

59  
2e1



UNIVERSIDAD NACIONAL AUTONOMA  
DE MEXICO

FACULTAD DE CIENCIAS

LOCALIZACION INMUNOCITOQUIMICA  
ULTRAESTRUCTURAL DE RECEPTOR A ESTRADIOL  
EN CELULAS OVARICAS DE RATA

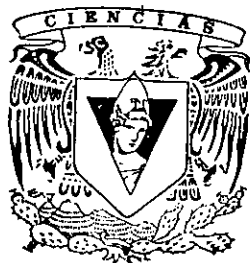
T E S I S

QUE PARA OBTENER EL TITULO DE:

B I O L O G A

P R E S E N T A :

FRANCISCA FERNANDEZ VALVERDE



TESIS CON  
FALTA DE ORIGEN

DRA. OLGA MARGARITA HEVERRIA MARTINEZ.



FACULTAD DE CIENCIAS  
SECCION ESTUDIOS

268692



Universidad Nacional  
Autónoma de México

Dirección General de Bibliotecas de la UNAM

**Biblioteca Central**



**UNAM – Dirección General de Bibliotecas**  
**Tesis Digitales**  
**Restricciones de uso**

**DERECHOS RESERVADOS ©**  
**PROHIBIDA SU REPRODUCCIÓN TOTAL O PARCIAL**

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

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



UNIVERSIDAD NACIONAL  
AUTÓNOMA DE  
MÉXICO

M. en C. Virginia Abrín Batule  
Jefe de la División de Estudios Profesionales de la  
Facultad de Ciencias  
Presente

Comunicamos a usted que hemos revisado el trabajo de Tesis:  
LOCALIZACION INMUNOCITOQUIMICA ULTRAESTRUCTURAL DE  
RECEPTORES A ESTRADIOL EN CELULAS OVARICAS DE RATA  
realizado por FRANCISCA FERNANDEZ VALVERDE

con número de cuenta 7482186-6 , pasante de la carrera de BIOLOGO

Dicho trabajo cuenta con nuestro voto aprobatorio.

Atentamente

Director de Tesis	Dña. Olga Margarita Echeverría Martínez	<i>Olga M. Echeverría</i>
Propietario		
Propietario	Dr. Gerardo Herbert Vázquez Nin	<i>GHV</i>
Propietario	DR. Luis Felipe Jiménez García	<i>L. Jiménez</i>
Suplente	Dra. Guadalupe Trinidad Zavala Padilla	<i>G. Trinidad</i>
Suplente	Biol. Ernestina Ubaldo Pérez	<i>E. Ubaldo</i>

FACULTAD DE CIENCIAS  
U.N.A.M.

Consejo Departamental de Biología

*Edna M. Suarez D.*

DRA. EDNA MARIA SUAREZ DIAZ DEPARTAMENTO  
DE BIOLOGIA



## DEDICATORIAS

- ❖ A mis Padres: como testimonio de mi cariño y agradeciendo por la oportunidad que me dieron de superarme.
  
- ❖ A mis hermanos por el cariño y confianza que son: Suilma Maricela, Aidé, Rogelio, Sandra Olivia, Hilda, Juan, Maribel, Jorge, y con especial agradecimiento a mi hermana Aidé por su apoyo de siempre; a Sandra por su estímulo, cariño y paciencia.
  
- ❖ Con cariño para mi prima Juanita Valverde Treviño que por su apoyo y confianza que siempre me ha tenido.
  
- ❖ Al Físico Marte Adamín Espejo Robinson, por todos los momentos que compartimos y por su gran amistad invaluable.
  
- ❖ A mis sobrinos.
  
- ❖ Al Biólogo Homero Lozano Sillas.
  
- ❖ Con cariño a la familia Ortiz Carrillo.
  
- ❖ A mis Compañeros de Laboratorio de Microscopía Electrónica de la Facultad de Ciencias: Elizabeth, Ernestina, Marco Antonio, Lourdes, Rafael, Martha, José del Carmen, Odalis, Guadalupe, Silvia, Rosario Bernardino, Georgina, Concepción y Aída.

## **AGRADECIMIENTOS**

- ❖ A la Dra. Olga Margarita Echeverría Martínez, por la asesoría la paciencia y la comprensión para la realización de este trabajo.
  
- ❖ Al Dr. Gerardo Hervert Vázquez Nin por el apoyo recibido durante la investigación del presente trabajo.
  
- ❖ Al Biólogo José del Carmen Benítez Flores por su estímulo y sus comentarios para la revisión del manuscrito.
  
- ❖ Al Dr. Luis Felipe Jiménez García por su apoyo, comprensión y confianza.
  
- ❖ A la Bióloga Ernestina Ubaldo Pérez mi agradecimiento por todo el apoyo recibido.
  
- ❖ A la M. En C. Martha Salcedo Alvarez por todo su apoyo le doy mi agradecimiento.
  
- ❖ A Sandra Olivia por su importante participación en el desarrollo de trabajo de Computo y por demostrarme su cariño.

# INDICE

I. RESUMEN .....	1
II. INTRODUCCIÓN .....	2
1. HISTOLOGÍA DEL OVARIO .....	2
2. HORMONAS ESTEROIDES .....	3
a) Importancia .....	3
b) Estructura química y vías de síntesis .....	4
c) Efectos .....	9
3. ESTRÓGENOS .....	9
a) Funciones Biológicas y mecanismos de acción .....	9
4. RECEPTOR A ESTRÓGENOS .....	10
a) Estructura .....	10
b) Dinámica del Receptor .....	12
5. NÚCLEO INTERFÁSICO .....	15
6. INMUNOLOCALIZACIÓN .....	25
7. ANTECEDENTES .....	27
III. OBJETIVO .....	29
IV. MATERIALES Y MÉTODOS .....	30
V. RESULTADOS .....	33
VI. DISCUSIÓN .....	44
VII. CONCLUSIONES .....	46
VIII. BIBLIOGRAFÍA .....	47

## I.-RESUMEN.

Los estrógenos son hormonas esteroides que ejercen gran cantidad de acciones en los tejidos "blanco" o de respuesta a estimulación estrogénica, entre las que se incluyen; la glándula mamaria, el tracto reproductor femenino, hipófisis, hígado y hueso. Estas funciones están directamente relacionadas con proliferación y diferenciación celular, las cuales están mediadas por una molécula proteica transdutora de la señal hormonal, de localización preferentemente nuclear, conocida como receptor de estrógeno (RE). Este se une con alta especificidad a la hormona y permite su interacción con secuencias específicas de ADN denominadas "elementos de respuesta a hormona".

El objetivo del trabajo fue la localización del receptor a estradiol en ovario de rata en diferentes etapas del desarrollo folicular por inmunolocalización ultraestructural utilizando como anticuerpo primario el policlonal AT3A y el policlonal 14A y como anticuerpo secundario GAR G 15.

Se utilizaron ovarios de rata wistar ( *Rattus norvegicus* ) de 18, 22 y 25 días de edad. La fijación del material biológico se hizo con paraformaldehído al 4% en solución amortiguadora de fosfatos a 0.16 M y a un pH de 7.2, a una temperatura de 4° C. La inclusión se llevó a cabo en resina acrílica LRW. Se obtuvieron cortes semifinos con un grosor de 1 $\mu$  aproximadamente en un ultramicrotomo Sorvall MT 2, se tiñeron con azul de toluidina y fueron observados en el microscopio óptico para determinar la zona de interés. Posteriormente se realizaron cortes ultrafinos con un grosor de 60 a 90 nm, los cuales se montaron sobre rejillas de níquel: Se llevó a cabo la inmunolocalización de receptores a estradiol siguiendo la metodología descrita por Fakan y col; 1984.

Se estudiarán folículos primordiales, en crecimiento, antrales y atrésicos. En cada uno de ellos se evaluarán cualitativamente los receptores a estrógenos.

Se obtuvo un mejor marcado con el anticuerpo policlonal AT3A que con policlonal 14A.

Observamos que los receptores a estradiol son más abundantes en el núcleo de células foliculares con o sin antro, que en el núcleo de células tecales. También se apreció que es mayor la cantidad de marca en ovocito de un folículo en crecimiento, que de un folículo en atresia. En el control positivo que fue células de epitelio glandular uterino se observa más marca a nivel nuclear que a nivel citoplásmico. En nuestro control de distribución del receptor en fibroblastos se observa mayor marca citoplásmica que a nivel nuclear.

## **II. INTRODUCCIÓN.**

### **1.- HISTOLOGÍA DEL OVARIO.**

Los folículos ováricos son unidades morfofisiológicas en cuyo interior se desarrolla el futuro óvulo. Los folículos se encuentran inmersos en el tejido intersticial y el tejido estromal de la región cortical del ovario. Están constituidos por un ovocito y células foliculares, rodeadas de células tecales alrededor de él. Se distinguen folículos primordiales, folículos primarios, folículos secundarios y folículos preovulatorios o de Graff. En los mamíferos durante cada ciclo estral existen controles intraováricos que favorecen la maduración folicular hasta la etapa preantral. Posterior a ella la estimulación de la hormona folículo estimulante (HFE) y la hormona luteinizante (HL), conducen a un crecimiento final, selección, dominancia y ovulación de algunos folículos. De todos los folículos que crecen y se desarrollan, sólo algunos cuantos alcanzan la madurez y serán ovulados y los demás se quedan detenidos en diferentes etapas del crecimiento folicular y sufrirán atresia ( Richards y Midgley, 1976 ).

La mayoría de los folículos que se encuentran en el ovario son folículos primordiales que se localizan principalmente en la periferia de la corteza. Inmediatamente por debajo de una capa de tejido conjuntivo fibroso, estos folículos están constituidos por un ovocito que se encuentra rodeado por una capa única de células foliculares aplanadas. El ovocito de este folículo es pequeño, con un núcleo redondo y grande situado excéntricamente con un nucleolo de gran tamaño ( Banks, 1996 ).

Los folículos primarios son folículos que empiezan a crecer. El inicio de este crecimiento, implica cambios citológicos en el ovocito, en las células foliculares y en las células intersticiales que lo rodean. Entre el ovocito y las células de la granulosa que lo rodean, se desarrolla una cubierta de material extracelular amorfo constituido por glucoproteínas, que se denomina zona pelúcida. Las células foliculares aplanadas que rodean al ovocito se vuelven cúbicas, y comienzan a proliferar por divisiones mitóticas, formando así un folículo con muchas capas de células. Debido al aspecto de las células foliculares en esta etapa se le denominan células de la granulosa, conforme se da este desarrollo las células foliculares incrementan sus organelos. En algunas especies se acumulan lípidos. Por fuera de la membrana basal del folículo se localiza una capa de células aplanadas en desarrollo que constituye la teca folicular ( Fawcett, 1987 ).

En la siguiente etapa de desarrollo, el folículo presenta una cavidad que surge como resultado de la fusión de pequeñas lagunas extracelulares llenas de líquido y que se conoce como antro. El folículo aumenta de tamaño y se desplaza a zonas más profundas de la corteza. El líquido folicular contiene proteínas, hormonas esteroides y carbohidratos que cambian constantemente su



concentración a lo largo del crecimiento folicular. El incremento del tamaño del antro folicular se da por la actividad mitótica de las células de la granulosa. Aunado a los cambios anteriores la teca interna se vasculariza y sus células cambian un aspecto similar a fibroblastos, por el de células secretoras que acumulan pequeñas gotas de lípidos y su citoplasma adquiere los rasgos estructurales de las células secretoras de esteroides. Por fuera de las células tecales se desarrolla una cubierta de conjuntivo que recibe el nombre de teca externa.

Al final de la maduración de los folículos el ovocito alcanza el diámetro máximo y se encuentra rodeado por una capa sencilla de células foliculares cuboides cuyas prolongaciones apicales atraviesan la zona pelúcida hasta contactar con la membrana celular del ovocito. Además se forma otra estructura como consecuencia de un engrosamiento local en uno de los lados del antro folicular por parte de las células foliculares de la capa de la granulosa que se denomina cúmulo ooforo ( Fawcett, 1987 ).

Todos los cambios que se dan en las poblaciones celulares que constituyen los folículos, conducen a la formación de los folículos preovulatorios, terciarios o de Graff, los cuales sobresalen de la superficie del ovario. Los folículos maduros son los protagonistas del fenómeno de ovulación, pero no todos los folículos que inician su crecimiento concluyen la maduración ( Weir y Rowlands, 1977 ).

Cuando el folículo de Graff está listo para ser ovulado las estructuras que lo constituyen han alcanzado el grado máximo de diferenciación. El folículo de Graff es esteroideogénicamente más activo que otro tipo de folículo y es el que responde más a las gonadotropinas ( Richards, 1980 ).

Después de la ovulación, las células foliculares y tecales que permanecen en el ovario, presentan una transformación morfológica y en el metabolismo de esteroides, que constituye el fenómeno conocido como luteinización, las células granulosas ahora conocidas como luteas, desarrollan un abundante retículo endoplásmico liso y mitocondrias con un sistema interno complejo constituido de crestas tubulares. Las células luteas a diferencia de las células foliculares sintetizan y secretan progesterona ( Bjersing, 1978 ).

## **2. HORMONAS ESTEROIDES.**

**a) Importancia.**

**b) Estructura química y vías de síntesis.**

**c) Efectos.**

**a) Importancia.** Las hormonas esteroides son una familia importante de sustancias producidas por algunas glándulas del sistema endocrino. La

importancia de las mismas puede inferirse de su amplia distribución en los seres vivos, desde los insectos hasta los vertebrados. Es muy difícil encontrar en los mamíferos, un tejido sobre el que no tengan efecto y que su función no sea importante (Pedrera, 1993).

Los compuestos que se conocen de este grupo incluyen andrógenos, estrógenos, glucocorticoides y mineralocorticoides.

A la fecha se han sintetizado gran cantidad de compuestos que simulan la acción biológica de los esteroides naturales.

En relación a los estrógenos, las acciones biológicas que se han descrito incluyen: inducción de la proliferación celular, aparición de los caracteres sexuales secundarios, el estro de muchos animales, la diferenciación sexual del cerebro fetal humano (Clark y Markayrich, 1988).

Otros efectos biológicos se presentan en el último tercio de la preñez y durante la labor de parto en ovejas (Wen et al. 1995).

En el humano se han descrito efectos favorables producidos por la administración a estradiol relacionados a la patología que se presenta durante la menopausia (Speroff, 1983), en particular aquella relacionada con la osteoporosis (Lindsay, 1993).

Las hormonas esteroides sexuales que incluyen estrógenos, progestinas y andrógenos son esenciales para el desarrollo programado y la función de los tejidos reproductivos durante el desarrollo fetal hasta la pubertad y la vida adulta. Participan en la regulación específica o precisa de la proliferación celular y frecuentemente actúan sobre células y tejidos específicos. (Musgrove y Sutherland, 1994).

Se sabe que los estrógenos estimulan la expresión de genes específicos de ciertos tejidos ;por ejemplo a nivel del epitelio uterino de rata.

Se ha descrito que los tratamientos con estrógeno favorecen la expresión y la distribución celular de proteínas conocidas como conexas  $\beta 1$  y  $\beta 2$  las cuales son componentes importantes en las uniones de tipo nexo. A nivel de útero se demostró que tratamientos combinados de estrógeno y progesterona producen un incremento en la cantidad de ARNm para  $\beta$ -actina (Risek et al. 1995).

**b.- Estructura química y vías de síntesis.** La estructura química básica de los esteroides son cuatro anillos aromáticos, tres ciclohexanos (A, B, C) y un ciclo pentano (D), toda la molécula es conocida como ciclo pentano perhidrofenantreno (fig a) sobre este núcleo se agregan cadenas laterales las que determinan las clases de esteroides.

El compuesto de 27 átomos de carbono ( $C_{27}$ ) con núcleo colestano y grupos metilo en posición  $C_{10}$  y  $C_{13}$  y una cadena de 8 carbonos en  $C_{17}$  corresponde al colesterol, compuesto básico a partir del cual se forman todas las hormonas esteroideas ( Gore-Langton y Armstrong, 1988 ).

Una vez formada la pregnenolona (  $P_5$  ) ( fig. b ) que es el primer paso en la biosíntesis de las hormonas esteroideas, puede entrar a alguna de las dos vías esteroídogénicas básicas; la vía  $\Delta 5$  , o la vía  $\Delta 4$  . La vía  $\Delta 5$  ó de la pregnenolona, que forma dehidroepi-androsterona ( DHEA ) a partir de  $P_5$ , o bien la misma pregnenolona transformarse a progesterona (  $P_4$  ) y entrar a la vía  $\Delta 4$  que forma androstendrona a partir de  $P_4$  ( fig. c ). Tanto la pregnenolona como la progesterona son los precursores fundamentales en la biosíntesis de esteroideas ( O' Malley y Strott, 1993 ).

Las células que llevan a cabo la esteroídogénesis obtienen el colesterol a partir de a) lipoproteínas circundantes en la sangre b) utilizando el colesterol almacenado bajo la forma de ésteres en las inclusiones de lípidos del citoplasma, y c) sintetizándola " de novo " a partir del acetato ( Lipshultz *et al.* 1991 ).

Las células esteroídogénicas ováricas obtienen el colesterol a partir de las proteínas circulantes principalmente.

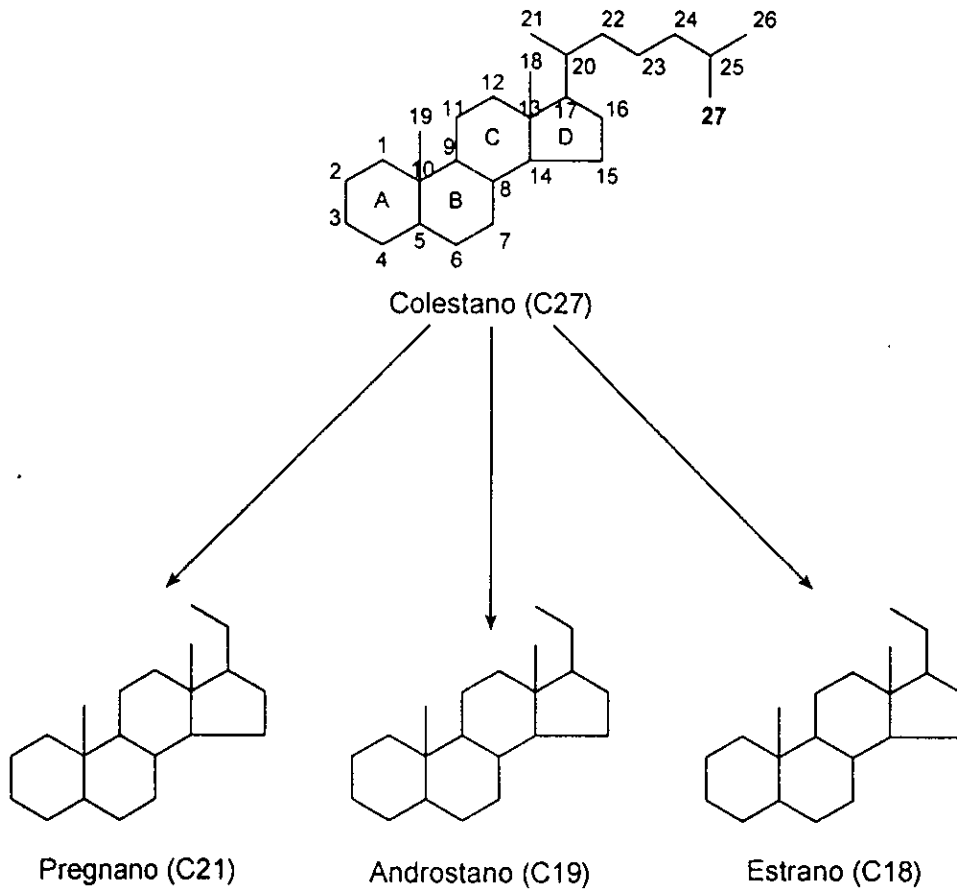
**Pregnano.** Consta de 21 carbonos, hay una pérdida de un segmento de la cadena lateral en el carbono 20 y 22. Biológicamente se clasifican como progestina e incluyen pregnenolona, progesterona, 17-OH progesterona y 20 dihidroprogesterona.

La progesterona se sintetiza en el cuerpo lúteo.

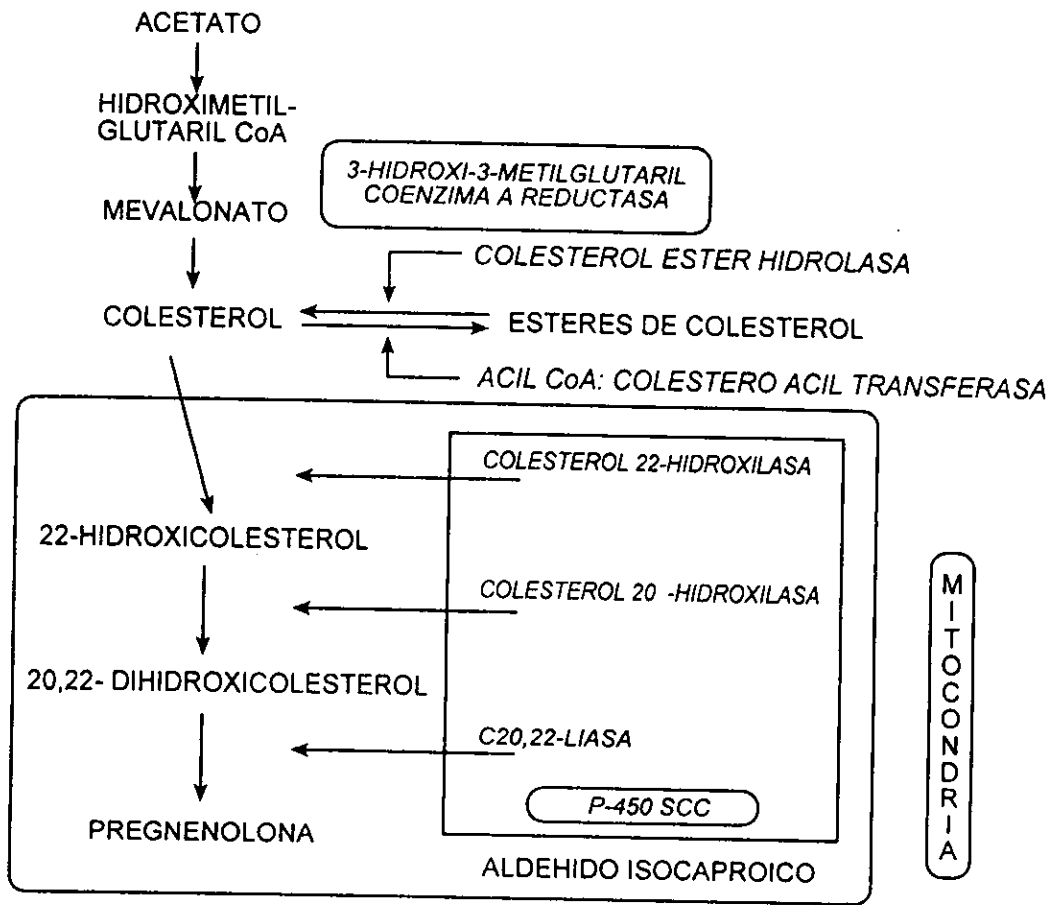
Las progestinas pierden el carbono 17 y forman el núcleo **androstano**, el cual contiene 19 átomos de carbono y producen **andrógenos**; androstemidona y testosterona.

Los andrógenos se producen en el testículo, se sintetizan también en el folículo ovárico y son el sustrato para la producción de estrógenos.

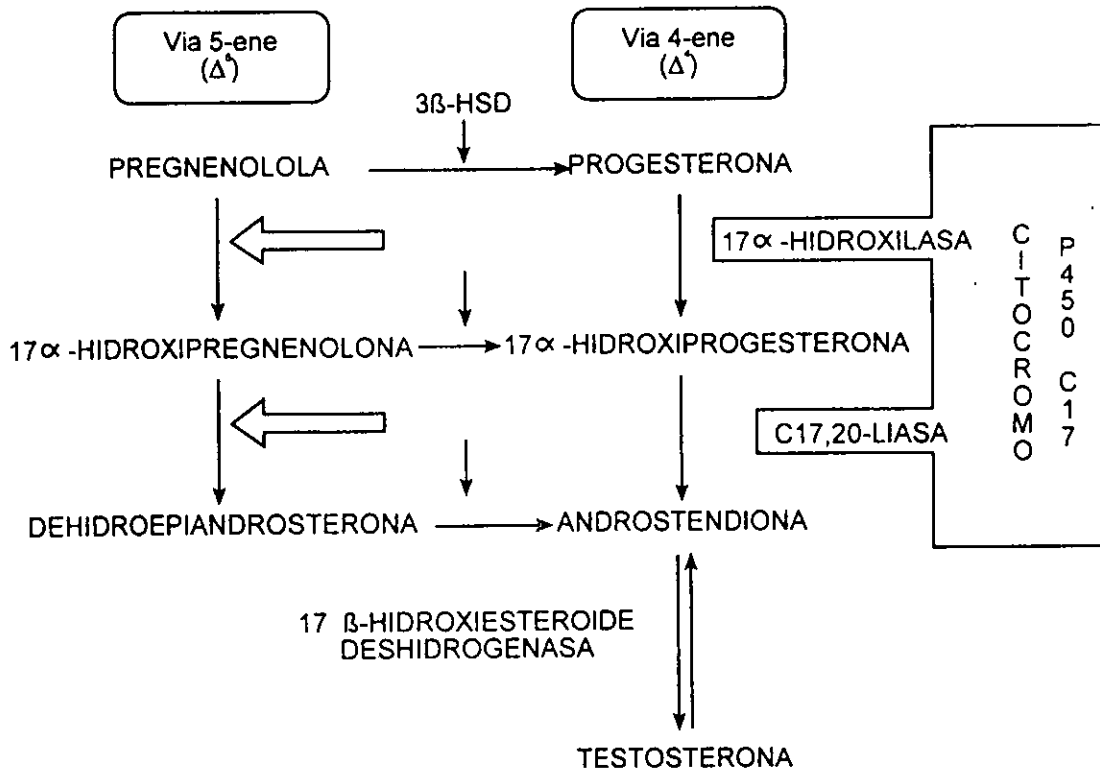
Con la pérdida del grupo metilo en  $C_{10}$  del androstano, se conforma el núcleo **estrano** ( $C_{18}$ ), el cual pasa por un proceso de aromatización en el anillo A necesario para producir los estrógenos. A este grupo pertenecen la estrona, estradiol, estriol y se sintetizan en ovario y placenta ( Gore-Langton y Armstrong, 1988 ).



**Fig a. Núcleos básicos de los diferentes tipos de hormonas esteroideas (Gore y Armstrong 1988)**



**Fig b. Esquema de la biosíntesis del colesterol y su biotransformación a pregnenolona, el recuadro encierra los pasos metabólicos que ocurren en la mitocondria ( Hall, 1985 ).**



**Fig. c. Metabolismo de la pregnenolona en la fracción microsomal para la formación de estrógenos mediante dos vías diferentes (Hall, 1988)**

**c) Efectos.** Las hormonas esteroides son una gran familia de compuestos de funciones biológicas muy diversas entre las cuales podemos mencionar: regulación de funciones reproductivas tanto en machos como en hembras. Algunas funcionan regulando el metabolismo de algunos minerales (mineralocorticoides), otras regulan el metabolismo de carbohidratos y algunas otras como mediadores del proceso inflamatorio. También ejerce efectos sobre el ciclo mitótico y la actividad de transcripción ( Musgrove y Sutherland, 1994 ).

### **3. ESTRÓGENOS.**

#### **a) Funciones biológicas y mecanismos de acción.**

**a) Funciones biológicas.** En relación a los receptores de hormonas esteroides se sabe que cuando estos se activan se lleva a cabo la transcripción de genes. El complejo hormona -receptor traduce la señal hormonal vía interacciones con el ADN y proteína-proteína con otros factores de transcripción. La formación subsecuente de un complejo de preiniciación estable cerca del sitio de inicio de la transcripción en el gene blanco, permite una iniciación eficiente de la transcripción por la RNA polimerasa II. Los receptores a hormonas esteroides pueden llevar a cabo esto en presencia de hormonas al estimular el ensamblaje del complejo de preiniciación o al estabilizar el complejo. Estas interacciones pueden ser directas o indirectas, involucrando coactivadores que median el sinergismo entre diferentes factores de transcripción ( Brinkmann, 1994 ).

Después de unirse el esteroide a su receptor, disminuye el número de receptores en el citosol y aumenta el número de ellos en el núcleo. Se acepta que la acción de las hormonas esteroides se debe a un incremento en la producción de ARNm específico. Actualmente se ha avanzado en la investigación sobre el mecanismo por el cual el complejo de esteroide nuclear y receptor aumenta la transcripción de genes específicos ( Williams, 1988 ).

**Mecanismos de acción.** El transporte de estrógenos desde su sitio de producción hasta sus órganos blanco se lleva a cabo por proteínas plasmáticas específicas como la globulina fijadora de hormonas sexuales y por proteínas séricas no específicas como la albúmina. Los genes que responden a hormonas esteroides contienen elementos reguladores que participan en la respuesta hormonal.

Para que se lleve a cabo la transcripción se necesitan: 1) los promotores elementos indispensables que determinan la tasa basal y la exactitud de la iniciación de la transcripción. 2) elementos de respuesta a esteroides (EsRH) que son sitios fijadores de los complejos hormona-receptor (HR) y aumentan la respuesta. 3) elementos silenciadores que tienen acción opuesta a los EsRH y reducen o apagan la transcripción del gene en ausencia de la hormona. Cuando

se activa los EsRH se supera la acción del silenciador y se lleva a cabo la transcripción ( O' Malley y Strott, 1993 ).

Se distinguen dos estados del receptor de una hormona esteroide: un estado inactivo ligado a las proteínas de choque térmico del receptor y un estado activo cuando se unen a su ligando específico, este proceso involucra la separación de las proteínas de choque térmico del dominio del receptor que une a la hormona (O' Malley y Strott, 1993 ).

Después de la unión al ADN, el receptor activado puede interactuar con los factores de transcripción básicos. Esta interacción permite estabilizar la maquinaria de transcripción en el gene promotor permitiendo a la RNA polimerasa II iniciar la transcripción ( Beekman et al. 1993 ).

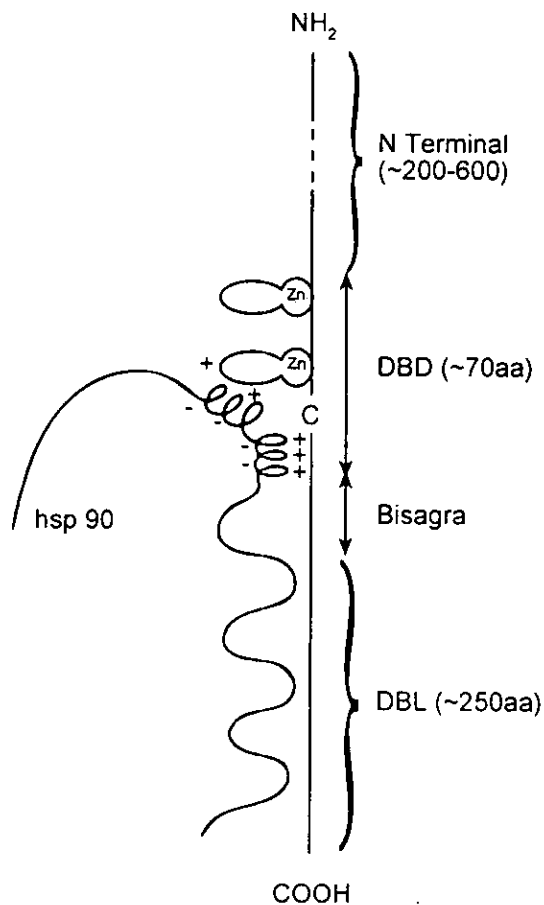
#### **4. RECEPTOR A ESTRÓGENOS.**

##### **a) Estructura.**

##### **b) Dinámica del receptor.**

**a) Estructura.** La estructura de los receptores de esteroides cuyo peso molecular varía entre 60 000 y 120 000 daltones incluye un dominio de enlace hormonal (DBL) de aproximadamente 200 aminoácidos, que permiten el enlace específico de cada hormona, los receptores correspondientes. EL DBL se sitúa en el extremo C-terminal del receptor y está precedido por un dominio de unión al ADN (DBD : ADN unión al dominio) que presenta dos "dedos de guante" cuya estructura está constituida por 4 moléculas de cisteína coordinadas por un átomo de zinc. La secuencia de los aminoácidos de los dos "dedos de guante" esta implicada en forma decisiva a la vez en el enlace al ADN en general (enlace no específico) y la interacción particular con un segmento (elementos de respuesta a hormonas) EsRH de ADN que encontramos en el nivel de la región promotora de los genes hormonoreguladores correspondientes. Entre el extremo C-terminal del 2º dedo de guante y el DBL, la región C-terminal del DBD incluye una secuencia de aminoácidos cargados positivamente. La región N-terminal del receptor, particularmente inmunológica y de longitud variable (aproximadamente de 200 a 600 aminoácidos según el caso), está implicado en las interacciones particulares de cada célula que son decisivas para la actividad transcripcional de los complejos hormona-receptor. Además del enlace hormonal, el DBL tiene un papel importante en la transactivación de la transcripción y en la homodimerización del receptor que está implicado en el enlace a la estructura casi palindrómica de EsRH ( Baulieu, 1991 ).





**Fig d. Representación esquemática de un receptor a estrógeno unido a las proteínas de choque térmico. DBD: dominio de unión al ADN, DBL: dominio de unión al ligando, hsp90: proteínas de choque térmico de peso molecular aprox. de 90 000 daltones, C : Cisteína, Zn : zinc (Baulieu 1991).**

**b) Dinámica del receptor.** Algunas hormonas en particular los esteroides sexuales, son moléculas hidrofóbicas que pueden cruzar con facilidad la bicapa de lípidos de la célula blanco, los esteroides se unen a proteínas portadoras específicas para el transporte a través del torrente circulatorio a sus células blanco. Una vez en su objetivo, las moléculas de las hormonas esteroides se liberan de sus portadores, pasan por una difusión simple a través de la membrana al interior de la célula y se unen a receptores específicos dentro de ella. Ya sean hormonas u otro tipo de sustancias químicas, las moléculas hidrofílicas o hidrofóbicas por lo general envían las señales a través de diferentes series de receptores: receptores de la superficie celular o receptores intracelulares ( O' Malley y Strott, 1993 ).

Los receptores intracelulares y la acción de las hormonas esteroides. Una vez dentro de las células objetivo, la molécula esteroide se une a una proteína receptora específica y provoca alteración de su conformación, lo que incrementa la capacidad del receptor para unirse al ADN. Los complejos hormona-receptor pueden pasar a través de poros nucleares y acumularse en el interior del núcleo. Una vez que los complejos se unen al ADN se induce la activación de genes específicos y el ADN es transcrito en ARN que codifica a una proteína específica ( O' Malley y Strott, 1993 ).

El receptor a estrógeno es un miembro de la superfamilia de receptores nucleares que son capaces de transformar señales extracelulares en respuestas transcripcionales. Los receptores a hormonas esteroides son diferentes de otros receptores nucleares en diferentes aspectos, incluyendo la naturaleza de sus ligandos, su asociación con un repertorio de proteínas de choque térmico, y por la asociación a elementos de respuesta hormonal como homodímeros ( Mosselman *et al.* 1996 ).

Los receptores no ligados para algunas hormonas esteroides tales como los glucocorticoides están retenidos como monómeros en el citoplasma por las proteínas de choque térmico, las chaperoninas e inmunofilinas. En este estado ellos no tienen efecto sobre la transcripción. En asociación con el ligando liberan a los receptores del agregado citoplásmico y los receptores activados se ligan como dímeros a los elementos de respuesta a hormona (EsRH) y se activa la transcripción ( Katzenellenbogen y Katzenellenbogen, 1996 ).

Recientemente Mosselman y colaboradores han identificado y caracterizado en humanos un receptor a estrógeno al cual han denominado  $\beta$  que es altamente homólogo al receptor estrógeno  $\alpha$  ( Mosselman *et al.* 1996 ).

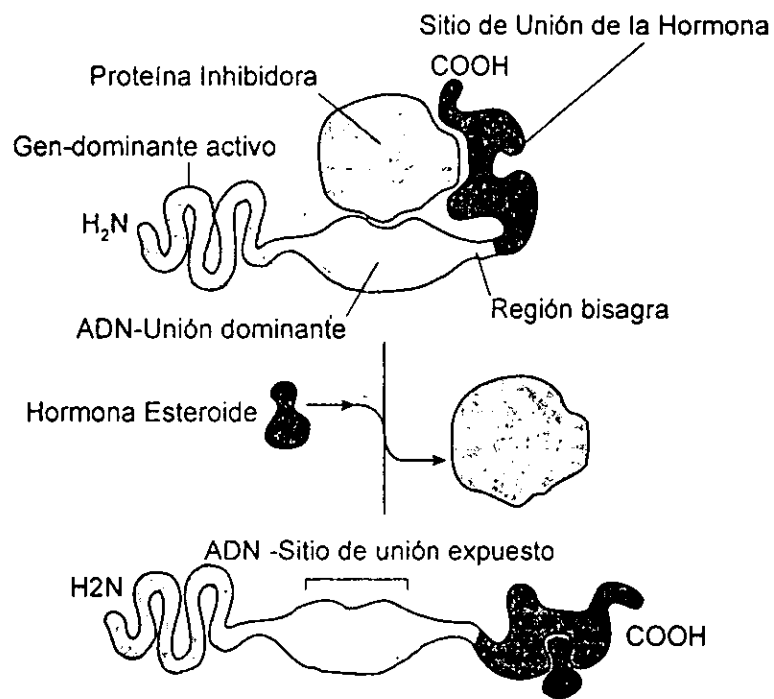
Se sabe que todos los miembros de las hormonas esteroides tienen una estructura similar en el dominio funcional; está constituida por una región N-terminal variable que está involucrada en la modulación de la expresión genética; Contiene además un dominio corto bien conservado en el ligamiento al ADN, el

cual es crucial para el reconocimiento de secuencias específicas de ADN y para la dimerización del receptor y por último un dominio C-terminal parcialmente conservado del ligamiento al ligando, que es importante para el ligamiento a la hormona, para la dimerización del receptor y para la transactivación ( Brinkmann, 1994 ).

El dominio de unión al ADN (DBD) le confiere especificidad a los elementos de respuesta a hormonas EsRH. El dominio de unión al ligando (DBL), libera las proteínas de choque térmico del receptor, y posteriormente se lleva a cabo la translocación del complejo hormona-receptor hacia los núcleos y se activa la transcripción. El dominio amino terminal contiene la función de activación transcripcional y puede ser independiente de la hormona, también puede interactuar con otras proteínas de activación transcripcional ( Ralff, 1995 ).

El receptor ya activado interacciona con las secuencias específicas del ADN correspondientes a los elementos de respuesta a la hormona, localizados dentro o cerca de la región promotora de los genes que responden a estrógeno ( Klock y Strahle, 1987 ).

Los mecanismos por los cuales el complejo hormona-receptor activa la transcripción son conocidos y han sido descrito por algunos autores, sin embargo, conviene señalar que los receptores nucleares también están involucrados en mecanismos de regulación negativa y pueden mediar la represión de ciertos genes en respuesta a la presencia de un ligando. Se sabe que el número de genes sujetos a represión mediada por un ligando es casi igual al número de genes que son activados por la presencia de un ligando. Sin embargo, los mecanismos de acción de estos genes de regulación negativa no son bien conocidos, aunque se ha propuesto que podían actuar mediante interferencia con la transcripción y una represión dependiente del ligando (Saatcioglu *et al.* 1994).



**Fig e. Representación del complejo hormona-receptor ( Alberts, 1989 )**

## 5. NÚCLEO INTERFÁSICO.

La interfase es el período en el ciclo celular en que las células no se dividen, pero existe una gran actividad metabólica. El núcleo en interfase es el más grande de los organelos intracelulares, mide entre 5 y 10  $\mu\text{m}$ .

Las funciones que se llevan a cabo en el núcleo están relacionadas con el funcionamiento general de la célula, el crecimiento y la reproducción celular:

- a) A partir del ácido desoxirribonucleico ( ADN ) se lleva a cabo la transcripción en ácido ribonucleico ( ARN ).
- b) El procesamiento intranuclear de los ARNs hasta su total maduración.
- c) La duplicación del ADN se sitúa entre las funciones nucleares relacionadas con la reproducción celular.
- d) Las relaciones entre el núcleo y el citoplasma que se llevan a cabo a través de la envoltura nuclear se producen constantemente en ambos sentidos (en Echeverría y Vázquez-Nin 1995).

**La envoltura nuclear.** Se halla reforzada por dos armazones de filamentos intermedios, uno adosado a su superficie interna -la lámina nuclear- y otro situado sobre la cara citosólica de la membrana externa. La envoltura nuclear está compuesta por dos membranas concéntricas. Estas se unen a nivel de los poros, los cuales se hallan distribuidos regularmente por toda la superficie de la envoltura. La membrana externa de la envoltura nuclear se continúa con la membrana del retículo endoplásmico. Comúnmente su cara citosólica aparece asociada a ribosomas, y el espacio entre la membrana externa y la membrana interna -conocido como espacio perinuclear- se continúa con la luz del retículo endoplásmico.

La membrana nuclear interna está sostenida por la lámina nuclear, que es un delgado enrejado de filamentos intermedios dispuestos en las más variadas direcciones. Esta lámina, cuyo espesor es de 10 a 20 nm, se interrumpe por los poros. Sus filamentos intermedios, compuestos por proteínas llamadas laminas, al ensamblarse forman una estructura bidimensional. Algunas proteínas transmembranales (laminas B) presentes en la bicapa lipídica de la porción interna nuclear de la envoltura sirven como puntos de anclaje para los filamentos laminares. La lámina nuclear establece la forma -generalmente esférica- de la envoltura nuclear, y le otorga rigidez. Como ocurre a la envoltura nuclear, la lámina nuclear se desensambla al comenzar la mitosis y se vuelve a ensamblar - en las dos células hijas- cuando aquella concluye, con la consiguiente reaparición de la envoltura (en De Robertis *et al.* 1996 ).

**Complejo de poro.** En la envoltura nuclear, se presentan estructuras grandes y complejas conocidas como complejo de poro. El complejo de poro está formado por más de 100 proteínas y presentan tres componentes básicos, un anillo orientado hacia el citoplasma, un elemento central que está constituido por ocho proteínas y otro anillo en contacto con el nucleoplasma. ( en Alberts *et al.* 1994 ). De Robertis, 1996 describe el complejo de poro de la siguiente manera:

1. La pared del complejo, con forma de cilindro hueco abierto en sus dos extremos, está compuesto por ocho columnas proteicas que atraviesan la envoltura nuclear. En conjunto los extremos citosólicos de dichas columnas forman un anillo a nivel de la membrana externa. Un anillo similar se forma en el lado del poro que da al interior del núcleo, a nivel de la membrana interna. Los filamentos intermedios de la lámina nuclear se hallan ligados al complejo de poro por medio del anillo interno y le confieren rigidez.

2. Las proteínas transmembranosas sostienen las columnas proteicas a la bicapa lipídica de la envoltura nuclear. Así, por uno de sus extremos cada una de estas proteínas se adhiere a la columna, su dominio central atraviesa la bicapa y el extremo opuesto queda libre en la luz del espacio perinuclear.

3. El complejo muestra además una serie de rayos que nacen en la cara interior de las columnas y se proyectan hacia el centro del poro, por lo que reducen su diámetro real.

4. Por último de los anillos externo e interno nacen fibrillas que se proyectan hacia el citosol y al interior del núcleo respectivamente. Las fibrillas que dan hacia el núcleo se unen por sus extremos lo cual genera una estructura con aspecto de jaula. El diámetro total del complejo de poro es de unos 100 nm y su longitud alrededor de 30 nm. Sin embargo, sus distintos componentes convierten al poro en un canal cilíndrico de apenas 9 nm de diámetro, ubicado en el centro del complejo. El complejo de poro se comporta como un diafragma que se abre o se cierra de acuerdo con las dimensiones de las moléculas que deben de atravesarlo ( en De Robertis *et al.* 1996 ).

El transporte a través de los poros puede ser por medio de difusión pasiva como lo han demostrado estudios de microinyección de partículas de oro coloidal (Feldherr *et al.* 1984 ).

Sin embargo, también se ha demostrado la utilización de ATP en el transporte activo ( Yoneda, 1996 ).

**Cromatina.** El descubrimiento de la cromatina se le puede atribuir a Miescher en 1869 quien fue el primero en aislar el ácido desoxirribonucleico, pero fue hasta 1879 cuando Flemming logró observar un material que se hallaba distribuido en el núcleo en forma de pequeños gránulos a los que denominó cromatina. ( en De Robertis y De Robertis 1983 ).

En 1928 Heitz distinguió dos componentes bien definidos: la cromatina condensada ( heterocromatina ) y la eucromatina que es la cromatina laxa ( en Avers, 1983 ).

Por cromatina es el material cromosómico de las células de los organismos superiores. Consta de ADN y proteínas.

Las proteínas se dividen en dos tipos: histonas y no histonas. Se han reconocido originalmente cinco clases de histonas caracterizadas por sus proporciones relativas de lisina y arginina. Estas son **H1, H2, H3, H4 y H5**. Todas las histonas son proteínas pequeñas de aproximadamente 11 000-15 000 daltones, donde H3 y H4 son las más conservadas en la evolución.

Las proteínas no histonas agrupan a la ARN polimerasa, las proteínas de alta movilidad HMG y las proteínas de expresión genética.

**El nucleosoma es la subunidad de toda la cromatina.** Cada nucleosoma consiste de un núcleo proteico conformado por un octamero de histonas.

Los nucleosomas individuales pueden obtenerse por tratamiento de la cromatina por nucleasa micrococcal. El nucleosoma contiene aproximadamente 200pb de ADN asociadas con el octamero de histonas que consiste de dos copias de H2A, H2B, H3, H4 y se conocen como histonas centrales. El papel de la H1 es diferente de las histonas centrales. Representa la mitad de la cantidad de una histona central y puede extraerse más rápidamente de la cromatina. La forma del nucleosoma corresponde a un disco plano o cilíndrico de 11 nm de diámetro y altura de 6 nm. A partir del nucleosoma existen varios niveles de compactación de la cromatina. El primer nivel de organización es la agrupación de ADN en forma de rosario o cuentas de collar, formando las fibras de 10 nm, con un radio de empaquetamiento aproximadamente 6 nm. Estas partículas son un componente invariable de eucromatina, heterocromatina y cromosomas. El segundo nivel de organización es el enrollamiento de las cuentas en un arreglo helicoidal para construir las fibras de 30 nm que se encuentra en la cromatina en interfase, y cromosomas mitóticos. La cromatina presenta un radio de empaquetamiento del ADN de aproximadamente 40 nm. La estructura de esta fibra requiere de proteínas adicionales. El radio de empaquetamiento final está determinado, por el tercer nivel de organización, el empaquetamiento de la fibra sobre si misma. Esto da un radio de empaquetamiento igual o mayor de 1000 en la eucromatina, cíclicamente intercambiable con el empaquetamiento en los cromosomas mitóticos, para alcanzar un radio total menor o igual de 10 000 ( en Lewin, 1994 ).

**Ribonucleoproteínas.** La información genética depositada en las moléculas de ADN se encuentra en el núcleo, y la síntesis proteica tiene lugar en el citoplasma. Por lo tanto es necesario que la información de ADN sea transferida desde el núcleo al citosol. Tal transferencia es un proceso complejo que requiere la intervención de una molécula intermedia. Esta molécula, ARN mensajero (ARNm), copia la información contenida en el ADN, sale del núcleo y una vez en el citosol,

dirige la síntesis de la proteína. En el núcleo el ADN guía la síntesis del ARNm, determinando la secuencia de sus nucleótidos, y en el citoplasma el ARNm dirige la síntesis de la proteína, estableciendo el orden de sus aminoácidos. La síntesis del ARN, se denomina transcripción, y la síntesis de la proteína se llama traducción. Este flujo de información se conoce como el "dogma central" de la biología molecular ( en De Robertis *et al.* 1996 ).

La transcripción es mediada por una enzima que es una polimerasa de ARN que depende del ADN, la que sintetiza una hebra complementaria de ARN a partir del ADN con sentido 3'- 5', a partir de la cual se producirá una hebra de ARN con dirección 5'- 3'. ( en Herskowitz, 1987 ).

El primer transcrito a partir del ADN se denomina ARN heterogéneo nuclear (ARN hn) incluyendo al Pre- ARNm ( Dreyfuss, 1986 ).

Se sabe que existen además del ARNm, ARNt y ARNr, otros dos tipos de ARN, ambos pequeños y localizados uno en el núcleo y otro en el citosol, los cuales posteriormente pasan al citosol. Los ARN pequeños confinados en el núcleo integran unas ribonucleoproteínas llamadas RNPsn (Small nuclear ribonucleoproteins ) (en De Robertis *et al* 1996). Las cuales se pueden separar en dos grupos, las nucleolares y las extranucleolares. El nucleolo es el sitio de síntesis y procesamiento de la ARN prerribosómico ( pre-ARNr ) y del ensamblado del ribosoma. Las RNPs extranucleolares parecen estar relacionadas con el metabolismo del ARN premensajero ( Pre-ARNm ) ( en Jiménez, y Segura 1993 ).

La ARN polimerasa II es la enzima que transcribe los genes precursores de ARNm de todas las proteínas, como la mayoría de ARNpn ( ARN's pequeños nucleares ) y su localización es nucleoplásmica ( De Pomerai, 1990 ).

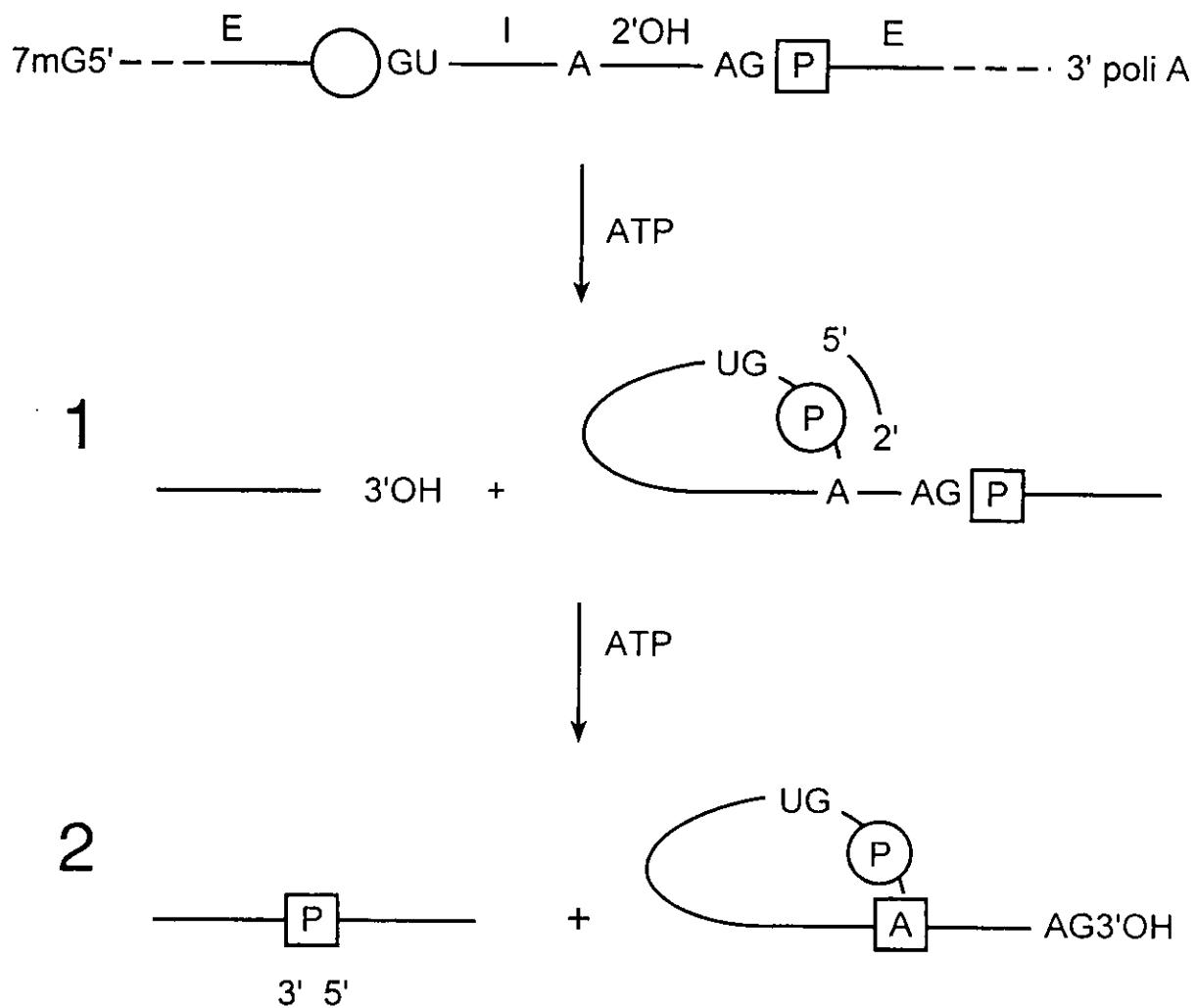
**Regulación transcripcional de la expresión genética.** Se conocen tres tipos de regulaciones transcripcionales que le ocurren al ARN premensajero ( Pre-ARNm ) y que involucran enlaces covalentes. La primera es la adición de un grupo 7-metilguanosina en el extremo 5' ( llamado en inglés "capping" ) . Otra es la adición de una secuencia de unos 100 a 200 residuos nucleotídicos de adenosina en el extremo 3' poliadenilación ( poly A ). La tercera modificación es la eliminación de secuencias no codificantes o intrones ( llamado "Splicing" ). Las dos primeras ocurren con la participación de enzimas específicas y algunas otras moléculas que intervienen en el proceso. El mecanismo de "Splicing" es más complejo.

El transcrito primario se conoce como Pre-ARNm y es procesado mediante el "Splicing," proceso en el que se eliminan los intrones ( secuencia de nucleotidos que no codifican ) y se unen los exones ( secuencia de nucleotidos que codifican ) por la formación de Spliceosomas, que son estructuras nucleares grandes ( de 40 a 60S ) compuestas de Pre-ARNm, ribonucleoproteínas nucleares pequeñas (snRNPs: U1, U2, U4, U5 y U6) y proteínas denominadas factores de Splicing que no forman snRNPs.



En el "Splicing" participan elementos de acción cis ( que son secuencia de nucleotidos evolutivamente conservados en el Pre-ARNm ) y elementos de acción trans ( factores que se unen al Pre-ARNm ). El "Splicing" ocurre mediante un mecanismo de transesterificación en dos pasos, uno de ruptura y otro de unión.

En el primer paso catalítico, el Pre-ARNm se corta en el enlace fosfodiéster, en el sitio de corte del extremo 5' del primer intrón, creándose así una estructura molecular en forma de lazo de vaquero entre el intrón y el segundo exón, con la producción de un extremo 3' libre en el primer exón. En la segunda reacción, se rompe el sitio de corte en el extremo 3' del intrón donde se une con el segundo exón, se libera el intrón en forma de "lazo" y se ligan los dos exones ( Jiménez y Segura 1993 ).



**Fig f.- Mecanismo de Splicing en el Pre-ARNm. Los sitios GU, AG que unen a los exones (E) con los intrones (I) y el sitio de empalme (A) son iguales en los eucariontes. Paso 1, ruptura en el sitio GU y formación del lazo. Paso 2, ligado de los exones y liberación del lazo (en Jiménez y Segura, 1993)**

**Gránulos pericromatinianos (GPCs).** Fueron observados por Watson en 1962, son cuerpos esféricos con un diámetro de 300-500 Å, localizados en la periferia de la cromatina compacta, rodeados por un halo claro de 250 Å de diámetro. Un estudio comparativo entre los GPCs de células de mamífero y los gránulos de Balbiani en núcleos de las glándulas salivales de *Chironomus thummi* concluye que ambos son similares, es decir, que ambos son estructuras ribonucleoproteicas del mismo tipo. Los gránulos de Balbiani se encuentran en regiones de alta síntesis de ARN y se considera que son almacenes de ARNm ( Vázquez-Nin y Bernhard 1971 ).

Estos gránulos se observan bajo la técnica de ácido etilendiaminotetraacético EDTA ( Monneron y Bernhard, 1969 ).

Los gránulos pericromatinianos son considerados como estructuras universales de eucariontes ( Jiménez et al 1989 ), involucrados en el almacenamiento y transporte del ARN maduro. ( Vázquez-Nin et al. 1983 ).

**Fibras pericromatinianas.** Descritas por primera vez en 1969 por Monneron y Bernhard, son fibras que se encuentran en contacto directo con la cromatina (Monneron y Bernhard, 1969 ).

En estudios realizados con uridina tritiada en los cuales las células fueron expuestas a pulsos cortos, se observó un marcaje preferencial en las zonas donde se localizan las fibras pericromatinianas en el borde de la cromatina condensada ( Fakan y Bernhard, 1973 ).

Estas fibras fácilmente digeridas por la ribonucleasa, se presume son precursoras de los gránulos pericromatinicos, los cuales son mucho más resistentes a la ribonucleasa, probablemente por su contenido proteico mayor ( De Robertis y De Robertis 1983 ).

**Gránulos intercromatinianos.** Aparecen en todas las células animales como estructuras esféricas con un diámetro que va de 200 a 250 Å, se encuentran formando racimos en la zona intercromatiniana conectándose con fibrillas delgadas ( Monneron y Bernhard, 1969 ).

Los gránulos intercromatinianos presentan una gran resistencia a la RNAsa y a la Pronasa, se considera que éstos gránulos se encuentran bien protegidos por un componente proteico ( Monneron y Bernhard, 1969 ).

En los gránulos intercromatinianos se han localizado proteínas con actividad enzimática, entre ellas la ATPasa, GTPasa y NAD-Pirofosfatasa ( Fakan y Puvion, 1980 ).

Jiménez García y colaboradores han llevado a cabo estudios de estas partículas ribonucleoproteicas en diferentes grupos de organismos. La diferencia en rasgos nucleares entre protistas y los similares entre plantas y animales sugieren que la principal variación en la estructura nuclear son antiguos a la adquisición de cloroplastos por el ancestro de plantas verdes y que una vez adquirida, el patrón nuclear es altamente conservado ( Jiménez *et al.* 1989 ).

**Matriz Nuclear.** La matriz nuclear fue descrita por primera vez por Berezny y Coffey en 1974. Se ha demostrado que la matriz nuclear está asociada con procesos biológicos tales como la síntesis de ADN, síntesis de ARN. La matriz nuclear residual esta formada por una capa proteica y ribonucleoproteica que mantiene la integridad y forma del núcleo. Conserva la lámina densa, el complejo de poro y el nucleolo residual. ( Berezny y Coffey, 1977 ).

La matriz nuclear juega un papel central en la acción de ciertas hormonas particularmente en las hormonas esteroides ( Nardoza *et al.* 1996 ).

La extracción de la matriz nuclear se obtiene por procedimientos diversos en los que predomina el tratamiento con soluciones hipertónicas y nucleasas.

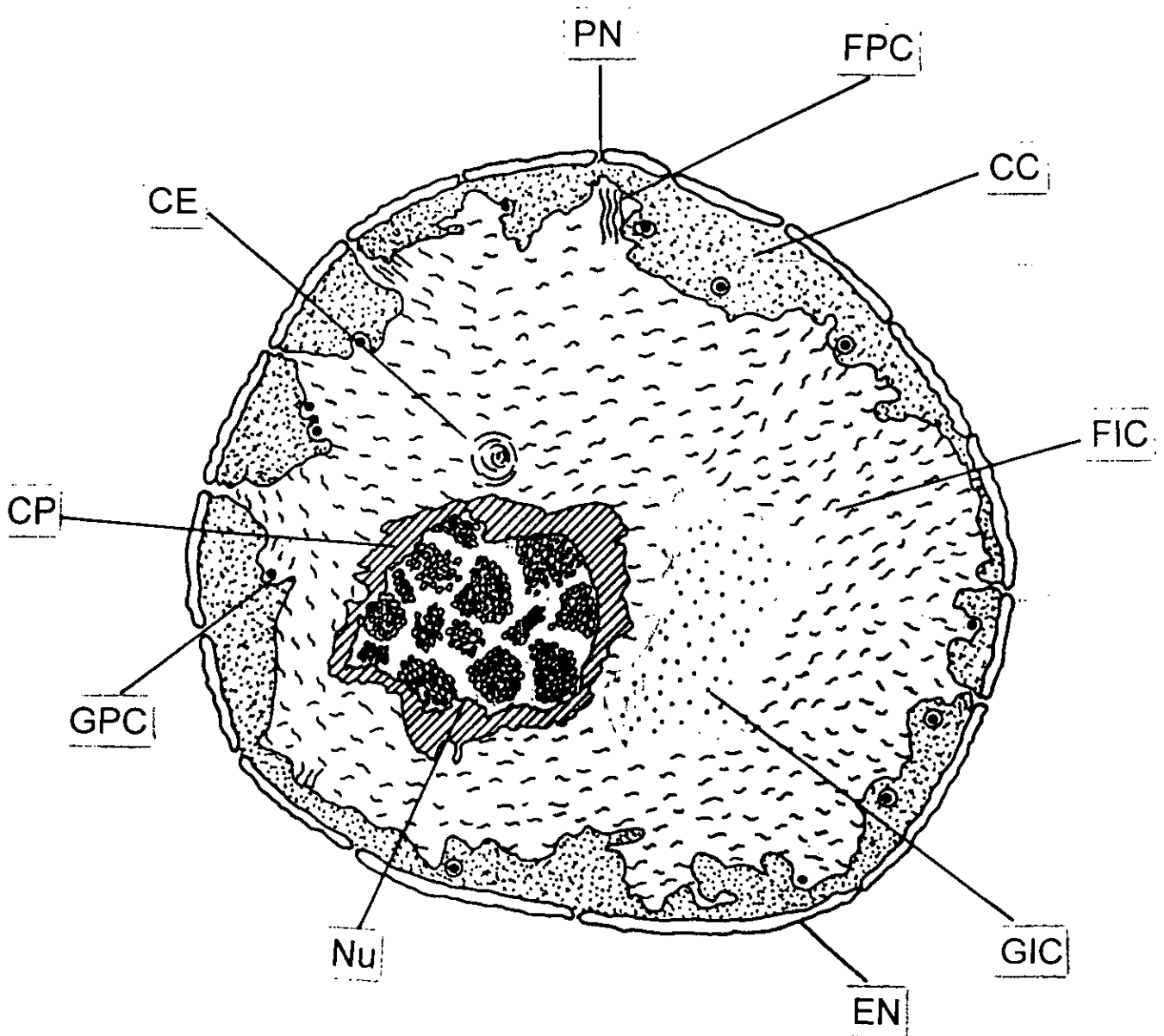
**Cuerpos espiralados.** Los cuerpos espiralados se han identificado en núcleos de células nerviosas, pancreáticas, de la glándula adrenal y en células Hela. Son agregados más o menos esféricos de 0.3 a 0.5  $\mu\text{m}$  de diámetro que presentan filamentos enrollados cuyo grosor varía de 400 a 600 Å. Estos filamentos conservan el contraste con la técnica de acetato de uranilo-EDTA-citrato de plomo (Bernhard, 1969), como los gránulos intercromatinianos y pericromatinianos, por lo que se piensa que la naturaleza química de estos elementos es ribonucleoproteica ( Monneron y Bernhard, 1969 ).

Los cuerpos espiralados se han también descrito en plantas ( Moreno Díaz de la Espina, y col. 1992 ).

**Nucleolo.** Morfológicamente el nucleolo es una área sub-nuclear notable de extensa transcripción y procesamiento de ARN. Es el sitio de transcripción de la ARN polimerasa 1 a partir del ADN ribosomal. Sus genes codifican para 3 de las 4 especies de ARN de los ribosomas ( 18S, 5.8S, 28S ). Participa en la mayor parte de los pasos de biogénesis de la subunidad grande y pequeña del ribosoma (Shaw y Jordan, 1995).

Presenta tres distintos componentes, los cuales se han distinguido a través de estudios ultraestructurales que son los centros fibrilares, el componente fibrilar denso y la región granular ( en Jiménez, 1988 ).

Los centros Fibrilares (CF) han sido considerados como los sitios de almacén de genes ribosomales inactivos en la transcripción. El componente fibrilar denso (CFD), se ha propuesto como el sitio de transcripción de estos genes. EL componente granular (CG) es el sitio de maduración y almacén de las subunidades ribosomales ( en Segura, 1996 ).



**Fig g. Esquema del núcleo interfásico donde se observa envoltura nuclear ( E N ), poro nuclear ( P N ) Y las partículas ribonucleoproteicas, las cuales se observan mediante la técnica de contraste de EDTA. Las fibras pericromatinianas (FPCs), gránulos pericromatinianos rodeados por su halo característico (GPCs) que se localizan cerca de la cromatina compacta (CC), cúmulo de gránulos intercromatinianos (GICs),fibras intercromatinianas ( FICs ),Nucleolo (Nu),cromatina perinucleolar (CP), y cuerpos espiralados ( CE ) ( Monneron y Bernhard, (1969).**

## 6. INMUNOLocalIZACIÓN.

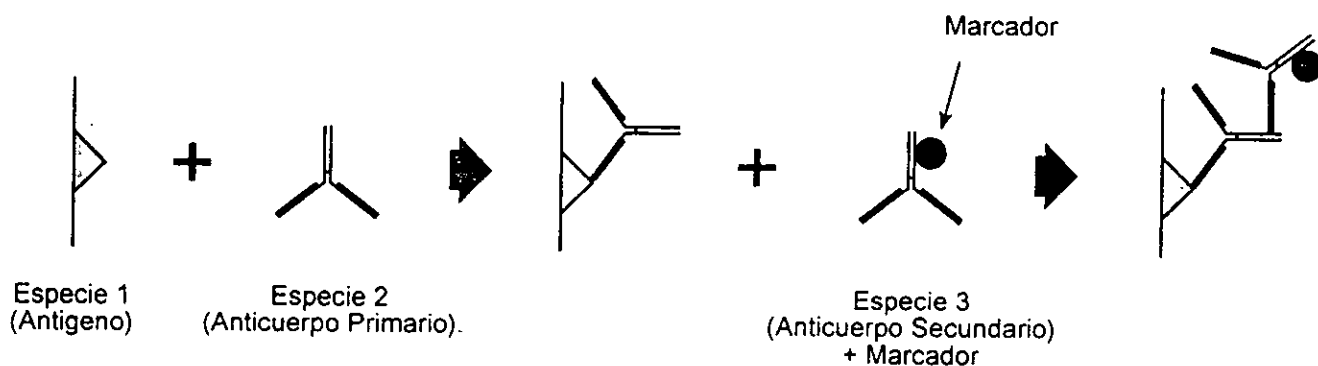
La inmunocitoquímica ha contribuido al conocimiento de la localización de una variedad de sustancias. Este tipo de metodología fue realizado por primera vez en 1959 por Singer que utilizó un anticuerpo marcado con proteína ferritina para tener una localización ultraestructural ( Martínez, 1979 ).

Por medio de esta técnica ha sido posible identificar y localizar una gran variedad de moléculas como **ADN, ARN, RNPtp** (ribonucleoproteínas de tamaño pequeño) y las ribonucleoproteínas heterogéneas nucleares (**RNPshn**). De esta forma se ha localizado a nivel estructural, algunos de los sitios en donde se llevan a cabo ciertas funciones celulares, tales como el procesamiento de ADN, ARN y proteínas ( Sass 1984; Lesser 1989; Vázquez-Nin 1986 ).

La inmunolocalización se basa en la detección de antígenos utilizando anticuerpos que reaccionan específicamente con ellos. Los antígenos son moléculas diversas como proteínas, polisacáridos, lípidos y ácidos nucleicos. La gran afinidad de los anticuerpos por su antígeno, le otorga una gran especificidad a la reacción de reconocimiento, disminuyendo las reacciones inespecíficas y cruzadas con otros componentes (en Bozzola y Russell, 1992).

En la reacción inmunocitoquímica, el anticuerpo permite localizar in situ el antígeno contra el cual fue preparado. El anticuerpo se aplica al tejido en estudio, y al interactuar con el antígeno tisular forma un complejo antígeno-anticuerpo fácil de localizar (Hayatt, 1989).

Existen dos métodos de inmunolocalización: el método directo en el cual sólo se usa un anticuerpo y en el indirecto que se usan dos anticuerpos (fig. e). En la inmunolocalización indirecta, el corte de tejido se hace reaccionar con el primer anticuerpo, contra la molécula que se desea localizar, posteriormente el tejido se hace reaccionar con un segundo anticuerpo que reconoce al primero. El segundo anticuerpo está acoplado a una molécula visible con el microscopio electrónico tales como el oro y la ferritina, que producen una marca electrodensa que permite la visualización directa del antígeno al observar los cortes ultrafinos al microscopio electrónico (en Bozzola y Rusell, 1992).



**Fig. h. Método de Marcado Indirecto. Se expone el anticuerpo primario (generalmente elaborado de una segunda especie) ante el antígeno (de la 1a. especie) y después de haberse formado el complejo antígeno anticuerpo, se expone a un anticuerpo secundario marcado (hecho de una tercera especie) que ha sido producido para reaccionar en contra de la segunda especie. El resultado es una secuencia de dos capas de anticuerpos y un marcador (Bozzola y Russell, 1992).**



## 7. ANTECEDENTES.

Traish y colaboradores trabajaron con el anticuerpo policlonal AT3A desarrollado contra una secuencia de aminoácidos 247-261 de dominio de unión a ADN del receptor a estradiol humano (Traish y Wotiz 1989).

Se han llevado a cabo investigaciones de receptor a estrógeno en tracto genital femenino de ratón recién nacido desde 1-22 días, usando un anticuerpo monoclonal anti-receptor a estrógeno.

Durante el desarrollo del tracto genital femenino, los receptores a estrógeno están presentes en células estromales, células epiteliales. La presencia de receptor a estrógeno sugiere que algunas de las acciones de los estrógenos, como proliferación y diferenciación celular, así como la anormalidad tisular que resulta de la administración de estrógeno prenatal y postnatal, puede estar mediada por interacciones con el receptor (Yamashita *et al* 1989 ).

Mediante la localización se han analizado las modificaciones cuantitativas del receptor a estradiol (RE). Se logró determinar los cambios del receptor por inmunolocalización ultraestructural, usando un anticuerpo policlonal que actúa contra una secuencia de aminoácidos, del dominio de unión al ADN, un anticuerpo monoclonal contra una proteína RNPhn y un anticuerpo anti-ADN ( Vázquez-Nin *et al.* 1991)

Estos trabajos se llevaron a cabo en células epiteliales endometriales, células musculares y fibroblastos de útero. En los que se reconoce:

- a) que el receptor es principalmente nuclear, pero también está presente en el citoplasma.
- b) que el receptor se une a las partículas que contienen ARNhn.
- c) que el ligamiento de las ribonucleoproteínas (RNPs) no bloquean el dominio de ligamiento al ADN del receptor a estradiol ( Vázquez-Nin *et al.* 1991 ).

Existe otro trabajo donde se localizó inmunocitoquímicamente el receptor a estradiol en tejidos no considerados blancos de la hormona. Se estudió hígado, duodeno, riñón, linfocitos de bazo, tomando como control el útero. Se usó como anticuerpo primario AT3A y como secundario el GAR G15 (Echeverría *et al.* 1994).

Se determinó la densidad de marca, es decir, se contó el número de granos por unidad de área, los espacios celulares estudiados fueron núcleo, citoplasma, espacios cromatinianos, intercromatinianos y extracelular.

El compartimiento cromatina se refiere a cromatina compacta, el intercromatiniano incluyendo regiones pericromatinianas e intercromatinianas y el ruido de fondo fue estimado en el espacio extracelular. Observaron que núcleos de hepatocitos, de célula epitelial del duodeno y de los túbulos proximales del riñón, estos tipos

celulares presentan mayor densidad de marca en el núcleo, particularmente en el espacio intercromatiniano. La prueba de "t" de Student demuestra que la densidad de marca en el núcleo y citoplasma, así como cromatina e intercromatina no presentan diferencias significativas entre hepatocitos, células epiteliales del duodeno y los túbulos contorneados proximales del riñón. Las células epiteliales de útero y linfocitos presentan una mayor densidad de marca en comparación con los otros tipos celulares estudiados, el patrón de distribución de RE en todos los espacios observados es semejante tanto en células de útero como las pertenecientes a órganos no considerados efectores para estradiol ( Echeverría *et al.* 1994 ).

Méndez Herrera en 1996 realizó inmunolocalización de receptores a estrógenos en ovario durante el desarrollo embrionario de polla y los encontró en los núcleos de los ovocitos meióticos ( Méndez -Herrera 1996 ).

A nivel ultraestructural no se han realizado trabajos donde se localicen los receptores a estrógeno en células foliculares, tecaes y ovocitos de rata de ahí nuestro interés para realizar este trabajo.

### **III. OBJETIVO:**

DETERMINAR LA LOCALIZACIÓN DEL RECEPTOR A ESTRADIOL EN OVARIO DE RATA EN DIFERENTES ETAPAS DEL DESARROLLO FOLICULAR POR INMUNOLocalización ULTRAESTRUCTURAL, UTILIZANDO COMO ANTICUERPOS PRIMARIOS EL POLICLONAL AT3A Y EL POLICLONAL 14A Y COMO ANTICUERPO SECUNDARIO EL GAR G15.

## IV. MATERIALES Y MÉTODOS.

En el presente trabajo se utilizaron ovarios de rata wistar (*Rattus norvegicus*) de 18, 22 y 25 días de edad, los cuales fueron procesados de la siguiente manera. La fijación del material biológico se hizo con paraformaldehído al 4% en solución amortiguadora de fosfatos a 0.16 M a pH 7.2 a una temperatura de 4 °C. La inclusión se llevó a cabo en resina LRW de acuerdo al diagrama de flujo.

### DIAGRAMA DE FLUJO

FIJACIÓN (Paraformaldehído al 4%)



LAVADOS

(tres lavados cada 5 minutos con buffer de fosfatos a 0.16 M a pH 7.2)



DESHIDRATACIÓN

Etanol al 70% 1 hora a 4 °C

Etanol al 90% 1 hora 4 °C

Etanol al 100% 3 cambios de 1 hora c/u



PREINCLUSIÓN

Etanol absoluto-Resina LRW 2:1 a 4 °C 3 hrs

Etanol absoluto-Resina LRW 1:1 a 4 °C 3 Hr

Etanol absoluto-Resina LRW 1:2 a 4 °C 3 hrs



INCLUSIÓN (12 hrs en resina pura )

al otro día 3 cambios de 1 hora a 4 °C en resina pura LRW



POLIMERIZADO

En estufa a 60°C 20 hrs

Se obtuvieron cortes semifinos con un grosor de  $1\mu$  aproximadamente en un ultramicrotomo Sorvall MT 2, los cortes se depositaron en portaobjetos, se tiñeron con azul de toluidina y fueron observados en un microscopio óptico, para determinar la zona de interés, es decir folículos en crecimiento y folículos en atresia. Posteriormente se realizaron cortes ultrafinos con un grosor de 60 a 90 nm en un ultramicrotomo Sorvall MT 2, los cuales se montaron sobre rejillas de níquel. Se llevó a cabo la inmunolocalización de receptores a estradiol utilizando los anticuerpos primarios AT3A y 14A, así como los anticuerpos secundarios GAR G 15 siguiendo la metodología descrita por (S. Fakan, et al 1984).

Se llevó a cabo la inmunolocalización en una cámara húmeda, las soluciones utilizadas se colocaron en una superficie plana cubierta con parafilm. Las rejillas no se dejan secar durante el procedimiento. El exceso de los reactivos se quita con papel filtro y se flotan inmediatamente en el siguiente.

En este estudio se utilizaron como anticuerpos primarios el policlonal AT3A y policlonal 14A y como marcadores ( anticuerpos secundarios ) el Goat Anti-Rabbit unido a partículas de oro de 15 nm ( GAR G15 ).

Para asegurarnos de la especificidad de dichos anticuerpos, se trabajó con los anticuerpos policlonal AT3A y el policlonal 14A, para observar la especificidad de dichos anticuerpos, se substituyó el anticuerpo AT3A y 14A, por PBS-BSA-Tween y después se procedió a incubar el anticuerpo secundario GAR G15. Este experimento control no presenta marca.

En el control positivo que fue epitelio de célula glandular uterina se observa más marca a nivel nuclear que a nivel citoplásmico. Nuestro control de distribución del receptor se observa marca a nivel citoplásmico solamente. Los estudios se realizaron cualitativamente, debido a que el número de muestras no fue muy grande y por lo tanto no fue posible hacerlo cuantitativamente.

La técnica es la siguiente:

- 3 minutos en PBS-Leche-Tween.
- flotar 3 minutos en suero normal de cabra ( Normal Goat Serum NGS ) diluido en PBS 10:50. Este paso constituye un bloqueo de sitios inespecíficos.
- El anticuerpo primario es diluido 1/15 en BSA-PBS-Tween- e incubado 17 a 24 hrs 40C.
- Al siguiente día se lava con PBS-Tween por goteo con piseta.
- Se lava con PBS por goteo.
- Flotar 15 minutos en PBS.
- Flotar 3 minutos en Leche-PBS-Tween.

- Se incubó el segundo anticuerpo diluido con PBS 1/15 a temperatura ambiente (de 30 a 45 minutos ).
- Lavar con PBS, posteriormente se deja flotar 15 minutos en PBS, gotear nuevamente PBS.
- Lavar con agua bidestilada y flotar 15 minutos en agua bidestilada y gotear con la misma.
- Se deja secar y se colorea suavemente con uranilo y plomo los tiempos empleados fueron de 2 y 1 minuto respectivamente. El contraste debe ser bajo para poder visualizar mejor los granos de oro.
- Las micrografías fueron tomadas a distintos aumentos en un microscopio Carl Zeis E M 10.

## V. RESULTADOS.

Se estudiaron folículos primordiales, en crecimiento, antrales y atrésicos. La micrografía 1 corresponde a un corte de ovario de rata de 18 días de edad. Se observan folículos primordiales, primarios, secundarios y antrales. En las células foliculares, tecales y ovocitos de cada tipo de folículo se evaluaron cualitativamente los receptores a estrógenos.

**Ultraestructura.** Las células foliculares se identificaron por el arreglo característico alrededor del ovocito. Son células que presentan un núcleo esférico y un citoplasma con organelos celulares típicos. Las células tecales están separadas de las primeras por una membrana basal y se identificaron por presentar forma alargada a nivel celular y nuclear.

Los ovocitos se identificaron por su típica forma esférica y por la presencia de microvellosidades y zona pelúcida. En estado de atresia se observa que existe cúmulo de lípidos en células tecales, la desaparición de las células de la corona radiata, así como el deterioro de la zona pelúcida y la deformación del ovocito.

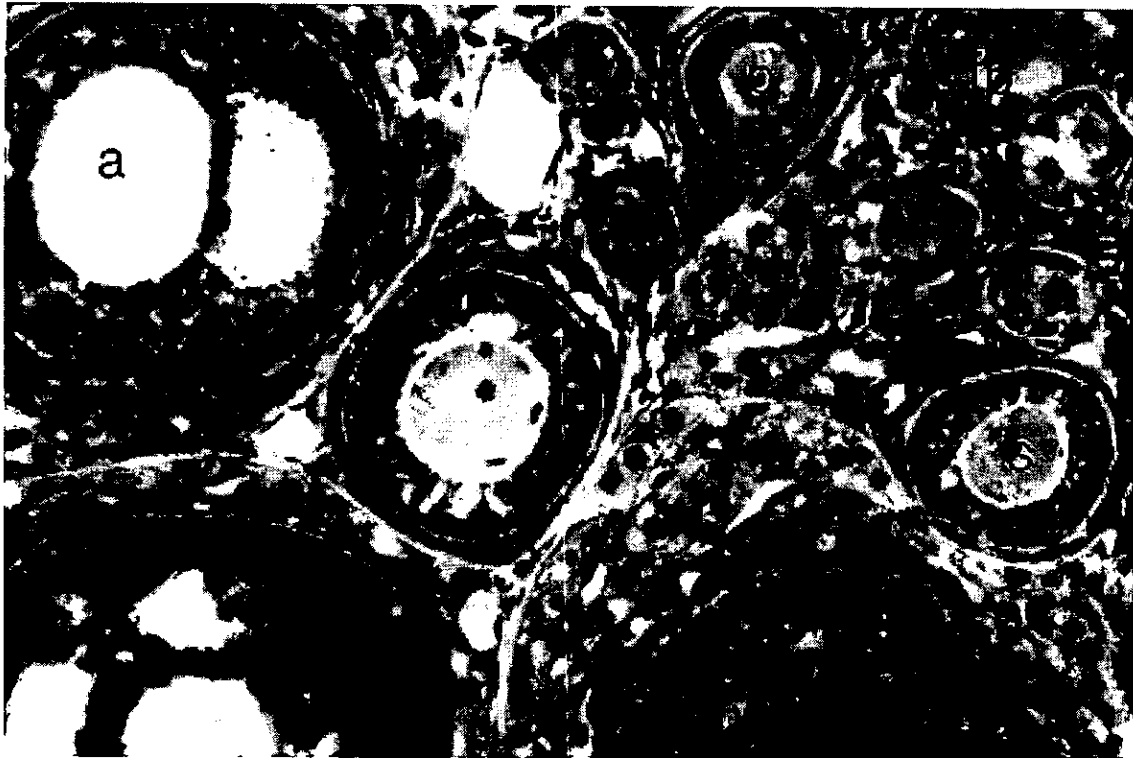
Se puede apreciar que los receptores a estradiol son más abundantes en el núcleo de células foliculares que en el núcleo de células tecales, aún cuando estos estudios fueron cualitativos y no cuantitativos (por no ser abundante el número de muestras). Como se observa en las figuras 2 a la 7.

Se estudiaron núcleos interfásicos de células foliculares con antro y sin antro. En la figura 2 se aprecia que en el núcleo de una célula folicular, la mayor densidad de marca se encuentra en el espacio intercromatiniano. Esta inmunolocalización se realizó con el anticuerpo policlonal AT3A. En la figura 3 se presenta una célula folicular en crecimiento sin antro, en la que se localizó el receptor a estradiol con el anticuerpo policlonal 14A. En ella también se observa que la marca se encuentra en el espacio intercromatiniano. En la figura 4 se observan núcleos de células tecales tratadas con anticuerpo policlonal AT3A unido a GAR G15 donde se ve menor cantidad de marca que en célula folicular. La figura 5 muestra núcleos de células tecales tratadas con el anticuerpo policlonal 14A unido a GAR G15. En el ovocito en crecimiento de la figura 6, la marca se encuentra asociada a fibras intercromatinianas. En la figura 7 se ve un ovocito atrésico de un folículo con antro que presenta menor cantidad de marca que el ovocito de un folículo en crecimiento de la figura anterior.

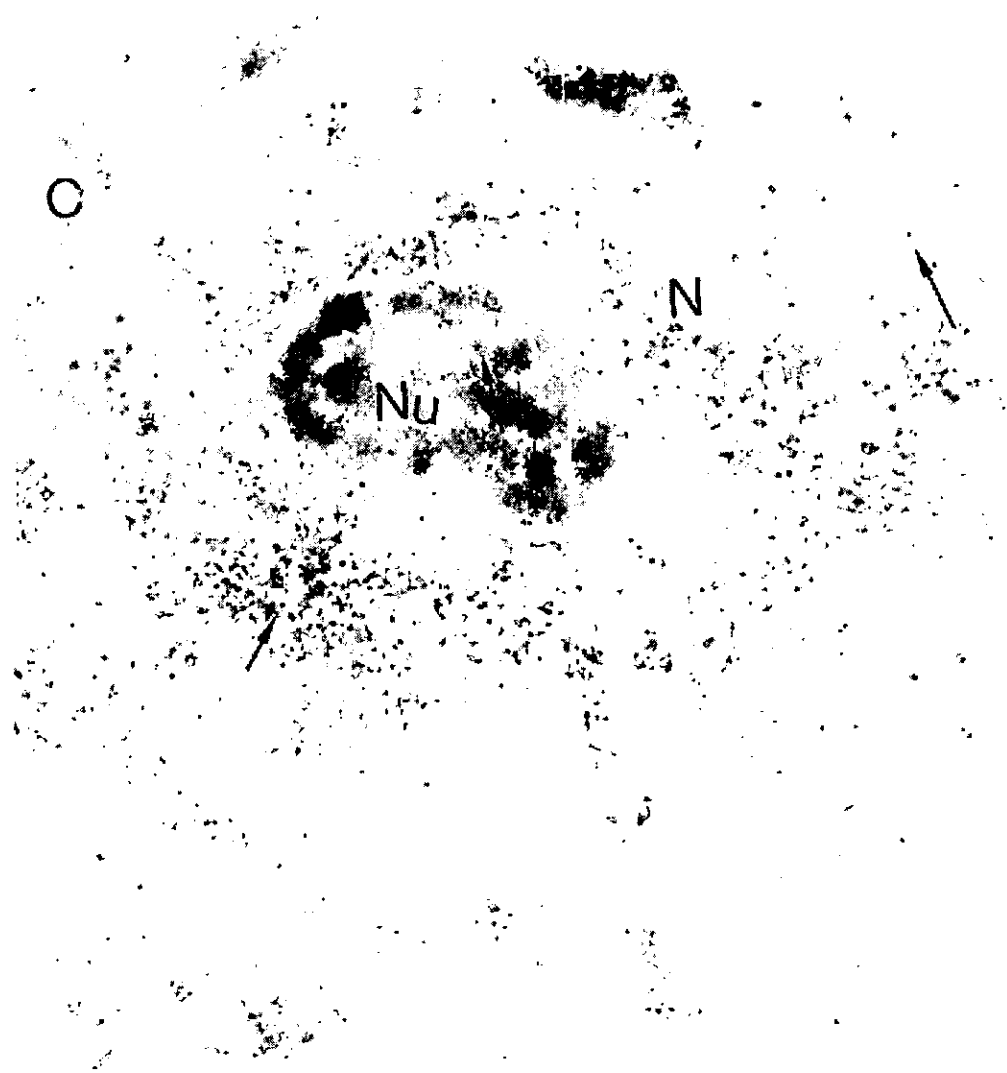
Como control positivo se muestra un núcleo de célula epitelial glandular uterina en la figura 8. La marca se encuentra preferencialmente en espacio intercromatiniano. La figura 9 muestra cortes de fibroblastos de ovario en la que se observa que la marca se distribuye en el citoplasma y es casi nula en el núcleo.

La marca se encuentra preferencialmente en el núcleo en todas las células estudiadas, a excepción de los fibroblastos. Se encontró poca marca en el nucleolo en general.

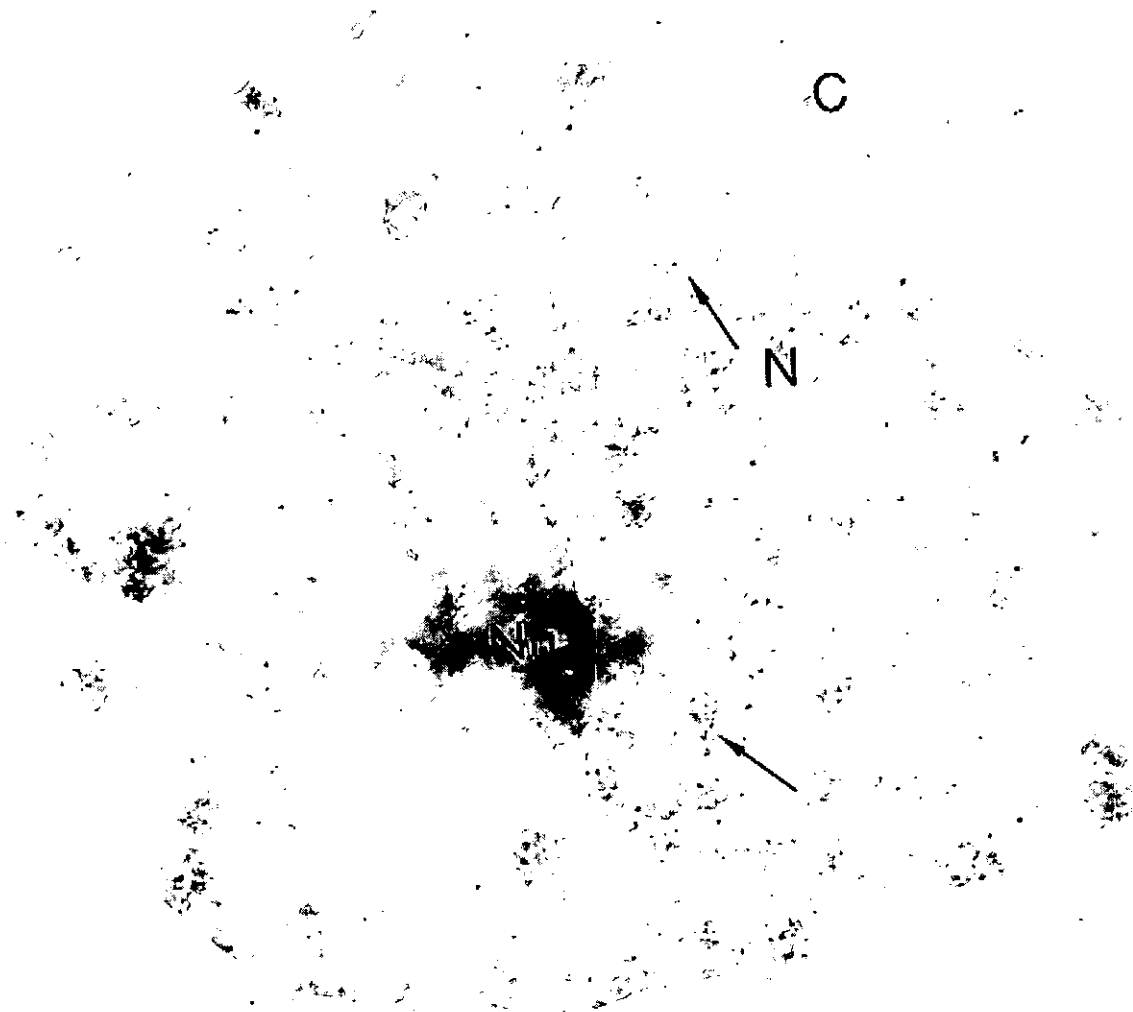




**Fig 1.- Fotografía óptica de un ovario de rata de 18 días de edad donde se observan folículos primordiales (fp), primarios (p), secundarios (s) y antrales (a). Tinción azul de toluidina 800x. (Cortesía del Profesor J del C. Benítez Flores).**



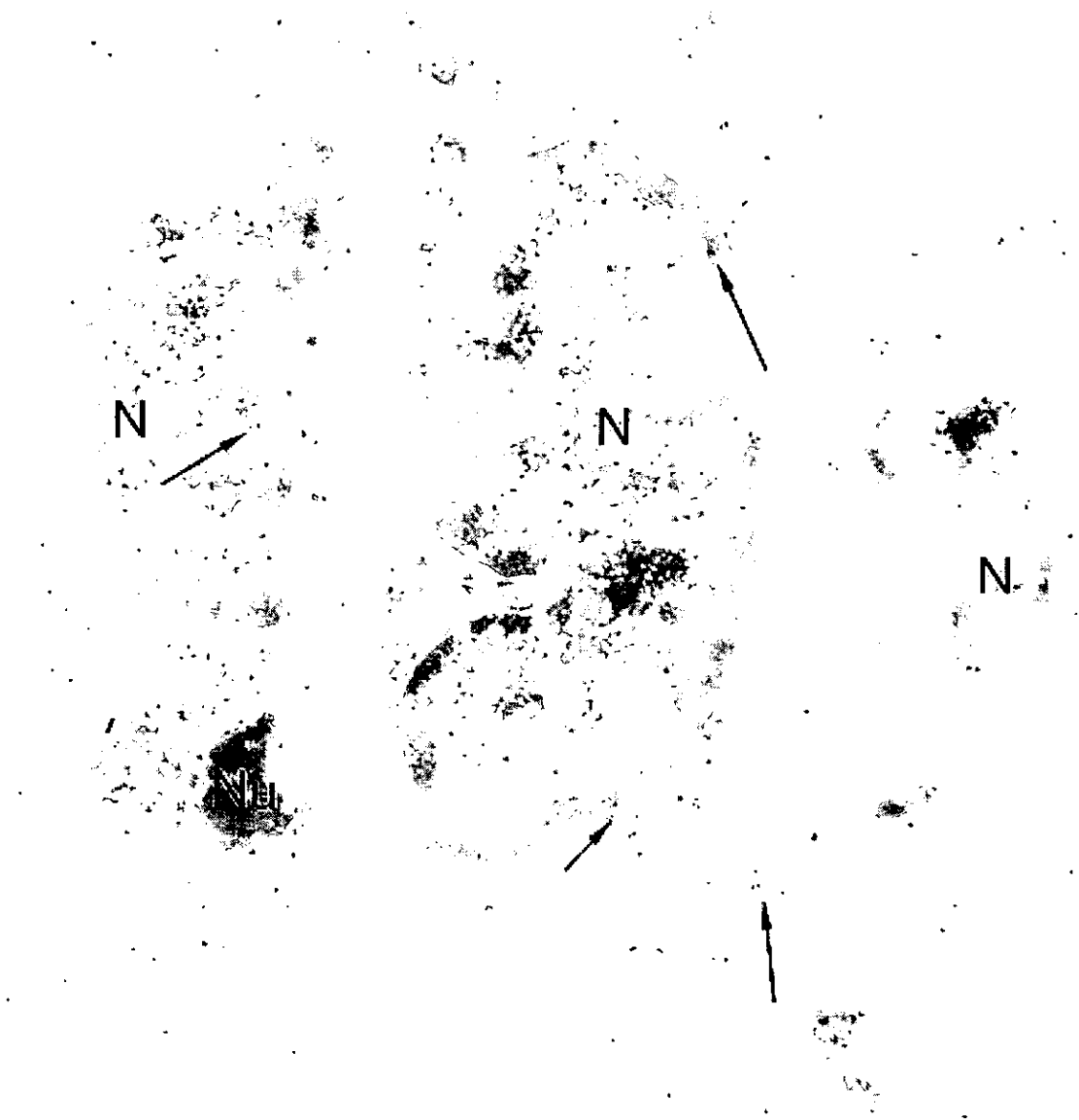
**Fig 2.- Núcleo (N) de célula folicular marcada con anticuerpo policlonal AT3A unido a GAR G15. La marca (→) se aprecia en el espacio intercromatiniano. Citoplasma (C) Nucléolo (Nu) Contraste Ur-Pb. 36.800 x.**



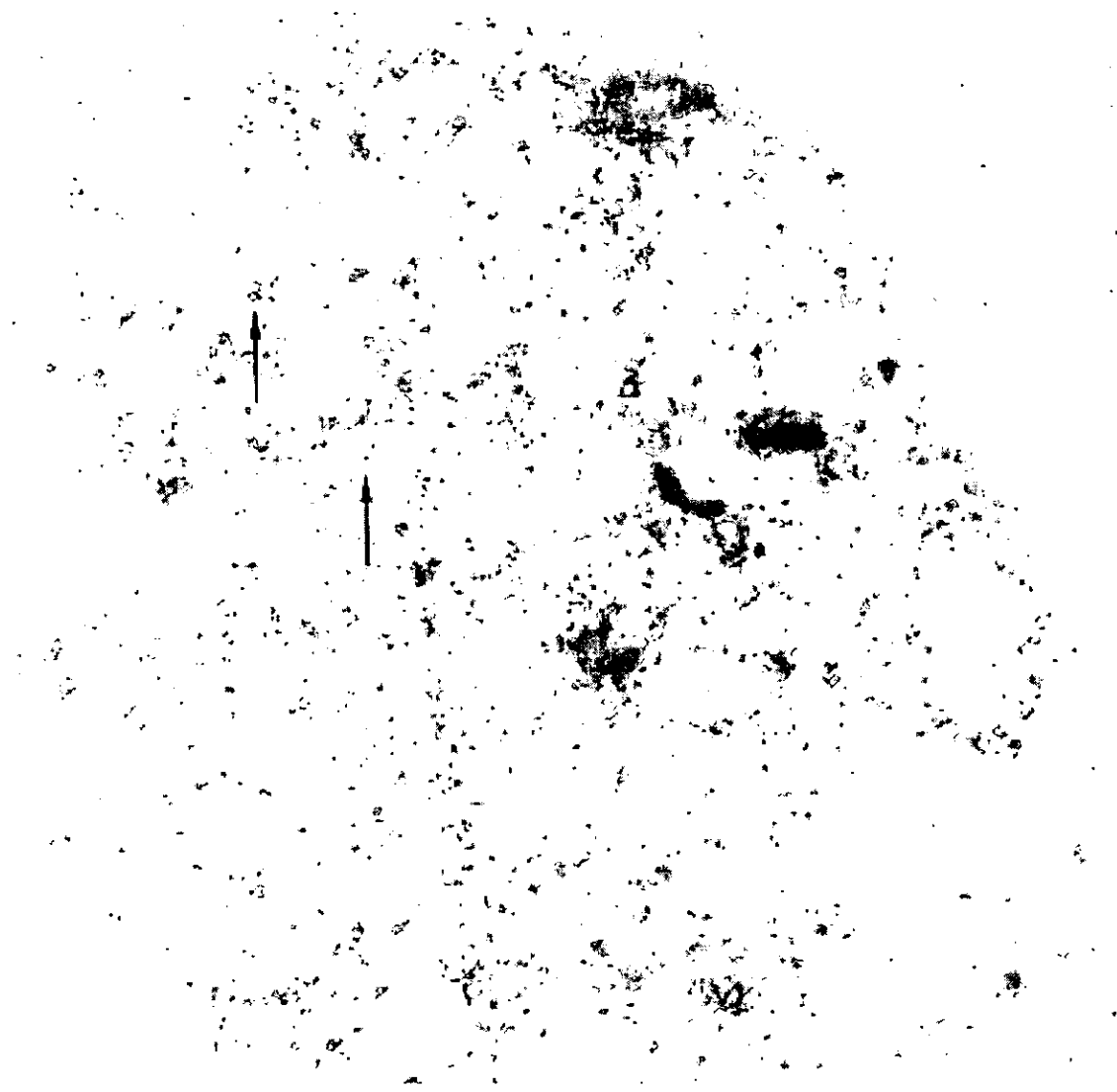
**Fig 3.- Núcleo (N) de célula folicular (folículo en crecimiento sin antro), marcado con el anticuerpo policlonal 14A unido a GAR G15. La marca (→) se encuentra preferencialmente en el espacio intercromatiniano. Citoplasma (C) Nucleolo (Nu). Contraste Ur-Pb. 28.750 x.**



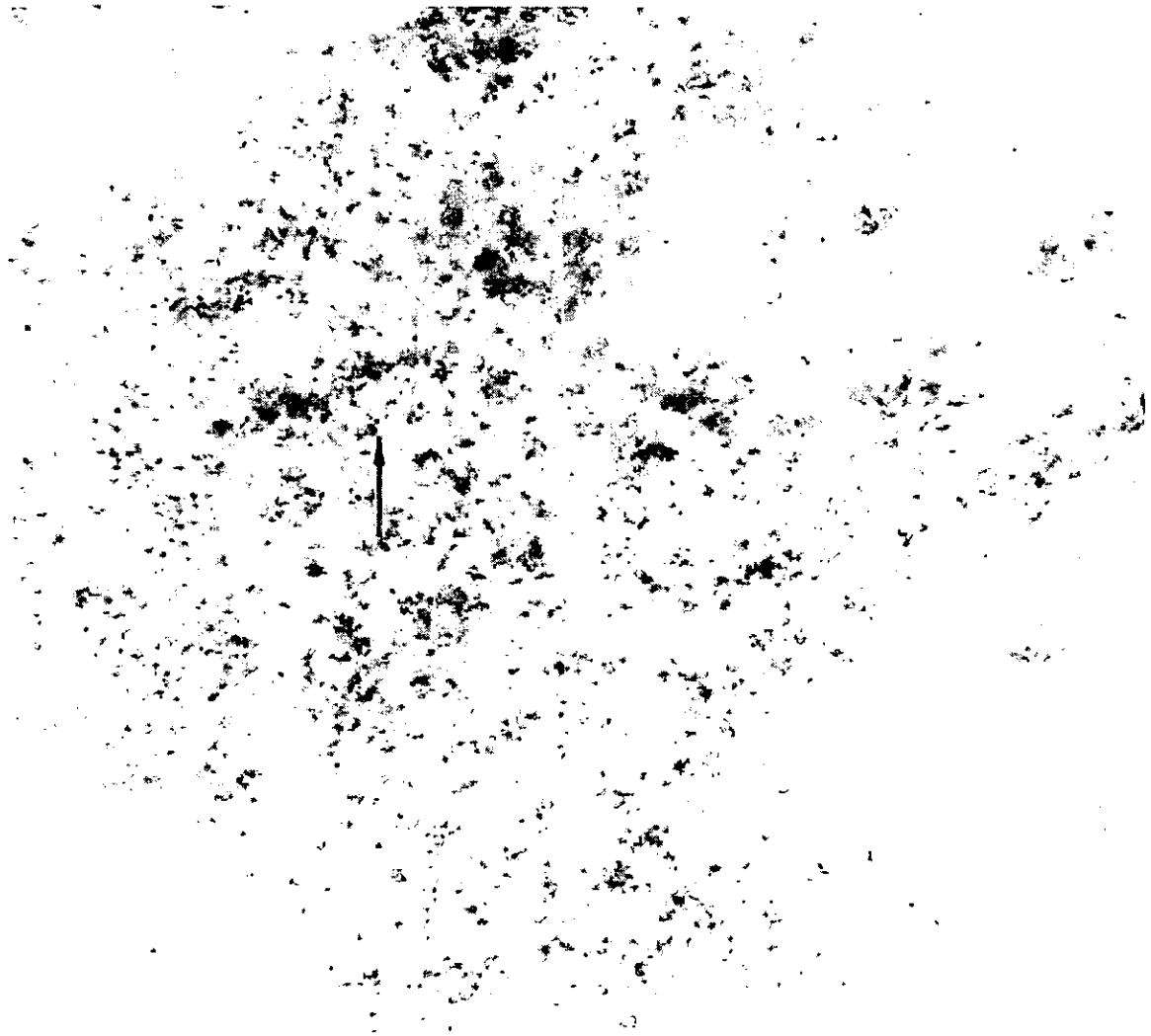
**Fig 4.- Núcleos (N) de células tecales marcado con anticuerpo policlonal AT3A unido a GAR G15. La marca (→) se encuentra en los espacios intercromatinianos. Citoplasma (C). Contraste Ur-Pb. 28.750 x.**



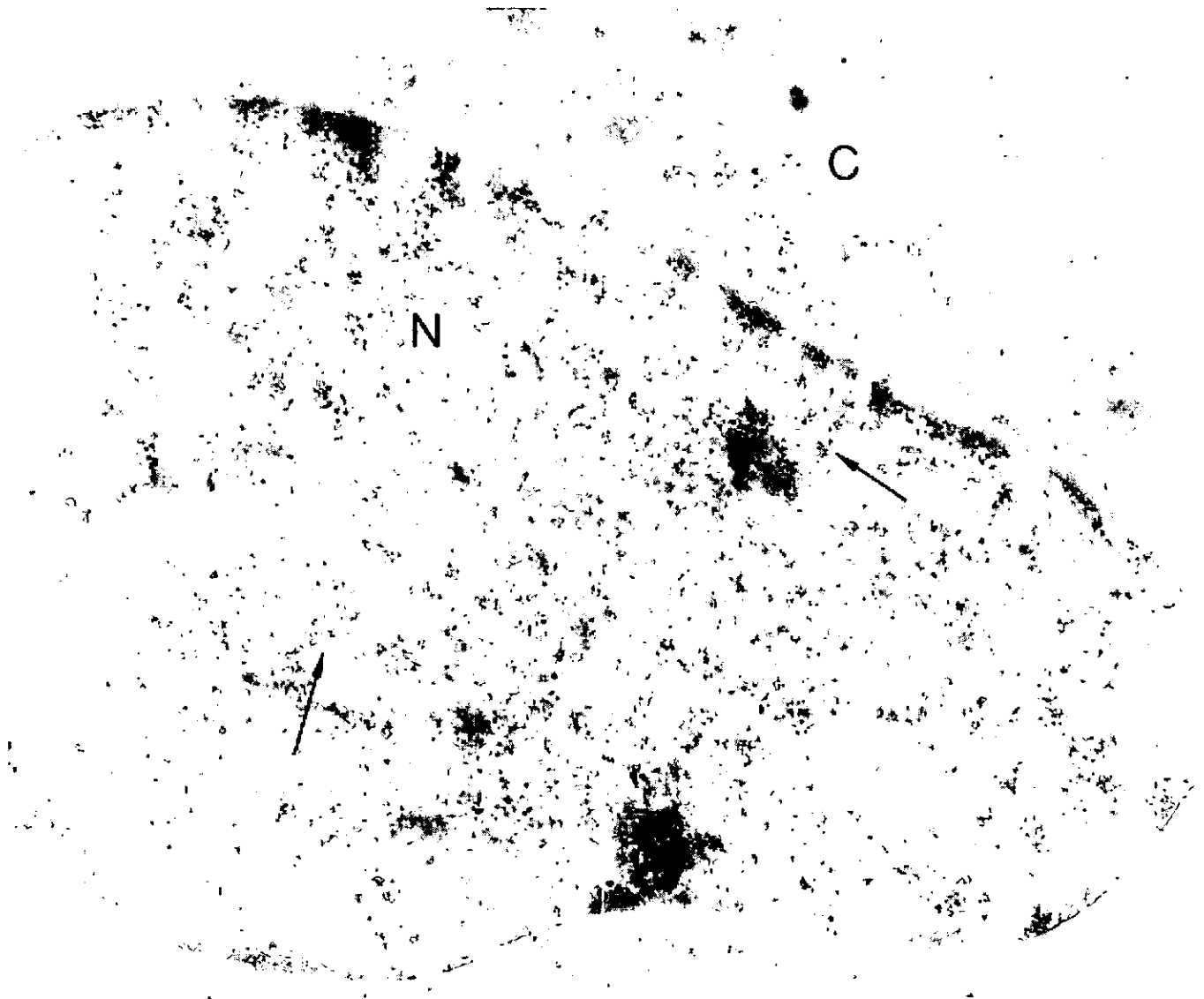
**Fig 5.- Núcleo (N) de células tecales marcadas con el anticuerpo policlonal 14A unido a GAR G15. La marca (→) se observa preferencialmente en la periferia de la cromatina compacta. Citoplasma (C) Nucleolo (Nu). Contraste Ur-Pb. 28.750 x.**



**Fig 6.- Ovocito marcado con anticuerpo policlonal AT3A unido a GAR G15. Donde la marca (→) se encuentra asociada a las fibras intercromatinianas o cromatina laxa. Contraste Ur-Pb. 22.500 x.**

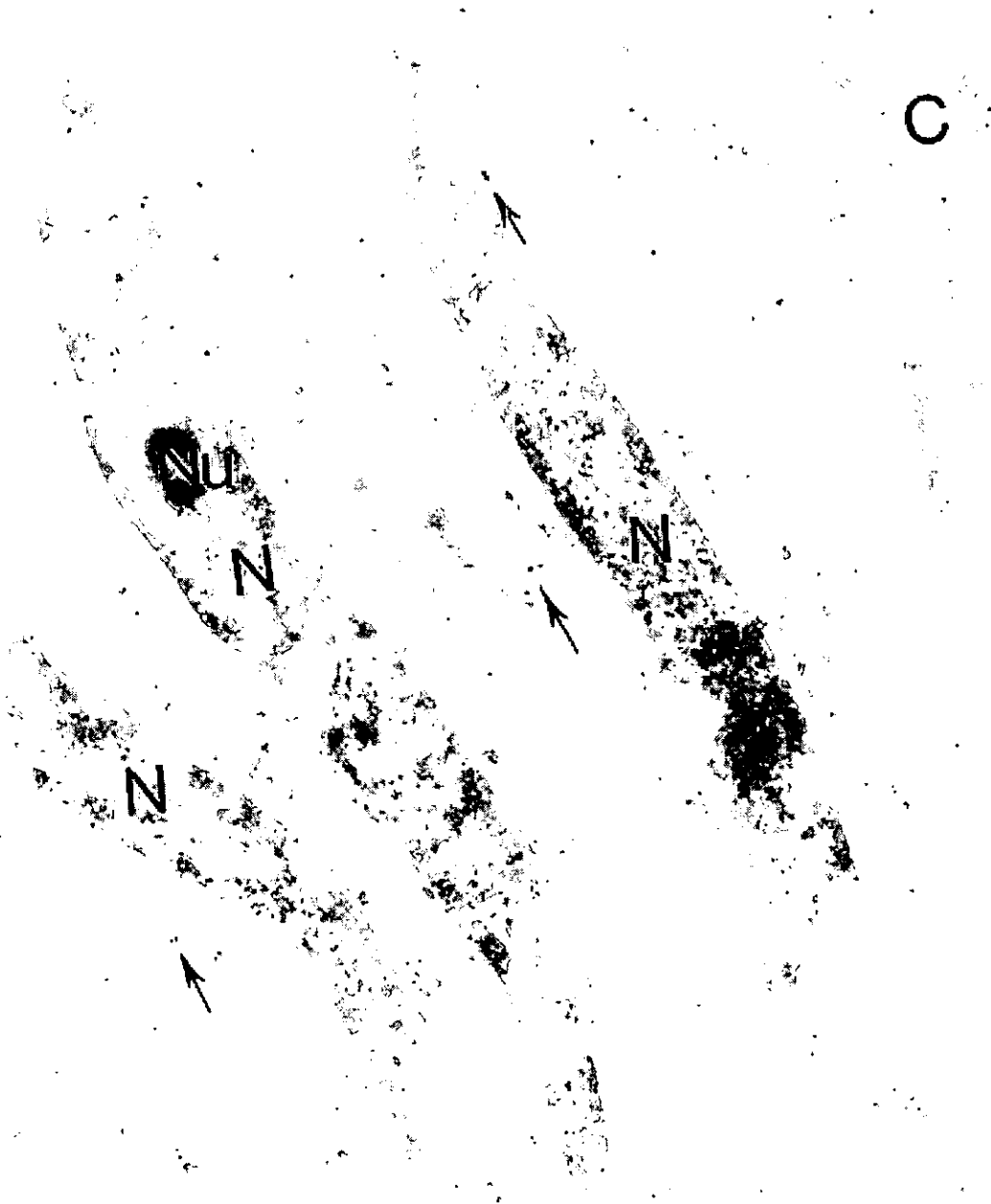


**Fig 7.- Ovocito atrésico de un folículo con antro marcado (→) con anticuerpo policlonal AT3A unido a GAR G15. Contraste Ur-Pb.45.000 x.**



**Fig 8.- Núcleo de una célula glandular uterina (N) marcada con anticuerpo policlonal AT3A y GAR G15. La marca (→) se encuentra preferencialmente en la cromatina laxa y en menor cantidad en cromatina compacta. El Citoplasma (C) presenta pocos granos de oro. Cumulos de cromatina compacta se localizan en la periferia del núcleo principalmente. Constraste Ur-Pb. 28.750 x.**





**Fig 9.- Fibroblasto de ovario marcado con anticuerpo policlonal 14A. La marca (→) se aprecia principalmente en el Citoplasma (C) Núcleo (N) y Nucleolo (Nu). Contraste Ur-Pb. 28.750 x.**

## VI. DISCUSIÓN.

Los resultados demuestran que los ovocitos, las células foliculares y tecaes de folículos primordiales y en crecimiento, sin o con antro, poseen receptores a estradiol.

A pesar de que no se obtuvieron suficientes fotografías de cada tipo celular en las diferentes etapas del ciclo vital de los folículos como para analizarlas estadísticamente, es evidente que la marca se acumuló más densamente en los núcleos que en los citoplasmas de todas las células observadas, salvo los fibroblastos.

Estos datos están de acuerdo a los hallazgos anteriores de la distribución del receptor a estradiol en células uterinas (Vázquez-Nin *et al* 1991) y en otros órganos del aparato reproductor femenino y masculino, así como también en órganos no reproductores (Echeverría *et al* 1994).

En los folículos atrésicos que se estudiaron, la cantidad de receptor en los núcleos, de los ovocitos de las células foliculares localizado fue menor, que en folículos en crecimiento y antrales, esto no resulta sorprendente ya que los folículos atrésicos entran a un proceso de muerte celular (apoptosis) (Hakuno, 1996).

La falta de receptor a estrógenos se asocia a la incapacidad de las células foliculares atrésicas para responder a estrógenos formando nuevos receptores, en una acción reconocida como autócrina (Chalbos *et al* 1994).

La presencia de receptores a estrógenos que se demuestra en este trabajo, en células tecaes no ha sido señalado en trabajos anteriores. El presente es el primero que identifica a la célula tecal como un blanco de estrógenos. Los efectos de los estrógenos sobre las células tecaes se desconocen.

La densidad de marca puede variar debido a que la fijación con paraformaldehído no produce una buena estabilización de las proteínas, lo que a su vez causa una conservación sub-óptima de las estructuras y abre la posibilidad a una pérdida parcial de moléculas de receptor. Sin embargo, considerando la escasa concentración del receptor a estradiol se estima que el marcado obtenido en este trabajo fue adecuado. Los anticuerpos utilizados están desarrollados para reaccionar con un dominio de la proteína receptora altamente conservada, por lo que está presente en todas las variantes del receptor.

El anticuerpo policlonal AT3A produjo siempre mayores intensidades de marcado que el policlonal 14A. Los policlonales son familia de anticuerpos que reconocen diferentes zonas de la molécula del receptor, el conjunto de ellos reconoce con mucho más facilidad las partes de la molécula del receptor expuesta en la superficie del corte. Como los métodos de preparación producen una

desnaturalización parcial de la proteína antigénica, si la región del epítopo está alterada, el anticuerpo monoclonal ya no la reconoce, en cambio un policlonal puede unirse a varias zonas de la proteína y por lo tanto tiene mayores posibilidades de localizarla.

En el presente trabajo se detectaron por inmunolocalización los receptores a estrógenos, sin embargo, cabría la posibilidad que el método a pesar de su alta sensibilidad no evidencie la totalidad de receptores presentes en diversos tipos y compartimientos celulares. Este planteamiento surge de datos aportados por Traish y Pavao (1996) en los que mencionan que a nivel del receptor puede haber cambios conformacionales, que afectan su afinidad por el anticuerpo cuando alguno de sus dominios está ocupado. En nuestro caso sabemos que el anticuerpo AT3A está dirigido a una región del receptor denominada péptido 3 la cual podría modificarse si el sitio de unión está vacío u ocupado. Por lo tanto si en una célula hay receptores ocupados y desocupados, la región 3 podría ser detectada por el AT3A o bien pasar desapercibida. Esto se desconoce ya que esta región del receptor no se ha estudiado en relación a los posibles cambios conformacionales. Si nos basamos en el dato que la traslocación del receptor del citoplasma al núcleo implica cambios conformacionales, esto quiere decir, que los anticuerpos que utilizamos son capaces de detectar al receptor con cambios o sin ellos, y esto explica que simultáneamente se halla podido detectar marca en citoplasma y núcleo.

## **VII. CONCLUSIONES.**

- Se observó a nivel nuclear y citoplasmático los receptores a estrógenos en diferentes etapas de desarrollo folicular (células: foliculares, tecaes y ovocitos).
- Se obtuvo mayor número de grano en el núcleo que en el citoplasma en células foliculares con antro y sin antro.
- En células tecaes encontramos receptores a estrógenos en núcleo y la marca es menor que en células foliculares.
- En ovocito en crecimiento existe una mayor marca, que en ovocito en atresia.
- De los anticuerpos que usamos el anticuerpo policlonal AT3A nos dió mayor densidad de marca que el policlonal 14A.

## VIII. BIBLIOGRAFÍA.

**ALBERTS, B. D. BRAY, D. LEWIS, J. RALFF, M. ROBERTS, K. Y J. D. WATSON** (1989). *Molecular Biology of the Cell*. Garland Pub. Co. 2 edición.

**ALBERTS, B. D. BRAY, J. LEWIS, M. RAFF, K. ROBERTS AND J. D. WATSON.** (1994). *Molecular biology of the cell*. 3ª. de. Garland. U.S.A. pp

**AVERS, CH. J.** (1983) *Biología Celular*. 2ª. ed. Grupo Editorial Iberoamericano. pp 386-395.

**BANKS J. W.** (1996) *Histología veterinaria aplicada*. 2a. edición. De. Manual moderno. México. pp 750.

**BAULIEU, E. E.** ( 1991 ) *Mécanisme d Action des Hormones et des Antihormoes Stéroïdes : une mine-revue Portant Sur Les Protéins Associées En Liant Pas Les Stéroïdes*. C. R. Soc. Biol., 185: 384-390.

**BEEKMAN, J. M. ALLAN, G. F. TSAI, S. Y. TSAI, M. J. AND B. W. O( MALLEY.** (1993) *Trancricional Activation by The Estrogen Receptor Requires Conformational Change in The Lingand Binding Domain Mol Endocrinal*. 7: 1266-1274.

**BEREZNEY, R. AND D. S. COFFEY.** (1977) *Nuclear Matrix: Insolation and Characterization of Frmework From Rat Liver Nuclei*. J. Cell Biol. 73:616-637.

**BJERSING, L.** (1978). *Maturation, Morphology and Endocrine Function of Follicular Wall in Mammals*. In R. J. Jones (de): *The Vertebrate Ovary*. New York: Plenum Press, pp 853.

**BRINKMANN, A. O.** (1994). *Steroid Hormone Receptors: Activators of Gene Transcription*. Freund Publishing house Ltd. Vol.7(4): 275-282.

**BOZZOLA, L. L. AND L. D. RUSSELL,** (1992). *Electron Microscopy Principles and Technique for Biologists* Published in the U.S.A. by Jones and Bartlett.

**CHALBOS, D. PHILIPS, A. Y H. ROCHEFORT,** (1994). *Genomic Cross-Talk Between the Estrogen Receptor and Growth Factor Regulatory Pathways in Estrogen Target Tissues*. *Semin Cancer Biol*. 5: 361-368.

**CLARK, J. H. AND B. M. MARKAYERICH.** ( 1998 ) *Actions of Ovarian Steroid Homones. The Phisiolgy of Reproduccion* edited by E. Knobit and J. Neill Raven Press. Ltd., New York. pp. 675-712.

**DE POMERAI, D.** ( 1990 ) *From Gene To Animal*. 2ª. ed. Cambridge. pp 417.

- DE ROBERTIS, E. D. P. Y E. M. F. DE ROBERTIS.** (1983). *Biología Celular y molecular*. 10ª. ed. El Ateneo. Argentina. pp
- DE ROBERTIS, E. D. P. HIB, J. y R. PONZIO.** (1996 ). *Biología Celular y Molecular*. 12ª. ed. El Ateneo. Argentina. pp.295-296.
- DREYFUSS, G.** (1986) Structure and Function of Nuclear an Cytoplasmic Ribonucleoprotein Particles. *Annu. Rev. Cell. Biol.* 2: 459-498.
- ECHEVERRÍA, O. M. GONZÁLEZ MACIEL, A. TRAISH, M. A. WOTIZ, H. H. UBALDO, E. AND VÁZQUEZ-NIN G.H.** (1994) Inmuno-Electron Microscopic Localization of Estradiol Receptor in Cell of Male And Female Reproductive And Non-Reproductive Organs. *J. Cell Biol.* 81: 257-265.
- ECHEVERRÍA, O. M. VAZQUEZ NIN G.H.** (1995) El núcleo celular interfásico. 1a. Edición. Facultad de Ciencias. UNAM, México.
- FAKAN, S. E. AND W. BERNHARD.** (1973) Nuclear Labelling After Prolonged H3 Uridine Incorporation As Visualized By High-Resolution Autoradiography. *Exptl. Cell Res.* 79: 431-444.
- FAKAN, S. LESSER, G. AND T. E. MARTIN.** (1984) Ultrastructural Distribution of Nuclear Ribonucleoproteins As Visualizad By Inmunicytochemistry of Thin Sections. *J. Cell Biol.* 98: 358-363.
- FAKAN, S. AND E. PUVION.** (1980) The Ultrastructural Visualization of Nucleolar and Extranucleolar RNA Synthesis and Distribution. *Int. Rev. Citol.* 65: 255-269.
- FAWCETT, D. W.** (1987) *Tratado de Histología*. Interamericana Mc Graw-Hill. España. pp.1026.
- FERRARO, A. EUFEMI, M. CERVONI, L. ALTIERI, F. AND C. TURANO.** (1995). Protein- DNA Interactions at the Nuclear Scaffold Attachment Regions of DNA Loops. *Physiol. Chem. Phys.& Med.* 27: 313-320.
- FELDHERR, C. M. KALLENBACH, E. AND N. SCHULTZ.** (1984) Movement of A Karyophilic Protein Through The Nuclear Pores of Oocytes. *J. Cell. Biol.* 99: 2216-2222.
- GORE-LANGTON, R. E. AND D. T. ARMSTRONG.** ( 1988). Follicular Steroidogenesis and Its Control. *The Phisiology of Reproduction*. Vol. 1 Raven Press N.Y. pp 331-369.
- HAKUNO, N.** (1996) FAS-APO-1/cd 95. System as a Mediator of Granulosa Cell Apotosis in Ovarian Follicle Atresia. *Endocrinology* 137. 5: 1938-1948.

- HAYATT, A. D.** (1989). In Colloidal gold: Principles, Methods, and Applications. Vol. 2. pp 19-31. Academic Press, London.
- HALL, P. F.** (1985). Cytochrome P-450: Physiology of Steroidogenesis. *Annal. NY. Acad. Sci.* 458:203-215.
- HALL, P. F.** (1988) Testicular Steroid Synthesis: Organization and Regulation. Knobil, E. Neill, J. D. Ewin, L. L. Greenwald, G. S. Market, C. L. Pfaff, D.W. (eds). *The Physiology of Reproduction*. Vol. 1 Raven Press N.Y. pp.975-978.
- HERSKOWITZ, I. H.** (1987) *Principios de Genética*. 1ª.ed. Compañía Editorial Continental, S. A. pp.103-116
- JIMÉNEZ- GARCÍA, L. F.** (1988) El Nucleolo: Relación Entre la Distribución Especial de Ácidos Nucleicos y Proteínas. Tesis Doctoral Biología. Facultad de Ciencias. U.N.A.M. México.
- JIMÉNEZ-GARCÍA, L. F. ELIZUNDÍA, J. M. LÓPEZ-ZAMORANO, B. MACIEL, A. ZAVALA, G. ECHEVERRÍA, O. M. AND G. H. VÁZQUEZ-NIN.** (1989) Implications for Evolution of Nuclear Structures of Animals, Plants, Fungi and Protoctists. *Biosystems*. 22:106-108.
- JIMÉNEZ- GARCÍA, L. F. Y M. DE L. SEGURA-VALDEZ.** El origen y la Evolución del Núcleo Celular. Un Enfoque Ultraestructural de la Evolución del Procesamiento Postranscripcional del ARN Premensajero. 155-174. En: Núñez-Farfán J. y C. Cordero. 1993. *Tópicos de Biología Evolutiva Diversidad y Adaptación*. Centro de Ecología. U.N.A.M. México. pp 183.
- KATZENELLENBOGEN, J. A. AND B. S. KATZENELLENBOGEN.** (1996) Nuclear Hormone Receptors: Ligand-Activated Regulators of Transcription and Diverse Cell Responses. *Chemistry & Biology* 3: 529-553.
- KLOCK, G. STRAHLE, V. AND G. SHUTZ.** (1987) Estrogen and Glucocorticoid Responsive Elements are Closly Related but Distinct Nature. *329: 734-736.*
- LESSER, G. P. FAKAN, S. AND M. E. TERENCE.** ( 1989 ) Ultrastructural Distribution of Ribonucleoprotein Complexes During Mitosis. SnRNP Antigens are Contained in Mitotic Granules Clusters. *Eur. J. Cell Biol.* 50: 376-389.
- LEWIN, B.** (1994) *Genes V.* Oxford University Press. pp.
- LIEHR, J. G.** (1990) Genotoxic Effects of Estrogens. *Mutation Research.* 238:269-276.
- LINDSAY, R.** (1993) Pathogenesis of Osteoporosis *Lancet* 341:707.

- LIPSHULTZ, L. Y. AND S. S. HOWARDS.** (1991) Infertility in The Male. 2ª. Mosby-Year Book. pp. 37-53.
- MARTÍNEZ, H. A.** (1979) Inmunohistoquímica en Microscopía Electrónica. Investigación y Ciencia edición en Español de Scientific American. 32:102-108.
- MÉNDEZ HERRERA M. DEL C.** (1996) Efecto de los Estrógenos en el Desarrollo del Ovario. Tesis De Doctorado. Facultad de Ciencias. U. N. A. M.
- MONNERON, A. AND W. BERNHARD.** (1969) Fine Structural Organization of the Interphase Nucleus in Some Mammalian Cells. J. Ultrastruct. Res. 27: 266-288.
- MORENO DÍAZ DE LA ESPINA, S., MÍNQUEZ, A., VÁZQUEZ-NIN G.H. AND ECHEVERRÍA O.M.** (1992). Fine Structural Organization of a Non-Reticulate Plant Cell Nucleus. An Ultracytochemical and Immunocytochemical Study. Chromosoma. 101: 311-321.
- MOSELMAN, S. POLMAN, J. AND R. DIJKEMA.** (1996). ERβ: Identification and Characterization of a Novel Human Estrogen Receptor. FEBS Letters 392: 49-53.
- MUSGROVE, E. A. AND R. L. SUTHERLAND.** (1994) Cell Cycle Control By Steroid Hormones. Cancer Biology. 5: 381-389.
- NARDOZZA, T. A. QUIQLEY, M. M. AND R. H. GETZENBERG.** (1996). Association of Transcription Factors With the Nuclear Matrix. Journal of Cellular Biochemistry. 61: 467-477.
- O' MALLEY, B. W. AND C. A. STROTT.** (1993) Hormonas Esteroides: Metabolismo y Mecanismo de Acción. En Endocrinología de la Reproducción. y en SC y Jaffe RB Editores 3ª. ed. Editorial Médica Panamericana.
- PEDERNERA, E. A.** (1993). Cooperación Celular en la Biosíntesis de Hormonas esteroides. En: Carmen Clapp, Gonzalo M. de la Escalera (Eds). Comunicación Neuroendócrina. Bases Celulares y Moleculares. México. Sociedad Mexicana de Ciencias Fisiológicas A. C., Consejo Nacional de Ciencia y Tecnología, Secretaria de Educación Pública. pp 33-46.
- RALFF, C. J. RIBEIRO, M. D. KUSHNER, P. J. PH. D., AND J. D. BAXTER, M. D.** (1995) The Nuclear Hormone Receptor Gene Superfamily. Annu Rew Med. 46: 443-453.
- RICHARDS, J. S.** (1980) Maturation of Ovarian Follicles: Actions and Interactions of Pituitary and Ovarian Hormones on Follicular Cell Differentiation. Physiological Reviews 60: 51-89.



**RICHARDS, J. S. AND A. R. J. MIDGLEY.** (1976) Protein Hormone action: A key to Understanding Ovarian Follicular and Luteal Cell Development. *Biology of Reproductive* 14: 82-94

**RISEK, B. KLIER, F. G. PHILLIPS, A. HAHN, D. W. AND N. B. GILULA.** (1995) Gap Junction Regulation in The Uterus And Ovaries of Immature Rats By Estrogen And Progesterone. *Journal of Cell Science.* 108: 1017-1032.

**SASS, H. AND T. PEDERSON.** (1984) Transcription dependent Localization of U1 and U2 Small Nuclear Ribonucleoprotein at Major Sites of Gene Activity in Polytene Chromosomes. *J. Mol. Biol.* 180: 911-926.

**SAATCIOGLU, F. CLARET, F. X. AND M. KARIN.** (1994) Negative Transcriptional Regulation By Nuclear Receptors. *Cancer Biology.* 5: 347-359.

**SEGURA VALDÉZ, M DE L.** (1996) Disección Molecular del Nucléolo in situ: Visualización de Ácidos Nucleicos Nucleolares por Hibridación in situ Fluorescente y Ultraestructural. Tesis Doctoral, Biología, Fac. de Ciencias. U. N. A. M. México.

**SHAW, P. J. Y E. G. JORDAN** (1995) The Nucleolus. *Annu. Rev. Cell Dev. Biol.* 11:93-121.

**SHUGHRUE, P. J. KOMM, B. AND I. MERCHENTHALER.** (1996) The Distribution of Estrogen Receptor- $\beta$  mRNA in the Rat Hypothalamus. Elsevier Science Inc. 61: 678-681.

**SPEROFF, L.** (1983) Menopause. *Semin Reprod Endocrinol.* 1:1.

**TRAISH, A. KIM, N. AND H. H. WOTIZ.** (1989) Characterization of Polyclonal Antibodies to Preselected Domains of the Human Estrogen Receptor. *Endocrinology* 125: 172-179.

**TRAISH, A. M. AND M. PAVAO.** (1996) Binding of Site-Directed Monoclonal Antibodies To An Epitope Located in the A/B Region (Amino Acids 140-154) of Human Estrogen Receptor-Induced Conformational Changes in an Epitope in The DNA-Binding Domain. 61:549-556.

**TUOHIMAA, P. BLÄUER, M. PASANEN, S. PASSINEN, S. PEKKI, A. PUNNONEN, R. SYVÄLÄ, H. VALKILA, J. WALLÉN, M. VÄLIAHO, J. ZHUANG, AND T. YLIKOMI.** (1996) Mechanisms of Action of Sex Steroid Hormones: Basic Concepts And Clinical Correlations. Elsevier Science Ireland Ltd. *Maturitas* 23: 3-12.

**VÁZQUEZ-NIN, G. H. AND W. BERNHARD.** (1971) Comparative Ultraestructural Study of Perichromatin and Balbiani in Granules. *J. Ultrastruc. Res.* 36: 842-860.

**VÁZQUEZ-NIN, G. H. ORTEGA-RANGEL J. A. ECHEVERRÍA, O. M. PARRA, M.R. AND L. F. JIMÉNEZ-GARCÍA.** (1983) Changes in the Nuclear Ribonucleoprotein Constituents and Chromatin Disposition During neuronal Differentiation and Maturation. *Biol. Cell.* 48:17-24.

**VÁZQUEZ-NIN, G. H. ECHEVERRÍA, O. M. ZAVALA, G. JIMÉNEZ GARCÍA, L. F. GONZÁLEZ, M. A. AND R. PARRA.** (1986) Relations Between Nucleolar Morphometric Parameters and Pre-rRNA Synthesis in Animal and Plant Cells. *Acta Anat.* 126:141-146.

**VÁZQUEZ-NIN, G. H. ECHEVERRÍA, O. M. FAKAN, S. TRAIISH, A. M.. WORTIZ, H. H. AND T. E. MARTIN.** (1991) Immunoelectron Microscopic Localization of Estrogen Receptor on Pre-mRNA Containing of Rat Uterine Cell Nuclei. *Experimental Cell Research.* 192: 396-404.

**WATSON, M. L.** (1962). Observations on a Granule Associated with Chromatin in the Nuclear of Cells of Rat and Mouse *J. Cell Biol.* 13: 162-167.

**WEIR, B. J. AND I. W. ROWLANDS.** (1977). Ovulation and Atresia. In. P. L. Zuckerman and Wier, B. J. *The Ovary.* London: Academic Press. pp.517.

**WEN XUAN WU, MD. PHD, DEAN A. MYERS, PHD, AND PETER W. NATHANIELSZ, MD. PHD, SCD.** (1995) Changes In Estrogen Receptor Messenger Ribonucleic Acid In Sheep Fetal And Maternal Tissues During Late Gestation And Labor. *Am J Obstet Gynecol.* 172 (3) : 844-850.

**WILLIAMS, J. A.** (1988) Mecanismos de la Secreción, Acción y Respuestas Hormonales. *Endocrinología Básica y Clínica.* . El Manual Moderno, S. A. de C. V. México, D.F. 1-19.

**YAMASHITA, S. NEWBOLD, R. R. McLACHLAN, J. A. AND K. S. KORACH.** (1989) Developmental Pattern of Estrogen Receptor Expression in Female Mouse Genital Tracts. *Endocrinology* 125:2888-2896.

**YONEDA, Y.** (1996) Nuclear Pore-Targeting Complex and Its Role on Nuclear Protein Transport. *Arch. Histol. Cytol.,* 59: 97-107.