



UNIVERSIDAD NACIONAL AUTONOMA
DE MEXICO

Escuela Nacional de Estudios Profesionales
I Z T A C A L A

EFFECTOS DE LA CASTRACION Y ADMINISTRACION DE TES-
TOSTERONA SOBRE LAS RIBONUCLEOPROTEINAS DE
LA VESICULA SEMINAL DE RATA.

T E S I S
Que para obtener el Título de
B I O L O G O
p r e s e n t a
MARGARITA TREJO GUERRERO



Tlalnepantla Edo. de México

1990



Universidad Nacional
Autónoma de México

Dirección General de Bibliotecas de la UNAM

Biblioteca Central



UNAM – Dirección General de Bibliotecas
Tesis Digitales
Restricciones de uso

DERECHOS RESERVADOS ©
PROHIBIDA SU REPRODUCCIÓN TOTAL O PARCIAL

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

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

" Esta tesis se llevo a cabo en el laboratorio de
Microscopía Electrónica de la Facultad de Cien-
cias U.N.A.M. (1988 - 1990) "

A la Dra. Olga Margarita Echeverría Martínez
y Dr. Gerardo H. Vázquez Nin, mi sincero agradecimiento.

A los profesores: Martín Martínez Torres, José del C.
Benítez Flores, Eduardo Barrera Escorcía e Irma E. Dueñas
García, por su revisión crítica y sugerencias en esta tesis.

A la Dra. Clara Esquivel Huesca y Dr. Luis Felipe Jiménez
García por su valiosa ayuda en la elaboración de este --
trabajo. A Lourdes, Guadalupe, Marco, Palmira y todos los --
compañeros en el laboratorio.

A los profesores Angel Durán y Agustín Vargas por su --
asesoría.

Y de manera muy especial a Henry por su ayuda incondi-
cional, a Mario Alberto y Michelle por su ternura.

A mi madre y hermanos por su apoyo y confianza.

Y a todos mis amigos por brindarme su amistad.

A todos ellos GRACIAS

EFFECTOS DE LA CASTRACION Y ADMINISTRACION DE TESTOSTERONA
SOBRE LAS RIBONUCLEOPROTEINAS DE LA VESICULA SEMINAL DE RATA.

INDICE

	pag.
I RESUMEN	1
II INTRODUCCION	3
III ANTECEDENTES HISTORICOS Y TEORIA CELULAR	5
III 1 Componentes Estructurales del Núcleo.....	7
- Envoltura Nuclear y Complejo del Poro.....	7
- Lámina Densa.....	8
- Matriz Nuclear.....	9
- Cromatina.....	10
- Nucléolo.....	11
- Partículas Ribonucleoproteicas.....	13
- Localización de RNP en el núcleo interfásico....	14
III 2 El Papel de las Hormonas Esteroides en la Transcripción.....	20
IV OBJETIVO.....	24
V MATERIAL Y METODO.....	25
VI RESULTADOS.....	31
VII DISCUSION.....	46
VIII CONCLUSIONES.....	51
APENDICE 1	
-La microscopía electrónica como técnica de estudio.....	52
APENDICE 2	
- Prueba de Tukey y tabla de ANOVA.....	56
IX BIBLIOGRAFIA CITADA.....	61

I RESUMEN

Actualmente algunas líneas de investigación están enfocadas en demostrar claramente el papel que juegan las estructuras ribonucleoproteicas dentro del núcleo. Los gránulos pericromatinianos (GPC) localizados en la periferia de la cromatina, se piensa, están relacionados con el procesamiento postranscripcional de los RNAs premensajeros.

En este trabajo son analizados los efectos de la castración y la administración de testosterona en la dinámica de los GPC. Se realizó en células del epitelio de la vesícula seminal de ratas normales o testigo, castradas y castradas con una posterior administración de testosterona, dejando actuar a la hormona durante los primeros 15, 30, 60 y 120 minutos, antes de ser sacrificadas.

Se corroboró que efectivamente la castración causa una atresia severa en la morfología y volumen tanto del núcleo como del nucleólo, y que al reponerles testosterona hay una cierta recuperación que resulta no ser significativa en los tiempos estudiados.

Para la localización de los GPC se utilizó la técnica regresiva de contraste preferencial para ribonucleoproteínas (RNP) propuesta por Bernhard en 1969 que optimiza el

contraste al microscopio electrónico. La volumetría del núcleo y nucleolo se determinó por microscopía óptica y tinción de Smetana que resulta preferencial para RNA.

En este estudio los resultados muestran que, en estas células, la densidad numérica de los GPC disminuye drásticamente con la castración y la administración de testosterona no provoca una clara recuperación en la cantidad de estas partículas.

Los cambios en el volumen nuclear y nucleolar de los grupos castrados con respecto a los normales y la frecuencia o densidad numérica de GPC, en el presente estudio, pueden interpretarse, en cuanto que no hay un efecto postranscripcional de la testosterona en el procesamiento y / o transporte de mRNA hacia el citoplasma.

II INTRODUCCION

En la actualidad se establece que las células son la unidad funcional compuesta por sustancias y elementos químicos, elementos que se encuentran presentes aún en la materia inorgánica. La función celular es la de coordinar e interrelacionar eventos fisiológicos del organismo; de tal manera que tan importante es conocer las diversas partes que conforman el organismo como los mecanismos y las relaciones que los unen en un perfecto equilibrio.

Los compuestos orgánicos presentes en la materia viva muestran una enorme variedad y la mayor parte de ellos son muy complejos. Aún el más sencillo de los organismos unicelulares contienen un gran número de moléculas orgánicas. Tal es el caso de *Escherichia coli* que contiene aproximadamente 5000 compuestos diferentes, entre los cuales unas 3000 diferentes clases de proteínas y 1000 distintos tipos de ácidos nucleicos (44).

Si se consideran organismos superiores en la escala evolutiva los compuestos orgánicos de que están constituidos resultan ser más complejos, es el caso de los animales y las plantas superiores, sin embargo la inmensa variedad de estas moléculas puede reducirse a moléculas sencillas que unidas entre sí forman largas y complejas cadenas; como ejemplo, el almidón y la celulosa están constituidos por moléculas de glucosa; los diferentes tipos de proteínas están

constituidos por solo 20 diferentes aminoácidos cuya ordenación determina la función y localización de ésta en las células. Analogamente los 1000 o más ácidos nucleicos de la célula *E. coli*, están constituidos a partir de un total de 8 moléculas diferentes, los nucleótidos. Puesto que todas estas biomoléculas sencillas son idénticas en todas las especies conocidas, podemos deducir que todos los organismos vivos proceden de un antepasado común (44).

III ANTECEDENTES HISTORICOS Y TEORIA CELULAR.

El nombre de célula fuè utilizado por primera vez en el siglo XVII por Robert Hooke, denominando así, a las celdillas que observó en el corcho, casi dos siglos despues M. J. Scheiden trabajando en tejidos vegetales y T. Schwann con tejidos animales fundamentaron las bases de la teoría celular

Todos los tejidos vegetales como animales están conformados por células y todas las células responden a los mismos principios de organización, desde los animales mas complejos hasta los diminutos seres vivos en los que una sola célula comprende todo el organismo. Mas tarde se establece que la célula es la unidad funcional, es decir que todos los fenómenos vitales podían reducirse a funciones celulares.

La teoría celular trajo como consecuencia la teoría del medio interno, formulada por C. Bernard en 1854, en la cual se postula que todas las células del cuerpo están incluidas en un medio interno que posee ciertas propiedades, las células son organismos que están incluidos en un medio ambiente propio diferente al medio externo en el que vive el organismo completo. Otra consecuencia de la teoría celular fue la doctrina de la neurona (Santiago Ramón y Cajal en 1888), en la que se propone que el sistema nervioso esta formado por células independientes y que el impulso nervioso salta de una neurona a otra.

Ya al principio de este siglo se establecen las leyes de disyunción de los caracteres que representan el fundamento que explica el mecanismo de la herencia, esto es en realidad un redescubrimiento de las leyes establecidas por Mendel en 1865. Hugo de Vries en 1901, establece el concepto de mutación para explicar las variaciones obtenidas en sus cultivos vegetales, lo cual introducía una explicación del origen de la variabilidad dentro del esquema sumamente estable de la teoría Mendeliana; liquidaba también la hipótesis Lamarkiana de una variabilidad adaptativa, estableciendo así, el concepto de variaciones debidas al azar.

La teoría cromosómica se debe principalmente a los trabajos de T. H. Morgan en 1910, anteriormente Flemming y Strasburger en 1875 habían visualizado los cromosomas, ocho años después Van Beneden enunció la ley de la constancia numérica de los cromosomas de acuerdo a cada especie, además de observar la reducción cromosómica durante la meiosis. Morgan en colaboración con Bridges, Sturtevant y Muller, establece que los genes se encuentran ordenados en forma lineal en los cromosomas. Más tarde Painter en 1933, confirma esta teoría demostrando que en los cromosomas de *Drosophila* existen bandas muy visibles; este trabajo se completó con el estudio de Griffith en 1928 que establece la naturaleza química de los cromosomas.

En 1952 Watson y Crick, haciendo una precisa recopilación de datos reportados anteriormente presentan el modelo de la molécula

de DNA, explicando su autoduplicación así como el fenómeno de mutación como consecuencia de su organización estructural (44).

III 1 Componentes Estructurales del Núcleo.

- Envoltura Nuclear y Complejo del Poro.

La membrana nuclear es una doble membrana de naturaleza lipoproteica que constituye la frontera entre el núcleo y el citoplasma. Constituye una prolongación del retículo endoplásmico; se presenta siempre con una cavidad aplanada o espacio perinuclear de aproximadamente 200 angstroms de espesor, en donde una parte de la membrana que la limita, está en contacto con el citoplasma y lleva asociados ribosomas y la otra se encuentra en contacto con el nucleoplasma. Ambas membranas están interconectadas por la presencia de poros, que son perforaciones de alrededor de 700 Å de diámetro (17).

Al borde de cada poro nuclear está adherido un material que forma un cilindro orientado perpendicularmente a la envoltura que atraviesa el poro y da salida a la vez al citoplasma y al nucleoplasma, este material es el denominado complejo del poro. Está constituido por 8 unidades cuya disposición aún no es precisa, pero se cree que están dispuestos en dos niveles a una y otra cara de la membrana nuclear, cada piso comparte probablemente 4 subunidades, formando un anillo. El diámetro externo del complejo del poro, es superior que el diámetro interno; los intercambios entre nucleoplasma y citoplasma se

realizan a través de un canal de aproximadamente 100 Å de diámetro.

El número de poros en la membrana nuclear es variable, como ejemplo, se han determinado, para los linfocitos humanos un total de 270 poros en la superficie total del núcleo, mientras que para el ovocito de anfibios al final del crecimiento un total de 40 millones que ocupan un 25% de la superficie nuclear (17).

- Lámina Densa.

Es también constituyente de la envoltura nuclear y se encuentra a lo largo de ésta, en la cara interna, adosada a la periferia del poro, su espesor y estructura varía según los diferentes tipos celulares y organismos. Aunque se ha establecido que su composición filamentososa está constituida por láminas, al parecer de citoqueratina y vimentina, el diámetro de tales filamentos va de 3 a 6 nm (18).

Se ha estudiado una posible conexión entre los filamentos que componen las tres láminas del núcleo y los filamentos intermediarios dentro del citoplasma como constituyentes del citoesqueleto, esto mediante, la utilización de anticuerpos monoclonales que reconocen ambas estructuras tanto en la envoltura nuclear como dentro de el citoplasma (18 , 20).

Se piensa que la función de esta lámina debido a su naturaleza, es la de darle consistencia y soporte al núcleo.

-Matriz Nuclear o Carioesqueleto.

Se ha observado al tratar al núcleo, con extracciones a diferentes concentraciones de sal y digestión con nucleasas. Se trata de una red filamentososa de naturaleza proteica que le proporciona cierta rigidez interna al núcleo.

Dentro de esta matriz nuclear se han caracterizado principalmente proteínas no histónicas de naturaleza ácida, carbohidratos y fosfolípidos, además de DNA y RNA en poca cantidad (25). Su constitución fibrosa presenta cierta continuidad con el citoesqueleto, dichas fibras se encuentran anastomosadas formando una red que se supone sirve de soporte mecánico a los componentes nucleolares, el diámetro de estas fibras se calcula entre 50 y 60 Å (24). Por su naturaleza química es susceptible a pepsinas y resistente a RNAsas.

Un estudio reciente muestra que en cultivos de células HeLa, a las cuales se aplicó diferentes tratamientos con RNAsa, extracción con detergentes, inhibidores de la síntesis de RNA, etc., se presentan cambios morfológicos entre la estructura de la cromatina y los componentes de la matriz nuclear, junto con una disminución del RNA dentro del núcleo. De esta manera se demuestra que esta red filamentososa además de constar en su mayor parte de RNP, también está en relación con la disposición de la cromatina dentro del núcleo (40).

- Cromatina.

Denominada así por Flemming en 1879 debido a su fuerte afinidad por los colorantes básicos. La cromatina es un estado morfológico del DNA presente dentro del núcleo interfásico en todas las células eucarionticas. En su totalidad la cromatina consta de DNA, RNA, proteínas histónicas y no histónicas, fosfolípidos y cationes (28).

Durante la interfase se le encuentra en estado condensado en su mayoría, aunque en las áreas donde se localizan los complejos de transcripción, la cromatina aparece difusa. Por lo que se establece un cambio morfológico en la cromatina activa y la cromatina inactiva.

El complejo DNA-histona, se denomina nucleosoma, esta es la unidad formada por un octàmero de histonas (H2 A)₂, (H2 B)₂, (H3)₂ y (H4)₂, que se encuentran en unión iónica con la doble cadena de DNA que envuelve a estas proteínas. Estas estructuras asemejan a un collar de cuentas cuyo diámetro es de 100 Å; entre los espacios de éstas se localiza el DNA libre, donde se ha comprobado una mayor sensibilidad a la acción de nucleasas, procedimiento mediante el cual, se obtienen múltiplos aproximados de 200 pares de nucleótidos (49).

Análisis de sedimentación han demostrado que el diámetro de las fibras que componen esta cromatina es de 30 nm, que se encuentran arrolladas en forma helicoidal, con 12 nucleosomas por vuelta. Existe una fuerte interacción iónica entre estas fibras por lo que se adopta su estructura molecular característica (19).

Es importante mencionar que las histonas no ejercen un influjo directo en la expresión de la información genética, aunque si pueden favorecer los cambios necesarios en la estructura del cromosoma para una expresión genética selectiva; cuando los genes de los cromosomas adquieren un estado de actividad, de cuya formación se conoce aún poco, a pesar de ello, acaba de determinarse que la cromatina activa mantiene todavía histonas enlazadas, y aún más se conserva la periodicidad repetitiva nucleosómica (40). Actualmente se apoya la teoría de que la cromatina activa, contiene además de histonas, proteínas no histónicas que de alguna manera modifican la estructura del nucleosoma(40).

Se ha llegado a demostrar que la cromatina no presenta una distribución al azar, por el contrario, durante la interfase se observa en disposición ordenada de acuerdo a patrones repetitivos, principalmente en las áreas cercanas al nucléolo (30).

- Nucléolo.

Es el componente nuclear más complejo y altamente ordenado en eucariontes, a pesar de no poseer un sistema de membranas que lo determinen como organelo. Se encuentra rodeado por una capa de cromatina, que bajo estas condiciones se denomina pericromatina nucleolar, que ocasionalmente penetra en el nucléolo en forma de delgadas fibras de DNA.

Las funciones del nucléolo están bien definidas y secuencialmente son la síntesis y procesamiento de preRNA

ribosomal así como el ensamblaje de partículas prerribosómicas (27). En cuanto a su morfología, dentro del nucleólo se localizan los centros fibrilares, que son regiones que aparecen claras al microscopio electrónico, unidas entre sí, contienen DNA y proteínas de naturaleza no ribonucleoproteica, esta zona se ha definido claramente como aquella donde se localiza el organizador nucleolar (NOR), que es una región de la cromatina que contiene agrupados los genes que transcriben a RNA ribosómico (26).

Rodeando a los centros fibrilares, se encuentra la región fibrilar densa, rodeando a ésta a su vez, la región granular, ambas regiones están constituidas principalmente por ribonucleoproteínas, el límite entre la región fibrilar y granular no está del todo bien definida. Es justamente en la zona de transición, entre el límite del centro fibrilar y la región fibrilar densa donde por métodos inmunocitoquímicos así como por autorradiografía se ha detectado cierta actividad transcripcional, en esta pequeña zona se ha encontrado también DNA y RNA (53).

Además de que contiene RNA, DNA, proteínas histónicas y ribonucleoproteínas, el nucleólo contiene proteínas no histónicas de naturaleza ácida tales como las denominadas, B23 y C23 o Nucleolina. En los centros fibrilares se ha localizado la Fibrilarina con un punto isoeléctrico de 8 (básica), de acuerdo con Busch y col. en el nucleólo existen más de 400 proteínas diferentes.

Cambios morfológicos a nivel molecular dentro del nucleólo,

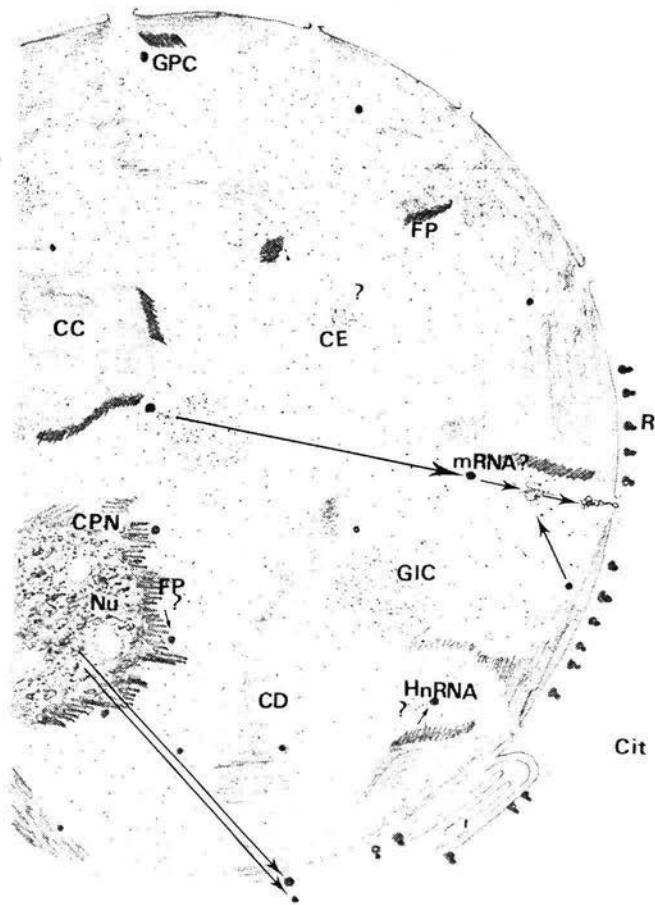
son atribuibles a la acción de enfermedades autoinmunes y de tipo canceroso, de ahí la importancia de su estudio en las últimas décadas. Actualmente se estudian desde los mecanismos que controlan su expresión genética, hasta la identificación a nivel molecular de lesiones causadas por cancerígenos (26).

- Partículas Ribonucleoproteicas.

Las ribonucleoproteínas (RNP) se encuentran como componentes del nucleoplasma y pueden observarse perfectamente mediante un procedimiento de tinción regresiva, mediante el cual, la cromatina aparece blanqueada y el contraste de las partículas que contienen RNP, se resalta (12).

Monneron y Bernhard han descrito algunas estructuras compuestas por RNP; gránulos intercromatinianos y pericromatinianos, fibras pericromatinicas y ciertas estructuras que por su organización les denominan cuerpos espiralados. Estas estructuras son características en núcleos en interfase de células animales y vegetales; en ovocitos de anfibios se han observado gránulos de 300 a 400 Å de origen nucleolar, además estructuras en forma de hélices de 300 a 800 Å en los núcleos de amiba, que también han sido caracterizadas como RNP (23).

Se ha establecido una interrelación entre cromatina y RNP, así como un posible mecanismo de transporte de las RNP a través de la membrana nuclear hacia el citoplasma, esto puede observarse en el siguiente esquema (5).



Representación esquemática de la localización de las RNP dentro del núcleo interfásico de células eucariotas y posible dinámica de la relación RNP - RNA, según E. Puvión (38).

(CC) cromatina compacta; (CPN) cromatina perinucleolar; (GPC) gránulos pericromatinianos; (GIC) gránulos intercromatinianos; (CE) cuerpos espiralados; (Nu) nucleolo; (FP) fibras pericromatínicas; (CD) cromatina dispersa; (Cit) citoplasma; (R) ribosomas.

También se ha demostrado mediante un estudio comparativo de evolución nuclear, que en la escala evolutiva desde *Euglena* hasta mamíferos las estructuras antes descritas, constituidas por RNP se conservan, de lo cual se postula que el papel funcional de estas partículas es primordial y está directamente relacionado con los procesos de transporte, almacén y procesamiento postranscripcional de los mRNA y rRNA (41).

Gránulos intercromatinianos (GIC).

Se han encontrado como componente permanente en todas las células animales, localizados en cúmulos interconectados con diminutas fibras cuyo diámetro va de 200 a 250 Å; no se ha encontrado ninguna relación topográfica con respecto al núcleo o los poros de la membrana. También se comprobó una alta resistencia a la acción de RNAsas y su función aún no ha sido bien definida, aunque se ha establecido que participan en la maduración del RNA mensajero.

Contienen pequeños ribonucleótidos dentro del núcleo ricos en Uridina (UsnRNP) (15 y 16).

También se especula en base a su localización y tamaño, así como por su naturaleza ribonucleoproteica, que los GIC pueden jugar un papel muy importante en la síntesis y/o transporte de una de las fracciones que componen los ribosomas (15, 34); esto resulta ser poco probable ya que en estudios por inmunolocalización, en núcleos politénicos de glándulas salivales

de *Chironomus thummi*, se ha establecido la estrecha relación de estas estructuras, con los nuevos sintetizados de RNA premensajero (54).

Fibras pericromatinianas

Fueron descritas inicialmente por Monneron y Bernhard en 1969, son también RNP cuyo diámetro va de 30 a 50 Å, se encuentran más o menos enrolladas entre ellas mismas, mediante autorradiografía se ha encontrado que precisamente al borde de la cromatina compacta donde se localizan estas fibras, hay una rápida e intensa incorporación de uridina tritiada. Son muy sensibles a la acción de RNAsas.

Se ha observado que con la utilización de cortisona se estimula la síntesis de RNA y la densidad numérica de fibras pericromatinianas aumenta; por el contrario si se inhibe la síntesis de RNA premensajero con α -amanitina se observa un decremento de estas fibras, en base a lo cual se establece una relación entre los niveles de síntesis de RNA inmaduro y la densidad numérica de fibras pericromatinianas (21).

Por tales evidencias, así como por su localización se ha sugerido que estas FPC constituyen el sustrato morfológico donde se localiza el RNA heteronuclear recién sintetizado (22).

Cuerpos Espiralados.

Se encuentran en el área de intercromatina, son esféricos y su diámetro va de 0.3 a 0.5 nm.. Son RNP, que se observaron en primer lugar dentro de las células de mamíferos (5).

Su función y origen es no del todo clara hasta el momento, aunque recientemente Fakan y col. asocian estas estructuras, con el procesamiento de los recién sintetizados de RNA heteronuclear (HnRNA) participando así también en la arquitectura del núcleo (42).

Gránulos Pericromatinianos

Los gránulos pericromatinianos (GPC) fueron descritos por primera vez en 1962 por Swifth y Watson por separado (6, 7). Se observaron asociados a la cromatina periférica del núcleo, de donde toman su nombre. Se localizan como un componente permanente en células de diferentes organismos tales como insectos (8) y plantas (9,10) sin embargo no se han localizado en *Euglena* (11). En células animales se encuentran en una concentración variable. Su diámetro va de 300 a 500 Å., la tinción regresiva con EDTA (agente quelante que elimina grupos uranilo del DNA, destacando regiones ricas en RNA), resalta las RNP, de esta manera se puede distinguir un halo claro alrededor de los GPC de aproximadamente 250 Å. de espesor. Los GPC pueden encontrarse más comunmente en la periferia de los grupos de

cromatina y cerca de la membrana nuclear, algunas veces en zonas aisladas del área de la intercromatina así como en la zona del nucléolo (4).

En cuanto a su composición química se ha establecido que los GPC presentan resistencia a la digestión enzimática con DNAasa y RNAasa en combinación; sin embargo, hay un decremento en el número de granulos, cuando se les digiere con Pronasa y RNAasa, lo cual sugiere que los GPC, consisten de RNP y no de DNA (5).

Cuando se emplea la técnica preferencial antes mencionada (Bernhard 1969), se puede observar que los GPC están constituidos por microfibrillas de aproximadamente 30 Å. de diámetro, algunas de estas fibrillas emergen de la partícula grano y pueden continuarse a cortas distancias a través de la cromatina o áreas de intercromatina, en otros casos pueden observarse pequeños grupos de GPC interconectados a través de fibrillas (5). Se ha comprobado una relación lineal entre el estado morfológico de fibra a grano, puesto que al haber un aumento en la aparición de fibras la concentración de granos decrece, además conjuntamente a este fenómeno, se presenta una disminución del volumen nuclear (7)

Un estudio ultraestructural, compara los GPC de hepatocitos y ovocitos, con los gránulos de Balbiani (GB), de los cromosomas gigantes de *Chironomus thummi*, se establece que ambos componentes son similares en talla (aprx. 450 Å) siendo los gránulos de Balbiani, algunas veces considerablemente pequeños, en lo que se refiere a sus propiedades citoquímicas, ambos presentan un

contraste positivo a la tinción de EDTA, desapareciendo después con una digestión combinada de Pronasa - RNAsa, en ambos no se ha determinado la presencia de DNA. Mientras que los GB son detectados desde su sitio de formación y seguidos a través del poro nuclear, los GPC están prácticamente asociados a cromatina condensada, se sugiere que su función es la misma (47).

Se han logrado aislar los GPC determinándose su coeficiente de sedimentación que es de 40S, también se ha establecido que están conformados por tres polipéptidos muy similares entre sí, cuyos pesos moleculares van desde 31 000 hasta 36 000; el polipéptido mayor presenta una migración en gel (poliacrilamida de SDS) muy similar a la del péptido encontrado en células HeLa que corresponde a las partículas de RNA heteronuclear (13, 48).

En condiciones de estímulo para la síntesis de RNA mediante el uso de cortisol, se observa que hay una acumulación de GPC, relativamente limitada, mientras que bajo condiciones que inhiben el procesamiento de RNA, esto es, utilizando cicloheximida, se induce a un incremento principalmente extranucleolar de los GPC (14). En estas mismas células (hepatocitos de rata), la acción del Diclorobenzoimidazol (DBR) es análogo a la Adenosina, ambos inhiben parcialmente la síntesis de RNA heteronuclear dañando así mismo el procesamiento de RNA ribosomal, paralelamente se denota una desaparición de fibras pericromatínicas, además de una fragmentación del nucléolo y una notable acumulación de GPC dentro de éste (4).

Muchos estudios del papel funcional de los GPC, apoyan la teoría de que los GPC son formas de almacenamiento y/o de transporte del RNA heteronuclear o RNA mensajero (4, 13, 22, 34, 38, 43, 45, 47, 50).

Recientemente Vázquez Nín y colaboradores (54), establecen en un estudio inmunocitoquímico y por medio de autorradiografía que en los núcleos de las glándulas salivales de larva de *Chironomus*, no se detecta la presencia de snRNP, (pequeños ribonucleotidos) en los gránulos de Balbiani maduros, estructuras que anteriormente, se han mencionado como homólogas de los GPC. Se sugiere que el mRNA es directamente procesado, incluyendo el proceso de eliminación de intrones, dentro de los sitios de transcripción y que estos GB contienen el RNA mensajero ya procesado (47, 54).

III 2 El Papel de las Hormonas Esteroides en la Transcripción.

Desde principios de siglo se ha sugerido que las hormonas son una especie de mensajeros que coordinan la actividad y crecimiento de diferentes tejidos. Los esteroides, son también hormonas que aparecen y desaparecen mediante procesos moleculares importantes en el desarrollo y mantenimiento de la actividad celular específica en la diferenciación del organismo.

Las hormonas esteroides se sintetizan en diferentes células, las células corticosuprarenales, células del cuerpo amarillo del

ovario y en las células intersticiales del testículo. La biosíntesis se realiza en varias etapas, la primera ocurre en el retículo endoplásmico liso, las otras en las membranas de las mitocondrias; en todos los casos la primera etapa es la formación de un precursor común, la pregnenolona a partir del colesterol, en las siguientes etapas ésta se transforma en hormona esteroide (desoxicorticosterona, progesterona y testosterona) (3,17).

En cuanto a el transporte de las hormonas esteroides se sabe que son transportadas dentro del núcleo de las células blanco, donde interaccionan con la cromatina. De acuerdo a el modelo propuesto por Main Woring en 1977, en cuanto a los mecanismos de acción de andrógenos, la interacción del complejo proteína receptora - hormona, con su sitio aceptor en el núcleo, estimula una secuencia temporal de eventos bioquímicos los cuales son los responsables de la manifestación de la respuesta andrógena (32).

La vesícula seminal es un órgano dependiente de andrógenos, cuya morfología y función es altamente sensitiva a los niveles de circulación de la testosterona (46). La castración causa una involución y la inyección de testosterona restaura el peso y la función de este órgano, los eventos que ocurren durante las primeras 24 hrs. después de la estimulación con testosterona consiste en un incremento en la transcripción de rRNA y mRNA, además de síntesis de proteínas, la síntesis de DNA resulta ser más sensible (36).

Se han realizado estudios en cuanto a los cambios

estructurales que ocurren en células dependientes de andrógenos; en el caso de vesícula seminal y próstata, se ha establecido que la castración induce un decremento en el volumen nuclear y nucleolar. Dentro del nucléolo ocurre una segregación de sus componentes fibrilar y granular, observándose también un relativo incremento en fibras (32). Además decrece el volumen vacuolar, intranucleolar y el de los centros fibrilares, tanto como su volumen absoluto. La administración de testosterona revierte progresivamente estos efectos siendo detectados los primeros cambios después de 1 hr de la inyección de la hormona (32).

En lo referente a la mitosis, los efectos citológicos de la vesícula seminal de ratas castradas son severos; antes de la administración de testosterona no se observa divisiones celulares, las que aparecen 24 a 36 horas después de la estimulación. La actividad mitótica se presenta en un 75% después de las 60 hrs. de aplicado el tratamiento (33).

Se ha establecido que existe una heterogeneidad celular, como respuesta a bajas dosis de testosterona (0.025 - 0.1 mg.) en vesícula seminal. Por medio de autorradiografía se pueden observar diferentes estadios; proliferación celular, células en tránsito, ésto es, en vías de maduración, algunas otras alcanzan a diferenciarse, un mayor porcentaje se observan en decaimiento formando cuerpos apoptóticos, antes de morir esto es, una compresión del citoplasma celular y un apilamiento entre estas células muy reducidas en tamaño (29).

En cuanto a la síntesis de RNA y DNA en células de vesícula

seminal y próstata de ratas castradas se ha observado que existe una estimulación de la síntesis, aproximadamente a los 2 días después de la inyección continua de testosterona. En el caso de la síntesis de RNA se obtiene un valor máximo a los 6 días, después de este tiempo hay un decremento en la síntesis hasta alcanzar un valor normal tanto en el núcleo como en el citoplasma. El DNA se sintetiza en una forma más conservada, llegando a un valor de síntesis normal hasta los 6 días después de la administración diaria de la hormona (36).

La síntesis *in vitro* de RNA en núcleos aislados de próstata de ratas castradas e inyectadas con testosterona, muestran un incremento a las 2 hs después de la administración, se postula que este incremento en la síntesis es el resultado de un aumento en los sitios de iniciación en la cromatina, lo mismo que se refleja en una mayor estimulación en la actividad de la RNA polimerasa II (37).

Los efectos del estradiol sobre las RNP de células del epitelio endometrial, muestran que existe un decremento de los gránulos pericromatinianos dentro de los primeros treinta minutos después del tratamiento con esta hormona, esto es, en ratas ovariectomizadas 21 días antes, presentándose una normalización en número después de una hora; el conjunto de los experimentos demostró que el estradiol incrementa el transporte de RNA sintetizado antes del tratamiento, hacia el citoplasma y que los GPC tienen una función muy importante en dicho transporte (43, 50).

IV OBJETIVO

Realizar un análisis cuantitativo intranuclear de estructuras ribonucleoproteicas, en particular de los gránulos pericromatinianos (GPC) de las células epiteliales de vesícula seminal de rata en condiciones normales (testigos), castradas y castradas con administración posterior de testosterona; así como el analizar morfométricamente cambios inducidos a nivel del núcleo y nucléolo en estas células.

V MATERIAL Y METODO

Se utilizó un lote de ratas machos de 3 meses de edad, (púberes de aproximadamente 100 gr. de peso) el cual se dividió en 3 grupos: N, C y T. Los grupos se designaron de la siguiente manera: N fue el grupo normal o testigo, las 3 ratas de este grupo fueron sacrificadas intactas; el grupo C de 3 ratas castradas, las cuales fueron sacrificadas 30 días después de la castración sin ninguna administración de testosterona; el grupo T consistió de 12 ratas castradas y tratadas con la testosterona, a las cuales se les extrajo la vesícula seminal a diferentes tiempos, después de haberlas inyectado.

La castración fue vía escrotal, bajo condiciones de anestesia. Al grupo T, se le inyectó vía intraperitoneal 1 mg de 17B-hemisuccinato de Testosterona por 100 gramos de peso corporal; previamente se diluyó la testosterona en alcohol absoluto y agua bidestilada, de tal manera que la solución final tuvo 1 mg de testosterona diluida en 1 ml., misma que le fue inyectada al animal. Se sacrificaron y se les extrajo el tejido, a los 15, 30, 60 y 120 min después de la inyección.

Se procedió a fijar en glutaraldehído al 2.5% amortiguado en fosfatos, durante 90 min.

Se deshidrató en alcoholes graduales de 70, 80, 96% y alcohol absoluto durante 20 min cada uno.

La preinclusión se realizó en una mezcla de epon y óxido de propileno en proporción 1:1 a temperatura ambiente durante 24 hs; posteriormente se incluyó en resina epóxica y finalmente ésta se polimerizó a 60°C durante 24 hs.

Para realizar los estudios específicos de núcleo y nucleolo parte del tejido se incluyó en glicol metacrilato (GMA), según describe Leduc y Bernhard (35). La fijación del tejido se realizó bajo las condiciones antes mencionadas, posteriormente se enjuagó con amortiguador de fosfatos.

La deshidratación se llevó a cabo en una solución de GMA a diferentes concentraciones; al 70%, 80% y 97% con dos cambios cada 20 min en las diferentes concentraciones. Se realizó una preinclusión del tejido, en una solución de 7 ml de GMA al 97% a la cual se le agregaron 2 ml de butil metacrilato y 100 mg de peróxido de benzoilo. El tejido se deja en dicha solución de inclusión no polimerizada durante 1 hr añadiendo GMA al 97% en proporción 1:1, se deja durante 24 hs en el prepolimero.

La inclusión se realiza en cápsulas de gelatina y se polimeriza con luz ultravioleta.

Una vez obtenidos los bloques y cápsulas de ambas resinas (GMA y EPON) que contienen porciones de epitelio de vesícula seminal, se procedió a la microtomía, para lo cual se utilizó un ultramicrotomo Sorvall MT II.

MICROSCOPIA OPTICA. Para el estudio específico de volumetría se utilizó la resina de GMA, de la cual se obtuvieron cortes semifinos de aproximadamente 1 micra de grosor, el cual se

mantuvo constante. Se localizó el epitelio y obtuvieron 4 portaobjetos por espécimen, se tiñeron con 0.025% de azul de toluidina en solución con etanol al 10% a un pH de 5.5 según Smetana, tinción que resulta ser preferencial para RNA (31).

Estos cortes se observaron al microscopio óptico a un aumento total fijo de 1600 X.

Se utilizó un ocular graduado para las mediciones del núcleo y nucleólo de las células que fueron cortadas longitudinalmente. Se escogieron aquellas células que presentaban un solo nucleólo, con el fin de estandarizar los resultados, tomando las coordenadas del diámetro mayor y menor, tanto del núcleo como del nucleólo de 30 células por espécimen (90 cel. por caso). Finalmente se realizó un análisis estadístico de varianza con prueba de Tukey.

MICROSCOPIA ELECTRONICA; Se utilizó la resina epóxica, obteniéndose cortes ultrafinos de 60 a 90 nm de espesor; estos cortes se colocaron en una rejilla de cobre cubierta con una delgada membrana de formvar en su cara superior, que a su vez sirve como soporte para que los delgados cortes se depositen extendidos. Estas rejillas se contrastaron según la técnica de Bernhard (12), que utiliza acetato de uranilo, EDTA y citrato de plomo.

El acetato de uranilo al 5%, se preparó con 500 mg de acetato de uranilo disueltos en 10 ml de agua bidestilada.

El ácido etil-diamino tetracético (EDTA) se preparó en solución con 7.44 g. de EDTA y 50 ml. de agua bidestilada a la cual se le añade solución fresca de NaOH, hasta alcanzar un pH de 6.9, se aforó a 100 ml con agua bidestilada y se utilizó a temperatura ambiente.

El citrato de plomo, consistió en una solución de 30 mg de citrato de plomo, disueltos en 10 ml. de agua bidestilada, agregando NaOH 10 N hasta alcanzar un pH de 11.

Las rejillas se depositaron flotando sobre una gota de solución acuosa de acetato de uranilo, EDTA y citrato de plomo, durante 5, 18 y 2 min respectivamente, en cada cambio de solución se enjuagó por goteo con agua bidestilada; una vez secas las rejillas se observaron al microscopio electrónico EM 10 Carl Zeiss a un aumento fijo de 8 800X.

Posteriormente se seleccionaron 10 núcleos por cada bloque (30 núcleos por caso) y se fotografiaron. La densidad numérica de GPC por unidad de área, fuè calculada de acuerdo con el programa diseñado por el Dr. Vázquez Nín, en una microcomputadora Franklin ACE 1200 con un sistema de procesamiento de imagen. El criterio para determinar los GPC fue el siguiente: la observación de un halo bien visible alrededor del grano redondo con un tamaño dentro del rango ya establecido (300 a 500 Å de diámetro). Una vez identificados, se pasó el cursor sobre el contorno nuclear de manera que se obtuvo el área de corte del núcleo y suministrando

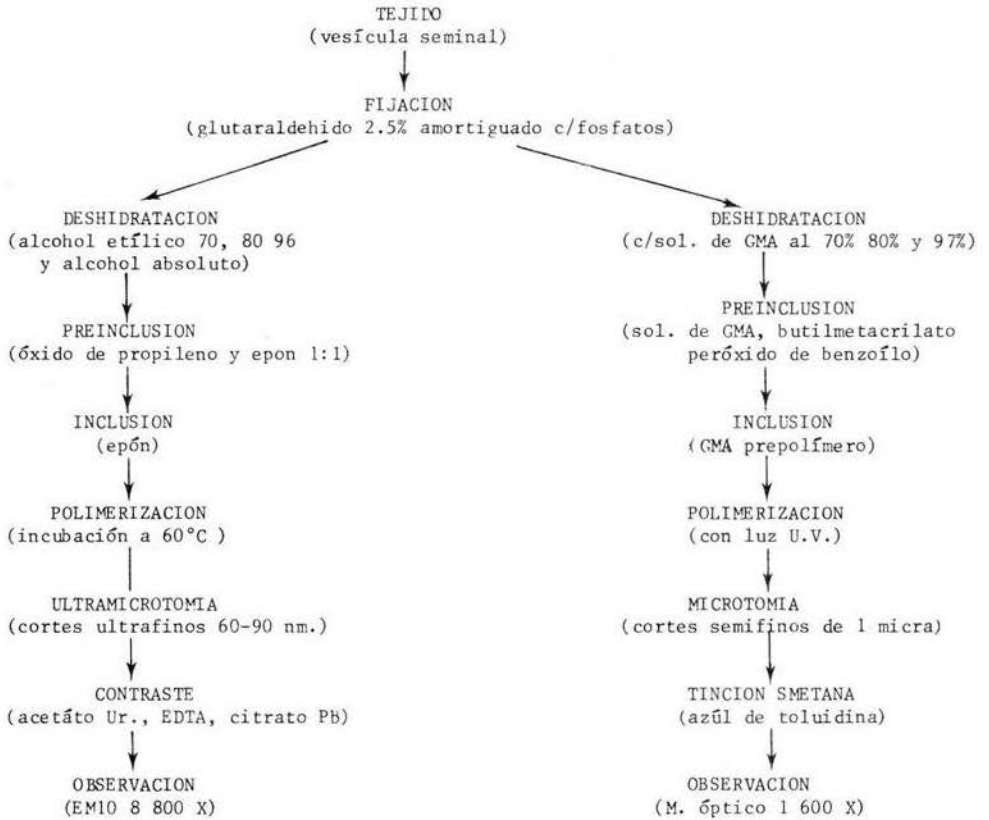
el número de GPC localizados anteriormente, el programa calculó la densidad numérica de estos granos en el corte.

Tomando en cuenta el volumen nuclear obtenido por la medición de los cortes observados en microscopía óptica, se calculó el número total de GPC por núcleo.

Se realizaron estudios de estadística descriptiva en todos los grupos de datos y se calculó la significancia de sus diferencias mediante un análisis de varianza y prueba de Tukey.

Es necesario aclarar que el análisis estadístico se realizó en los 3 casos diferentes (3 ratas) de cada grupo experimental, de tal manera que VOL.N1, VOL.N2 y VOL.N3 se refiere a el análisis cuantitativo del volumen nuclear comparativo de la rata número 1, 2 y 3 de cada grupo, según sea denotado; así mismo VOL.Nu1, VOL.Nu2 y VOL.Nu3 es el análisis del nucléolo por cada lote experimental. El análisis de varianza comparó las similitudes o diferencias entre todos los grupos experimentales de la rata 1, 2 y 3.

DIAGRAMA DE FLUJO DE LA METOLOGIA



VI RESULTADOS

Una clara alteración morfológica se puede observar al microscopio óptico en las células epiteliales de vesícula seminal de rata, bajo condiciones de castración, en comparación con las células de ratas normales. Existe una reducción muy notoria en el volumen tanto del núcleo como del nucleolo. Así también el citoplasma se comprime, por lo cual el tamaño de la célula decrece (ver fig. 1).

En lo que a volumen nuclear se refiere, los valores medios de cada uno de los grupos experimentales aparecen en la tabla # 1. Se observa que el volumen del grupo testigo es aproximadamente 3 veces mayor con respecto al grupo de castrados; los diferentes grupos tratados con testosterona presentan un promedio muy cercano al grupo de castrados sin administración alguna de la hormona. En la gráfica # 1 puede observarse que no existe una recuperación significativa del volumen nuclear con la administración de testosterona después de la castración.

En el nucleolo también existe una drástica reducción del volumen (gráfica # 2). El grupo testigo tiene un valor promedio de poco más de 3 veces el valor promedio del grupo castrado (tabla # 2).

Las gráficas 4 y 5 describen la variación promedio del volumen nuclear y nucleolar respectivamente, desde el momento de la castración. Se observa un pequeño aumento en el volumen nuclear (5 micras cúbicas aprox.) después de 15 minutos, mientras que el

Figura # 1 : Micrograffías ópticas de células epiteliales de vesícula seminal de rata. Cortes semifinos de aproximadamente una micra de grosor. Tinción con azul de tolouidina.

a) y b) vesícula seminal normal a 5,120X y 12,800X respectivamente.

c) y d) vesícula seminal de rata castrada - sin administración de hormona a 5,120X y 12,800X respectivamente.

Las cabezas de flecha señalan núcleos en todos los casos. Existe una disminución en el volumen nuclear en las células de animales castrados

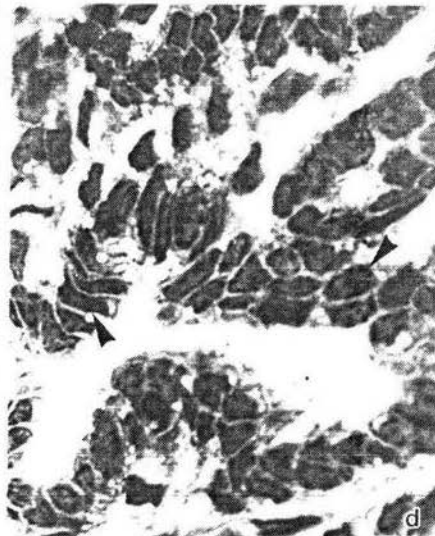
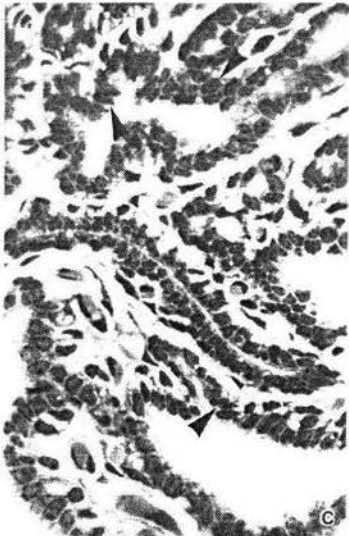
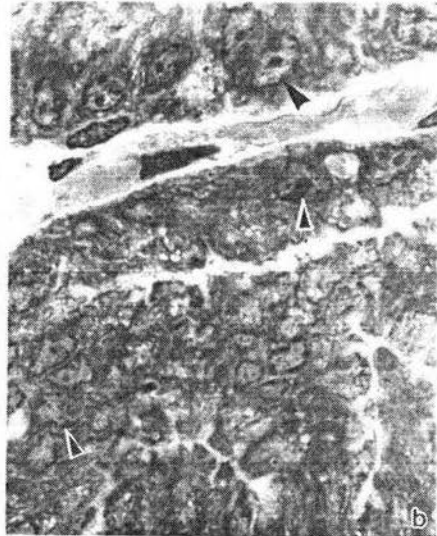


Tabla # 1 y 2

Volumen nuclear y nucleolar respectivamente, se indica media, mediana y desviación estandar, - en micras cubicas, de todos los grupos experimentales; donde N es el grupo normal o testigo, C el grupo castrado, C15, C30, C60 y C120 los grupos - castrados con testosterona a esos tiempos en minutos.

VOL. N1, VOL. N2, VOL. N3, se refiere a las mediciones del volumen nuclear de los 3 casos analizados de cada uno de los grupos experimentales, así mismo VOL. NU1, VOL. NU2, VOL. NU3, es la nomenclatura en las mediciones de volumen del nucleolo.

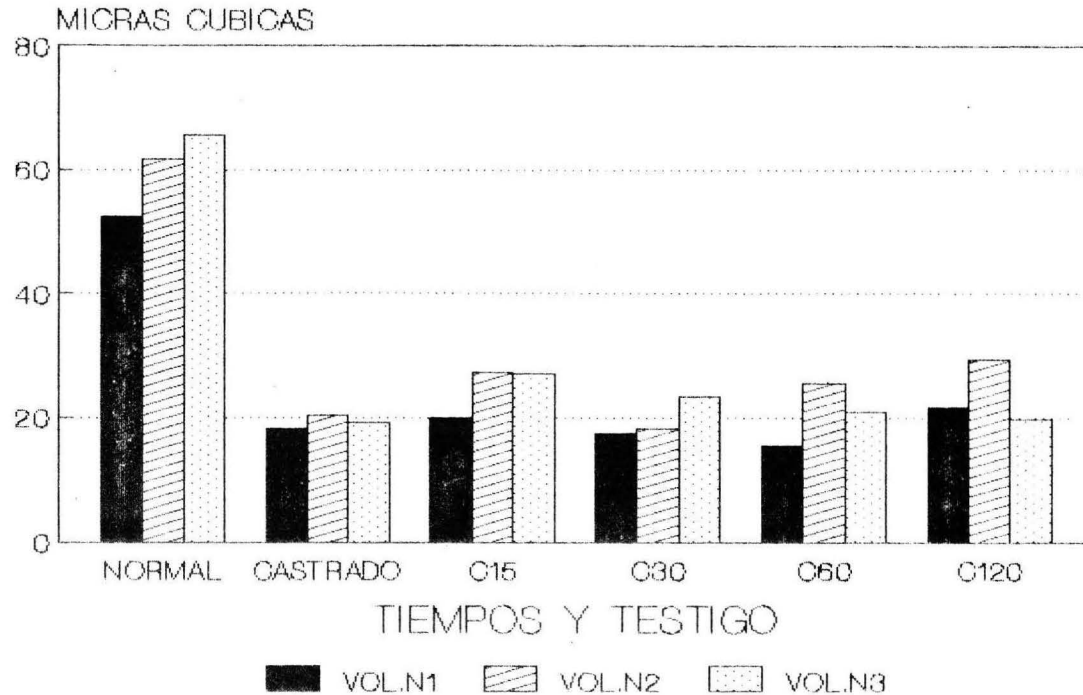
Tabla # 1

VOLUMEN NUCLEAR						
Vol. N1 (n = 30)						
	N	C	C15	C30	C60	C120
Media	52.39	18.33	19.94	17.57	15.63	21.78
Mediana	47.31	14.67	19.6	15.93	14.67	18.17
D. Standar	28.56	11.46	9.0	8.0	7.62	12.51
Vol. N2 (n = 30)						
Media	61.78	20.33	27.39	18.2	25.62	29.41
Mediana	35.47	17.85	22.49	15.84	20.36	28.19
D. Standar	17.57	10.68	13.65	11.56	18.45	13.47
Vol. N3 (n = 30)						
Media	65.68	19.3	27.2	23.44	20.94	19.78
Mediana	61.37	16.84	23.95	19.34	17.78	16.93
D. Standar	35.41	9.34	15.03	14.8	10.48	13.32

Tabla # 2

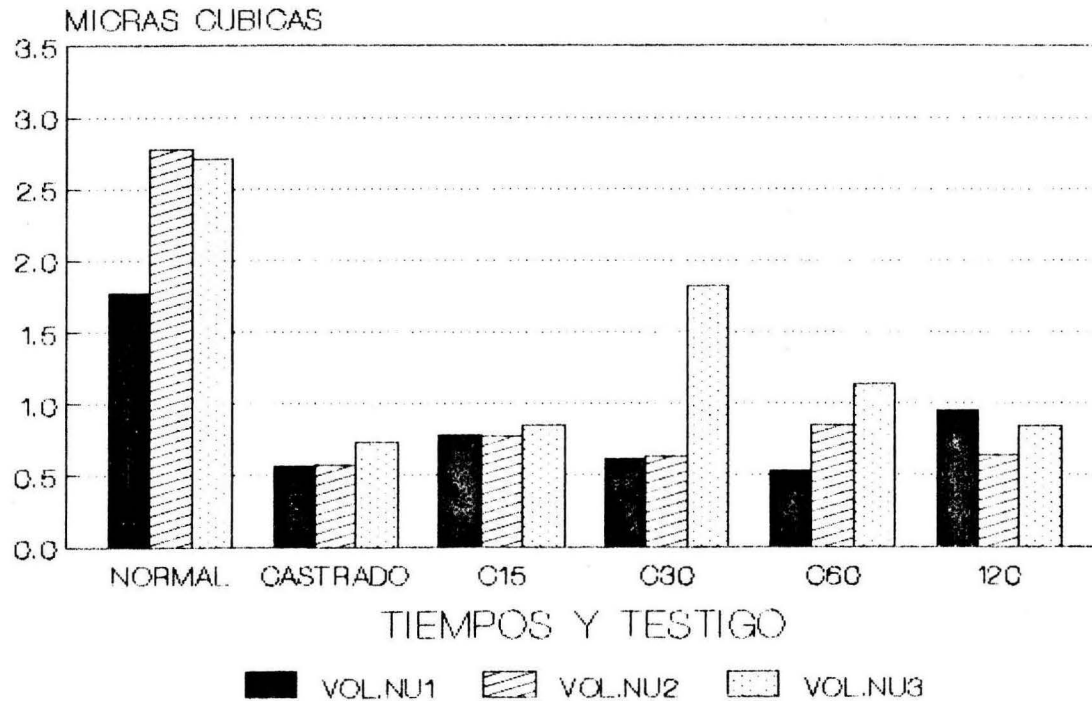
VOLUMEN NUCLEOLAR						
Vol. Nul (n= 30)						
	N	C	C15	C30	C60	C120
Media	1.77	0.56	0.78	0.61	0.51	0.95
Mediana	1.34	0.42	0.38	0.49	0.36	0.6
D. Standar	1.24	0.42	0.89	0.4	0.43	0.48
Vol. Nu2 (n= 30)						
Media	2.78	0.57	0.77	0.63	0.85	0.64
Mediana	2.22	0.56	0.66	0.5	0.68	0.47
D. Standar	2.08	0.28	0.43	0.59	0.58	0.48
Vol. Nu 3 (n = 30)						
Media	2.71	0.73	0.85	1.82	1.14	0.84
Mediana	1.98	0.64	0.62	0.5	0.5	0.61
D. Standar	2.0	0.46	0.8	0.48	0.47	0.67

VOLUMEN NUCLEAR

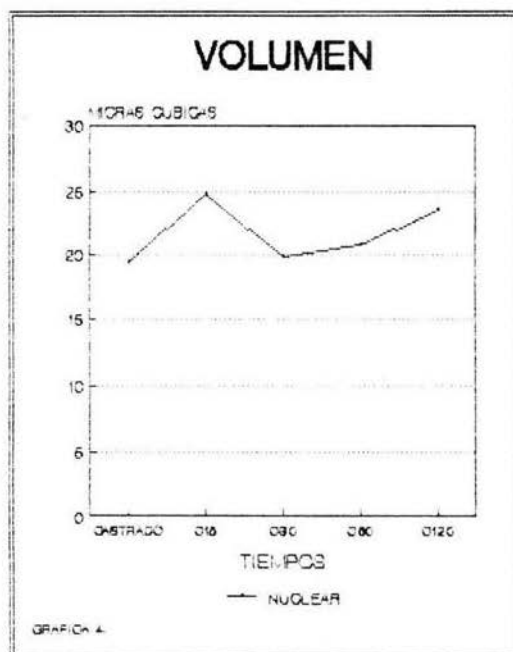


Gráfica 1 : Diagrama de barras que representa el volumen nuclear de los diferentes grupos estudiados, C15, C30, C60 y C120 son los grupos tratados con testosterona y tiempo en minutos. Diferencias significativas solo entre el grupo normal con respecto a los demás.

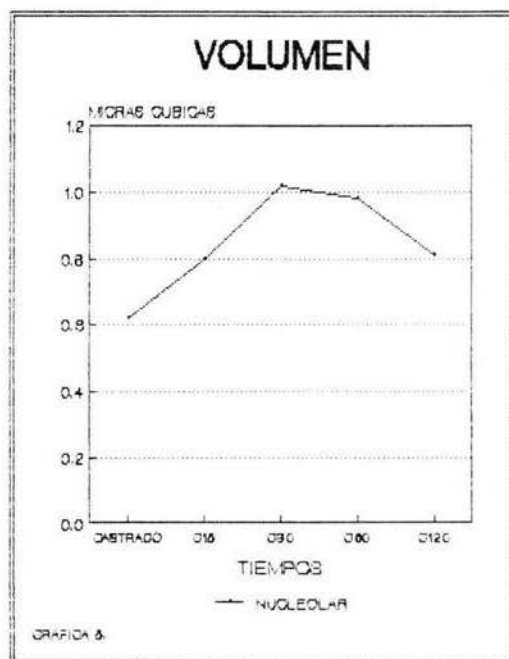
VOLUMEN NUCLEOLAR



Gráfica 2 : Diagrama de barras que representa el volumen nucleolar de los diferentes grupos estudiados, C15, C30, C60 y C120 son los grupos tratados con testosterona y tiempo en minutos. Diferencias significativas solo entre el grupo normal con respecto a los demás grupos experimentales.



Gráfica 4: Representa la variación en el volumen nuclear, a partir de la castración; C15, C30, C60 y C120 son los grupos tratados con testosterona.



Gráfica 5: Representa la variación en el volumen nucleolar a partir de la castración; C15, C30, C60 y C120 son los grupos tratados con testosterona.

Se observa cierto incremento en el grupo C30.

nucléolo se incrementa levemente a los 30. Estos aumentos son ligeros y no se mantienen a lo largo de 2 horas de tratamiento.

El análisis de varianza para estos parámetros, describe a el grupo castrado y los grupos tratados con testosterona como muy similares; las diferencias significativas solo existen con respecto a el grupo control.

Al realizar el contraste preferencial para RNP, propuesto por Bernhard (1969), se observan los núcleos contrastados; la cromatina periférica aparece grisada, la región del nucléolo más oscura; se observan también RNP. Los gránulos pericromatinianos (GPC) aparecen claramente en la región periférica del nucléolo y la cromatina compacta, los rodea un halo claro, que en algunos aparece bien definido. Pueden distinguirse también algunos grupos de gránulos intercromatinianos en cúmulos. Alrededor del núcleo se observa retículo endoplásmico asociado a ribosomas (fig. 2).

Este fue en general el perfil de los núcleos control o testigo que se observaron al microscopio electrónico.

El valor medio de la densidad numérica de GPC en los grupos control fue de casi el doble con respecto al determinado en los núcleos del grupo castrado (tabla # 3).

Los grupos tratados con testosterona no presentan un aumento significativo en la densidad de GPC con respecto al castrado, alcanzando el valor más alto a los 30 min después de la administración hormonal. Este dato es discutido posteriormente.

La diferencia entre el grupo de ratas normales con respecto a los castrados resultó ser significativa. También existe cierta diferencia entre el grupo testigo y todos los grupos tratados con la testosterona.

En la gráfica 3 se representa la densidad numérica de GPC por unidad de área, encontrándose diferencias significativas entre el grupo control y castrado; control y C60 y entre los grupos de castrado y C30 (apéndice 2).

Es necesario aclarar que las gráficas denotan variabilidad dentro de los grupos para los 3 casos analizados en cada uno de los experimentos, por lo que las desviaciones estándar son relativamente grandes. Por ejemplo, en el grupo control los valores promedio para el volumen nuclear tienen un rango de 1.8 a 2.8 micras cúbicas.

Figura # 2: Micrografía electrónica de un núcleo interfásico de célula epitelial de vesícula seminal de rata normal, contrastado según la técnica de Bernhard al EDTA (24 310X).

Se observan los gránulos pericromatinianos (GPC) rodeados por un halo claro (flechas), alrededor de cúmulos blanqueados de cromatina compacta (CC) perinucleolar y en relación con el nucléolo (Nu). Los gránulos intercromatinianos (GIC) aparecen en cúmulos. Envoltura nuclear (EN): retículo endoplásmico rugoso -- (RER): las cabezas de flecha señalan poros con material electrodenso atravesándolos.

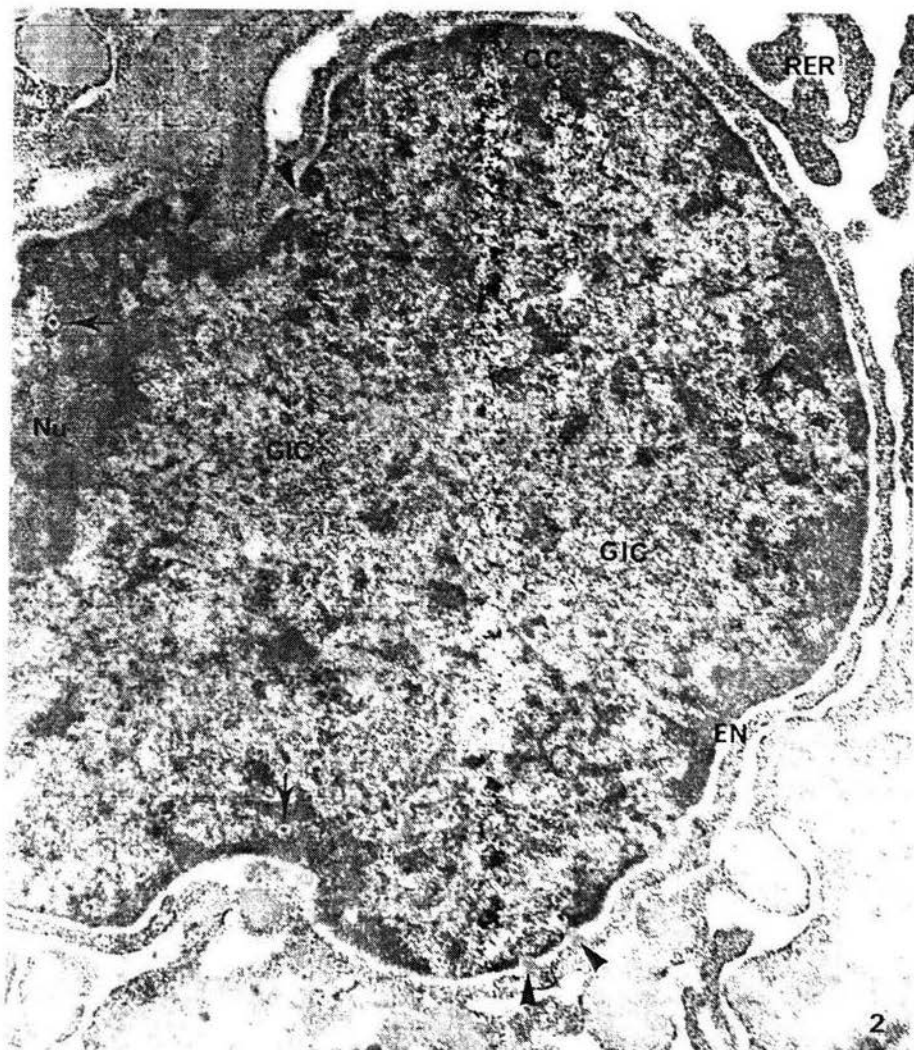
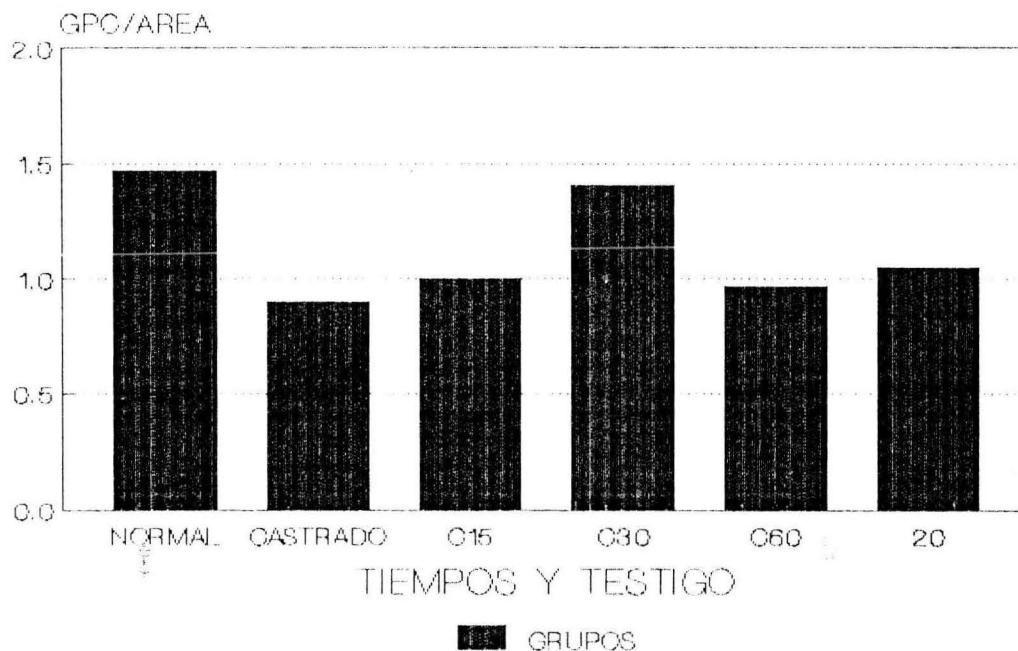


Tabla # 3

DENSIDAD NUMERICA DE GPC

n = 30	Grupos					
	N	C	C15	C30	C60	C120
Media	1.47	0.9	1.0	1.41	0.97	1.05
Mediana	1.01	0.43	0.63	0.76	0.47	0.43
D.Standar	1.24	0.75	0.83	1.27	0.93	1.0

DENSIDAD NUMERICA DE GPC



Gráfica 3 : Histograma que representa la densidad numérica de GPC por unidad de área. C15, C30, C60 y C120 son los grupos tratados con testosterona a esos tiempos en minutos. Diferencias no significativas solo entre el grupo control y C30.

VII DISCUSION

Se ha establecido que la falta de andrógenos debido a la castración provoca una serie de alteraciones, en las cuales se incluyen una disminución en el volumen nuclear y nucleolar, la inhibición de síntesis de las proteínas, del DNA y RNA (32, 33, 36).

A nivel celular, después de la castración se observa un decremento en el volumen del núcleo, con la aplicación continua de testosterona, después de 72 hs, hay una recuperación total así como estimulación en la síntesis de proteínas (36).

Una manifestación ultraestructural de la inhibición, por ausencia de andrógenos, en la síntesis de RNA mensajero y RNA ribosomal, se reflejaría en el núcleo y nucléolo respectivamente. En este estudio se analizaron las variaciones producidas por la inyección de testosterona (1 dosis de 1 mg / 100 g de peso corporal), durante las primeras 2 horas. Nuestros resultados muestran que hay una disminución en el volumen del núcleo y nucléolo, debido a la castración y que la estimulación con testosterona no restaura el volumen normal registrado en las células de ratas testigo. En lo que se refiere al nucléolo la disminución en volumen resulta ser más severa en relación con el núcleo. Como ejemplo Gulbenkian (32) demuestra una recuperación en volumen nucleolar, después de las 12 hs de inyección continua de

testosterona. Nosotros no observamos tal recuperación en el volumen nucleolar, puesto que el modelo de estudio fuè diferente.

El enfoque directo de este estudio relaciona los efectos de la castración y la administración de testosterona con la densidad numérica de los granos pericromatinianos, presentes en el núcleo en los diferentes grupos analizados.

Como ya se sabe la transcripción ocurre dentro del núcleo, en dos áreas topológicamente distintas, en el nucléolo (rRNA) y en el espacio extranucleolar (mRNA, tRNA, etc.), cambios bioquímicos dentro del núcleo, se van a reflejar, en la síntesis y/o transporte del RNA. Apoyando la teoría de que los granos pericromatinianos son estructuras de almacén y/o transporte de el RNA mensajero hacia el citoplasma (4, 5, 13, 14, 15, 16, 22, 34, 43, 45, 47, 48, 50, 51, 52); un decremento en el número de GPC después de la castración puede ser indicio de una tasa de síntesis muy baja, por lo cual no existe almacén de gránulos sintetizados, o bien, que hay un transporte aumentado con respecto a la síntesis, o ambos mecanismos en una tasa muy baja.

Al igual que en este modelo, se ha estudiado la acción de la testosterona en las células del epitelio de la próstata ventral de rata (52). Se ha comprobado que la castración induce una disminución significativa en el volumen nucleolar con un incremento en la densidad numérica de GPC. Al inyectar testosterona este número decrece durante los primeros 60 min de el estímulo y después se mantiene. Si hacemos una analogía con este estudio, podremos decir que en vesícula seminal la

biosíntesis de las RNP es definitivamente diferente, puesto que hay una reducción significativa en tamaño nucleolar, pero el número de GPC decrece con la castración. Por lo que se deduce que no existe un control del número de GPC por restricción del transporte de mRNA hacia el citoplasma, y el equilibrio entre transcripción y transporte no cambia al inyectar testosterona.

Por todo esto el número de GPC en los núcleos de células epiteliales de la vesícula seminal varía proporcionalmente a la velocidad de la transcripción, como el volumen nuclear y nucleolar.

Es interesante señalar que 30 min después de la administración de testosterona, la densidad numérica de GPC aumenta significativamente con respecto del grupo castrado. Este incremento puede deberse a un desbalance transitorio entre la transcripción y el transporte de mRNA que no persiste en los especímenes tratados por una y dos horas.

Los estudios de los efectos de estradiol en células epiteliales de endometrio de ratas ovariectomizadas, muestran que después de la operación, existe un aumento en el número de GPC, asumiéndose que el mecanismo del transporte de RNA hacia el citoplasma, se hizo más lento que la transcripción. Entre 15 y 30 min, después de inyectar estradiol, los GPC decrecen hasta una cuarta parte del valor registrado en los grupos castrados. Una hora después del estímulo con estradiol hay un notable incremento alcanzando su nivel normal entre una y doce horas. El estradiol

estimula independientemente la síntesis de RNA y su transporte hacia el citoplasma (50).

En células aisladas y cultivadas después de la ovariectomía, se describe un aumento en el número de GPC y una reducción en el volumen del nucléolo en relación a cultivos celulares de epitelio de endometrio de rata normal. El número de GPC disminuye entre 15 y 30 min después de agregar estradiol al medio de cultivo y vuelve a aumentar posteriormente. La autorradiografía ultraestructural cuantitativa, muestra que el estradiol aumenta el transporte de RNA al citoplasma más rápidamente que lo que incrementa la transcripción, lo que confirma la existencia de un control postranscripcional de la expresión genética producido por la hormona a nivel del transporte (43).

La progesterona en el endometrio de ratas, también induce un pequeño pero significativo aumento en el volumen del núcleo a los 30 min después de la inyección, incrementa la síntesis de RNP extranucleolares, mientras que la densidad numérica de GPC no cambia. Existe un equilibrio entre la transcripción y el transporte (45).

En vesícula seminal se sugiere que no existe un efecto postranscripcional de la testosterona sobre la salida de mensajeros hacia el citoplasma, puesto que no se evidencia aumento en el número de GPC en animales castrados, sino que por el contrario, su frecuencia disminuye bastante. La falta de respuesta a la administración de la hormona, de todos los parámetros

estudiados, podría deberse a una mayor sensibilidad de la vesícula seminal a dicha hormona o a una respuesta muy lenta.

En este estudio la técnica de autorradiografía ultraestructural nos habría ayudado a evaluar la transcripción y el transporte de mRNA, en células de animales normales y castrados y de esta manera se podría comprobar prácticamente, los efectos de la testosterona en la regulación de los transcritos de RNA.

VIII CONCLUSIONES

- La castración induce severos cambios; disminución en el volumen nuclear y nucleolar, observándose una alteración aún mayor en el nucléolo de las células epiteliales de la vesícula seminal.

-Existe una disminución en la densidad numérica de los GPC, debida a la castración.

- La inducción con testosterona en los tiempos determinados en este estudio, no restaura el volumen perdido del núcleo y del nucléolo después de la castración, por lo que se supone que existe una inhibición en la síntesis de RNA.

- La testosterona no produce aumentos progresivos del número de GPC en los tiempos y concentraciones estudiados.

- Se sugiere que en este tejido no existe un control postranscripcional de la expresión genética regulado por la hormona, a nivel del transporte de mensajeros hacia el citoplasma.

APENDICE 1

La Microscopía Electrónica como Técnica de Estudio.

Para estudios de Biología Molecular, así como para otras áreas resulta de gran ayuda el uso de la microscopía electrónica. Aunque ésta surgiera inicialmente para la experimentación física, el avance de técnicas histoquímicas de fijación e inclusión de las muestras, así como de contraste y tinción, han permitido su aplicación a materiales biológicos. En la actualidad este instrumento es indispensable en estudios morfológicos a nivel de organización celular; obteniéndose una descripción morfológica detallada, se pueden analizar y correlacionar eventos fisiológicos muy estrechamente relacionados a la ultraestructura celular.

El microscópio electrónico de transmisión es un instrumento muy parecido a el microscópio óptico en cuanto a su diseño, solo que éste utiliza un haz de electrones acelerados para irradiar una muestra por una de sus caras y producir una imagen detallada de ésta, formada por los electrones que emergen de la cara contraria (1).

El microscópio electrónico consiste de una cámara de vacío que es la columna electrón óptica por donde cursan los electrones que son acelerados por una diferencia de potencial entre cátodo y ánodo. El voltaje puede seleccionarse desde 40 000 hasta 100 000 volts, algunos instrumentos están equipados con un solo voltaje de aceleración que puede ser hasta de 1 000 000 de volts, cuanto

mayor es el voltaje de aceleración, mayor será la velocidad de los electrones (2).

La columna del microscópio es uno de los componentes principales por encontrarse en ella el cañón electrónico, lentes condensadoras, la cámara del espécimen, el microscópio propiamente dicho y la pantalla fluorescente. El sistema de iluminación está formado por el cañón electrónico y las lentes condensadoras y sirve para producir una emisión de electrones que pasará posteriormente por cada uno de los sistemas. El cañón electrónico está localizado en la parte superior de la columna y es el encargado de producir el haz electrónico con cierta velocidad y dirección, se encuentra formado por un filamento (cátodo o emisor), ánodo y cilindro de Wehnelt. El filamento es un alambre de tungsteno en forma de "V" que tiene un diámetro de 0.1 a 0.2 mm. El flujo de electrones es producido por emisión termiónica, el filamento es calentado a una alta temperatura para acelerar un número suficiente de electrones de la punta superficial del metal, los electrones que de esta forma son liberados hacia el espacio forman una nube alrededor del filamento, los electrones salen de éste y vuelven a caer en él en cuanto pierden la energía adquirida por efecto joule (1,2). Este efecto se contraresta cuando se emplea un campo eléctrico entre el filamento y el ánodo.

Entre el ánodo y el cilindro de Wehnelt se establece un campo electrostático que sirve como lente; recoge la gran mayoría de electrones desprendidos por el filamento los canaliza y dirige.

Los condensadores suelen estar formados por una o dos lentes magnéticas dispuestas una a continuación de otra, su función es la de concentrar el rayo electrónico de tal manera que permita iluminar la preparación en forma adecuada.

La cámara del objeto está construida de materiales no magnéticos a fin de evitar las distorsiones del campo magnético, se localiza justo debajo de la lente condensadora, está provista de esclusas que permiten introducir y sacar los especímenes sin alterar mayormente el vacío de la columna. Una platina a la que queda unido el objeto dentro de esta cámara, puede ser movida mecánicamente por el operador, permitiéndole observar diversas zonas de un espécimen hasta de tres milímetros de diámetro.

En esto consiste básicamente un microscopio electrónico de transmisión.

En cuanto a las descripciones de la ultraestructura celular realizadas por el microscopio electrónico, se encuentran entre las primeras, las de K. Porter y col. describiendo al retículo endoplásmico en el año de 1945. A partir de 1952 se publicaron numerosos trabajos entre ellos las detalladas descripciones, de la estructura interna de las mitocondrias. Los ribosomas llevado al cabo por G.E. Palade; la ultraestructura del Aparato de Golgi por Felix y Dalton, seguida de estudios correlacionados

bioquímica y estructuralmente en el retículo endoplasmico rugoso de células pancreáticas, en colaboración con Siekevitz; la síntesis de proteínas destinadas a la secreción; la estructura del centriolo y microtúbulos; la envoltura nuclear, por lo que se describieron las relaciones entre el núcleo y el citoplasma; la organización de los cromosomas durante la profase meiótica gracias a J. R. Sotelo; la estructura interna de los cloroplastos; la estructura multilamelar de la mielina por H. Fernández Morán; estructura y funcionamiento de la sinapsis por E.D.P. De Robertis; la disposición de la actina y miosina en el músculo, las bases macromoleculares de la contracción y la estructura fina de las fibras de colágena; la ultraestructura de los hongos, protozoarios y bacterias. Desde que este instrumento se aplica a estudios biológicos, se emplea en enfermedades humanas, en especial del cáncer (1).

En los años 60', cuando las técnicas ya estaban establecidas y difundidas, los instrumentos comerciales y los grupos de investigadores se habían multiplicado, los trabajos fundamentalmente descriptivos disminuyen y aparecen la citoquímica, la autorradiografía, la morfometría y la estereología, como auxiliares de la microscopía electrónica (1).

Ahora su aplicación es multidisciplinaria, la investigación a llevado a hallazgos importantes gracias a este instrumento que junto con la Bioquímica, Biología Molecular y Fisicoquímica son la base para los más importantes adelantos científicos.

Apendice 2

Procedimiento general para la prueba de Tukey.

El procedimiento general fué el siguiente:

- 1.- Obtener todas las posibles diferencias en valor absoluto entre las medias (\bar{X}) de los diferentes grupos experimentales.

Donde: \bar{X}_1 = media de grupo control o testigo.

\bar{X}_2 =	"	"	castrado			
\bar{X}_3 =	"	"	"	con testosterona a los 15 min.		
\bar{X}_4 =	"	"	"		"	30 "
\bar{X}_5 =	"	"	"		"	60 "
\bar{X}_6 =	"	"	"		"	120 "

- 2.- Calcular la diferencia mínima significativa real (DMSR), de acuerdo a la siguiente fórmula :

$$DMSR = Q_{\alpha, n-a} \sqrt{\frac{\text{varianza error}}{2} \left(\frac{1}{n_i} + \frac{1}{n_j} \right)} ;$$

donde: $Q_{\alpha, n-a}$ es un valor obtenido de la tabla de los valores críticos de Tukey; la varianza del error es la obtenida en el ANOVA, n_i y n_j es el número de observaciones en cada uno de los grupos experimentales.

- 3.- Se compararon las diferencias en valor absoluto, con respecto a DMSR, de acuerdo a la siguiente regla de decisión: sí la diferencia absoluta $|\bar{X}_i - \bar{X}_j|$ resulta ser mayor que la DMSR obtenida, entonces la diferencia de las medias (\bar{X}) se considera significativa.

Prueba de Tukey para volumen nuclear:

Vol. N1

$\bar{X}_1 - \bar{X}_2 = 34.06 *$	$\bar{X}_2 - \bar{X}_3 = 1.61$	$\bar{X}_3 - \bar{X}_5 = 4.31$
$\bar{X}_1 - \bar{X}_3 = 32.45 *$	$\bar{X}_2 - \bar{X}_4 = 0.76$	$\bar{X}_3 - \bar{X}_6 = 1.84$
$\bar{X}_1 - \bar{X}_4 = 34.82 *$	$\bar{X}_2 - \bar{X}_5 = 2.7$	$\bar{X}_4 - \bar{X}_5 = 1.94$
$\bar{X}_1 - \bar{X}_5 = 36.76 *$	$\bar{X}_2 - \bar{X}_6 = 3.45$	$\bar{X}_4 - \bar{X}_6 = 4.21$
$\bar{X}_1 - \bar{X}_6 = 30.61 *$	$\bar{X}_3 - \bar{X}_4 = 2.37$	$\bar{X}_5 - \bar{X}_6 = 6.15$

Diferencia entre las medias de este grupo en valor absoluto.

La DMSR sería calculada así.

$$DMSR = 4.03 \sqrt{\frac{213.6318}{2} \left(\frac{1}{30} + \frac{1}{30} \right)}$$

$$\underline{DMSR = 10.75}$$

Los (*) indican los casos en los que si se encuentran diferencias significativas, todas los demas tiene diferencias no significativas

Diferencias entre las medias Vol. N2

$\bar{X}_1 - \bar{X}_2 = 41.45 *$	$\bar{X}_2 - \bar{X}_3 = 7.06$	$\bar{X}_3 - \bar{X}_5 = 1.77$
$\bar{X}_1 - \bar{X}_3 = 34.39 *$	$\bar{X}_2 - \bar{X}_4 = 2.13$	$\bar{X}_3 - \bar{X}_6 = 2.02$
$\bar{X}_1 - \bar{X}_4 = 43.58 *$	$\bar{X}_2 - \bar{X}_5 = 5.24$	$\bar{X}_4 - \bar{X}_5 = 7.42$
$\bar{X}_1 - \bar{X}_5 = 36.16 *$	$\bar{X}_2 - \bar{X}_6 = 9.08$	$\bar{X}_4 - \bar{X}_6 = 15.79$
$\bar{X}_1 - \bar{X}_6 = 32.37 *$	$\bar{X}_3 - \bar{X}_4 = 9.19$	$\bar{X}_5 - \bar{X}_6 = 3.79$

La DMSR se calcula así :

$$DMSR = 4.03 \sqrt{\frac{919.1401}{2} \left(\frac{1}{30} + \frac{1}{30} \right)}$$

$$\underline{DMSR = 22.30}$$

Diferencias entre las medias Vol. N3

$\bar{X}_1 - \bar{X}_2 = 46.38 *$	$\bar{X}_2 - \bar{X}_3 = 7.9$	$\bar{X}_3 - \bar{X}_5 = 6.26$
$\bar{X}_1 - \bar{X}_3 = 38.48 *$	$\bar{X}_2 - \bar{X}_4 = 4.14$	$\bar{X}_3 - \bar{X}_6 = 7.42$
$\bar{X}_1 - \bar{X}_4 = 42.24 *$	$\bar{X}_2 - \bar{X}_5 = 1.64$	$\bar{X}_4 - \bar{X}_5 = 2.5$
$\bar{X}_1 - \bar{X}_5 = 44.74 *$	$\bar{X}_2 - \bar{X}_6 = 0.48$	$\bar{X}_4 - \bar{X}_6 = 3.66$
$\bar{X}_1 - \bar{X}_6 = 45.9 *$	$\bar{X}_3 - \bar{X}_4 = 3.76$	$\bar{X}_5 - \bar{X}_6 = 1.16$

$$DMSR = 4.03 \sqrt{\frac{34.50463}{2} \left(\frac{1}{30} + \frac{1}{30} \right)}$$

$$\underline{DMSR = 13.66}$$

Diferencias entre las medias del grupo Vol.Nu1

$\bar{X}_1 - \bar{X}_2 = 1.21 *$	$\bar{X}_2 - \bar{X}_3 = 0.43$	$\bar{X}_3 - \bar{X}_5 = 0.27$
$\bar{X}_1 - \bar{X}_3 = 0.99 *$	$\bar{X}_2 - \bar{X}_4 = 0.05$	$\bar{X}_3 - \bar{X}_6 = 0.17$
$\bar{X}_1 - \bar{X}_4 = 1.16 *$	$\bar{X}_2 - \bar{X}_5 = 0.05$	$\bar{X}_4 - \bar{X}_5 = 0.1$
$\bar{X}_1 - \bar{X}_5 = 1.26 *$	$\bar{X}_2 - \bar{X}_6 = 0.39$	$\bar{X}_4 - \bar{X}_6 = 0.34$
$\bar{X}_1 - \bar{X}_6 = 0.82 *$	$\bar{X}_3 - \bar{X}_4 = 0.17$	$\bar{X}_5 - \bar{X}_6 = 0.44$

$$DMSR = 4.03 \sqrt{\frac{0.848212}{2} \left(\frac{1}{30} + \frac{1}{30} \right)}$$

$$\underline{DMSR = 0.6776}$$

Diferencias entre las medias del grupo Vol.Nu2

$\bar{X}_1 - \bar{X}_2 = 2.21 *$	$\bar{X}_2 - \bar{X}_3 = 0.2$	$\bar{X}_3 - \bar{X}_5 = 0.08$
$\bar{X}_1 - \bar{X}_3 = 2.01 *$	$\bar{X}_2 - \bar{X}_4 = 0.06$	$\bar{X}_3 - \bar{X}_6 = 0.13$
$\bar{X}_1 - \bar{X}_4 = 2.15 *$	$\bar{X}_2 - \bar{X}_5 = 0.28$	$\bar{X}_4 - \bar{X}_5 = 0.22$
$\bar{X}_1 - \bar{X}_5 = 1.93 *$	$\bar{X}_2 - \bar{X}_6 = 0.07$	$\bar{X}_4 - \bar{X}_6 = 0.01$
$\bar{X}_1 - \bar{X}_6 = 2.14 *$	$\bar{X}_3 - \bar{X}_4 = 0.14$	$\bar{X}_5 - \bar{X}_6 = 0.21$

$$DMSR = 4.03 \sqrt{\frac{0.92779}{2} \left(\frac{1}{30} + \frac{1}{30} \right)}$$

$$\underline{DMSR = 0.7087}$$

(*) indican diferencias significativas con respecto a los demas grupos, su ausencia quiere decir igualdad.

Diferencias entre las medias del grupo Vol.Nu3

$\bar{X}_1 - \bar{X}_2 = 1.98$	$\bar{X}_2 - \bar{X}_3 = 0.12$	$\bar{X}_3 - \bar{X}_5 = 0.29$
$\bar{X}_1 - \bar{X}_3 = 1.86$	$\bar{X}_2 - \bar{X}_4 = 1.09$	$\bar{X}_3 - \bar{X}_6 = 0.01$
$\bar{X}_1 - \bar{X}_4 = 0.86$	$\bar{X}_2 - \bar{X}_5 = 0.41$	$\bar{X}_4 - \bar{X}_5 = 0.68$
$\bar{X}_1 - \bar{X}_5 = 1.57$	$\bar{X}_2 - \bar{X}_6 = 0.11$	$\bar{X}_4 - \bar{X}_6 = 0.93$
$\bar{X}_1 - \bar{X}_6 = 1.87$	$\bar{X}_3 - \bar{X}_4 = 0.97$	$\bar{X}_5 - \bar{X}_6 = 0.3$

$$DMSR = 4.03 \sqrt{\frac{9.44648}{2} \left(\frac{1}{30} + \frac{1}{30} \right)}$$

$$\underline{DMSR = 2.26}$$

En este grupo las medias de todos los casos se consideran iguales.

Diferencias entre las medias de los grupos de Densidad Numérica de GPC.

$\bar{X}_1 - \bar{X}_2 = 0.57 *$	$\bar{X}_2 - \bar{X}_3 = 0.1$	$\bar{X}_3 - \bar{X}_5 = 0.03$
$\bar{X}_1 - \bar{X}_3 = 0.43$	$\bar{X}_2 - \bar{X}_4 = 0.51 *$	$\bar{X}_3 - \bar{X}_6 = 0.04$
$\bar{X}_1 - \bar{X}_4 = 0.06$	$\bar{X}_2 - \bar{X}_5 = 0.07$	$\bar{X}_4 - \bar{X}_5 = 0.44$
$\bar{X}_1 - \bar{X}_5 = 0.5 *$	$\bar{X}_2 - \bar{X}_6 = 0.14$	$\bar{X}_4 - \bar{X}_6 = 0.37$
$\bar{X}_1 - \bar{X}_6 = 0.43$	$\bar{X}_3 - \bar{X}_4 = 0.41$	$\bar{X}_5 - \bar{X}_6 = 0.07$

$$\text{DMSR} = 4.03 \sqrt{\frac{0.4261032}{2} \left(\frac{1}{30} + \frac{1}{30} \right)}$$

$$\text{DMSR} = 0.4802$$

En este grupo solo algunas medias resultaron ser significativamente diferentes (*).

TABLA DE ANOVA.

para Vol. N1

Fuente de Varianza	Suma de Cuadrados	g° de l.	Varianza	Fo.	
Tratamiento	29109.94	5	5821.988	27.25246	(p 10 ⁻⁶)
Error	37171.91	174	213.6318		
total	66281.85	179	-		
para Vol. N2					
Tratamiento	38027.63	5	7605.526	8274.606	(p 10 ⁻⁶)
Error	159930.4	174	919.1401		
total	197958.1	179	-		
para Vol. N3					
Tratamiento	48691.75	5	9738.35	28.22335	(p 10 ⁻⁶)
Error	60037.99	174	345.0463		
total	108729.7	179	-		

para Vol. Nul

Fuente de Varianza	Suma de Cuadrados	g° de l.	Varianza	Fo.	
Tratamiento	33.25353	5	6.650706	78.40851	(p 10 ⁻⁶)
Error	147.5889	174	0.848212		
total	180.8424	179	-		
para Vol. Nu2					
Tratamiento	110.627	5	22.1254	23.84715	(p 10 ⁻⁶)
Error	161.4373	174	0.92779		
total	272.0642	179	-		
para Vol. N3					
Tratamiento	90.32052	5	18.064104	1.912258	(p 10 ⁻⁶)
Error	1643.688	174	9.44648		
total	1734.008	179	-		

Tabla de Anova para Densidad Numérica
de G P C por unidad de área.

Fuente de Varianza	Suma de Cuadrados	g° de l.	Varianza	Fo.	
Tratamiento	8.88649	5	1.777298	4.171054	(p 1.324 ⁻⁰³)
Error	74.14191	174	0.426103		
total	83.0284	179	-		

IX BIBLIOGRAFIA

- 1.- Vázquez - Nín G. H. y Olga M. Echeverría (1984). "El microscopio electrónico". Naturaleza, vol. 15 (2): 102.
- 2.- Sjostrand S. (1967). "Electron microscopy of cells and tissues". Academic Press New York, London.: 63-91.
- 3.- Ryutaro Murakami (1987). "Autoradiographic studies of the localization of androgen-binding cells in the genital tubercles of fetal rats". J. Anat. 51; 209-219.
- 4.- Puvion E., J. P. Bachelierie and M. I. Burglen (1979). "Nucleolar pericromatin granules induced by dichlorobenzimidazole riboside". J. of Ultrastuc. Res. 69 ; 1-12.
- 5.- Monneron A. and Bernhard W. (1969). "Fine structural organization of the interfase nucleus in some mammalian cells". J. Ultrastuc. Res. 27; 266-288.
- 6.- Swift, H. (1962). " Interpretation of ultrastructure". Symp., Int. Soc. Cell. Biol. 1 ; 213-232.

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

8.- Halkk A. L. and Halkk O. (1975). " Accumulation of gene products in the oocytes of the dragonfly *Cordulia aenea* L.". J. Cell Sci., 19; 103-115.

9.- Feluga B and Martinucci G.B. (1975). "Nuclear organization in male gonial cell of *Eisenia foetida*". Submicro. Cytol., 7; 185-196.

10.- Lai V. and Srivastav A. L. (1976). "Nuclear changes during differentiation of xylem vessel elements". Cytobiologie, 12; 220-243.

11.- Moyne G., Bertaux O. and E. Puvion (1975). "The nucleus of *Euglena*. An ultracytochemical study of the nucleic acids and nucleoproteins of synchronized *Euglena gracilis* Z.". J. Ultrastruc. Res., 52 ; 362-376.

12.- Bernhard W. (1969). "A new staining procedure for electron microscopical citology". J. Ultrastruc. Res., 27 ; 250-265.

13.- Daskal Y, Laszlo Komaromy and Harris Busch (1980). "Isolation and partial characterization of perichromatin granules". *Experimental Cell. Res.*, 126; 39-46.

14.- Moyne G., R. E. Nash and E. Puvion (1977). "Perichromatin granules and other nuclear components in isolated rat hepatocytes treated with cortisol and cycloheximide". *Biol. Cell.*, 30; 5-16.

15.- Fakan S., Puvion E. (1980). "The ultrastructural visualization of nucleolar and extranucleolar RNA synthesis and distribution". *Int. Rev. Cytol.*, 65; 255-299.

16.- Fakan S., Leser G. and Martin T. (1986). "Immunoelectron microscope visualization of nuclear ribonucleoprotein antigens within spread transcription complexes". *J. Cell. Biol.*, 103; 1153-1157.

17.- Berkaloff, Bourguet, Favard y Lacroix (1986). "Biología y fisiología celular". Ed. Omega, Barcelona; 249-251, 163-177.

18.- Yoshinori K., French S. W. et al. (1987). "Connections of Intermediate filaments with the nuclear lamina and the cell periphery". *Biol. Cell.*, 59 (3); 193- 204.

19.- Roy Walker P. and M. Sikorska (1987). "Chromatin structure". *J. of Biol. Chemistry* 262 (25); 12223- 12227.

- 20.- Osborn M. and K. Weber (1986). "Intermediate filaments proteins a multigene family distinguishing major cell lineages". *Trens. Biochem. Tips.* vol II; 469-472.
- 21.- Bush H. (1983). "The cell nucleus. Nuclear particles". *Ac. Press, New York.* Vol. I.
- 22.- Fakan S., E. Puvion and G. Spohr (1976). "Localization and characterization of newly synthesized nuclear RNA in isolated rat hepatocytes". *Exp. Cell. Res.*, 99; 155-164.
- 23.- De Robertis, E. D. P., W. Nowinski y F. A. Sàez (1975). "Biología Celular". oct. ed., *El Ateneo.* Buenos Aires.
- 24.- Capco, D. G., K. M. Wan and S. Penman (1982), "The nuclear matrix: three dimensional architecture and protein composition". *Cell.*, 29; 847-851.
- 25.- Berezney R. and D. S. Coffey (1977). "Nuclear matrix. Isolation and characterization of a franeework structure from rat liver nuclei". *J. Cell. Biol.*, 73; 616-637.
- 26.- Jiménez García L. F. (1988). "El nucléolo. Relaciones entre la distribución espacial de ac. nucleicos y proteínas". Tesis doctoral., *Biología, Facultad de Ciencias UNAM.* Mexico D.F.

27.- Busch H. and Smetana K. (1970). "The Nucleolus". Academic Press. New York.

28.- Homberger H. and Kuller (1988). "The integrity of the histone DNA complex y chromatin fibres is not necessary for the maintenance of the shape of mitotic chromosomes". Chromosoma Biol., 96; 197-204.

29.- Nobuyuko Terada, Yutaka Ogasawara, Tetsumi Yamane, Keishi Matsumoto and Yukihiike Kitamura (1985). " Heterogeneity in mouse seminal vesicle epithelial cell, responding to androgen as evaluated by incorporation of (¹²⁵I) Iododeoxyuridine". Endocrinology, vol.16, 4; 1466-1472.

30.- Esquivel C., Vázquez Nín G. H. and Echeverría O. (1989). "Evidence of repetitive patteerns of chromatin distribution in cell nuclei of the rat liver". Act. Anat., 136; 94-98.

31.- Smetana K. (1976). " Basic histochemical and cytochemical methods". Busch H., in Methods in cancer research, vol. II, chapt. X, Busch (ed.) New York.

- 32.- Arnold Ch., Gulbenskian S., M. Carmo-Fonseca and Ferreira D. (1983). "Androgen-dependent changes in nuclear ultrastructure. A stereological study on rat ventral prostate and seminal vesicle". Biol. Cell. vol. 47; 161-169.
- 33.- Cavazos L. F. and R. M. Melampy (1954). "Cytological effects of testosterone propionate in epithelium of rat seminal vesicle". Endocrinology, 54; 640-648.
- 34.- Puvion E., G. Moyne (1978). "Intranuclear migration of newly synthesized extranucleolar ribonucleoproteins". Exp. Cell Res., 115; 79-88.
- 35.- Leduc E. H., Bernhard W., Viron A., Fain J. and Puvion E. (1981). "Effect of quinacrine on nuclear structure and RNA-synthesis in cultured rat hepatocytes". Cancer Res., vol.41 7; 2832-2841.
- 36.- Carl Ritter (1969). "Androgen stimulated restoration in rat seminal vesicle and prostata epithelial cells". Endocrinology, 84; 844-854.
- 37.- T. Y. Wang and R. M. Loor (1979). "Testosterona activated RNA synthesis in isolated prostate nuclei". J. of Steroid Bioq.. 10; 299-304.

38.- Puvion E. et G. Moyne (1976). "Le noyau cellulaire". La recherche 65, 7; 214-225.

39.- Bouteille M., Laval M. and Dupuy-Coin A.M. (1974). "The cell nucleus". Ac. Press, New York I; 5-64.

40.- Nickerson J. A., G. Krochmalnic, K. M. Wan and S. Penman (1989). "Chromatin architecture and nuclear RNA". Cell Biology, 86; 177-181.

41.- Jiménez García L. F. (1985). "Evolución nuclear en animales". Tesis, maestro en ciencias (Biología). Facultad de Ciencias UNAM. Mexico D.F.

42.- Fakan S., G Leser and T. E. Martin (1984). "Ultrastructural distribution of nuclear ribonucleoproteins as visualized by immunocytochemistry on thin section". J. Cell. Biol., 98; 358-363.

43.- Echeverría O., G. Vázquez Nín and J. Pedrón (1980). "An rapid method for the isolation and culture of endometrial epithelial cells responsive to estradiol". Act. Anat., 106; 45-56.

44.- Lehninger A. L. (1981). "Bioquímica". Ed. Omega, 2da. ed. Barcelona España. p. p; 5-10.

45.- Echeverría O., J. Díaz Osuna, Irma Hernández, C. Sánchez, R. Parra, R. Hernández and G. Vázquez Nín (1985). "Effects of progesterone on nuclear ribonucleoprotein constituents of endometrial cell of the rat". Act. Anat., 122; 205-211.

46.- Mohabananda Sar, Shutsung Liao and Walter E. Stumpf (1970). "Nuclear concentration of androgens in rat seminal vesicles and prostate demonstrated by dry mont autoradiography". Endocrinology, 86; 1008-1011.

47.- Vázquez Nín G. H. and Bernhard W. (1971). "Comparative ultrastructural study of perichromatin and Balbiani ring granules". J. Ultrastuc. Res., 36; 842-860.

48.- Daskal Y. (1981). "Perichromatin granules" in : The cell nucleus, H. Busch (Ed) Academic Press, New York, vol. 8; 117-137.

49.- Kornberg R. D. and A. Klug (1981). "The nucleosoma". Sci. Am., 224 ; 52-64.

50.- Vázquez Nín G.H., O. Echeverría, E. Molina and J. Fragoso (1978). "Effects of ovariectomy and estradiol injection on nuclear structures of endometrial epithelial cell". Ac. Ant., 102; 308-318.

51.- Takeuchi I. K., S. Sonta and Y. K. Takeuchi (1984).
"Association of perichromatin granules with nuclear pores of
growing chinese hamster oocytes". J. Electron Microsc., vol. 33.
4 ; 388-394.

52.- Pagán R. H., O. Echeverría and G. H. Vázquez Nin (1988).
"Effects of testosterona on gene expression on ventral prostate of
the rat". 4th. International congress of cell. biology. Montreal
Canada.

53.- Raska, I., Reimer, G., Jarnik, Kostrouch Z. and Raska Jr. K.
(1989). "Does the synthesis of ribosomal RNA take place within
nucleolar fibrillar centers or dense fibrillar components?"

54.- Vazquez Nin G. H., Echeverría O. M., Fakan S. Leser G. and
Martin T. E. (1990). " Immunoelectron microscope localization of
SnRNPs in the polytene nucleus of salivary glands of *chironomus
thummi*". Chromosoma, 99; 44-51.