



0034 / 2ej

UNIVERSIDAD NACIONAL AUTONOMA DE MEXICO

FACULTAD DE CIENCIAS

DIVISION DE ESTUDIOS DE POSGRADO

EFFECTO DEL 17 β ESTRADIOL SOBRE LA DENSIDAD DE GRANULOS INTERCROMATINIANOS EN RATAS OVARIECTOMIZADAS

T E S I S

QUE PARA OBTENER EL DIPLOMA DE LA ESPECIALIZACION EN MICROSCOPIA ELECTRONICA APLICADA A LAS CIENCIAS BIOLÓGICAS PRESENTA SILVIA JUAREZ CHAVERO

DIRECTORA DE TESIS:

DRA. EN CIENCIAS OLGA MARGARITA ECHEVERRIA MARTINEZ

MEXICO, D. F.

1999

TESIS CON FALLA DE ORIGEN

271732



Universidad Nacional  
Autónoma de México



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

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

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

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

**EFECTO DEL 17  $\beta$  ESTRADIOL SOBRE LA DENSIDAD DE GRÁNULOS  
INTERCROMATINIANOS EN RATAS  
OVARIECTOMIZADAS**

*A todos mis compañeros y profesores del Laboratorio de Microcopia Electrónica de la Facultad de Ciencias de la U.N.A.M., por compartir conmigo su experiencia y conocimientos, mil gracias.*

**Biol. Ernestina Ubaldo**

*Biol. Ernestina Flores*

*Dra. Guadalupe Zavala*

*Biol. Marco Antonio González*

*Biol. Gabriel López*

*Dr. Luis Felipe Jiménez*

*Dr. Gerardo Hebert Vázquez*

*M. en C. Rosario Ortíz*

*M. en C. Lourdes Agredano*

*A mi Madre:  
Con todo mi amor.*

*A Juan por su apoyo.  
A mis hijos Juan Manuel  
y Alma Rosa.*

*A la Dra. Olga M.  
Echeverría Martínez:*

*Por el apoyo, que me  
dió para que este  
trabajo fuera posible.*

# ÍNDICE

## INTRODUCCIÓN

HORMONAS REPRODUCTORAS	4
CICLO ESTRAL	8
ULTRAESTRUCTURA DEL NÚCLEO EN INTERFASE	9
ENVOLTURA NUCLEAR	9
LÁMINA NUCLEAR	10
CROMATINA	10
ESTRUCTURAS RIBONUCLEOPROTEICAS	10
GRÁNULOS INTERCROMATINIANOS	11
GRÁNULOS PERICROMATINIANOS	14
FIBRAS PERICROMATINIANAS	14
CUERPOS NUCLEARES	15
NUCLEOLO	15
A) COMPONENTE FIBRILAR DENSO	15
B) CENTROS FIBRILARES	15
C) ÁREA GRANULAR O COMPONENTE GRANULAR	15
D) CROMATINA NUCLEOLAR	15
OBJETIVO	17
MATERIAL Y MÉTODOS	17
FIJACIÓN	18
DESHIDRATACIÓN	18
PREINCLUSIÓN	19
INCLUSIÓN	19
CORTE	19
CONTRASTE	20
TOMA DE IMÁGENES	20

RESULTADOS	23
DESCRIPCIÓN MORFOLÓGICA	23
DESCRIPCIÓN MORFOMÉTRICA	23
TABLA 1	28
TABLA 2	29
GRÁFICA 1	30
DISCUSIÓN	31-33
CONCLUSIONES	34
BIBLIOGRAFÍA	35-38

## RESUMEN

Los gránulos intercromatinianos son estructuras ribonucleoproteicas que contienen factores de splicing, los cuales juegan un papel muy importante en la maduración de los RNA mensajeros. Estos factores se han clasificado como U1, U2, U4, U5, U6. por tener una gran cantidad de uridina. En microscopia electronica los gránulos intercromatinianos se contrastan con la técnica preferencial de Bernhard, (1969). Se encuentran en los núcleos interfásicos en cúmulos de gránulos y de manera dispersa.

La maduración y almacenamiento de los RNA mensajeros han sido estudiados en tejidos normales, de ratas ovariectomizadas, y ovariectomizadas con tratamiento de  $17\beta$  estradiol y en células en cultivo. En estos trabajos se han encontrado cambios en los procesos antes mencionados. Los gránulos intercromatinianos no han sido cuantificados en estas condiciones a pesar de que es bien sabido que contienen a los factores que intervienen en la maduración de los RNA mensajeros. Este es el principal motivo que llevó a la realización de este trabajo.

Se trabajó con un grupo de 12 ratas de tres meses de edad aproximadamente. A tres de las ellas, no se les aplicó ningún tratamiento. Las 9 ratas restantes se ovariectomizaron y así permanecieron durante 21 días. Al término de este tiempo, a tres de las ratas ovariectomizadas se les inyectó 1 ml de  $17\beta$  estradiol en una concentración de  $20\ \mu\text{g/ml}$  por rata, durante 30 minutos y a otras tres ratas ovariectomizadas por un periodo de 2 horas. Una vez hecho esto, se procedió a sacrificar a las doce ratas. Se tomó la parte media de los cuernos uterinos de cada una de las ratas y se procesaron para microscopia electrónica. Se fijaron con glutaraldehído 2.5 % en amortiguador de fosfatos 0.16 M a pH 7.2, después se lavaron con amortiguador, el mismo que se utilizó para la fijación, se deshidrataron con alcoholes graduales, se utilizó como agente intermediario el óxido de propileno y se hizo una preinclusión, óxido de propileno-resina con una concentración 2:1,1:1 y 1:2, seguida de una inclusión en resina epóxica.

Se procedió a obtener cortes semifinos y posteriormente ultrafinos. Estos últimos se contrastaron con la técnica regresiva para RNP (EDTA Bernhard, 1969)). Una vez obtenidas las preparaciones, se observaron en un microscopio Zeiss EM10 y se grabaron 30 imágenes de núcleos de células epiteliales por cada rata, las cuales se llevaron a un sistema de cómputo, que tiene el programa Imagenia 5000 de Biocom, por medio del cual se puede determinar la densidad de gránulos intercromatinianos por micra cuadrada.

Se compararon los datos de los diferentes grupos aplicando la prueba estadística de T, la cual nos permitió determinar que se trataba de poblaciones diferentes.

Se encontró que existe una disminución en la densidad de los gránulos intercromatinianos en las ratas ovariectomizadas con respecto de las normales. Con la aplicación de  $17\beta$  estradiol en ratas ovariectomizadas durante media hora y dos horas se observó un aumento en la densidad numérica de los gránulos intercromatinianos con respecto de las ratas únicamente ovariectomizadas, pero no alcanzó el valor de la densidad numérica de las ratas normales.

Por lo tanto la densidad de gránulos intercromatinianos es modificada por la adición o supresión de la hormona  $17\beta$  estradiol. La supresión de la hormona provoca una disminución de la densidad numérica de gránulos intercromatinianos y la administración de la misma un aumento de su número.

## INTRODUCCIÓN

### HORMONAS REPRODUCTORAS

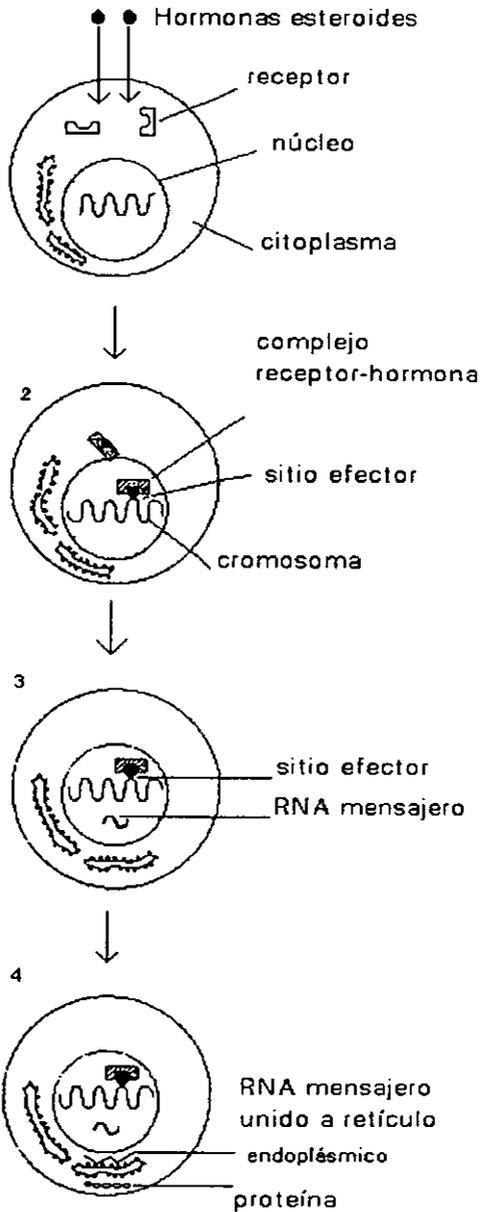
Las hormonas son sustancias químicas secretadas por las glándulas endocrinas que inducen el crecimiento, la diferenciación y/o la alteración de la actividad metabólica de las células que forman a los seres vivos, después de ser sintetizadas se vierten al torrente sanguíneo, para ser transportadas hasta las células del órgano blanco, las cuales serán reguladas. La captación de una hormona del torrente sanguíneo y su conservación en un tejido, se limita a órganos que contienen receptores específicos para dicha hormona, por ejemplo, la membrana celular y el núcleo de las células del endometrio, contienen una proteína que actúa como receptor y se liga al  $17\beta$  estradiol, de modo que aunque tenga efectos generalizados en todo el cuerpo se concentra en el útero, (Esquema 1 y 2), (Harvey, 1979)

Las hormonas pueden clasificarse en tres grupos de acuerdo a su estructura química, (Austin y Short, 1982):

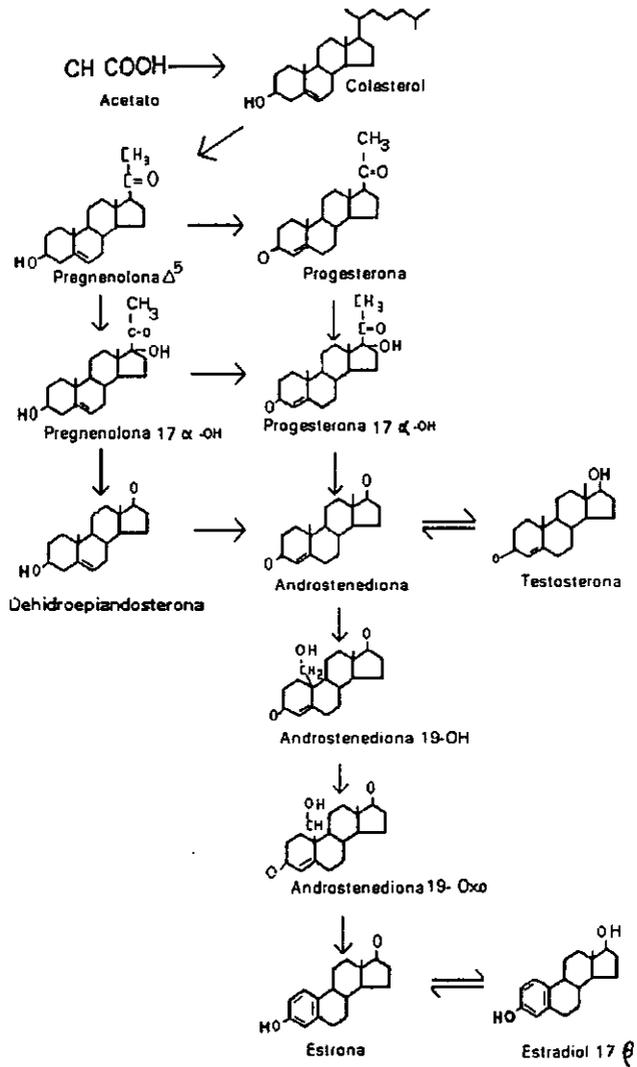
- a).- Hormonas derivadas de colesterol
- b).- Hormonas derivadas de aminoácidos
- c).- Hormonas de naturaleza peptídica.

Las hormonas esteroideas se derivan del colesterol (Esquema 3), son secretadas por la glándula adrenal y por las gonadas, entre estas se encuentra los estrógenos secretados por el cuerpo lúteo y la hormona  $17\beta$  estradiol por las células tecaes que forman parte del óvulo. (Harvey, 1979).





Esquema 2 Respuesta celular a la hormona esteroide (tomado de Harvey, 1979)



Esquema 3.- Principales vías de la biosíntesis de los andrógenos, de los estrógenos y de la progesterona a partir del colesterol (tomado de Austin y Short, 1982)

Desde 1958, se determinó que la administración de estradiol en ratas origina un incremento en la tasa de síntesis, de RNA así como de proteínas. Cuando a conejas ovariectomizadas se les inyecta  $17\beta$  estradiol se estimula la síntesis de proteínas (Harvey, 1979, Malkinson, 1980). Otros estudios han demostrado que el estradiol induce la transcripción de ARN (Beato, 1989; Milan y col. 1992), y tiene un efecto postranscripcional que consiste en la inducción de la salida de los ARN mensajeros al citoplasma (Vázquez Nin y col. 1978, Vázquez Nin y col. 1979). Estudios macroscópicos han demostrado que los estrógenos tienen influencia directa sobre el crecimiento y el peso del útero, (Austin y Short 1982).

### **CICLO ESTRAL DE LA RATA**

Las ratas presentan un ciclo estral de 4 días y su ovulación es espontánea, los cuerpos lúteos que se forman después de la ovulación nunca son funcionales, pero, si hay copula, se estimula el desarrollo de un cuerpo lúteo funcional y entonces la rata tiene una preñez o una pseudopreñez, dependiendo de que la copulación haya sido fértil o no. Toda la cronología del ciclo estral se determina con base al ritmo diurno, la ovulación siempre se presenta poco después de la media noche. Un día antes de que la rata entre en celo, en la mañana del proestro, la secreción del  $17\beta$  estradiol de los folículos De Graaf que se encuentran en desarrollo alcanza su valor máximo. Esto desencadena un incremento en la secreción del cuerpo lúteo de progesterona durante la tarde del proestro y la ovulación se presenta en las primeras horas de la mañana siguiente, (Austin y Short, 1982). La liberación de  $17\beta$  estradiol estimula la proliferación del endometrio y el aumento de LH en el torrente sanguíneo e inhibe la producción del factor liberador de gonadotropinas por el hipotálamo. Durante el ciclo estral se han estudiado los cambios nucleares de las células epiteliales endometriales tanto glandulares como luminales, utilizando el método preferencial para ribonucleoproteínas (EDTA) (Bernhard, 1969), el cual contrasta las estructuras ribonucleoproteicas. Se encontró que el volumen del núcleo se incrementa y los gránulos pericromatinianos disminuyen en proestro, en este día los niveles de estradiol tienen un máximo en la sangre. En la etapa de diestro cuando el estradiol tiene niveles bajos, los núcleos son de pequeños tamaños y los gránulos son abundantes. (Echeverría y col. 1980). Los efectos de  $17\beta$  estradiol sobre las células epiteliales del endometrio de la rata, también han sido estudiados en cultivo de tejidos con la técnica de autorradiografía, en la que se

demostró que con una alta estimulación hormonal se observa, la incorporación de <sup>3</sup>H-uridina en el nucleolo, así como en el área extranucleolar. Con estos experimentos se demostró que la hormona influye en el incremento de la transcripción y transporte del ARN al citoplasma. (Vázquez Nin y col 1979)

## ULTRAESTRUCTURA DEL NÚCLEO EN INTERFASE

La interfase es el periodo del ciclo celular, en que las células no están dividiéndose y no suceden cambios visibles con el microscopio óptico, pero existe gran actividad metabólica, (Echeverría y Vázquez Nin 1995). El núcleo en esta etapa es el organelo mas grande en las células eucariontes, mide entre 5 y 10 µm de diámetro, (Echeverría y Vázquez Nin, 1995).

### **Envoltura nuclear**

El núcleo es el sitio que sirve como deposito del material genético de las células eucariontes, este material genético se encuentra rodeado por una doble membrana denominada envoltura nuclear, que juega un papel importante en la regulación del intercambio nucleocitoplasmico, de moléculas y complejos macromoleculares, y sirve como sitio de anclaje para la cromatina en la etapa de interfase. La membrana externa es continua con el reticulo endoplasmico y muy frecuentemente posee ribosomas en su superficie, los cuales están involucrados en la síntesis de proteínas. La membrana nuclear interna está unida a la lámina nuclear y a la cromatina, el espacio entre las dos membranas se le conoce como espacio perinuclear, y es directamente continuo con el lumen del reticulo endoplasmico, la membrana nuclear externa y la interna son fusionadas en diferentes puntos, formando los poros nucleares. Estos poros están ocupados por complejos macromoleculares ensamblados, denominados complejos de poro nucleares (NPC), los cuales controlan el pasaje de moléculas dentro y fuera del núcleo, su número varía entre diferentes tipos celulares, su diámetro es de 120 nm., su simetría es octagonal rodeando un eje central, el cual es

perpendicular al plano de la membrana nuclear. Se ha propuesto que existe el paso de proteínas y RNAs entre el núcleo y el citoplasma por medio de los poros nucleares, (Spector, 1993)

### **Lámina nuclear.**

Se encuentra entre la membrana interna de la envoltura nuclear y la cromatina perinucleolar, es una capa electrodensa de 10 nm., que contiene polipéptidos. Esta formada por filamentos de 10 nm de diámetro orientados ortogonalmente, se ha propuesto que la lámina nuclear puede actuar como un sustrato para la formación de complejos de replicación, o bien, que puede regular la condensación del DNA o formación de elementos de la matriz nuclear, los cuales son requeridos para que ocurra una replicación eficiente, además tiene una función estructural en el núcleo. (Spector, 1993)

### **CROMATINA**

La cromatina es el material genético o ADN de las células, se encuentra de dos formas, compacta y dispersa o laxa. La cromatina compacta contiene la información genética que no se transcribe, (Angus, 1998). La cromatina laxa o extendida se clasifica en dos tipos, la constitutiva y la facultativa, la constitutiva es altamente enriquecida en secuencias repetitivas y la función de este tipo de cromatina es desconocida, la facultativa es la cromatina potencialmente activa e involucra la condensación de un cromosoma o un par de cromosomas homólogos, el caso mas conocido es la condensación de un cromosoma X o cuerpo de Barr (Spector, 1993).

### **ESTRUCTURAS RIBONUCLEOPROTEICAS**

Las estructuras formadas por ribonucleoproteínas, están involucradas en el proceso de transcripción y maduración del ARN mensajero, y están formadas por ARN y proteínas (proteínas provenientes del citoplasma celular) (Esquema 4 ),(Monneron y Bernhard, 1969; Vázquez Nin y Echeverría 1996; Fakan, 1980). La transcripción es el proceso por el cual se polimeriza una molécula de ácido ribonucleico (ARN) a partir de nucleótidos que contienen el azúcar ribosa en lugar de la

desoxirribosa del ácido desoxirribonucleico (ADN). Las ARN polimerasas catalizan la formación de los enlaces estéricos entre el ácido fosfórico de un nucleótido y la hidrólisis en posición 3' de la ribosa de otro nucleótido. De esta manera se va formando una molécula de ARN con una secuencia de bases complementaria a la hebra de ADN. Los transcritos primarios de ARN se les denomina ARN heterogéneo nuclear o ARN premensajero, hnRNA o pre-mRNA respectivamente. La nueva molécula de RNA se une a proteínas constituyendo partículas ribonucleoproteicas heterogéneas nucleares (hnRNP), las cuales sufren un proceso de maduración antes de salir del núcleo como RNA mensajero que saldrá al citoplasma hasta los ribosomas, para completar la síntesis de proteínas (Echeverría y col., 1995). Esta maduración consiste en la adición de un capuchón o "cap" en el extremo 5' de la molécula de RNA, la adición de un "cola" de ácido poliadenilico (poli A) en el extremo 3' y el proceso de "splicing", que consiste en la eliminación de secuencias que no codifican para algún aminoácido denominadas intrones, (Jiménez García, 1985). Las ribonucleoproteínas forman estructuras que son visibles al microscopio electrónico las cuales se mencionan a continuación:

**Gránulos intercromatinianos (GIC)**

**Gránulos pericromatinianos (GPC)**

**Fibras pericromatinianas (FPC)**

**Nucleolo.**

**Los gránulos intercromatinianos**

Fueron descritos por primera vez por Swift (1959), aparecen en todas las células animales como grupos distribuidos al azar de partículas de un diámetro de 20 a 25 nm. Las cuales se contrastan con el método preferencial (EDTA) (Bernhard 1969), y con oxinitrato de bismuto (Medina y col., 1989). Estos gránulos están interconectados con fibras y aparecen como cadenas que forman una malla o de red. Estas cadenas están presentes en pequeños fragmentos que parecen estar en contacto con cúmulos de cromatina. (Medina y col. 1989). Se sabe que son sitios de acumulación de partículas de ribonucleoproteínas que contienen ARNs de bajo peso molecular ricos en uridina (snARN-U ), (Spector y col 1983, Puvion y col. 1984), las partículas snRNP se señalan como U1,

U2, U4, U5, U6 y estos contienen una sola especie de snARN. Estas snRNP son esenciales en el proceso de splicing que da como resultado la maduración de los mARNs y se les conoce como factores de "splicing", algunos de los cuales están bien identificados, como el SC-35, SF2. (Spector, 1993; Melka y Raska, 1996). Las ribonucleoproteínas han sido incluidas en un grupo, denominado fosfoproteínas nucleares, por su gran cantidad de fósforo, y además tienen un dominio terminal-carboxilo rico en serina y arginina. En algunos núcleos las snRNP se encuentran organizadas en snurposomas de tres tipos: los snurposomas A, que varían de 1 a 5  $\mu\text{m}$  de diámetro y contienen únicamente U1snRNP, los snurposomas de tipo B, tienen 4  $\mu\text{m}$  de diámetro y contienen U1, U2, U4, U5, U6, y SC-35, y los snurposomas C son los más grandes miden 20  $\mu\text{m}$  de diámetro, y contienen inclusiones granulares. Se cree que los snurposomas de tipo B sean equivalentes a los cúmulos de gránulos intercromatinianos en células de mamíferos. (Spector, 1993; Pombo y Cook, 1996). Se ha propuesto que los cúmulos de gránulos intercromatinianos juegan un papel en el transporte o distribución del RNA mensajero intranuclear y posiblemente que pueden ser un sitio de degradación de moléculas anormales incluyendo los RNA ribosomales ya que han sido detectados en los cúmulos de gránulos intercromatinianos, (Puvion y Puvion, 1996)

### **Proceso postranscripcional del RNA mensajero**

Durante o después de la transcripción de la molécula pre-mRNA, esta sufre un proceso de maduración y después es transportada al citoplasma donde son traducidas en proteínas. Este proceso de maduración, incluye los siguientes pasos, la adición de un 7-metil-guanosina denominado cap en la terminación 5' del hnRNP, "splicing" de intrones, que son regiones que no codifican para alguna proteína y poliadenilación del extremo 3', (Jiménez García 1985; Jiménez-García, y Spector, 1993; Puvion and Puvion, 1996)



Esquema 4.- Estructura del núcleo celular, cromatina (chr), nucleolo (nu), gránulos intercromatinianos,(ig) gránulos pericromatinianos (pg), fibras pericromatinianas (→), cuerpos espiralados (cb), (tomado de Monneron and Bernhard, 1969).

### **Los gránulos pericromatinianos.**

Los GPC están formados por ribonucleoproteínas, (Monneron y Bernhard, 1969). Tienen un diámetro de 30 a 45 nm., están rodeados de un halo claro de 25 nm. se encuentran localizados en la periferia de los cúmulos de cromatina y algunas veces en el área de los GIC, además entre la cromatina que forma canales en dirección a los poros nucleares donde se han visto desaparecer. (Vázquez Nin y Echeverría, 1996). Los GPC se observan electrodensos, cuando se emplea (EDTA), su contraste es incrementado en tanto que la cromatina es blanqueada, esto facilita localizarlos en el área periférica a la cromatina, y revela su ultraestructura, que parece consistir de fibras entrecruzadas de alrededor de 30 A, algunas fibras salen de las partículas. Estos gránulos también se pueden localizar entre la cromatina, o en el área intercromatiniana, en ocasiones, pequeños grupos de GPC se conectan entre sí por fibras, y se ha propuesto que podrían ser sitios de almacenamiento y / o transporte del RNA mensajero (Vázquez Nin y Bernhard, 1971, Vázquez Niny col., 1979; Melcak y Raska, 1996, Pombo y Cook, 1996).

### **Fibras pericromatinianas.**

Fueron descritas por Monneron y Bernhard (1969). Se encuentran rodeando a la cromatina periférica en algunas de sus áreas, las propiedades de contraste de estas fibras son exactamente las mismas de los GIC y las demás estructuras ribonucleoproteicas, su diámetro varía entre 30 y 50 A en ocasiones aparecen plegadas. Algunas son más gruesas y miden alrededor de 200 A En otros casos se observan con conexiones hacia dentro de los gránulos con transiciones visibles que dan continuidad entre los GIC o GPC. (Monneron y Bernhard, 1969). Se ha sugerido que la fibras pericromatinianas pueden representar el RNA heterogéneo (RNA<sub>h</sub>) en proceso de transcripción o recién sintetizado (Fakan y col., 1976), (Puvion y Moyne, 1978). Y son estructuras que contienen fósforo. Se han observado en diferentes grados de enrollamiento que llegan a formar cuerpos irregulares y finalmente forman gránulos esféricos, este proceso es similar al de los gránulos de Balbiani, las fibras pueden emigrar a través del espacio intercromatiniano, desde los sitios de transcripción, se ha propuesto que en estas fibras se realiza el proceso de splicing (Puvion y

Puvion, 1996; Vázquez Nin y Echeverría, 1996), ya que se han localizado factores de splicing como SC-35 cerca de las fibras (Spector 1993), así como las moléculas poli A, U1 y U2, (Spector, 1993, Puvion y Puvion, 1996) y por otra parte se ha sugerido pueden tener un papel más activo en el transporte de RNA mensajero del núcleo al citoplasma (Spector, 1993, Pombo y Cook, 1996).

## **Cuerpos nucleares**

Los cuerpos nucleares son estructuras entre 0.3 y 1.5  $\mu\text{m}$  de diámetro, generalmente se encuentran en núcleos de células malignas o hiperestimuladas, tienen apariencia fibrilar, granular o parecidas a lípidos. Están formados por proteínas y RNA, el cuerpo nuclear más estudiado es el cuerpo espiralado, identificado por Cajal en 1903 como cuerpo accesorio del nucleolo, su estructura es de tipo fibrilar (Spector, 1993). Los cuerpos espiralados, tienen un diámetro de 0.3 a 0.5  $\mu\text{m}$ , están formados por fibras espiraladas, con espesor de 40 a 60 nm, estas fibras son ligeramente teñidas con la técnica de EDTA. A grandes aumentos, los cuerpos espiralados parecen ser manojos de fibras finas de 50 Å de grosor, las cuales están irregularmente entre cruzadas a lo largo del eje de las fibras. No se han observado relaciones topológicas con el nucleolo pero algunas veces se encuentran en continuidad con la cromatina que lo rodea (Monneron y Bernhard, 1969). La DNAsa no tiene ningún efecto visible en los cuerpos espiralados (Monneron y Bernhard, 1969). Se han localizado en las cercanías de los cúmulos de gránulos intercromatinianos (Puvion y Puvion, 1996).

## **Nucleolo**

El nucleolo, no tiene una estructura que lo delimite, pero en animales se encuentra rodeado de cromatina perinucleolar, la cual está conectada con regiones de cromatina intranucleolar de manera continua. El nucleolo es el sitio donde se encuentra el DNA que sirve como molde a partir del cual se sintetizan las moléculas precursoras de los ARN ribosomales. A las regiones donde se transcriben estos RNA que formaran parte de los ribosomas se denominan regiones organizadoras nucleolares

(NOR) en (Jiménez García y col. 1993). Desde el punto de vista estructural, el nucleolo está formado por cuatro áreas en (Spector, 1993).

- a) componente fibrilar denso (DFC)
- b) centros fibrilares (CF)
- c) área granular o componente granular (GC) siendo junto con el componente fibrilar denso las más abundantes) cromatina nucleolar condensada,
- d) cromatina nucleolar

Los centros fibrilares están rodeados, por el componente fibrilar denso, haciéndolos estructuras independientes de los demás componentes nucleolares. En la periferia de los centros fibrilares se encuentra el DNA que forma la región organizadora nucleolar (NOR) (Spector, 1993) Este DNA es matriz de la cual se transcriben las moléculas precursoras de los RNA ribosomales 18 y 28 S, en todas las células animales, vegetales y fúngicas en (Jiménez García, 1988). Trabajos de autorradiografía en microscopía electrónica han revelado que en el componente fibrilar denso y centros fibrilares se realiza la síntesis de RNA ribosomales (Shaw, 1995).

En el componente granular, se encuentran partículas de 15 a 20 nm de diámetro, las cuales corresponden a los RNAs prerribosomales en diversos estados de maduración, así como gran cantidad de proteínas enzimáticas y no enzimáticas, siendo este el sitio específico para la combinación de RNA con las proteínas nucleolares específicas, tales como las argirofilicas, denominadas Ag-NOR. ( Busch, 1977; Vázquez Nin y col. 1993; Hernández-Verdún y col. 1993), el componente granular es el sitio de almacenamiento o acumulación de las moléculas prerribosomales (Spector 1993; Shaw, 1995).

La cromatina nucleolar condensada es transcripcionalmente inactiva, y se encuentra esparcida entre la cromatina laxa (Delgado y col. 1995).

## OBJETIVO

Determinar el efecto de  $17\beta$  estradiol sobre los gránulos intercromatinianos en el núcleo interfásico de las células epiteliales del endometrio de ratas normales, ovariectomizadas y ovariectomizadas con aplicación hormonal durante 30 minutos y dos horas

## MATERIAL Y MÉTODO

Se utilizaron 12 ratas hembras de la raza Wistar de 250 gr. de peso aproximadamente, las cuales se dividieron en cuatro grupos con tres individuos cada uno:

En el primer día se ovariectomizaron nueve ratas, con el siguiente método: se tomó una rata y se colocó en una cámara cerrada con un vaso de precipitado que a su vez contenía una borla de algodón mojado con éter, se dejó por un tiempo, hasta que la rata se quedó dormida, en ese momento se pasó a una charola de disección y se le colocó el vaso con el éter en la nariz, por períodos cortos de tal manera que permaneciera dormida y sin causarle la muerte. Se prosiguió a realizar una incisión longitudinal ventral de tal manera que nos permitiera localizar los ovarios, ya localizados se hicieron dos ligaduras, una del lado del cuerno uterino y otra del lado del tejido adiposo que rodea al ovario para evitar sangrados, se disecó el ovario y se regresó el cuerno uterino a su lugar, se continuó con el otro ovario siguiendo el mismo procedimiento. Una vez ovariectomizada se cerró la incisión, en dos planos, primero se cerró la capa muscular, con hilo esterilizado y después se cerró la piel y se le aplicó merthiolate, al finalizar se le inyectó 0.2 ml. de penicilina de 800 mg., después se pasaron las ratas a la jaula con un foco de 60 watts, donde se recuperaron, permaneciendo así por una noche, se les dio agua y alimento. Este procedimiento se siguió con las ocho ratas restantes, y así permanecieron por 21 días. Se formaron cuatro grupos de tres ratas de la siguiente manera:

a).-Primer grupo: a las ratas de éste grupo no se les aplicó ningún tratamiento, y se sacrificaron a los 21 días después de iniciado el experimento

b).-Segundo grupo: Estas ratas se ovariectomizaron de forma bilateral y 21 días después se sacrificaron.

c).-Tercer grupo: Las ratas de este grupo se ovariectomizaron bilateralmente y a los 21 días después se les aplicó 1 ml. de  $17\beta$  estradiol intraperitoneal en concentración de  $20\ \mu\text{g/ml}$ , esperando 30 minutos para su sacrificio

d).-Cuarto grupo, Se ovariectomizaron a las tres ratas en forma bilateral, a los 21 días se les aplicó 1 ml. de  $17\beta$  estradiol intraperitoneal en concentración de  $20\ \mu\text{g/ml}$  esperando 2 horas, antes de sacrificarlas.

Para anestesiar se utilizó la técnica antes mencionada se controló el sueño, quitando y poniendo el vaso con el éter, después se realizó una incisión ventral y longitudinal para localizar los cuernos uterinos, de los cuales se tomó la parte media y se procedió a fijarlas.

## **FIJACIÓN**

Después de tomadas las muestras se colocaron en una gota de fijador sobre placas de cera, el fijador utilizado fué, Glutaraldehído 2.5% en amortiguador de fosfatos 0.16 M a pH 7.2 y el tejido se fragmentó en cubos de 1 mm cuadrado, se pasaron a los frascos con fijador y permanecieron ahí durante una hora y media.

## **LAVADOS**

Después de la fijación, con la ayuda de una pipeta se quitó el fijador y se colocó amortiguador de fosfatos .16 M a pH 7.2 por 10 minutos y se cambió en dos ocasiones más, dándoles el mismo tiempo.

## **DESHIDRATACIÓN**

Se realizaron cambios graduales con alcohol etílico desde 60% y se continuó con 70%, 80%, 90% 96%, con periodos de duración de diez minutos, y se concluyó con etanol absoluto dos cambios de 20 minutos.

## **PREINCLUSIÓN**

Con el fin de lograr una inclusión adecuada se realizó una preinclusión usando como agente intermediario, óxido de propileno, que sirve por un lado para deshidratar y por otro sirve como solvente para la resina epon, esto facilita la penetración de la resina al tejido. Se realizaron tres cambios de óxido de propileno de 10 min. cada uno, seguidos de una mezcla de óxido de propileno-epon en concentración 2:1 y se dejaron ahí por 24 horas, se continuó con óxido de propileno-epon en concentración 1:1 por 12 horas y óxido de propileno-epon en concentración 1:2 por 12 horas

## **INCLUSIÓN**

La inclusión es el proceso por el cual el tejido adquiere un soporte para que pueda ser cortado, este soporte lo da la resina, que al polimerizar su consistencia pasa de viscosa a sólida, esto se logra con temperatura de 60 °C. De tal forma que después de la preinclusión, con la resina ya preparada, y habiendo realizado una prueba previa de polimerización en una estufa a 60 °C , se incluyeron en la resina pura con dureza 2 y se dejaron por 24 horas en la estufa a 60 °C.

## **CORTE**

Después de la inclusión se sacaron los bloques de la estufa y se realizaron cortes en un microtomo (MT 2), donde se obtuvieron cortes semifinos con el fin de localizar el epitelio uterino, se colocaron en portaobjetos y se fijaron con calor, se contrastaron con azul de toluidina-borax, se colocó una gota de colorante sobre los cortes y pasando el portaobjetos por la flama de una lámpara de alcohol,

retirándola varias veces, hasta que el colorante presentara un halo de color verde a su alrededor, se enjuagaron con agua y por último se secaron. Después se observaron con un microscopio óptico, este procedimiento se repitió varias veces, hasta encontrar el epitelio. Una vez encontrado el epitelio se procedió a retallar nuevamente el bloque y se obtuvieron los cortes ultrafinos entre 60 y 150 nm que se colocaron en rejillas de cobre cubiertas con formvar.

## **CONTRASTE**

Después de obtener los cortes ultrafinos, se contrastaron con la técnica preferencial para ribonucleoproteínas (EDTA), de la manera siguiente, en una caja petri, que sirvió de cámara cerrada y húmeda se colocó un pedazo de parafilm, con el objeto de tener una superficie limpia. Se colocó una gota de acetato de uranilo 3% y sobre ésta, la rejilla con los cortes, cubriéndola de la luz durante 2 minutos. Se sacó la rejilla y se lavó con agua desionizada, se dejó secar por unos minutos. En la misma caja se colocó un parafilm limpio y se puso una gota de EDTA 7.44 % a pH 6.8 y sobre esta la rejilla por 18 minutos, nuevamente se lavó con agua destilada y se dejó secar por unos minutos. Por último se colocó en otra caja de petri un algodón con agua y un vidrio de reloj, con lentejas de hidróxido de sodio se puso parafilm y sobre éste una gota de citrato de plomo concentración 0.3 %, se colocó la rejilla durante 1 minuto, se lavó y se puso a secar.

## **TOMA DE IMÁGENES**

Las diferentes rejillas se llevaron al microscopio electrónico Zeiss modelo EM-10 y se localizó el epitelio luminal. Con la ayuda de un televisor adaptado al microscopio, así como una videogradora, se capturaron 30 imágenes de núcleos por cada rata. Para ello se eligieron los cortes que tenían un contraste adecuado para observar los gránulos intercromatinianos sin mayor problema, con un aumento de 2500, se localizó uno de los extremos del epitelio, se colocó uno de los núcleos en el recuadro de la pantalla fluorescente y se cambió el aumento a 20 000. La imagen que se encontraba en el recuadro del televisor se enfocó y se videograbó. Este procedimiento se

repitió hasta videgrabar 30 núcleos de células epiteliales endometriales. Una vez videgrabados los núcleos de cada rata, se cuantificaron los granos intercromatinianos con ayuda del programa de cómputo Imagenia 5000 de BIOCROM. Primero se contaron uno a uno y después se midió el área excluyendo la cromatina y la región del nucleolo, al terminar la computadora nos da la densidad de granos por micra cuadrada. Una vez obtenidas las densidades de cada núcleo se reunieron los datos de las 3 ratas normales en uno solo y se hizo lo mismo con las ratas ovariectomizadas y con las ovariectomizadas e inyectadas con estradiol por media hora y dos horas. Se realizó una estadística descriptiva para cada grupo y se aplicó la prueba estadística de t de Student para determinar si la diferencia entre los cuatro grupos era significativa o debido al azar.

## DIAGRAMA DE FLUJO

3 ratas  
normales

3 ratas  
ovariectomizadas  
21 días

3 ratas  
ovariectomizadas  
21 días inyectadas  
1/2 horas

3 ratas  
ovariectomizadas  
21 días inyectadas  
2 horas

### FIJACIÓN

2.5% glutaraldehido 1.5 horas  
en amortiguador de fosfatos



### LAVADOS

con amortiguador 3x 10 min.



### DESHDRATACIÓN

con etanol 60%,70%,80%,90%, 1x 10 min.  
etanol absoluto 2x 20 min.



### PREINCLUSIÓN

Oxido de propileno 3x 10 min.  
Oxido de propileno-epon 2:1 24 horas  
Oxido de propileno-epon 1:1 12 horas  
Oxido de propileno 1-2 12 horas



### INCLUSIÓN

Epon 24 horas a 60 °C



### CORTES

semifinos y ultrafinos



### CONTRASTE (EDTA)



### CAPTACIÓN DE IMÁGENES EN VIDEO

(se captaron 30 núcleos por cada rata)



### CUANTIFICACIÓN DE DENSIDAD DE GRÁNULOS CON AYUDA DEL PROGRAMA

IMAGENIA 5000 DE BIOCROM



SE APLICÓ LA PRUEBA ESTADÍSTICA DE T DE STUDENT PARA DETERMINAR  
SI LA DIFERENCIA ENTRE LOS CUATRO GRUPO ERA  
SIGNIFICATIVA, O DEBIDO AL AZAR

## RESULTADOS

### DESCRIPCIÓN MORFOLÓGICA

Las células epiteliales en condiciones normales son cilíndricas presentan núcleos ovoides, en los cortes ultrafinos se observaron los núcleos con la cromatina dispersa y compacta, esta última se encuentra distribuida en forma perinuclear. Las células presentan poca cromatina condensada, como se observa en la figura 1.

En las ratas ovariectomizadas existen células con núcleos deformados con indentaciones, al parecer más pequeños, aunque también se encuentran núcleos esféricos u ovoides, existe un aumento en la cromatina compacta como se observa en la figura 2.

En las ratas ovariectomizadas con tratamiento de media hora con  $17\beta$  estradiol los núcleos tienen una ligera recuperación en su forma con respecto de las ratas normales.

En las células de las ratas, que tienen tratamiento con  $17\beta$  estradiol durante dos horas, se observó una recuperación morfológica más detectable como se puede observar en la figura 3, sin volver a su estado normal.

### MORFOMETRÍA

Los gránulos intercromatinianos en las células epiteliales de las ratas normales se observan en cúmulos y de manera dispersa al igual que en las ratas ovariectomizadas y tratadas con la hormona. En las ratas ovariectomizadas la densidad numérica de los gránulos intercromatinianos presenta una disminución significativa con respecto de las ratas normales. En las ratas ovariectomizadas con un tratamiento de  $17\beta$  estradiol durante media hora se observa un aumento en la densidad numérica de los gránulos intercromatinianos. Estos se incrementan aun más con tratamiento de dos horas, la tabla 1 muestra las medias de la densidad numérica de cada grupo y en la gráfica 1, se observa el comportamiento de la densidad numérica de los gránulos intercromatinianos.

La tabla 2 muestra el resultado de la prueba estadística de T, la cual sirve para comparar las diferentes muestras, la aplicación de esta prueba nos permite decir que se trata de muestras diferentes y que las diferencias entre estas es significativa para todas las comparaciones y por tanto

las diferencias entre la densidad numérica de las muestras es debido a la supresión o administración de la hormona y no debido al azar.

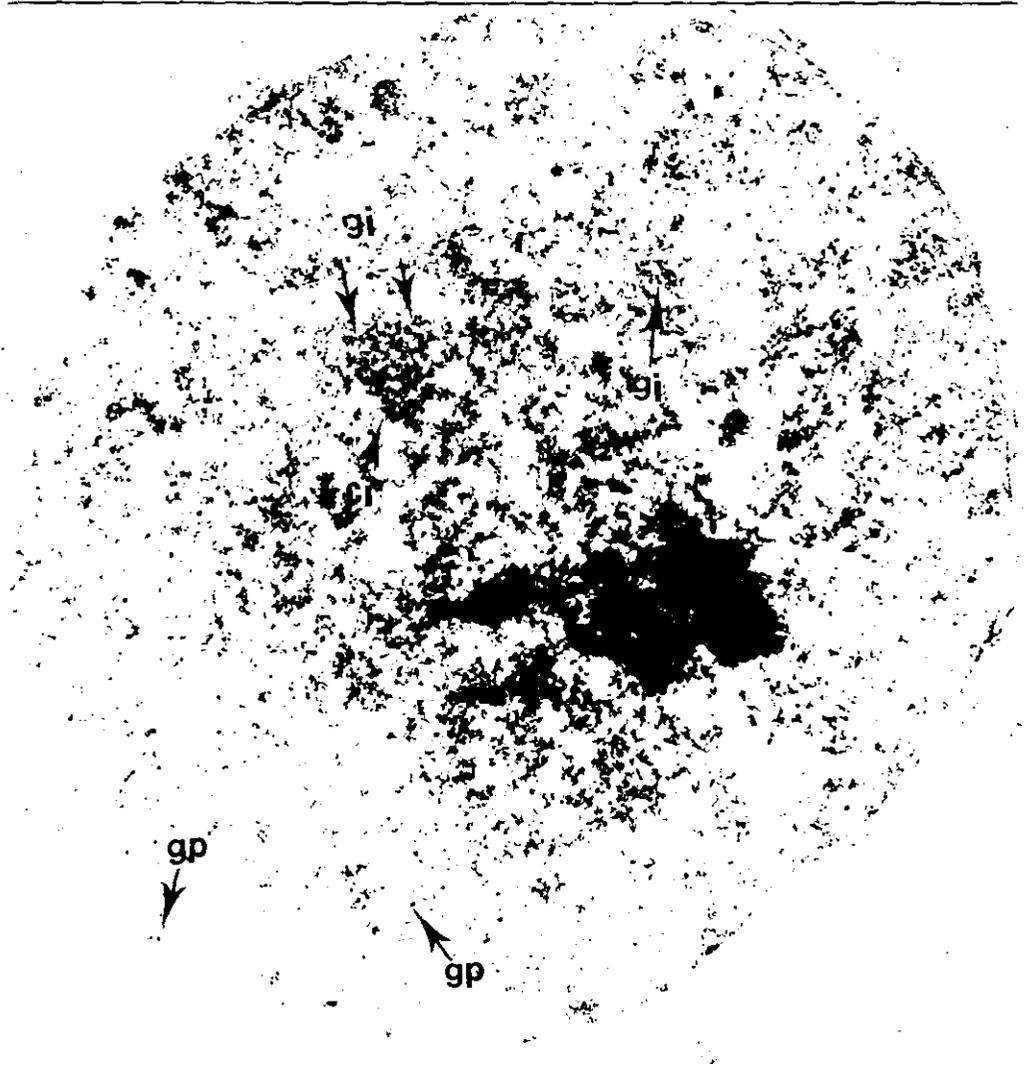


Fig. 1.-Micrografía de célula epitelial luminal de útero de rata normal. Contraste EDTA. gránulos intercromatinianos (gi), gránulos los pericromatinianos (gp), nucleolo (n), cúmulo de gránulos intercromatinianos (ci). 30,500x.



Fig. 2.-Micrografía de célula epitelial luminal de rata ovariectomizada. Contraste EDTA. nucleolo (n), cúmulo de gránulos intercromatinianos (ci), gránulos pericromatinianos (gp), Cromatina (c), gránulos intercromatinianos (gi), desmosoma (d), 33,000x.



Fig. 3.- Micrografia célula epitelial de rata ovariectomizada y tratada con  $17\beta$  estradiol durante 2 horas. Contraste EDTA. Envoltura nuclear (e), cromatina (c), Nucleolo (n), cúmulo de gránulos intercromatinianos (ci), gránulos pericromatinianos (gp), 26500x

**TABLA 1**

**DENSIDAD NUMÉRICA DE GRÁNULOS INTERCROMATINIANOS  
POR MICRA CUADRADA**

GRUPO	N	X	DS	ES
NORMALES	97	22.5	5.35	0.54
OVARIECTOMIZADAS	95	14.5	4.08	0.41
OVARIECTOMIZADAS CON 1/2 HR	90	16.97	5.14	0.54
OVARIECTO-MIZADAS CON 2 HR.	89	19.76	5.12	.512

N: tamaño de la muestra

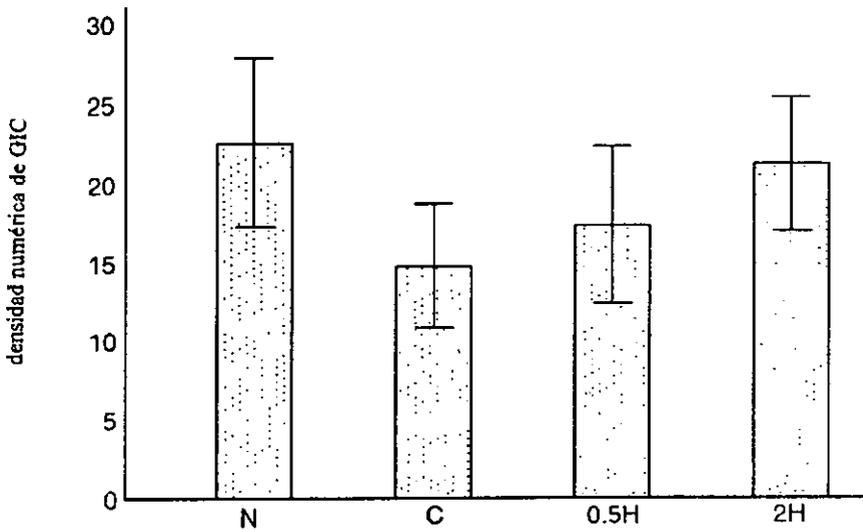
X: media

DS: desviación estándar

ES: error estándar

### GRÁFICA 1

Densidad numérica de GIC en útero de ratas normales, castradas e inyectadas con 17  $\beta$  estradiol



N - normales

C - castradas

0.5 Hr. Castradas tratadas con estradiol durante media hora

2.0 Hrs. Castradas tratadas con estradiol durante 2 horas.

**ESTA TESIS NO DEBE SALIR DE LA BIBLIOTECA**

**TABLA 2**

**COMPARACIÓN ENTRE MUESTRAS**

comparación entre dos muestras	N	diferencia entre las medias	valor de T	nivel de significancia	
normales y castradas	97 95	8.0	11.64	2.66 E-15	sig.
normales y castradas con 0.5 hrs. de H.	97 90	5.55	7.23	2.36 E - 8	sig.
normales y castradas con 2 hrs. de H.	97 89	1.86	2.62	9.50 E - 3	sig.
castradas y castradas con 0.05 de H.	95 90	2.45	3.60	4.05 E - 4	sig
castradas con 0.5 hrs. de H. y castradas con 2 hrs de H.	90 89	3.69	5.25	4.46 E - 7	sig
castradas y castradas con 2 hrs de H.	95 89	6.14	10.06	1.11 E -14	sig.

## DISCUSIÓN

En el presente trabajo, se demostró que la ovariectomía causa una disminución significativa en la densidad numérica de GIC y que la inyección de  $17\beta$  estradiol induce un incremento en la misma en tiempos cortos.

La técnica preferencial (EDTA) (Bernhard, 1969), para ribonucleoproteínas nos permitió observar los gránulos intercromatinianos con facilidad y se obtuvieron imágenes apropiadas como se ha citado en trabajos anteriores, (Monneron y Bernhard, 1969). Con la aplicación de la técnica de EDTA hace más firme nuestro conocimiento de que los gránulos intercromatinianos están formados por ribonucleoproteínas.

Está comprobado que el útero es órgano blanco de la hormona  $17\beta$  estradiol y que ésta es producida por las células que forman la teca en los óvulos los cual a su vez están localizados en el ovario (Harvey, 1979).

La ovariectomía como mecanismo para suprimir la producción de la hormona  $17\beta$  estradiol y a su vez eliminar lo efectos que ésta produce sobre el útero, ha sido utilizada desde los inicios de esta línea de investigación hasta tiempos actuales (Harvey 1979, Vázquez Nin y col. 1978).

En trabajos anteriores se ha demostrado que cuando la hormona  $17\beta$  estradiol se suspende por ovariectomía, aumenta el número de gránulos pericromatinianos y los ARN mensajeros son almacenados en las células epiteliales endometriales y al estimular nuevamente con la hormona los mensajeros almacenados salen del núcleo hacia el citoplasma (Vázquez Nin y col. 1979). Esto hace suponer que cuando se elimina la hormona, los hnARN que darán lugar a los ARN mensajeros se siguen madurando y se almacenan, teniendo por lo tanto una regulación postranscripcional de algunos mensajeros (Vázquez Nin y col. 1978, 1979).

La ovariectomía trajo como consecuencia una disminución en la densidad de gránulos intercromatinianos, si pensamos que los gránulos intercromatinianos son necesarios para la maduración de los RNA mensajeros (Spector, 1993), podemos decir que probablemente los gránulos intercromatinianos disminuyan porque se siguen utilizando en la maduración de los RNA mensajeros que fueron transcritos antes de la ovariectomía, lo cual concuerda con el aumento de los gránulos pericromatinianos que se ha observado en trabajos anteriores (Vázquez Nin y col. 1996).

Si lo anteriormente expuesto es correcto, podríamos decir que la densidad de los gránulos intercromatinianos probablemente disminuye por dos motivos, uno por que han sido utilizados en la maduración de los ARN mensajeros que quedan almacenados, o porque ya no se siguen produciendo, ya que la transcripción de los snRNP-U probablemente se suspenda al ovariectomizar a las ratas.

Otra causa de la disminución de la densidad numérica de los gránulos intercromatinianos en las ratas ovariectomizadas puede ser por una disminución en la transcripción de los RNA que darán origen a las ribonucleoproteínas que formarán a los factores de splicing y no por la suspensión total de la transcripción, en estas condiciones los factores de splicing siguen formando gránulos intercromatinianos, aunque no en la misma cantidad que en condiciones normales como lo reflejan los datos obtenidos en el presente trabajo.

Por otra parte, los gránulos intercromatinianos dejan de ser perceptibles porque tal vez los factores de splicing cambien su conformación química después de intervenir en la maduración de los RNA mensajeros y esto no les permita formar nuevamente parte de un gránulo, aunque se encuentren dentro del núcleo.

Podríamos pensar que la transcripción de snRNA-U está dada por un mecanismo de retroalimentación regulado por la presencia de un número determinado de gránulos pericromatinianos, es decir que al existir un número mayor del normal de éstos gránulos en la célula, los snRNA-U dejan de transcribirse y por tanto de formar gránulos y al reiniciarse nuevamente la transcripción, maduración y transporte de RNA mensajero al citoplasma, traería como consecuencia la salida de los RNA mensajeros al citoplasma (Vázquez Nin y col. 1978) que trae como consecuencia una disminución en la densidad de pericromatinianos en el núcleo, y esto sería la señal de reinicio de la transcripción de snRNA-U.

Al aplicar la hormona  $17\beta$  estradiol a las ratas ovariectomizadas, los gránulos pericromatinianos son transportados al citoplasma y su número disminuye (Vázquez Nin y col. 1978), en estas condiciones la densidad de los gránulos intercromatinianos aumenta, podemos pensar que el aumento de los gránulos intercromatinianos está dado como respuesta a la disminución de gránulos pericromatinianos, que estimularía la síntesis de snRNP-U

Con la aplicación de la hormona durante dos horas la densidad de los gránulos intercromatinianos aumentó más que en las ratas estimuladas durante media hora, con este resultado podemos pensar

que se siguen produciendo más snRNA-U y que probablemente con una mayor exposición a la hormona se alcance el valor normal de los gránulos intercromatinianos.

## CONCLUSIONES

La supresión de la hormona  $17\beta$  estradiol por medio de la ovariectomía influye de manera significativa en la densidad numérica de los gránulos intercromatinianos disminuyendo su frecuencia con respecto a condiciones normales.

La adición de  $17\beta$  estradiol durante 0.5 hr. aumenta la densidad numérica de los gránulos intercromatinianos de forma significativa con respecto de las ratas ovariectomizadas

La adición de  $17\beta$  estradiol durante dos horas nos muestra un aumento mayor en la densidad numérica de gránulos intercromatinianos con respecto de las ratas con aplicación de la hormona durante 0.5 hr.

Por lo tanto la densidad de gránulos intercromatinianos es modificada por la adición o supresión de la hormona  $17\beta$  estradiol. La supresión de la hormona provoca una disminución de la densidad numérica de gránulos intercromatinianos y la administración de la misma un aumento de su número.

## BIBLIOGRAFÍA

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

Austin C R., Short R. V. (1982). *Hormonas en la reproducción*. edit La prensa medica mexicana México.

Beato M. (1989). Gene regulation by steroid hormones. *Cell* 56, 335- 344.

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

Busch H. (1977). *Receptors and hormone action*. Edit. O Malley B. W. Birnbaumer L. Academic Press. N. Y. 1, 32-97.

Delgado M., Morais C. L., Neves N., Jones R. N. (1995). The influence of B Chromosomes on rDNA organization in rye interphase nuclei. *Chromosome Research* 3, 487-491.

Echeverría Martínez O. M., Vázquez Nin G. H. (1995). El núcleo celular interfásico. *Coordinación de servicios editoriales. Facultad de Ciencias U.N.A.M*

Echeverría Martínez O. M, Zavala G., Benitez A., Vázquez Nin G. H. (1980). Changes during estral cycle in de nucleus of endometrial cells of the rat. *Biol. Cellulaire* 39, 139-142.

Fakan, S., Puvion E., Spohr G. (1976). Localization and characterization of newly synthesized nuclear RNA in isolated rat hepatocytes. *Exp. Cell Res.* 99, 155-164.

Harvey H. F. (1979). Hormones and reproductive behavior. Scientific American, ed. Freeman W.H. and company San Francisco cap. 7, 9, pag 84-92.

Hernández-Verdún P., Russel P., Junera R. (1993). Proteínas asociadas con las regiones organizadoras nucleolares ( NORs) durante la interfase y mitosis. *Progresos en biología celular*, pags. 139-141, Becerra J., Fígares J. M., Fernández- Llebreg P. Eds. Universidad de Málaga.

Jiménez García L. F., (1985). Tesis de Maestría: Evolución nuclear en animales. (Enfoque ultraestructural de las partículas ribonucleoproteicas intranucleares del período interfásico). Facultad de Ciencias, Laboratorio de Microscopía Electrónica Universidad Nacional Autónoma de México.

Jiménez García L.F., Segura- Valdez M. L., Ochs R. L., Echeverría O. M , Vázquez Nin G.H., Busch H. (1993). Electron microscopic localization of ribosomal DNA in rat liver nucleoli by non-isotopic in situ hybridization. *Exp. Cell Res.* 207, 220-225.

Jiménez-García, L. F., Spector, D. L. (1993). In vivo evidence that transcription and splicing are coordinated by a recruiting mechanism. *Cell* 73, 47-59.

Malkinson A. M. (1980). *Acción hormonal cuadernos de biología*, edit. Omega Barcelona.

Medina A. M., Moreno Diaz De La Espina S., Martín M., Fernández Gómez E. (1989). Intercromatin granules in plant nuclei. *Biology of the cell*, 67, 331-339.

Melcak I., Raska I. (1996). Structural organization of the pre-mRNA splicing commitment: a hypothesis. *Journal of Structural Biology* 117,189-194

Milan K., Bagchi, Ming-Jer T., Bert W. O' M., Siphia Y. T. (1992). Analysis of the mechanism of steroid hormone receptor- dependent gene activation in cell-free systems. *The Endocrine Society* 13, 3, 525-535.

Monneron A., Bernhard W. (1969). Fine structural organization of the interphase nucleus in some mammalian cell. *J.Ultrastructure Research* 27, 266-288.

Pombo A., Cook P.R., (1996). The localization of sites containing nascent RNA and splicing factors. *Exp. Cell Res.* 229, 201-203.

Puvion E., Puvion-Dutelleul F. (1996). Ultrastructure of the nucleus in relation to transcription and splicing: roles of perichromatin fibrils and interchromatin granules. *Exp. Cell Res.* 229, 217-225.

Puvion, E., Moyne G. (1978). Intranuclear migration of newly synthesized extranucleolar ribonucleoproteins. *Exp. Cell Res.* 115, 79-88.

Puvion E, Viron A., Xu X. F. (1984). High resolution autorradiographical detection of RNA in the interchromating granules of DRB treated cells. *Exp. Cell* 43, 147-150

Spector L. D. (1993). Macromolecular domains within the cell nucleus. *Cell Biol.* 9, 265-315

Shaw P. J. (1995). The Nucleolus. *Ann. Rev. Cell Dev. Biol.* 11, 93-121.

Swift H. (1959). Studies on nuclear fine structure. *Brookhaven Symp. Biol.* 12, 134 - 152.

Vázquez Nin G.H., Bernhard W. (1971). Comparative ultrastructural study of perichromatin and Balbiani ring granules. *J. Ultrastruct. Res.* 36, 842-859.

Vázquez Nin G.H., Echeverría O. M. (1996). The polytene in nucleus in morphological, cytochemical, and functional studies of messenger RNA transcription, processing, and transportation. *Eur. J. Histochem.* 40, 7-16.

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

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

Vázquez Nin H. G., Jiménez García L. F. y Echeverría O. M. (1993). Relaciones entre morfología y funciones nucleolares. Estudio de hibridación in situ y morfometría. *Progresos en biología celular*, págs. 135 - 138 eds. Becerra J., Pérez J. M., Figares, Fernández P., Lebrez L Universidad de Málaga.