatocitos. Sin embargo, no se ha establecido si el aumento o variación en la densidad numérica se debe a un incremento simultáneo en el número de GPC y en el volumen nuclear. Con el objeto de aclarar este problema, se estudió el efecto de la aflatoxina B1 en el núcleo interfásico de células hepáticas de ratón.

Se aplicó intraperitonealmente un mililitro de aflatoxina B1 diluida en benceno acetonitrilo (98:2) a 50 ratones adultos. Se sacrificó a los animales a diferentes tiempos 20,30,60,90,120,150,y 180 min.; 6,24,48, y 72 hrs y las muestras de hígado fueron procesadas para microscopía electrónica.

Los cortes ultrafinos fueron contrastados con la técnica preferencial para ribonucleoproteínas y observadas al microscopio electrónico. También se obtuvieron cortes semifinos para las mediciones del volumen nuclear y nucleolar.

Los datos se analizaron estadísticamente. A los 30 minutos de aplicada la droga, hay un aumento significativo del número de GPC, pero sin un aumento considerable en el volumen nuclear. Los resultados sugieren que la aflatoxina B1 modifica el procesamiento postranscripcional y/o el almacén y/o el transporte del ARN prerribosomal y premensajero en el núcleo de hepatocitos de ratón.

II.- INTRODUCCION

Con excepción del nucleolo que ha sido estudiado en años recientes con el microscopio electrónico, todavía se conoce poco sobre la topología y la ultraestructura de otros componentes del núcleo interfásico. En particular, la distribución de partículas ribonucleoproteicas que representan un alto porcentaje del total del ARN contenido en el núcleo normal (Monneron y Bernhard, 1969) El estudio ultraestructural del núcleo interfásico ha resultado en el descubrimiento de varios tipos de ribonucleoproteínas (RNP) que transportan componentes con una fina estructura característica, compartimientos citoquímicos y patrones de distribución en el espacio extranucleolar. A parte de los gránulos intercromatinianos y gránulos pericromatinianos que han sido estudiados ampliamente desde su descubrimiento; dos estructuras poco conocidas han sido recientemente descritas: las fibras pericromatinianas y los cuerpos espiralados. Estos son menos comunes y siempre se encuentran individuales en el nucleoplasma.

La visualización y estudio de los diferentes tipos de partículas ribonucleoproteicas nucleares han sido facilitadas por un nuevo método de tinción regresiva, que blanquea la cromatina y da un contraste preferencial a las ribonucleoproteínas (Bernhard, 1969). A partir de esta publicación se han realizado numerosos estudios del nucleolo, gránulos intercromatinianos, gránulos y fibras pericromatinianas.

Ha sido demostrado repetidas veces que las alteraciones en la transcripción y/o procesamiento nuclear del ARN produce

cambios en el número, morfología, características citoquímicas y autorradiográficas de estas partículas (Vázquez-Nin y col., 1983), lo que sugiere que tiene un papel en tales procesos.

11.2 COMPONENTES ESTRUCTURALES DEL NUCLEO

Hasta el momento, se han reconocido varios elementos estructurales que conforman el núcleo celular en interfase. Estos son :

- a).- Envoltura nuclear. Es una doble membrana de naturaleza lipoproteica. Circunscribe y separa a la zona nuclear de la citoplasmática; sin embargo, ambas zonas quedan interconectadas por la presencia de poros en la envoltura y por la existencia de una continuidad entre las membranas nucleares externas y la membrana celular.
- b).- El nucleoplasma o jugo nuclear. Representa la mayor parte del volumen nuclear. Abarca las áreas entre la cromatina condensada o heterocromatina, por lo tanto contiene tanto a la eucromatina o cromatina laxa como algunos componentes ribonucleoproteicos.
- c).- Cromatina condensada o heterocromatina. Este componente se dispone generalmente en la zona adyacente a la membrana nuclear y en la periferia del nucleolo.

d).- Nucleolo. Es la estructura ribonucleoproteica más conspicua; puede ser único o múltiple.

e).- Partículas ribonucleoproteicas. Comprenden a las fibras y gránulos pericromatinianos, a los gránulos intercromatinianos y a los cuerpos espiralados (en De Robertis y col., 1977).

f).- Matriz nuclear. Se considera como un andamiaje constituido de proteínas, carbohidratos, fosfolípidos, ADN y ARN.

g).- Láminas. Están localizadas en la parte interna de la envoltura nuclear, son tres polipéptidos de 74,000, 72,000, 62,000 daltones, se denominan lámina A, B y C. (en De Robertis y col., 1977; Lebel, S. y col. 1987).

11.2.a. CROMATINA

Las primeras observaciones que probablemente describían a la cromatina fueron hechas por Nägeli entre 1842 y 1847, en polen de Trasdescantia y por Reichert en 1847, al estudiar la espermatogénesis de Strongylus auricularis. Pero fué Kowalevski en 1871 quien realizó las primeras descripciones precisas de los cromosomas, los cuales sin embargo, fueron interpretados como productos de la división de los nucléolos. Schneider, trabajando con huevos de Merostomun ehrenbergii y Tschistiakoff en 1875, realizaron las primeras reproducciones

gráficas de una etapa de la mitosis: la metafase. Flemming en 1880 sistematizó las fases de la mitosis y asoció a los cromosomas con la cromatina del núcleo celular interfásico (en Albarracín T., 1983). Kornberg en 1974 fué el primero en proponer la estructura molecular básica de la cromatina (en Finch y Klug, 1976). Esta se encuentra compuestas por subunidades repetitivas : los nucleosomas. El nucleosoma consiste de una cantidad de ADN de entre 140 y 240 pares de bases, asociada a un octámetro de proteínas histónicas.

El ADN forma una super hélice uniformemente enrollada en el cilindro proteico ; el diámetro de esta hélice es de 90 Å y cada 75 a 82 pares de bases da una vuelta completa. El octámetro de histonas contiene dos unidades de histonas ricas en lisina (H2A y H2B) e histonas ricas en arginina (H3 y H4); la histona H1 no es parte del nucleosoma, pero se encuentra asociada con éste.

Los trabajos de Richards y col. en 1977 y Pardon en 1977, utilizando la técnica de difracción de rayos X y de neutrones, sugirieron que el nucleosoma no es esférico, sino que se trata de una estructura cilíndrica de aproximadamente 100 Å de diámetro y 50 Å de altura (Felsenfeld, 1978). Todas las evidencias que sugieren que la cromatina se encuentra organizada por medio de subunidades repetitivas, así como el conocimiento de su estructura, han provenido de trabajos realizados in vitro; pero recientemente también han sido observados los nucleosomas in situ, en hepatocitos de rata (Derenzini y col., 1983). Heitz en 1928 describió a la heterocromatina como el estado condensado

de la cromatina y a la eucromatina como el estado laxo (en Frenster, 1981). Por otro lado, se ha sugerido que los factores involucrados en la condensación de la cromatina son similares en todos los animales (Sunkara y col., 1979). Sin embargo, existen diferencias en cuanto a las condiciones en que intervienen los mecanismos de condensación entre las plantas y los animales; en las primeras, la condensación es dependiente de la especie, independientemente de su función, probablemente determinada por la cantidad de ADN y la organización del genoma; en los segundos, la compactación depende de los tejidos, de su función y es controlada por el metabolismo de las histonas (Nagl, 1979).

En 1965, al realizar el análisis bioquímico de ambas formas de la cromatina, la condensada y la laxa, Frenster encontró un contenido igual de proteínas histónicas, pero encontró en la cromatina descondensada abundante ARN, proteínas no histónicas y fosfoproteínas (Frenster, 1981). Sin embargo, la carencia de histonas con estructuras que presentan un superenrollamiento del ADN sugiere que las histonas desempeñan un papel importante en evitar el superenrollamiento (Cook y Brazell, 1976; Galleron 1984). Asimismo, la extracción de la histona H1 de la cromatina, provoca la descompactación de la heterocromatina (Tanaka y Oda, 1976). En este sentido se ha propuesto que la histona H1 puede servir como neutralizador de las cargas eléctricas negativas de ADN internucleosomal (Gaubatz y col., 1978).

Otros autores, como Matsumoto y col., en 1980, apoyan la hipótesis de que la compactación de la cromatina es debida a la fosforilación, acetilación, metilación, y poli (ADP-ribosilación) de las proteínas histónicas, en especial el de la histona H1. Se ha propuesto también que la compactación sea

debida a neutralización de las cargas eléctricas negativas de los radicales fosfatos del ADN mediante la interacción de este ácido nucleico con cationes libres (Derenzini y col., 1978).

Por otra parte, se ha sugerido que los grados de compactación son debidos a la cantidad de productos transcripcionales unidos a la cromatina. Está más dispersada cuando sea mayor la cantidad de partículas ribonucleoproteicas que contienen ácido ribonucleico premensajero de síntesis reciente que se encuentren adheridos todavía a la cromatina (Derenzini y co., 1981). En cuanto a las funciones de los diferentes estados estructurales de la cromatina, Littau y col., en 1969, utilizando autorradiografía, observaron que la mayoría del ARN recién sintetizado se encontraba en las proximidades de la eucromatina; Hay y Revel en 1963, también con autorradiografía, encontraron que en la eucromatina existe una mayor síntesis de ADN (Frenster, 1981).

11.2.b. PARTICULAS RIBONUCLEOPROTEICAS

11.2b.1 EXTRANUCLEOLARES

Existen numerosas evidencias de que el procesamiento postranscripcional de los diferentes ácidos ribonucleicos no solubles se efectúa no sobre la molécula desnuda de ARN, sino en complejos ribonucleoproteicos (Flint, 1984). El estudio sistemático de estos complejos ribonucleoproteicos se inició en 1969, al ser implementado por Bernhard, una técnica de contraste preferencial para las partículas ribonucleoproteicas (Bernhard,

1969). Así, Monneron y Bernhard caracterizan a las primeras partículas ribonucleoproteicas en el núcleo celular interfásico en los mamíferos.

Las fibras pericromatinianas (FPC) son fibras de aproximadamente 30 a 50 Å de diámetro, que se encuentran en la periferia de la cromatina condensada y se enrollan para formar a los gránulos pericromatinianos (GPC).

Los GPC se encuentran generalmente en la periferia de la heterocromatina y presentan un diámetro de 400 a 450 Å; se ha observado que en la cercanía de los poros nucleares sufren cambios estructurales al deshilarse y formar conjuntos de fibras. Los gránulos intercromatinianos (GIC) son cúmulos de partículas con un diámetro de 200 a 250 Å, que no presentan relación topográfica con la heterocromatina, nucléolo o con los poros nucleares. Por último, se encuentran los cuerpos espiralados (CE), constituidos por fibras en espiral con un grosor de 400 a 600 Å (Monneron y Bernhard, 1969). Los gránulos pericromatinianos fueron observados por primera vez por Watson en 1962 en hepatocitos de roedores. Se ha resaltado la similitud morfológica y citoquímica entre los gránulos pericromatinianos y los gránulos de Balbiani; estos últimos, se encuentran en los núcleos de larvas de dípteros y representan el producto de la actividad transcripcional (Vázquez-Nin y Bernhard, 1971). En condiciones experimentales se ha encontrado que existen dos poblaciones de gránulos pericromatinianos, los cuales pueden ser distinguidos funcionalmente, pero no morfológicamente: los nucleolares y los extranucleolares (Moyné y col., 1977). La función de los gránulos pericromatinianos se ha esclarecido mediante la utilización de drogas que alteran la

síntesis o el procesamiento del ARNpre-m, como la cordicepina (Puvion y col., 1976), la captotecina (Gajkowskay col., 1977), la cicloheximida (Moyné y col., 1977), el 5,6 dicloro-1- β -ribofuranosilbenzimidazol (Cervera y col., 1983). También utilizando otros factores que alteran igualmente la síntesis o el procesamiento del ARNpre-m, como el choque hipotérmico (Cervera y Montero 1980), hormonas como el cortisol (Petrov y Bernhard, 1981, Moyné y Puvion, 1976) el estradiol (Vázquez-Nin y col., 1978; Echeverría y col., 1980). Asimismo, se ha estudiado cuantitativamente a los gránulos pericromatinianos durante la diferenciación de los neuroblastos (Vázquez-Nin y col., 1980). Con la información obtenida de este conjunto de trabajos, se ha propuesto que los gránulos pericromatinianos extranucleolares se encuentran involucrados en el procesamiento, almacenamiento y transporte del ARNpre-m (Vázquez-Nin y col., 1980), en tanto que los gránulos pericromatinianos nucleolares se encontrarían relacionados con el procesamiento del ARNpre-r (Puvion y col., 1981).

Al parecer, dentro de los gránulos intercromatinianos se llevan a cabo reacciones enzimáticas, como las sugieren Verbrodt y Bernhard en 1969, quienes encontraron que esas partículas presentaban actividad de ATPasa y de GTPasa (en Puvion y Moyné, 1981). Además, se ha determinado en estos gránulos la existencia de enzimas como la β - glicerofosfatasa y la NAD-pirofosfatasa (Buchwalow y Unger, 1977). Sin embargo, aún se desconoce la interacción de este conjunto de enzimas con el complejo ribonucleoproteico en general, ó su función global. Las pruebas enzimáticas sugieren que los gránulos intercromatinianos contienen proteínas ácidas, las cuales

protegen al ARN de la acción de las ribonucleasas; pero estas partículas son digeridas si previo al tratamiento con la ribonucleasa son sometidas a la acción de la pepsina (Smetana y col., 1971). Análisis citoquímicos extensos han determinado que estas partículas contienen proteínas fosforiladas (Wassef, 1979). Sin embargo, ni las pruebas enzimáticas ni las citoquímicas han sido capaces de determinar inequívocamente la presencia de ARN en los gránulos intercromatinianos; alto contraste que adquieren con la técnica de contraste preferencial para las ribonucleoproteínas de Bernhard, no es una prueba concluyente, debido a su carácter preferencial (por lo tanto no específica) (en Puvion y Moyne, 1981). Las pruebas con autorradiografía han evidenciado que los gránulos intercromatinianos se marcan débilmente con los precursores radiactivos para el ARN, por lo que pueden contener cantidades pequeñas de ácido ribonucleico de marcaje lento (Fakan y Bernhard, 1973).

Otras estructuras presentes en el núcleo interfásico son los cuerpos nucleares. Han sido descritos 5 tipos de cuerpos nucleares con diámetro entre los 0.2 a los 0.9 μm (Chaly y col., 1983a). Utilizando la técnica de contrastación regresiva preferencial para las partículas ribonucleoproteicas se ha sugerido que los cuerpos nucleares simples se encuentran constituidos por material fibrilar no cromatínico, el cual parece ser principalmente proteico. Los componentes fibrogranulares de los cuerpos nucleolares complejos parecen ser ribonucleoproteínas. Hasta el momento se desconoce completamente cual puede ser la función de estas estructuras. Por último los gránulos interiores del cuerpo nuclear del tipo

111 presentan una gran similitud morfológica con los gránulos intercromatinianos (Chaly y col., 1983b).

112b.2 NUCLEOLO

Otro componente intranuclear es el nucleolo. Su estudio bioquímico y molecular se inició en los años 60s. Por medio de técnicas como la citología ultraestructural y la autorradiografía, Granboulan y Granboulan en 1965 determinaron la existencia de cromatina dentro del nucleolo. Spiegelman y col., en 1961 detectaron actividad transcripcional nucleolar. Existe un buen número de evidencias que permiten establecer que en el nucleolo es donde se lleva a cabo la síntesis del ARNr. En 1960 Edstrom encontró que la composición de bases es muy similar entre los ácidos ribonucleicos ribosomal y nucleolar. Perry en 1962 observó que al ser tratadas las células con actinomicina D, droga que inhibe la síntesis del ARNr, cesaba completamente la incorporación de uridina tritiada en el nucleolo, más no en la cromatina extranucleolar.

En la estructura del nucleolo es posible reconocer diversos componentes :

- a).- Centros fibrilares, constituidos por fibras de 50 Å de diámetro y 300 a 400 Å de longitud, aunque este varía con el estado fisiológico de la célula.
- b).- Zonas granulares constituidas predominantemente por gránulos de 150 Å de diámetro.
- c).- Los constituyentes fibrilares y granulares del nucleolo conforman una red fibrilar gruesa : el nucleolonema. Existen

también zonas homogéneas llamadas partes amorfas ó matriz amorfa, en las cuales los componentes fibrilares y granulares son escasos.

- d).- Región fibrilar densa, representa la forma transcripcionalmente activa del nucléolo.
- e).- Por último se encuentra la cromatina perinucleolar (Ghosh, 1974).

Los elementos bioquímicos son :

- a).- ARN polimerasa 1
 - b).- Proteínas prerribosomales de alto peso molecular que nunca abandonan el nucléolo.
 - c).- Muchas de las proteínas ribosomales.
 - d).- Enzimas procesadoras del ARNpre-r : Enzimas modificadoras; metilasas, fosfatasa, endonucleasas, proteínas modificadoras de las enzimas y kinasas .
 - e).- ARNpre-r de alto peso molecular como el 45 S, así como productos intermedios y productos finales como 28 S y 18 S.
 - f).- ARNsnU3.
 - g).- 90 % ó más de ADNr de la célula.
 - h).- ADN que no tiene secuencias prerribosomales.
- (Alberts, 1983; De Robertis, 1977).

112.c. NUCLEOPLASMA Y MATRIZ NUCLEAR

El nucleoplasma o jugo nuclear se encuentra comprendido en la región extranucleolar interheterocromatiniana. Es en esta región en donde se pensaba que se llevaban a efecto varias reacciones enzimáticas, además de la síntesis y el transporte de

las diversas moléculas de una manera más o menos azarosa. Otro descubrimiento sobre este aparente desorganización es la presencia de un andamiaje en el cual se encuentra anclada la cromatina en todas sus formas (Bouvier y col., 1982).

Este andamiaje ó matriz nuclear es puesto en evidencia después de tratar a los núcleos con diversas concentraciones salinas y detergentes, así como al ser sometidos a enzimas como ADNasa y la ARNasa. Entre los constituyentes moleculares estaban los elementos proteicos y en menos cantidad el ADN, ARN, carbohidratos y fosfolípidos. Si se logra extraer en su totalidad al ADN y el ARN de la matriz-nuclear, queda solamente un armazón proteico llamado matriz-nuclear proteica. la cual se encuentra compuesta principalmente por tres polipéptidos de peso molecular de 62000, 66000 y 69000 (Berezney y Coffey, 1977).

Los elementos estructurales de la matriz nuclear son: el complejo lámina-poro nuclear, la matriz intranuclear y la matriz nucleolar (van Eckelen y van Venrooij, 1981). Cook y col. en 1976, aportaron evidencias de que la matriz nuclear es fundamental para el ordenamiento del genoma en el núcleo celular interfásico (en Bouvier y col., 1982). Técnicas de autorradiografía han revelado que la mayor parte del ADN recién sintetizado se encuentra asociado a la matriz nuclear.

Asimismo, debido a que el ADN unicationario se une preferencialmente a las proteínas de la matriz nuclear, se ha propuesto que esta estructura resulta fundamental no solamente para el ordenamiento del ADN, sino también para la duplicación (Comings y Wallack, 1978). No solamente en la duplicación del ADN interviene la matriz nuclear, sino también en la modulación, de la actividad transcripcional; al respecto existen evidencias

de que existen partículas ribonucleoproteicas que contienen ARNhn asociado a la matriz nuclear (van Eckelen y van Benrooij, 1981). Debido a esto, se ha propuesto que el ARN es sintetizado conforme el ADN pasa a través de un complejo molecular y el ARN recién sintetizado se adhiere a la matriz nuclear (Jackson y col., 1981).

11.3. PROCESAMIENTO POSTRANSCRIPCIONAL DE LOS ARNs NO SOLUBLES

Se conocen las transformaciones moleculares que sufren los primeros transcritos de los ácidos ribonucleicos no solubles; los ARN sintetizados por la enzima ARN polimerasa II, debe sufrir varias modificaciones antes de ser traducido (en Alberts y col.1983).

Las modificaciones que se observan en el primer transcrito, de ARNpre-m en los eucariontes son : la adición de un capuchón metilado en la terminal 5 , la adición de un segmento de poli (A) en la terminal 3 ; reacciones de corte-uni6n y la metilaci6n de residuos internos de adenosina (Lehninger, 1981) . Al parecer este capuch6n resulta imprescindible en algunas ocasiones, para que se efectúe una traducci6n eficiente del ARNm; adem6s se ha observado que las mol6culas de ARNm que poseen esta estructura presentan una mayor estabilidad . Este capuch6n parece ser necesario tambi6n para que se efectúe con el mayor rendimiento la transcripci6n del ARNpre-m a ARNm (Banerjee,1980),

La presencia del segmento poli (A) fu6 determinado por primera vez por Kates en 1970. Brawerman y Diez en 1975, con

electroforesis en gel, precisaron que la longitud del tal segmento era de 200 a 250 residuos adenilados. Sin embargo, además de que el fragmento poliadenilado varía entre las diferentes especies de organismos, existe una fuerte correlación entre la longitud de este fragmento y la antigüedad evolutiva del organismo ó del taxón al que pertenece. En cuanto a la función, Penman y col., en 1970, al inhibir la adición de esta secuencia mediante el sometimiento de las células a dosis pequeñas de cordicepina, resaltaron la importancia que tiene esta estructura para que se lleve a cabo completamente la maduración del ARNpre-m. Harpol y col., 1979, con el ARNm de la hormona del crecimiento, resaltaron que la mayor eficiencia en el transporte del ARNm desde el núcleo hacia el citoplasma se produce cuando estos ácidos ribonucleicos poseen la cola de poli (A) Zeevi y col., en 1982, comprobaron que los ARNm que carecían de tal segmento eran más susceptibles a la degradación enzimática durante el trayecto nucleocitoplasma (Nevins, 1984).

Procesamiento postranscripcional de los otros ácidos ribonucleicos no solubles, el ribosomal.

El primer transcrito del ARNr es una molécula grande con un coeficiente de sedimentación de 45S, el cual es sintetizado en la región fibrilar del nucleolo a partir de los organizadores nucleolares.

Determinadas secuencias de esta molécula están metiladas en los grupos ribosa; estas regiones metiladas corresponden a los futuros ácidos ribonucleicos ribosomales 18S, 28S. 5.8S.

Después de la metilación, la molécula de 45S es fragmentada y degradada, probablemente por medio de una endonucleasa, dando

lugar a moléculas más pequeñas: 41S y 20S. Esta última es degradada en la porción no metilada, por una exonucleasa, quedando como producto el ARNr 18S, el cual es transportado rápidamente hacia el citoplasma (en De Robertis y col., 1977).

III.- ANTECEDENTES

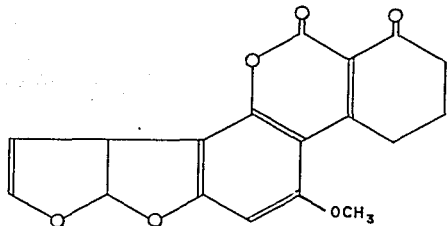
Desde hace tiempo se han realizado una serie de investigaciones sobre la estructura nuclear. Para esto se han utilizado drogas, hormonas y un sistema de diferenciación con el objeto de aclarar el posible papel citofisiológico de las partículas nucleares relacionadas con el metabolismo postranscripcional del ARN en sistemas transcripcionales alterados. Es decir, en sistemas donde la transcripción de algunos genes se reprimen por el proceso de diferenciación celular y en sistemas donde la transformación ocurre de acuerdo a estímulos ambientales (en Jiménez García, 1985).

Para el estudio de algunas partículas RNP como en el caso de los gránulos pericromatinianos, se han utilizado algunos agentes que tienen efectos tóxicos (bleomicina, cicloheximida y otras) y se ha observado un aumento en número y cambios en la disposición. Otros estudios realizados con hormonas, como el estradiol sobre las RNP del núcleo de células epiteliales endometriales, mostraron que hay un aumento significativo del número de gránulos pericromatinianos cuando disminuye el nivel de la hormona, y por otro lado se encontró que la administración del estradiol tiene el efecto contrario (Vázquez-Nin y col., 1980).

Basándose en estas investigaciones, posteriormente se realizaron estudios sobre las características estructurales y morfométricas de los GPC y de otras RNP durante la diferenciación celular. Se tomó como sistema de diferenciación la transcripción de células matriz a neuroblasto, la de éste en

neuronas y la maduración de la misma en médula espinal cervical de embrión de pollo. Los resultados mostraron que los gránulos pericromatinianos casi no existen en células matrices y en neuroblastos, y aumentan significativamente en número cuando éstos ya se transformaron en neuronas y establecen contacto sinápticos (Vázquez-Nin y col., 1983).

Otras investigaciones realizadas para estudiar la citofisiología del núcleo se han llevado a cabo utilizando la actinomicina D y la aflatoxina. Esta última es el producto metabólico de hongos como *Aspergillus flavus*, *A. parasiticus*, (Doris y col., 1981). La aflatoxina B1 es un antibiótico que inhibe la síntesis de ácidos nucleicos a través de la interacción con las bases adenina o guanina. Es el miembro más tóxico y carcinogénico de un grupo de aflatoxinas. Son estructuras de anillos pentacíclicos. su estructura es :



AFLATOXINA B1

Esta toxina es un carcinogénico que afecta principalmente el hígado y el riñón. Se ha observado que la toxicidad de la aflatoxina B1 se incrementa en asociación con una dieta pobre en proteínas. Esto ha sido observado en estudios histopatológicos en animales de experimentación (Gupta 1981). En estudios en microscopia electrónica, se han observado alteraciones en hepatocitos de cerdos y ratas. Los cambios generalmente fueron restringidos al núcleo, retículo endoplasmático, y ribosomas. Friedman y Wogen (1966-1967) han estudiado el tiempo en que la aflatoxina B1 afecta la síntesis de ARN y han establecido que una dosis administrada a ratas inhibe la incorporación del precursor a el ARN nuclear del hígado en menos de 15 minutos. La síntesis de ARN es reducida a causa de inhibir la ARN polimerasa (Galbain, 1966), aunque la inhibición de la actividad de la ARN polimerasa ha sido relacionada con la interacción de la aflatoxina B1 con el ADN molecular (Sporn, 1966).

Una serie de estudios han mostrado que la alteración del metabolismo del ARN nuclear resulta del tratamiento con aflatoxina y están asociados con cambios en la morfología de los nucleolos. Esto se ha reportado en células de hígado de rata tratadas con aflatoxina B1, presentándose segregación de los que son llamados caps nucleolares. Estos cambios estructurales fueron observados después de 30 minutos de la administración de la toxina. Sin embargo, estos fenómenos demuestran ser reversibles; la morfología nucleolar fue normal a las 24 horas (Bernhard, 1965).

Svoboda y Higginson (1968) estudiaron hepatomas celulares

inducidos por la administración de aflatoxina. Ellos mostraron que células tumorales tienen pequeñas mitocondrias, moderados cuerpos de microcuerpos, y cortos segmentos dilatados de retículo endoplasmático rugoso, hinchazón mitocondrial e incremento de lisosomas.

Monneron y col. en 1968 señalaron que inyectando ratas con aflatoxina se produce una acumulación densa de gránulos corticales (0.2-1 de diámetro); en núcleos de tejidos hepáticos. Los gránulos corticales fueron identificados como ribonucleoproteínas (gránulos pericromatinianos). El incremento de estos gránulos puede estar relacionado con la síntesis de ribonucleoproteínas y el probable bloqueo de su transporte al citoplasma. Hay también evidencias de que la aflatoxina interviene con la síntesis de ADN mitocondrial en células de plantas y que inhibe el transporte electrónico en la mitocondria (Brown 1965a; Svoboda 1966, 1967). Sin embargo, el incremento en el número de gránulos puede deberse a decremento en el volumen nuclear, lo que indicaría que el aumento no cambia sustancialmente la densidad de los mismos y por lo tanto, la cantidad de transcritos disponibles en la célula.

IV.- OBJETIVOS

El propósito de este estudio fue determinar el efecto de la aflatoxina B1 en el núcleo interfásico de hepatocitos de ratón. Para tal efecto se establecieron los siguientes puntos :

- a.- Determinar si existe un incremento o disminución de la densidad de los gránulos pericromatinianos.
- b.- Ver si este aumento se debe a una variación en el volumen nuclear como nucleolar.
- c.- Por último corroborar si hay cambios en la compactación de la cromatina.

V.- MATERIAL Y METODO

Se utilizaron 30 ratones con un peso de 20 g. A dos ratones se les inyectó intraperitonealmente 1 ml de benceno acetónitrilo; a los demás ratones se les inyectó intraperitonealmente 1 ml de aflatoxina eluida con benceno acetónitrilo (98:2). La aflatoxina B1 fué proporcionada por el Centro de Investigación y de Estudios Avanzados del I.P.N. Unidad Irapuato.

Los ratones fueron sacrificados a distintos tiempos : 20, 30, 60, 90, 120, 150, y 180 minutos; 6, 24, 48 y 72 horas.

Los fragmentos de hígado se fijaron con glutaraldehído al 2.5 %, disuelto en amortiguador de fosfatos a 0.1 M , pH 7.2 durante 90 minutos; se lavaron con amortiguador de fosfatos hasta eliminar el fijador. Posteriormente fueron deshidratados con alcoholes graduales de 70 %, 80 %, 96 % y alcohol absoluto; en los tres primeros se utilizaron dos cambios de 10 minutos; en el último se realizaron tres cambios de 15 minutos. Los fragmentos de hígado se colocaron en óxido de propileno, con el cual se realizaron tres cambios con duración de 15 minutos cada uno. La preinclusión se realizó con 50% de óxido de propileno y 50% de Epon 812, durante 24 horas, a temperatura ambiente. Finalmente se incluyó en Epon 812 y se polimerizaron en una estufa a 60°C durante 24 horas.

Los cortes semifinos se tiñeron con azul de toluidina para determinar el volumen nuclear y nucleolar.

Los parámetros medidos fueron los siguientes : para la determinación del volumen nuclear y nucleolar, se midieron el diámetro mayor y diámetro menor .Las mediciones se llevaron a

cabo en un microscopio Carl Zeiss equipado con un ocular micrométrico, un objetivo de 100 X y un aumento intermedio de 2 X. Los resultados se expresaron en micras cúbicas.

Las mediciones obtenidas tanto del volumen nuclear como nucleolar se procesaron estadísticamente utilizando programas para computadora desarrollados en el laboratorio de Microscopia Electrónica de la Facultad de Ciencias de la U.N.A.M. por el Dr G.H. Vázquez-Nin.

Los cortes ultrafinos utilizados para determinar la variación del número de gránulos pericromatinianos en cada uno de los tratamientos se contrastaron durante 5 minutos con acetato de uranilo, 19 minutos con EDTA y 3 minutos con citrato de plomo (Bernhard, 1969). Las micrografías fueron tomadas con un microscopio electrónico M-10 de la casa Carl Zeiss .

El análisis cuantitativo se realizó determinando el número de gránulos pericromatinianos de cada tratamiento y obteniendo la densidad numérica.

VI.- RESULTADOS

En núcleos de hepatocitos de ratones tratados con aflatoxina B1, los principales cambios observados en forma cualitativa a nivel nuclear son; el aumento en la compactación de la cromatina y la acumulación de gránulos pericromatinianos, durante los primeros 30 minutos después de aplicada la inyección intraperitoneal de la droga (Fig. a y b).

Sin embargo, todos los núcleos tratados presentan alteraciones similares pero menos drásticas. También se puede observar en algunos núcleos la segregación del nucléolo en sus componentes granulares y fibrilares aunque esto no es general (Fig. c) Asimismo, se observa la presencia de cúmulos de gránulos intercromatinianos y de fibras pericromatinianas.

El volumen nuclear y nucleolar de células testigo y tratadas con aflatoxina, con uno y dos nucleolos no presentan diferencia significativas entre los distintos grupos ($P > 0.05$) (Fig. 3 y 4).

En cada uno de los grupos mencionados se determinó la densidad numérica de los gránulos pericromatinianos y los resultados obtenidos para análisis estadístico indicaron un aumento significativo en los primeros 30 minutos de aplicada la droga ($P < 0.05$) (Fig. 2).



FIG. A- NUCLEO INTERFASICO DE HEPATOCITOS DE RATON NORMAL. NUCLEOLO (n),
CROMATINA (Cr), GRANULOS INTERCROMATINIANOS (GIC), GRANULOS PERICROMA-
TINIANOS (FLECHAS). 17,600 X .

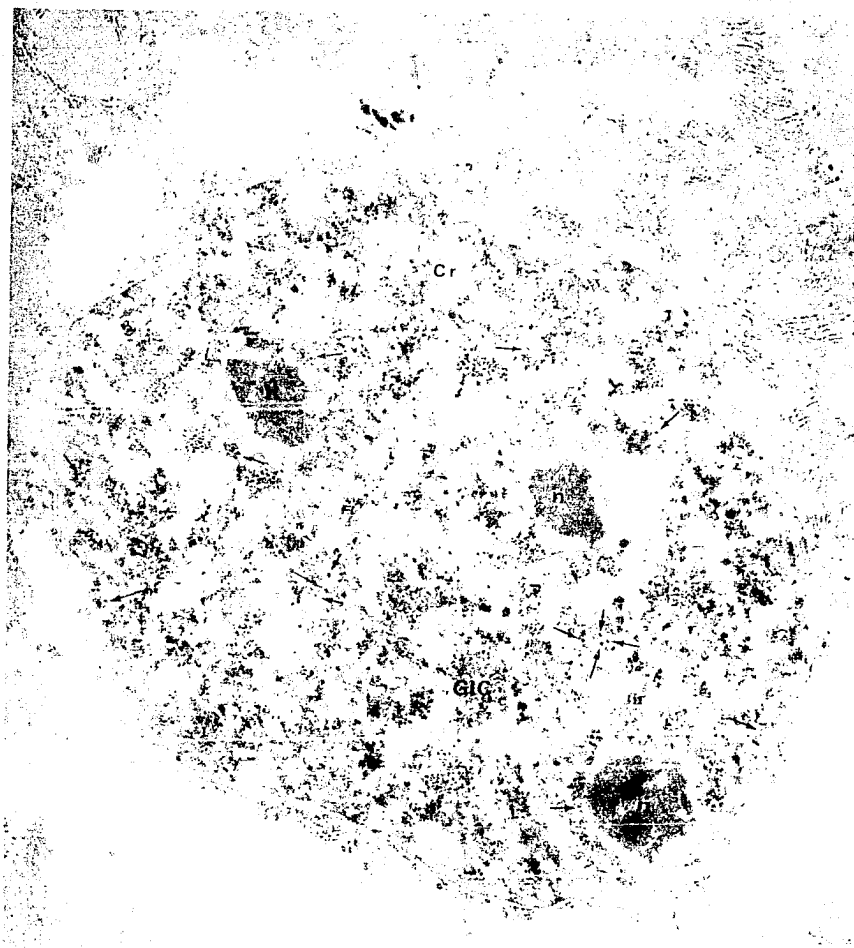


FIG. B- NUCLEO INTERFASICO DE HEPATOCITOS DE RATON TRATADOS CON AFLA-
TOXINA BI DURANTE 30 MINUTOS. NUCLEOLO (n), CROMATINA (Cr), GRANULOS
INTERCROMATINIANOS (GIC), GRANULOS PERICROMATINIANOS (FLECHAS). -

24,000 X .

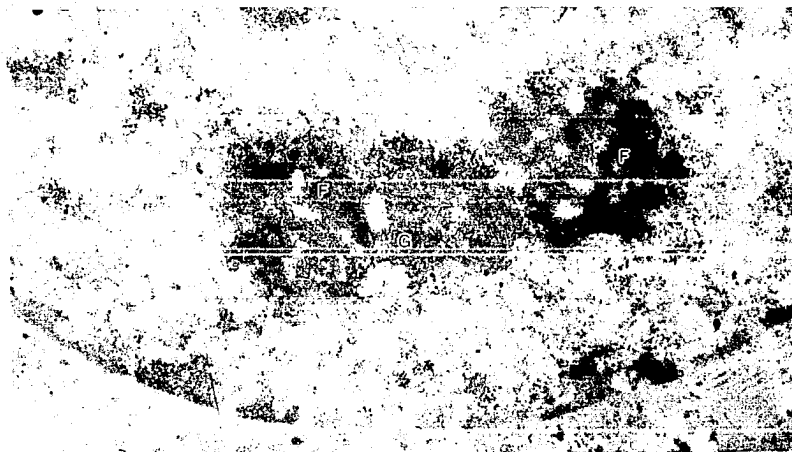


FIG. C- SEGREGACION NUCLEOLAR EN HEPATOCITOS DE RATON TRATADOS CON AFLATOXINA BI, SE PUEDE OBSERVAR SUS COMPONENTES GRANULARES (G) Y FIBRILARES (F) . 30,000 X .

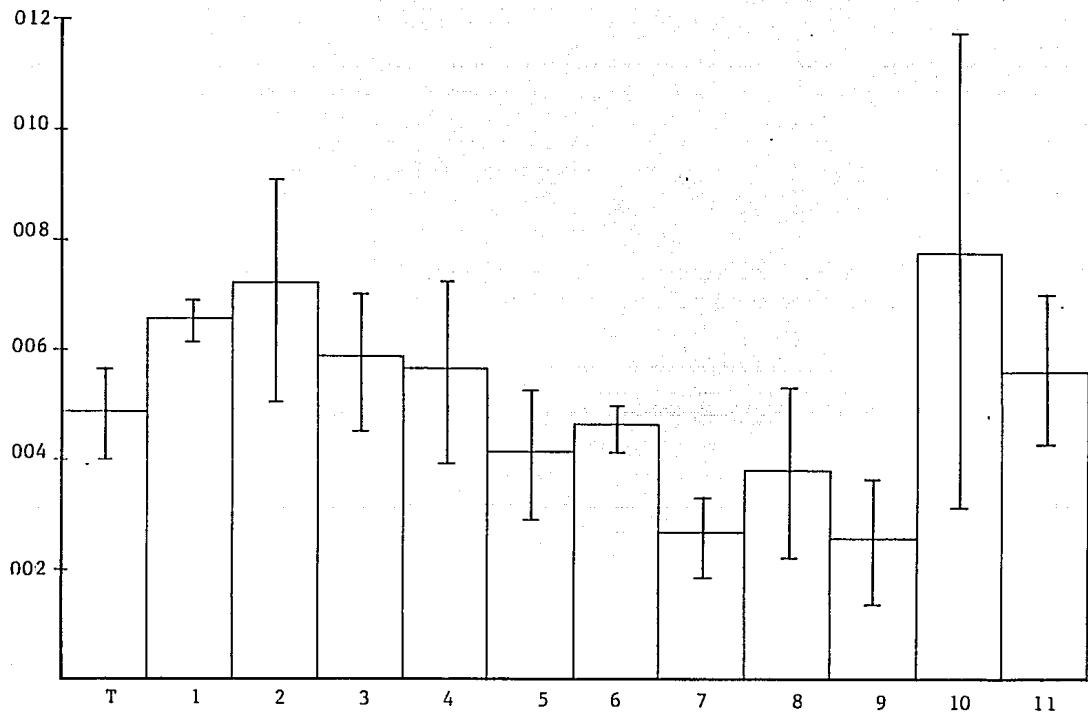


Fig.2.- Densidad numérica de los gránulos pericromatinianos en núcleos de hepatocitos de ratón normal (T) y tratados con aflatoxina B1. El tiempo de tratamiento en - min 20,30,60,90,120,180 (representado por las barras 1-7) y en hrs 6,24,48,72 (representado por las barras 8-11) se presentan en las abscisas. Se observa una variación de los gránulos durante los distintos tiempos de tratamiento con la aflatoxina B1, apareciendo un aumento inicial en los primeros 30 min .

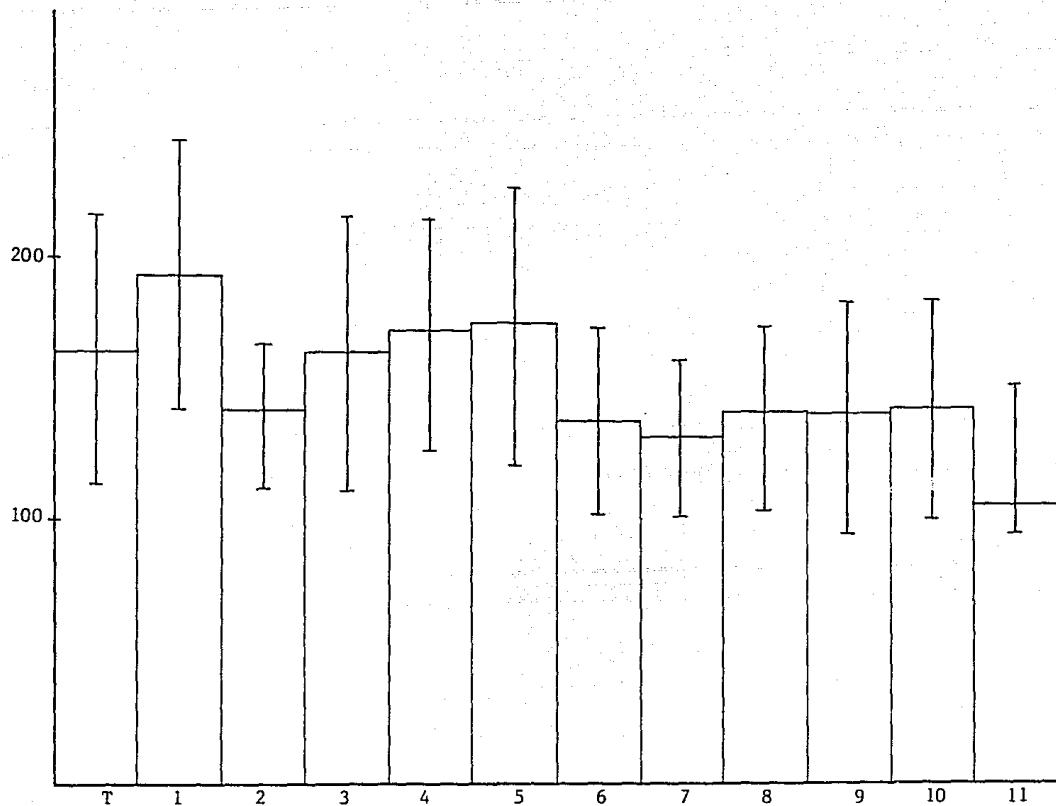


Fig.3.- Volumen nuclear de hepatocitos de ratón normal (T), y tratados con aflatoxina B1. El tiempo de tratamiento en min 20,30,90,120,150,180, (representado por - las barras 1-7) y en hrs 6,24,48,72 (representado por las barras 8-11), el volumen esta dado en micras cúbicas.

VOLUMEN NUCLEOLAR

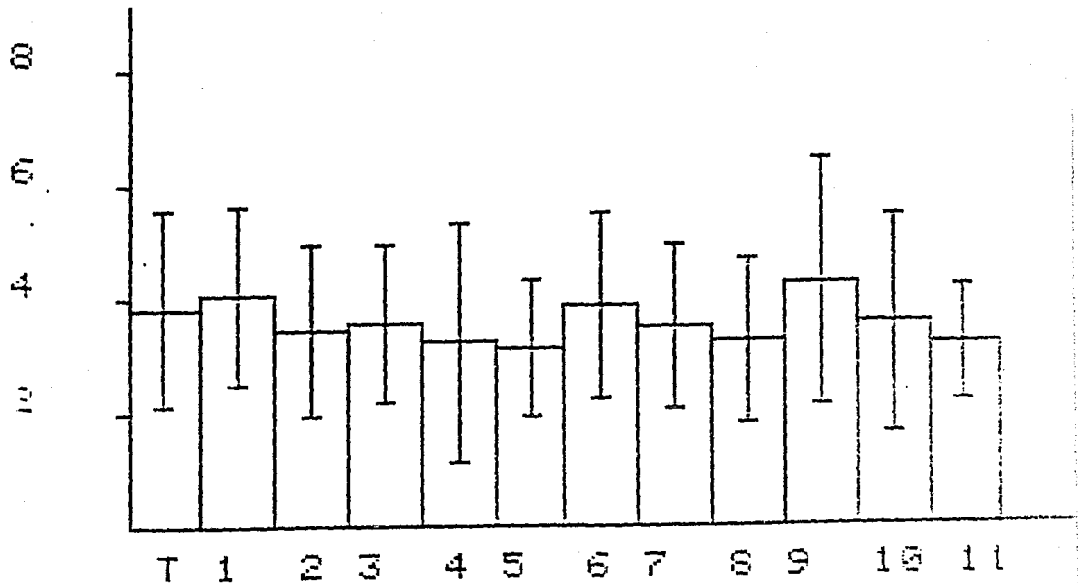


Fig.4.- Volumen nucleolar de hepatocitos de ratón normal (T):no se aprecian cambios significativos en los diferentes tiempos con la aflatoxina B1 en min. 20,30,90,120,150,180, (representado por las barras 1-7) y en hrs. 6,24,48,72 (representado por las barras 8-11), el volumen esta dado en micras cúbicas

VII.- DISCUSION

Los resultados del presente estudio demostraron que la aflatoxina B1 produce alteraciones transitorias a nivel nuclear en algunos hepatocitos, compactación gradual de la cromatina, así como aumento en la densidad numérica de gránulos pericromatinianos asociados principalmente con la cromatina perinucleolar. Estas observaciones concuerdan con lo reportado por Monneron en 1968 (Monneron, 1968), aunque ella no utilizó la técnica de contrastación regresiva (EDTA) para ribonucleoproteínas.

El aumento de los GPC en el presente estudio se debe a un aumento real en la densidad numérica, aunque el aumento en el número de estas RNP no trae consigo aumento ó disminución significativo en el volumen nuclear.

En condiciones experimentales donde se hace uso de la acción drogas que afectan principalmente la síntesis del ARN (cordicepina, bleomicina, etc.), el número de gránulos pericromatinianos aumenta . Dichos estudios han sugerido que estos gránulos son estructuras de almacenamiento, transporte y/o procesamiento intranuclear de ARN mensajero o premensajero (Vázquez-Nin y col., 1979, 1983).

El aumento en la compactación de la cromatina y en el número de gránulos pericromatinianos se debe principalmente a la inhibición de la transcripción del ARN, pues la aflatoxina inhibe la actividad de la ARN polimerasa II (Serin y Gallo, 1980).

VIII.- CONCLUSIONES

La aflatoxina B₁ eluida con benceno acetonitrilo (98 : 2), aplicada intraperitonealmente a ratones adultos, produce en núcleos de hepatocitos a los 30 minutos de tratamiento:

- Aumento en la densidad numérica de GPC
- Compactación gradual de la cromatina y
- Segregación nucleolar

Por esto, la droga altera el procesamiento y/o el transporte y/o el almacén de ARN tanto premensajero como prerribosomal.

IX.- REFERENCIAS

Albarracín-Teulón, A. (1983): La teoría celular. Alianza Editorial, S.A., España, p. 298.

Alberts, B., D. Bray, J. Lewis, M. Raff, K. Roberts and J. D. Watson (1983): Molecular Biology of the cell. Garland Publishing. Inc., U.S.A., p. 460 .

Banerjee, A. K. (1980): 5 - terminal cap structure in eukaryotic messenger ribonucleic acids. Microb. Rev., 44(2): 175-205.

Bernhard.W.,Fraysinnet,C., Lafarge, C., and LeBreton, E. (1965) Compt. Rend 261, 1785.

Bernhard, W. (1969): A new staining procedure for electron microscopical cytology. J. Utrastr. Res., 27:250-265.

Berezney, R. and D. S. Coffey (1977): Nuclear matrix, isolation and characterization of a framework structure from rat liver nuclei. J. Cell Bioll., 73: 616- 637.

Bouvier, D., J. Hubert, A.- P. Seve and M. Bouteille (1982): RNA is responsible for the three- dimensional organization of nuclei matrix proteins in HeLa cell. Biol. Cell, 43:143-a46

Brown,J.M. (1965a) S. African Med. J. 39, 778.

Buchwalow, I. B. and E. Unger (1977): Enzyme activity of nuclear ribonucleoproteins. *Exptl. Cell Res.*, 104:139-150.

Cervera, J. and Montero (1980): Effects of thermic shock on Hep-2 cells. III Accumulation of perichromatin granules: *J. Ultrastr. Res.*, 71:1-13.

Cervera, J. and M. Almar, A. Martínez and J. Renau-Piqueras (1983): Nuclear alteration induced by cadmium chloride and 1-canavanine in HeLa S3 cells. Accumulation of perochromatin granules. *J. Ultrastr. Res.*, 82:241-263.

Ciegler, A. (1971), *Microbial toxins- vol-VI fungal toxins.* Academic Press New York and London.

Coming, D. E. and A. S. Wallack (1978): DNA-binding properties of nuclear matrix proteins *J. Cell Sci.*, 34:233-246

Cook, P.R. and I. A. Brazell (1976): Characterization of nuclear structures containing superhelical DNA. *J. Cell Sci.*, 22:303-324.

Chaly, N., G. Setterfield, J. G. Kaplan and D. L. Brown (1983a)
: Nuclear bodies in mouse splenic lymphocytes. I.-
Ultrastructural changes during stimulation by concanavalin A.
Biol. Cell, 57:275-284.

Chaly, N. G. Setterfield, J. G. Kaplan and D. L. Brown (1983b)
: Nuclear bodies in mouse splenic lymphocytes. II.-

Cytochemistry and autoradiography during stimulation by concanavalin. *A. Biol Cell*, 49:968-975.

De Robertis, E.D.P., F.A. Saez y E.M.F. De Robertis (1977)
Biología Celular. El Ateneo, Argentina. p. 528.

Derenzini, M., A. Pession-Brizzi (1981): Relationship between ribonucleoprotein particles containing heterogenous RNA and ultrastructure and function of chromatin in purified rat hepatocyte nuclei. *J. Ultrastr. Res.*, 77:66-82

Derenzini, M., F. Novello and A. Pession-Brizzi (1978): Pericromatin fibrils and chromatin. ultrastructural pattern. *Exptl Cell Res.*, 112:443-454.

Derenzini, M., D. Hernandez-Verdun and M. Bouteille (1983): Visualization of a repeating subunit organization in rat hepatocyte chromatin fixed in situ. *J. Cell Sci.*, 61:137-149

Doris, M. Miller, Dum, Ms; Wayne A. Crowell, (1981): Acute aflatoxicosis in swine: clinical pathology, histopathology, and electron microscopy.

Dunsif, and T. Campbell, (1987): Relative contribution of dietary level and aflatoxin B1 dose in generation of presuptive preneoplastic foci in rat liver. *JNCL*. vol. 78, No. 2 February.

Echeverría, O. M., G. Zavala, A. Benítez and G.H. Vázquez-Nin (1980) : Changes during estral cycle in the nucleus of

endometrial cell of the rat. *Bio Cellulaire*, 39:139-142.

Edstron, J.E. 1960 *Comp. Neurol.* 107; 195.

Fakan, S. and W. Bernhard (1973): Nuclear labelling after prolonged ³H-uridine incorporation as visualized by high resolution autoradiography. *Exptl. Cell Res.*, 79:431-444

Felsenfeld, G. (1978): Chromatin. *Nature*, 271:115-122.

Finch, J.T. and A. Klug (1976): Solenoidal model for Superstructure in chromatin. *Proc. Nat. Acad. Sci., U.S.A.*, 73(6): 1897-1901.

Flint, S. J. (1984) Processing of mRNA precursor in eukaryotic cells. En Apirim, D. (Ed.) Processing of RNA, chapt. 7, pp. 155-179. CRC. Inc., U.S.A.

Friedman, M.A., and Wogan, G.N (1966) *Federation Proc.* 25, 662.

Friedman, M.A., and Wogan, G.N. (1967) *Federation Proc.* 26, 358.

Furuichi, Y., A. La Fiandra and A.J. Shatkin (1977): 5'-terminal structure and mRNA stability. *Nature*, 266:235-239.

Frenster, J.H. (1981): Ultrastructure and function of heterochromatin and euchromatin. En Busch, H. (Ed.). *The cell nucleus*, vol.1, chapt.12, pp.565-580, Academic Press. New York.

Gajkowska, B., E. Puvion and W. Bernhard (1977): Unusual perinucleolar accumulation of ribonucleoprotein granules induced by camptothecin in isolated liver cells. J. Ultrastr Res., 60:335-347.

Galbain, H.V., Wortham, J.S., Wilson, R.G., Freedman, M., and Wogan, G.N. (1966). Science 154.

Galleron, C. (1984): The fifth base: a natural feature of dinoflagellate DNA. Origins of life 13(3/4):195-203.

Gaubatz, J., R. Hardison, J. Murphy, M.E. Eichner and R. Chalkey (1978): The role of H1 in the structure of chromatin. Cold Spring Harbor Symposium on Quantitative Biology, XLII:265-271.

Ghosh, S. (1976): The nucleolar structure. Int. Rev. Cytol., 44:1-28

Granboulan, N. and Granboulan, Ph. (1965) Cytochimie ultrastructurale du nucléole II. Etude des sites de synthèse de RNA dans le nucléole et le noyau. Exp. Cell Res., 38:604 .

Gupa, J. (1981): Histopathology of mycotoxicosis produced in swine albino mice by metabolites of some fungal isolates. Applied and Environmental Microbiology Vol. 41 No.3

Hiroko Yoshizawa, Reiko Uchimaru, and Yoshio Ueno (1981): Metabolism of aflatoxin B1 in the isolate nuclei of rat liver: J. Biochem Vol, 189, No.2, 443-452.

Jackson, D.A., S.J. McCready and P.R. Cook (1981): RNA is syntetized at the nuclear cage. *Nature*, 292:552-555.

Jiménez-García, L.F. Evolución nuclear en animales; enfoque ultraestructural de las partículas ribonucleoproteicas intranucleares del período interfásico. Tesis de Maestría en Ciencias, Biología. Facultad de Ciencias U.N.A.M. México (1985)

Jiménez-García, L.F. Estudio de las variaciones cuantitativas de la cromatina durante la diferenciación y maduración neuronal. Tesis de licenciatura. Biología. Facultad de Ciencias, U.N.A.M. México (1983).

Kozak, M. (1983): Comparizon of initiation of protein synthesis in procaryotes, eucariotes and organelles. *Microb. Rev.*, 49(1):1-45.

Lehninger, 1981. Bioquímica. ED, Omega, 2 edición. Barcelona.

Monneron, Ch.L. et Frayssinet, M. Ch. présentés par Courier, M.R. C.R. Acad. Sc. Paris. T. 267 (1968) . Cancerologie- Induction par l' aflatoxine et la lasiocarpine d' amas de grain péricomatiniens dans le fois de rat.

Monneron, A. and W. Bernhard (1969): Fine structural organization of the interphase nucleus in some mammalian cells. *J. Ultrastr. Res.*, 27:266-288.

Moyne, G., R.E. Nosh and E. Puvion (1977): Perichromatin granules in isolated rat hepatocytes treated with cortisol and cycloheximide. *Biol. Cellulaire*, 30:5-16.

Moyne, G. and E. Puvion (1976): Visualization of transcriptional activity in the cell nucleus: Sixth European Congress on Electron Microscopy Jerusalem :14-19.

Nagl, W. (1979): Condensed interphase chromatin in plant and animal cell nucleus: fundamental differences. *Pl. Syst. Evol.*, Suppl., 2:247-260.

Nevins, J.R. (1984): Poly(A) in eucaryotic mRNA. En Apirion, D. (Ed.), *Processing of RNA*. Chapt. 6, pp. 133-150. C.R.C. Press, Inc., U.S.A.

Penman, M., Huffman, S., Rosbash, M., Wenberg, R. and Zylber, E. (1970) Distinct RNA synthesis of the Hela cell Cold Spring Harbor Symp., *Quant. Biol* 35:561-575.

Petrov, P. and W. Bernhard (1971): Experimentally induced changes of extranucleolar ribonucleoprotein components of the interphase nucleus. *J. Ultraste. Res.*, 35:386-402.

Perry, R.P., (1962) The cellular sites of synthesis of ribosomal and 4S RNA. *Proc. Natl. Acad. Sci.* 48:2179.

Puvion, E., G. Moyne and W. Bernhard (1976): Action of 3' deoxyadenosine Cordycepin on the nuclear ribonucleoproteins of

isolate liver cells J. Microscopie Biol Cell 25:17-32

Puvion, E., F. Puvion-Dutilleul and E.H. Leduc (1981): The formation of nucleolar pericromatin granules. J. Ultrastr. Res., 76:181-190.

Puvion, E. and G. Moyne (1981): In situ localization of RNA structure. En Busch, H. (Ed.), the cell nucleus, vol. VII, Chapt.2, pp. 86-87 Academic Press, A.S.A.

Sarin, S. and Gallo, R. (1980): Inhibitors of DNA and RNA polymerase, Pergamons Press Oxford and New York.

Smetana, K., J. Lejnar, A. Vlastiborova and H. Busch (1971): On interchromatin dense granules of mature human neutrophil granulocytes. Exptl. Cell Res., 64:105-112.

Spector, D.L., W.H. Schrier and H. Busch (1983): Immunoelectron microscopic localization of SnRNAs. Biol. Cell., 49:1-10

Sporn, M.B. Dignmun, C.W., Phelps, H.L. and Wogan, G.N. (1966) Science 151, 1539.

Sunkara, P.S., D.A. Wright and P.N. Rao (1979): Mitotic factors from mammalian cell induce germinal vesicle breakdown and chromosome condensation in amphibian oocytes. Proc. Nat. Acad. Sci., U.S.A., 76(6):2799-2802.

Svoboda, D. Racela, A., and Higginson (1967) Biochem Pharmacol 49,

1023.

Svoboda, D. and Higginson (1968) Cancer Res 28, 1703.

Svoboda, D. Grady H.J. Higginson J. (1976): Aflatoxin B1 injury in rat and monkey liver Am J. Pathol 49:1023-1052.

Tanaka, T. and T. Oda (1976): Configurational changes in rat liver nuclear chromatin and nucleoli caused by dissociation and reassociation of H1 histone . Exptl. Cell Res., 103:143-149.

van Eckelen, C.A.G. and W.J.G. and W.J. van Venrooij (1981): HnRNA and its attachment to a nuclear protein matrix. J. Cell Biol., 88:554-563.

Vázquez-Nin, G.H. and W. Bernhard (1971): Comparative ultrastructural study of perichromatin and Balbiani ring granules. J. Ultrastr Res., 36:848-860.

Vázquez-Nin, G.H., O.M. Echeverría, E. Molina and J. Fragoso (1978): Effects of ovariectomy and estradiol injection on nuclear structures of endometrial epithelial cell Acts Anat., 102:308-318.

Vázquez-Nin, G.H., O.M. Echeverría and J. Pedron (1979): Effects of estradiol on the ribonucleoprotein constituentes of the nucleus of cultured endometrial epithelial cells. Biol. Cellulaire 35.

Vázquez-Nin, G.H., J.A. Ortega-Rangel and O.M. Echeverría (1980): Nuclear aspects of nucleoblast differentiation in the chick embryo. *Biol. Cellulaire*, 39:143-146.

Vázquez-Nin, Juan A. Ortega-Rangel, Olga M. Echeverría, María del Rosario Parra y Luis F. Jiménez-García (1983): Changes in nuclear ribonucleoprotein constituents and chromatin disposition during neuronal differentiation and maturation. *Biol Cell* 48, 17-24.

Veena Singhal, Mathur, M., Ramalingaswami (1981): Aflatoxin B1 induced injury in Monkeys. *Arch Pathol Lab Med*. Vol. 105.

Wassef, M. (1979): A cytochemical study of interchromatin granules. *J. Ultrastr. Res.*, 69:121-133.

Watson, M.L. (1962): Observations of a granule associated with chromatin in the nuclei of cell of rat and mouse. *J. Cell Biol.* 14:162-167.

Yoshizawa, H., Uchimaru, R., and Ueno, Y. (1981): Metabolism of aflatoxin B1 in the isolated nuclei of rat liver. *J. Biochem* 89.