

60377



**UNIVERSIDAD NACIONAL AUTONOMA
DE MEXICO**

POSGRADO EN CIENCIAS BIOLÓGICAS
FACULTAD DE CIENCIAS

**ESTUDIO INMUNOCITOQUÍMICO DE LAS
VARIACIONES DEL FACTOR DE ACTIVACION DEL
RECEPTOR ESTROGENICO (*E-RAF*) POR EFECTO
DE LA CASTRACION**

T E S I S

QUE PARA OBTENER EL GRADO ACADÉMICO DE
MAESTRA EN CIENCIAS BIOLÓGICAS

(BIOLOGIA EXPERIMENTAL)

P R E S E N T A :

SILVIA JUAREZ CHAVERO

DIRECTORA DE TESIS: DRA. OLGA MARGARITA ECHEVERRÍA MARTÍNEZ



MEXICO, D.F.

NOVIEMBRE 2004



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

POSGRADO EN CIENCIAS BIOLÓGICAS COORDINACIÓN

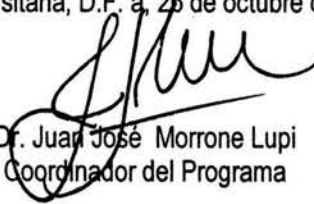
Ing. Leopoldo Silva Gutiérrez
Director General de Administración Escolar, UNAM
Presente

Por medio de la presente me permito informar a usted que en la reunión ordinaria del Comité Académico del Posgrado en Ciencias Biológicas, celebrada el día 16 de agosto del 2004, se acordó poner a su consideración el siguiente jurado para el examen de grado de Maestría en Ciencias Biológicas (Biología Experimental) del(a) alumno(a) **Juárez Chavero Silvia**, con número de cuenta **77346490** y número de expediente **3981125** con la tesis titulada: **"Estudio Inmunocitoquímico de las variaciones del factor de activación del receptor estrogénico (E-Raf) por efecto de la Castración"**, bajo la dirección del(a) **Dra. Olga Margarita Echeverría Martínez**.

Presidente:	Dr. Enrique Antonio Pedemera Astegiano
Vocal:	Dr. Marco Antonio Carbon Cervantes
Secretario:	Dra. Olga Margarita Echeverría Martínez
Suplente:	Dr. Felipe de Jesús Vilchis Uribe
Suplente:	Dr. René de Jesús Cárdenas Vázquez

Sin otro particular, quedo de usted.

Atentamente
"POR MI RAZA HABLARA EL ESPIRITU"
Cd. Universitaria, D.F. a 26 de octubre del 2004


Dr. Juan José Morrone Lupi
Coordinador del Programa

c.c.p. Expediente del interesado

Agradezco a PAPIIT por el apoyo al proyecto 200101, responsable Dr. Gerardo Hebert Vázquez Nin y corresponsable Dra. Olga Margarita Echeverría Martínez.

Agradezco a los integrantes del comité tutorial por la orientación recibida durante el desarrollo de este trabajo, y por sus valiosas observaciones que ayudaron a mejorar la presentación del manuscrito:

Dra. Olga Margarita Echeverría Martínez
Dr. Gerardo Hebert Vázquez Nin
Dr. Enrique Antonio Pedernera Astegiano
Dr. Rene de Jesús Cárdenas Vázquez

Agradezco a la Dra. Olga Margarita Echeverría Martínez por darme la oportunidad de pertenecer a su grupo de trabajo, por ser parte de mi formación, por su comprensión y paciencia.

Un agradecimiento especial al Dr. Gerardo Hebert Vázquez Nin, por su apoyo, por compartir su experiencia y conocimientos durante mis estudios de maestría.

Agradezco al Dr. Felipe de Jesús Vilchis Uribe, por la revisión del manuscrito, gracias por sus aportaciones y consejos para mejorar la presentación del mismo.

Agradezco al Dr. Marco Antonio Carbon Cervantes por sus sugerencias y aportaciones para que este trabajo estuviera mejor presentado.

Agradezco a mis compañeros del laboratorio de Microscopía Electrónica de la Facultad de Ciencias de la UNAM, por sus consejos y por impulsarme a continuar con mis estudios: Dra. Rosario Ortiz Hernández, Dra. Guadalupe Zavala Padilla, M. en C. Ernestina Ubaldo Pérez, Dr. Luis Felipe Jiménez García, Dra. Maria de Lourdes Segura Valdéz y M en C Marco Antonio González.

Dedicada a mi madre donde quiera que estés
por mostrarme el camino
por enseñarme a ser perseverante
por darme lo mejor de ti.

A mis hijos con todo mi amor
Alma Rosa y Juan Manuel
Por ser la mejor inspiración

A Juan por todo el apoyo
por su comprensión y
paciencia

**ESTUDIO INMUNOCITOQUÍMICO DE LAS VARIACIONES DEL FACTOR DE
ACTIVACIÓN DEL RECEPTOR ESTROGÉNICO (E-RAF) POR EFECTO DE LA
CASTRACIÓN**

ÍNDICE

RESUMEN

INTRODUCCIÓN

I.- EJE HIPOTÁLAMO HIPÓFISIS GÓNADA	1-2
METABOLISMO DEL ESTRADIOL.....	3
EFECTOS CAUSADOS POR LA DEFICIENCIA DE ESTRÓGENOS.....	4
II .- RECEPTORES DE ESTRÓGENOS	5-6
ESTRUCTURA DE LOS RECEPTORES DE ESTRÓGENOS.....	7-8
ELEMENTOS DE RESPUESTA A ESTRÓGENOS.....	8-9
COACTIVADORES DE LOS RECEPTORES DE ESTRÓGENOS.....	10-11
CORRESPONDIENTES DE LOS RECEPTORES DE ESTRÓGENOS.....	12
ANTAGONISTAS DE LOS RECEPTORES DE ESTRÓGENOS	13
MECANISMOS DE ACCIÓN DE LOS RECEPTORES DE ESTRÓGENOS.....	14
1.- Mecanismo clásico dependiente del ligando.....	14
2.- Mecanismo independiente del ligando.....	14
3.- Mecanismo de unión independiente de ERE.....	15
4.- Mecanismo por señalamiento de superficie- celular (no genómico).....	15
EFECTOS DE LOS ESTRÓGENOS SOBRE LOS NÚCLEOS CELULARES.....	18
III .- RECEPTOR DE ESTRÓGENOS NO ACTIVADO (naRE)	19-22
IV .- FACTOR DE ACTIVACIÓN DEL RECEPTOR DE ESTRÓGENOS NO ACTIVADO (E-RAF)	23-24
V .- ULTRAESTRUCTURA DEL NÚCLEO EN INTERFASE	25
ENVOLTURA NUCLEAR	25
LAMINA NUCLEAR	25
CROMATINA.....	26
ESTRUCTURAS RIBONUCLEOPROTEICAS.....	26
a).- gránulos intercromatinianos	27
b).- gránulos pericromatinianos	27
c).- fibras pericromatinianas	29
d).- cuerpos de Cajal	29
e).- nucleolo	29
VI.- HIPÓTESIS	31
VII .- OBJETIVO	32
VIII .- MATERIAL Y MÉTODOS	33-37
IX .- RESULTADOS	38-58
X .- DISCUSIÓN	59-61

XI .- CONCLUSIONES.....	62
XII .- BIBLIOGRAFÍA	63-78

RESUMEN

Se conocen dos tipos de receptores a estrógenos (α y β). Recientemente fue caracterizado un nuevo receptor estrogénico, el receptor no activado (naRE), diferente a los ya conocidos. El naRE requiere de un factor de activación (E-RAF) para interactuar con el DNA y producir el inicio de la transcripción. Mediante estudios bioquímicos y en fracciones celulares se ha deducido su estructura, localización, transporte de la membrana citoplásmica al núcleo celular, así como la forma en que se regula la transcripción del DNA. En el presente trabajo se estudia la distribución y la abundancia de E-RAF en el epitelio endometrial mediante técnicas inmunocitoquímicas. Para ello se utilizaron 21 ratas de dos meses de edad y se formaron 2 grupos de ratas: normales y ovariectomizadas, estas últimas fueron tratadas con estradiol durante 3, 9, 18, 27 y 36 minutos. En todos los casos las ratas se anestesiaron y se tomaron los úteros, los cuales fueron procesados, con el siguiente protocolo: fijación en paraformaldehído al 4% en amortiguador de fosfatos 0.16 M a pH 7.2, deshidratación con alcoholes graduales, inclusión en resina epóxica y LR White.

Se realizaron cortes de 1μ de grosor para hacer localizaciones usando inmunofluorescencia con el anticuerpo policlonal primario anti E-RAF. El anticuerpo primario anti E-RAF hecho de una proteína purificada de cabra y desarrollado en conejo es una gammaglobulina policlonal, fue adquirido del Rajiv Gandhi Center for Biotechnology en la India a cargo del DR. Raghava Varman Thampan (Thampan, 1987) y un anticuerpo secundario GAR IgG acoplado con isocianato de fluoresceína de la marca SIGMA. Para microscopía electrónica se utilizaron cortes ultra finos de epitelio uterino en los cuales se realizaron inmunolocalizaciones con el anticuerpo primario antes mencionado y con un segundo anticuerpo, anti GAR IgG acoplado con oro coloidal de 12 nm de SIGMA. Finalmente se contrastó con acetato de uranilo por 1 minuto y citrato de plomo 30 segundos.

Con la inmunolocalización de fluorescencia, se observó que la localización de anti E-RAF es preferencialmente en la cromatina perinuclear, en células epiteliales uterinas.

La inmunolocalización ultraestructural permitió la localización de E-RAF en el núcleo y en el citoplasma de las células epiteliales endometriales. En el núcleo se localiza de manera preferencial en la cromatina periférica, en los espacios pericromatinianos, en regiones cercanas a los poros nucleares, así como en la cromatina perinucleolar, en el citoplasma se

encuentra asociado al retículo endoplásmico. La presencia de anti E-RAF en los núcleos de las ratas ovariectomizadas aumentó en forma estadísticamente significativa con respecto de las normales. Probablemente en estas condiciones E-RAF se encuentre como E-RAF I estabilizando al DNA e inhibiendo la transcripción.

Tratando a las ratas ovariectomizadas con estradiol, la densidad numérica de E-RAF en los núcleos disminuye a los 3 y 9 minutos; es factible que en estas condiciones E-RAF interactúe con el nREII para reiniciar la transcripción. En las ratas que se expusieron a tiempos más largos de 17β estradiol, la densidad numérica de los granos de oro presenta variaciones: después de 18 minutos aumenta en forma significativa.

La presencia de E-RAF asociada a las fibras pericromatinianas, indica que podría también intervenir en procesos de transcripción.

Las imágenes mostraron que la localización de E-RAF en el citoplasma, se encuentra fundamentalmente en el retículo endoplásmico como lo han demostrado previamente Thampan y sus colaboradores (Kumar et. al. 1999).

STUDY IN IMMUNOCYTOCHEMISTRY OF THE VARIATIONS OF THE ESTROGEN
RECEPTOR ACTIVATION FACTOR (E-RAF) BY EFFECT OF THE
CASTRATION.

The localization and abundance of the estrogen receptor activation factor (E-RAF), has been studied in rat endometrial epithelial cells by immunofluorescence and by means of the high resolution quantitative immunocytochemistry. In the cytoplasm E-RAF is associated with the rough endoplasmic reticulum. In the nucleus it is mainly localized in relation to the clumps of semi-condensed chromatin adjacent to the nuclear membrane and the extended chromatin that surrounds the semicondensed chromatin. To a lesser extent E-RAF has been found scattered in the nucleoplasm. Quantitative analyses show that the abundance of E-RAF in the nucleus increases after ovariectomy and decreases between 3 and 30 minutes after estradiol administration. These results are in perfect agreement with the currently available biochemical data.

INTRODUCCIÓN

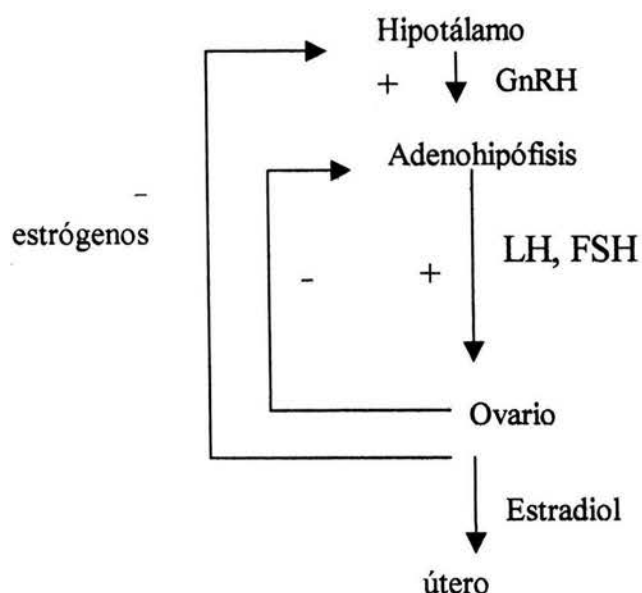
I.- EJE HIPOTÁLAMO – HIPÓFISIS - GÓNADA

Las hormonas son sustancias químicas secretadas por las glándulas endocrinas que inducen el crecimiento, la diferenciación, ciclos reproductivos y la regulación de la actividad metabólica de las células que forman los tejidos de órganos blanco. Después de ser sintetizadas por las glándulas se vierten al torrente sanguíneo para ser transportadas hasta las células de diferentes órganos (Burriss y Mc Cabe, 2001).

La hormona liberadora de Gonadotropinas (GnRH) es secretada por el hipotálamo y se dirige a su órgano blanco la adenohipófisis, que al ser estimulada inicia la liberación de la Hormona Luteinizante (LH) y la Hormona Folículo Estimulante (FSH) (Malkinson, 1980; Hiller, 2001).

La LH y FSH secretadas por la adenohipófisis actúan sobre los ovarios y testículos, en los ovarios se estimula el desarrollo de los folículos y en los testículos el desarrollo de los túbulos seminíferos y la espermatogénesis. En el ovario, la FSH estimula la diferenciación y proliferación de las células de la granulosa y al mismo tiempo induce la expresión del citocromo P450arom en las células de la granulosa, el cual convierte los andrógenos a estrógenos que van a estimular al útero (Hiller et. al., 1994), en las células de la granulosa también se inicia la producción de progesterona inducida por el citocromo P450scc a partir del colesterol (Malkinson, 1980; Norman y Litwack, 1997; JoAnne et. al., 1998; Hiller, 2001).

La regulación hormonal está determinada por el balance de la secreción hormonal en relación con la generación de la respuesta fisiológica deseada. Las hormonas esteroides regulan la cantidad de su propia secreción mediante una serie de reacciones de retroalimentación o de Feedback negativas, los niveles bajos de estrógenos hacen que las células secretoras del hipotálamo secreten la GnRH y las células secretoras de LH/FSH en la adenohipófisis sean más sensibles a la señal de la GnRH, así el ovario también será estimulado al igual que el útero completando el ciclo (Esquema 1) (Malkinson, 1980; Kolodziejczyk et. al., 2001).



Esquema 1: Eje hipotálamo-hipófisis-gónada. La secreción de GnRH por el hipotálamo estimula a la adenohipófisis a producir LH y FSH que a su vez estimularan al ovario y en éste se sintetizará estradiol el cual estimulará al útero, cuando en el torrente sanguíneo los niveles de estradiol se elevan, actuarán en forma negativa en hipotálamo y adenohipófisis para que dejen de producir hormonas. Cuando los niveles de estradiol son bajos, se desencadena nuevamente la síntesis hormonal.

La entrada de las hormonas esteroides en el útero, ocurre a través de las membranas de las células blanco, por un proceso de difusión simple, el mecanismo exacto de cómo se da esta difusión no se conoce hasta ahora, aunque con los nuevos hallazgos de receptores en las membranas se ha planteado una nueva hipótesis, la cual propone que el estradiol puede ser internalizado a las células por los mismos receptores que se encuentran en la membrana plasmática. (Ramírez y Zheng, 1996; Singh et. al., 2002).

La captación de una hormona del torrente sanguíneo y su permanencia en un tejido se limita a órganos que contienen receptores específicos para dicha hormona. Los receptores son proteínas que sirven de blanco para una hormona y se enlazan de forma muy específica, este enlace se caracteriza por fuerzas débiles y no covalentes, por lo tanto la formación de un complejo hormona-receptor es fácilmente reversible, este complejo sirve como disparador de una respuesta fisiológica (Malkinson, 1980).

Se cree que la entrada de esteroides en la célula es regulada por el receptor, ya que discrimina entre las diversas señales de los esteroides. Si está presente el receptor, la hormona forma un complejo hormona-receptor, esta unión altera la estructura del receptor para unirse al DNA; de esta forma, activa la transcripción y se desencadena toda una respuesta fisiológica (Shymala y Gorski, 1969).

DEGRADACIÓN DEL ESTRADIOL

Una vez que las hormonas esteroides unidas a su receptor han cumplido con la activación de la transcripción son inactivadas, el estradiol no se metaboliza en las células del órgano blanco, salen del órgano blanco vía sanguínea y viajan hasta el hígado. Los esteroides son compuestos hidrofóbicos y muchos de los mecanismos catabólicos inactivan a las hormonas esteroides, también reducen marcadamente la afinidad por sus receptores y hacen que las moléculas sean más hidrofílicas y así incrementan su solubilidad en el agua, siendo oxidadas, la conjugación de los esteroides con sulfatos o ácido glucurónico incrementa el grado de solubilidad en agua, estos esteroides conjugados son excretados en grandes cantidades en la orina (Burriss y McCabe, 2001; Norman y Litwack, 1997)



Esquema 2: Estructura química del estradiol

Se han propuesto los siguientes pasos para explicar la inactivación del estradiol (Esquema 2):

-oxidación de 17β -OH, Hydroxilación del carbono 2 con subsiguiente metilación

-Además la hidroxilación en varios carbonos C- 6 C-7, C-14, C-15, C-16, C-18

(Burriss y McCabe, 2001)

EFFECTOS CAUSADOS POR LA DEFICIENCIA DE ESTRÓGENOS

Las hormonas esteroides sexuales son muy importantes para los animales, ya que los efectos del estradiol y de progesterona en la fisiología están íntimamente relacionados, ambos compuestos son requeridos para inducir el desarrollo y funcionamiento del sistema reproductor así como las características sexuales y mantener el embarazo. Durante la etapa de reproducción en las hembras, se producen los óvulos y en el momento de ser liberados se forma un cuerpo lúteo por cada óvulo liberado, en estos cuerpos y en especial en las células de la granulosa se sintetiza el estradiol, que actuará en el útero. En la etapa de la menopausia la producción de óvulos cesa y esto trae como consecuencia una disminución en la producción de estrógenos (Yen, 1977), ésta disminución afecta al organismo en general produciendo trastornos considerables como la descalcificación del sistema óseo (Cosman et. al., 1997), alteraciones en el sistema cardiovascular (Stampfer y Colditz, 1991; Mendelsohn, 2000), en el sistema urogenital (Fantl et. al., 1994), así como en el sistema nervioso central (Smith, 1994). A causa de la deficiencia de estrógenos, en el hombre también se han detectado trastornos fisiológicos, ya que se impide la diferenciación de las células de Leydig (Ge et. al., 1996). Los estrógenos regulan estas actividades a través de uniones específicas a una proteína nuclear receptora (receptor de estrógenos RE), que funciona como una señal para la transcripción de genes blanco y como regulador para la expresión de otros genes, como es el caso en el cual sirve como co-factor para STAT3 dependiente de interleucina 6 en células de cáncer de mama (Wehling, 1997). Los daños en los receptores también tienen consecuencias drásticas como es el caso del receptor de estrógenos α en ratón, que trae como consecuencia la infertilidad en los mismos (Lubahn et. al., 1993; Eddy et. al., 1996).

II.- RECEPTORES DE ESTRÓGENOS

Los receptores de estrógenos son parte de un grupo de proteínas de la familia de receptores nucleares a la que pertenecen el receptor de glucocorticoides, el receptor de mineralocorticoides, el receptor de progesterona, el receptor de andrógeno y los receptores de estrógenos (Enmark et. al., 1996b; Olefsky, 2001). Los receptores como otras proteínas son transportados del citoplasma al núcleo y tienen una señal de localización nuclear que consiste en una alta proporción de aminoácidos cargados positivamente (lisina y arginina), ocasionalmente asociados con prolina (Kalderon et.. al., 1984; Chelsky et. al., 1989).

Los receptores de estrógenos se encuentran unidos a proteínas de choque térmico en su forma inactiva en el citoplasma, éstas proteínas se identificaron como hsp90, hsp70 y hsp56 y en su forma activa se unen al estradiol para interactuar con el DNA en el núcleo celular (Pratt y Toft,1997). Se han reportado dos tipos de receptores de estrógenos, el receptor α (RE α) clonado en 1985 (Walter et. al., 1985) y el β (RE β), clonado en 1996 (Kuipier et. al., 1996; Mosselman et. al., 1996). Ambos receptores, tanto el β como el α , son funcional y estructuralmente similares, la forma en que se unen al DNA es muy parecida y además los dos reconocen a los mismos ligandos (Kuipier et. al., 1997). El gen para el receptor α se encuentra en el cromosoma 6 en humano (Enmark et. al., 1996 a) y el gen para el receptor β se encuentra en el cromosoma 14 (Green et. al., 1986; Kuiper et. al., 1996, 1998 b), ambos receptores han sido localizados en varias especies de vertebrados (Nilsson et. al., 2001).

En los receptores de estrógenos se han determinado diferentes dominios que son similares en los dos receptores, el dominio de unión al DNA es el más conservado, y el dominio de unión al ligando (hormona) es el menos conservado, esto parece indicar que son proteínas que provienen de una molécula ancestral común. Este origen común se hace patente en las similitudes de los mecanismos de unión al DNA entre los miembros de la familia de receptores nucleares. (Klinge, 2001)

El receptor β ha sido localizado en ovario, testículo, próstata, bazo, pulmón, hipotálamo y timo (Couse et. al., 1997; Kawata et. al., 2001; Echeverría, 1994). El RE α está distribuido en el útero glándulas mamarias, hígado, cerviz y vagina (Couse et. al., 1997; Kuiper, 1997, 1998; Kawata et. al., 2001; Echeverría et. al., 1994).

Ambos receptores se han localizado en forma simultánea en algunos órganos, como en el cerebro en el que se ha observado que se expresan de forma diferente, ya que el receptor β se expresa más en ciertas regiones que en otras (Osterlund et. al., 1998; Gustafsson, 1999).

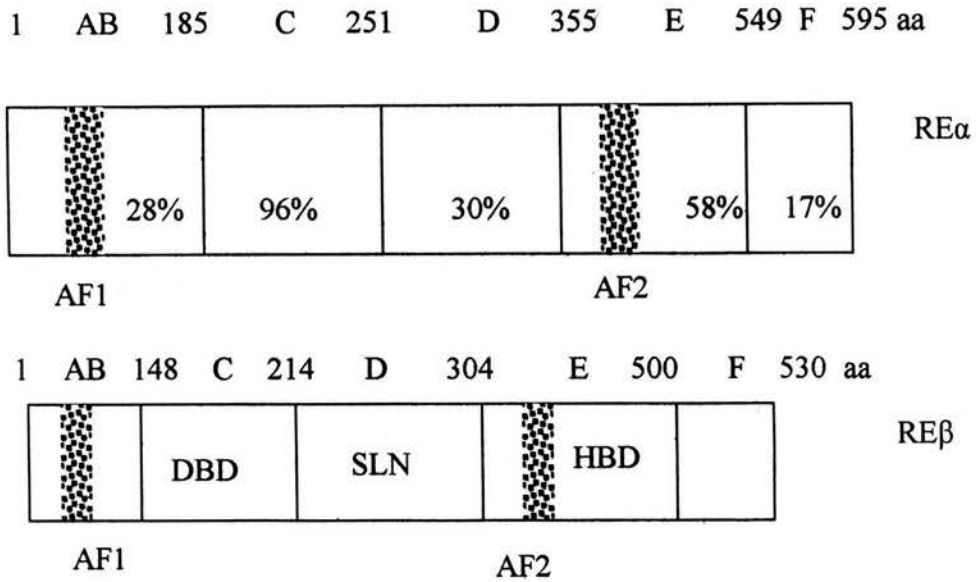
Los estudios sobre receptores indican que estos se concentran principalmente en el núcleo celular y en menor cantidad en el citoplasma (Clark, 1987), pero también existe un número considerable de trabajos que muestran que la membrana celular es el primer sitio en el que se produce una respuesta a la hormona. En 1942 Selye observó que en presencia de estradiol existe un incremento en la proliferación de células que contienen REs de membrana (citado en Pietras et.al., 2001), el incremento de la densidad de microvellosidades en células endometriales producido por estradiol observado por Rambo y Szego en 1983 (citado en Pietras et.al., 2001), la detección del RE en vesículas formadas por membranas de células endometriales (Watters et.al., 2000), la detección de un receptor de membrana con identidad antigénica al receptor a estradiol nuclear (Pappas et.al., 1995, Watson y Gatmechu, 1999), la localización del receptor a estrógeno en membranas de células endoteliales reconocidas por el anticuerpo monoclonal anti-RE α (Russell et. al., 2000), la detección de sitios de unión de los receptores de progesterona, estrógenos y de testosterona en membranas de células nerviosas (Ramírez y Zheng, 1996), la demostración de la presencia de los dos receptores a estradiol en membranas de células epiteliales vaginales de rata (Singh et. al., 2002).

ESTRUCTURA DE LOS RECEPTORES DE ESTRÓGENOS α β

El receptor de estrógenos fue caracterizado bioquímicamente en el laboratorio de Gorski y Davidson (Talwar et. al., 1964; Tolf y Gorski, 1966) y por varios investigadores (Walter et al. 1985; Greene et. al., 1986; Krust et. al., 1986).

El RE α es una proteína formada por 595 aminoácidos y el RE β por 530 aminoácidos; ambos están divididos en regiones o dominios, A/B, C, D, E, y F (Esquema 3) (Kuiper et. al., 1998; Nilsson et. al., 2001; Kinyamu y Archer, 2004). En el dominio A/B se encuentra la región de unión de coactivadores denominada la región AF-1, tiene la función de activación y modulación de la transcripción. La región C es el dominio de unión al DNA (DBD) que conserva una homología de 96% en ambos receptores (Kuiper et. al., 1997), en este dominio se encuentra una secuencia de aminoácidos denominada la caja P, que juega un papel muy importante para la formación de un dímero del receptor y para la unión del dímero al DNA (Mader et. al., 1993; Hart y Davie, 2001; Kinyamu y Archer, 2004).

El dominio E tiene el sitio de unión a la hormona o ligando (HBD), tiene una similitud del 58% en ambos receptores, también se encuentra un sitio involucrado en la dimerización y contiene el sitio de activación y represión (Kuiper et. al., 1997 b; Hart y Davie, 2001), en el dominio E se encuentra una región de activación (AF-2) la cual, al igual que AF-1, tiene la función de unirse a los coactivadores y de regular la expresión génica, ésta región es moderadamente conservada. Al dominio D también se le denomina la región en forma de bisagra y ahí también se encuentra la señal de localización nuclear. Los receptores de estrógenos α y β tienen un dominio adicional F que es el menos conservado y en el RE α juega un papel en la distinción de agonista contra antagonistas estrogénicos. (Montano et. al., 1995; Kuiper et. al., 1997) y su función aún no es totalmente clara (Enmark et.el., 1997 a y b; Paech et. al., 1997; Nilsson et. al., 2001).

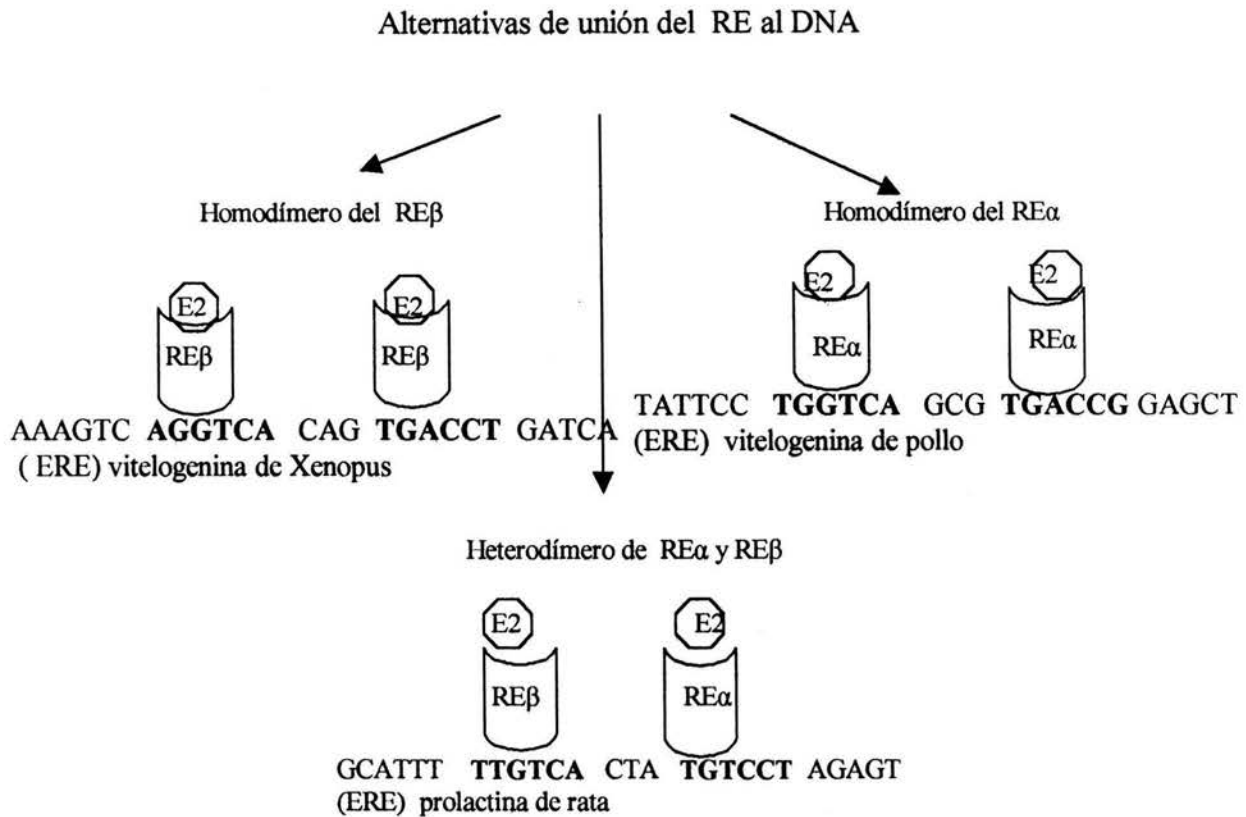


Esquema 3: Dominios y porcentajes de similitud de los receptores de estrógenos α y β . El receptor α está formado por 595 aminoácidos y el β por 530. En ambos se encuentran los dominios AB, C, D, E, y F, en el dominio AB y E se encuentran los sitios AF1 y AF2 respectivamente, que son sitios de unión de coactivadores, en el dominio C se encuentra el dominio de unión al DNA (DBD), en el dominio D se encuentra la señal de localización nuclear (SLN) y en la región E se encuentra el dominio de unión del ligando (HBD). El dominio C es el más conservado (96%) y el F el menos conservado (17%).

ELEMENTOS DE RESPUESTA A ESTRÓGENOS

Los receptores de esteroides activan la transcripción de genes blanco cuando el complejo H-RE se une a secuencias de DNA denominadas elementos de respuesta estrogénica (ERE), algunos de estos ya han sido caracterizados (Klein-Hitpass et. al., 1986; Tsai, 1990). Los ERE son secuencias de DNA de 34 pares de bases y cuando se encuentran repetidas veces, las designan como elementos de respuesta hormonal múltiple o MHREs (Liu, 2003), tienen una secuencia doble de bases muy conservada, estas secuencias; llevaron a suponer que el receptor de estrógenos se une al DNA en forma de homodímeros, (Klein-Hitpass et. al., 1988, 1989; Kumar y Chambon, 1988; Tsai et. al., 1988). Y algunos investigadores plantean la posibilidad de que

en los órganos en los que se expresan tanto el receptor α como el β se pueden formar heterodímeros al unirse al DNA (Esquema 4).



Esquema 4: Alternativas de unión del RE al DNA, los RE se pueden unir a los elementos de respuesta a estrógenos (ERE) en forma de homodímeros RE β -RE β , RE α -RE α o como Heterodímeros RE β -RE α .

Hasta el año 2001 han sido secuenciados alrededor de 50 elementos de respuesta en humano, pollo, anfibios, rata y ratón. (Klinge, 2001). Estas secuencias se pueden observar en los siguientes ejemplos de genes que codifican para las proteínas vitelogenina, ovoalbumina y prolactina que tienen EREs.

vitelogenina de Xenopus	AAAGTC AGGTCA CAG TGACCT GATCA
vitelogenina de pollo	TATTCC TGGTCA GCG TGACCG GAGCT
ovoalbumina de Pollo	TTATTC AGGTAA CAA TGTGTT TTCTG
prolactina de rata	GCATTT TTGTCA CTA TGTCCT AGAGT

Al observar los ERE se ha determinado que la secuencia más común es la siguiente: **AGGTCA** NNN **TGACCT** donde N puede ser cualquier base.

COACTIVADORES DE LOS RECEPTORES DE ESTRÓGENOS

Los coactivadores son proteína o complejos proteicos que interaccionan y estabilizan la formación de un complejo de preiniciación de la transcripción y facilitan el desdoblamiento de la cromatina (Hall et. al., 2001; Klinge, 2001), se han observado procesos de acetilación/desacetilación y metilación durante la formación de complejos multiproteicos que interactúan con los receptores (Olefsky, 2001; Stenoien et. al., 2001), así como procesos de fosforilación, en los cuales intervienen proteínas activadoras de la mitosis (Orti et. al., 1992; Weigel, 1994; Shao y Lazar, 1999).

Las proteínas que actúan como coactivadores tienen múltiples motivos de leucinas “LXXLL” (donde x puede ser cualquier aminoácido) y se ha propuesto que estos motivos son utilizados para interaccionar entre ellos mismos y con los receptores. (Heery et. al., 1997; Darimont et al., 1998).

Durante el proceso de activación los coactivadores (tabla 1), son reclutados para unirse al receptor en los dos dominios de transactivación, estos dominios son AF 1 en la región NH₂ del receptor y el dominio AF2 en la región carboxilo terminal del mismo (Tasset et. al., 1990; Mc. Kena et. al., 1999; Rosenfeld y Glass, 2001).

A los miembros de la familia p160: SRC-1, TIF2, GRIP-1 y AIB1 también son referidos como ACTR, RAC3, pCIP, or NCoA-3 (Onate et al., 1995; Anzick et al., 1997; Chen et al., 1997; Hong et. al., 1997; Li et. al., 1997; Torchia et. al., 1997). Se ha observado que las proteínas p160 interactúan con el dominio de unión al ligando (LBD) del receptor de estrógeno, mediante la intervención de otros coactivadores como CBP/P300 (Chen et. al., 1999; White et. al., 2000; Koh et. al., 2001).

Tabla 1

COACTIVADORES CONOCIDOS DE LOS RECEPTORES DE ESTRÓGENOS

COACTIVADORES	FUNCIÓN	CITA
PRIP140 o p140		(White R., et. al. 2000).
CBP, p300	histonas acetiltransferasas	(Chakravarti et. al. 1996 Hanstein et. al. 1996)
P/CAF interactúa con el complejo P300/CBP)	actividad de acetiltransferasa histónica	(Chen et.al. 1997, Spencer et. al. 1997, Blanco et. al. 1998, Martínez-Balbas et. al. 1998).
AIB1		(Anzick et. al. 1997)
TFIIH, TAFII30, TAFII110; TFIIF (TBP)	Proteínas de unión a la caja TATA	(Sadovsky et. al. 1995, Jacq et. al. 1994, Schwerk et. al. 1995)
ERAP-140 ERAP-160		(Halachmi et.al. 1994)
PGC-1 y PERC	coactivadores selectivos del RE α	(Kressler et. al. 2002)
P/CIP, ACTR, RAC3	tienen función de acetil transferasa	(Collinwood et.al. 1999)
-SRC1/NcoA-1	Tienen actividad de acetiltransferasa histónica, interactúa con CBP	(Onate et. al. 1995, 1998, Li et.al. 1997, Stenoien et. al. 2001)
-SRC2/TIF-2/NcoA-2	factor -2 transcripcional intermediario	(Voegel et. al. 1996)
P/CIP/AIB1/ACTR/RAC/TRAM-1		(Mc Kennal et. al. 1998, 1999)
CBP/p300 p160. TRAP-DRIP-ARC PBP/TRAP220/DRIP205	Complejos que han sido localizados simultáneamente unidos al receptor estradiol actividad intrínseca de acetil transferasa histónica	(Shang, et. al. 2000, Burakov et al. 2000)

CORREPRESORES DE LOS RECEPTORES DE ESTRÓGENOS

Los correpresores son proteínas que pueden actuar como inhibidores de la actividad del RE cambiando su estructura conformacional (McDonnell et. al., 1995), estos cambios son diferentes a los producidos por los coactivadores (Pike et. al., 2001).

Los correpresores como el NcoR, SMRT y mSin3, reclutan desacetilasas histónicas para detener la transcripción génica (Heinzel et. al., 1997, Collinwood et. al., 1999), otra forma de actuar es compitiendo con los coactivadores para unirse al complejo RE-H como es el caso del correpresor REA que compete con SRC-1 (McKenna y O'Malley, 2002).

Los correpresores y coactivadores son también blancos de múltiples rutas de transducción de señales. La activación de las rutas de señalización que estimula la ruta de las proteínas activadoras de la mitosis (MAP cinasas), disminuye la asociación de NcoR con el receptor estrogénico en la presencia de antagonistas como el tamoxifen basado en la fosforilación de región NH2 terminal del RE. (Rosenfeld y Glass, 2001).

ANTAGONISTAS DE LOS RECEPTORES DE ESTRÓGENOS

Las sustancias denominadas antagonistas intervienen en el proceso de acción de los receptores estrogénicos. La forma como actúan estas proteínas, parece ser que depende del tipo de tejido, ya que se ha observado que las sustancias que se han determinado como correpresores en algunos tejidos, en otros funcionan como coactivadores, como se muestra en la tabla 2 (Hall et. al., 2001).

Tabla 2: ACTIVIDAD BIOLÓGICA DE ANTAGONISTAS DEL RE EN TEJIDOS BLANCO					
	Hueso	Seno	Tejido cardiovascular	útero	
17 β estradiol	+	+	+	+	Mc Donnell 1999
ICI 182, 780	-	-	-	-	Jordan y Morrow 1999, Carrer et. al. 2003
Tamoxifen	+	-	+	+	Tzukerman et. al. 1994, Smith et. al. 1997
Raloxifene	+	-	+	-	McDonnell 1995
GW5638	+	-	+	-	Connor et. al. 2001

En la tabla 2 se observa en la primer columna el 17 β estradiol como ejemplo de activador y en seguida diferentes antagonistas que en ocasiones pueden actuar como activadores (+) y en otros como inhibidores (-) en diferentes tejidos como son el hueso, seno, tejido cardiovascular y útero (Hall et. al., 2001).

MECANISMOS DE ACCIÓN DE LOS RECEPTORES DE ESTRÓGENOS α Y β

Existen cuatro posibles rutas propuestas de acción de los RE α y β (esquema 5) (Tsai, 1994; Gustafsson, 1999; Olefsky, 2001; Kawata, et. al., 2001; De Franco, 2002)

- 1.- Mecanismo clásico dependiente del ligando.
- 2.- Mecanismo independiente del ligando
- 3.- Mecanismo de unión independiente de ERE
- 4.- Mecanismo por señalamiento de superficie celular (no genómico)

1.- Mecanismo clásico dependiente del ligando

En este modelo en ausencia de la hormona los receptores son secuestrados en un complejo inhibitorio multiproteico en el núcleo de las células blanco. La unión del ligando induce un cambio conformacional de activación en el RE, dimerización y unión de promotores que conllevan a una alta afinidad de unión a ERE localizados en los genes blanco en el DNA. En las uniones DNA-receptores contactan con el aparato transcripcional general a través de los cofactores (McKenna et. al., 1999).

La actividad transcripcional ligando-dependiente del RE α se efectúa mediante los dos dominios de activación, el primero de acción constitutiva (AF-1) localizado en la región amino terminal (NH₂) (dominio A/B) y el dominio hormonal dependiente AF2, localizado en el dominio del ligando. El AF-2 incluye una α hélice (H12) que es esencial para la unión de coactivadores de la familia SRC (McKenna et. al., 1999; Heery et. al., 1997), el dominio AF-1 recluta coactivadores similares a los de AF2 y coactivadores únicos para ésta región (Webb et. al., 1998; MacKenna et. al., 1999)

2.- Mecanismo independiente del ligando

La función del RE puede ser modulada por señales extracelulares en ausencia de estradiol, este mecanismo de acción puede desencadenarse por medio de factores de crecimiento como el

Factor de crecimiento epidermal (EGF) y el factor- 1 dependiente de insulina (IGF-1), así como el efector intracelular análogo 8 bromo adenosin monofosfato ciclico los cuales activan al receptor y así iniciar, la expresión de genes blanco del RE (Smith 1998, Curtis et al 1996). Las modificaciones del estado de fosforilación del RE por Kinasas celulares pueden servir como un mecanismo importante de activación del mecanismo ligando-dependiente. El residuo de serina 118 del RE α en el dominio de AF-1 es fosforilado por una proteína cinasa activadora de la mitosis (MAPK) siguiendo en la ruta con EGF o IGF, permitiendo al receptor interactuar con el coactivador específico del RE α p68 RNA helicasa y activar la transcripción de los genes blanco. La ruta de las MAPK también incrementa la actividad del RE β estimulando el reclutamiento de SRC-1 y AIB1 que son fosforilados por las MAPK (Font de Mora y Brown 2000, Rowan et al 2000).

3.- Mecanismo de unión independiente de ERE

En esta ruta de acción, el complejo RE-E2 no se une a los EREs sino que se une a sitios de unión AP1 o Sp1 en el DNA a través de las proteínas Jun y Fos (también denominados como unión proteína-proteína), donde varios genes contienen secuencias promotoras ricas en GC son activadas vía un complejo RE α -Sp1 (Nilsson 2001).

La activación de AP-1 por el complejo E2-RE requiere de los dominios AF-1 y AF-2, este factor de activación incrementa el reclutamiento de los coactivadores p160 (SRC-1 GRIP1), los cuales son reclutados por las proteínas Jun y Fos (Hall et. al., 2001; Kushner et. al., 2000).

Cuando el tamoxifen actúa como agonista en conjunto con el RE β , utiliza los sitios AP-1 los cuales son dominios de unión en el ADN que tienen un parecido a los elementos de respuesta antioxidante y por este motivo se cree que el RE β puede estar implicado en la regulación de genes reguladores-antioxidantes y su expresión puede contribuir a la iniciación y progresión de transformaciones neoplásicas (Peaech et al., 1997; Hu et. al., 1998)

4.- Mecanismo por señalamiento de superficie- celular (no genómica)

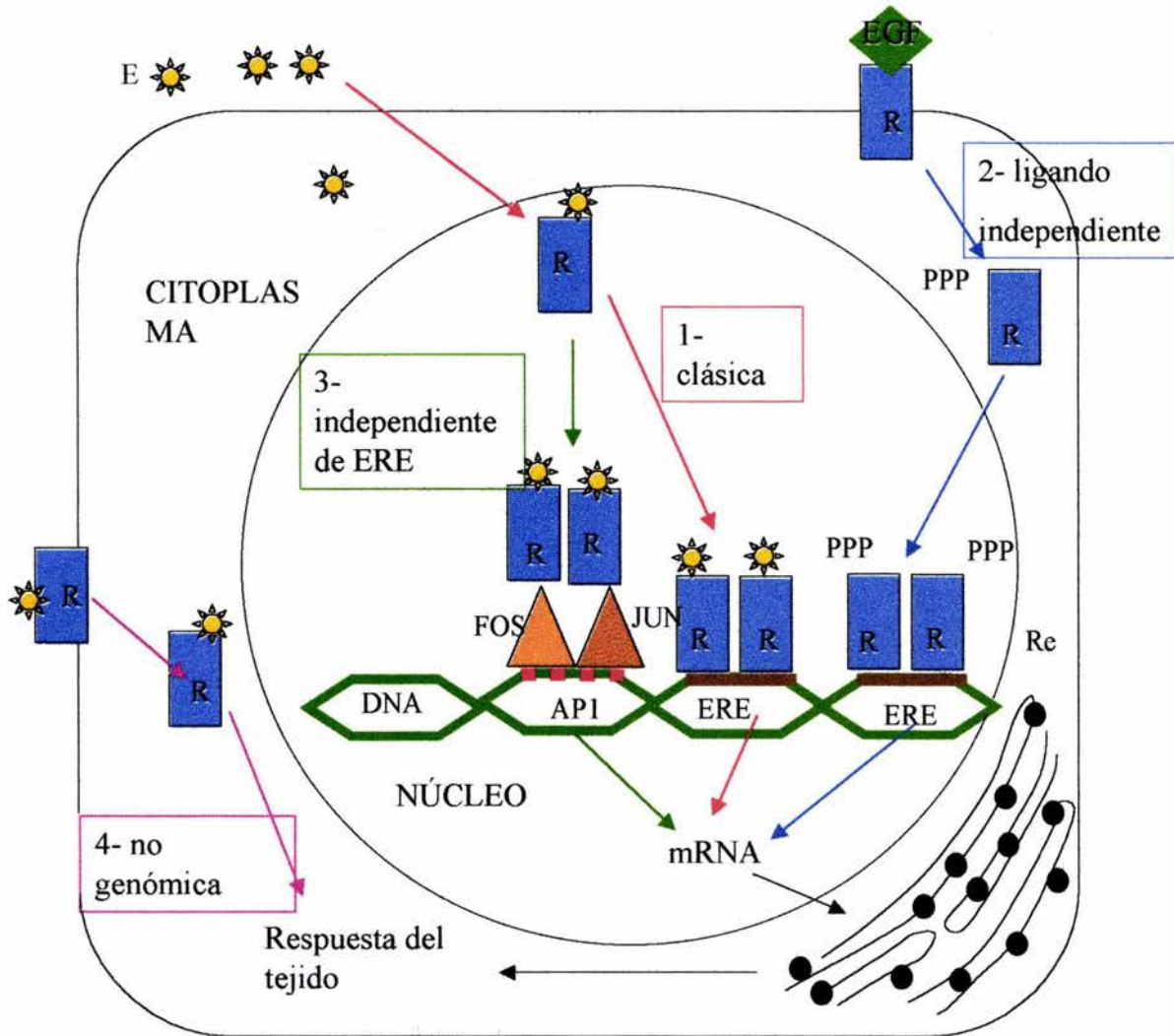
Los efectos rápidos del estradiol en el hueso, mama, sistema vascular y nervioso sugieren que el estrógeno puede también producir efectos no genómicos y esto podría ser a través de formas de

RE de superficie celular que están ligados a proteínas de transducción de señales. El RE y la ruta tirosina cinasa acoplada a la membrana están integralmente unidos, el E2 activa la ruta de señalización de las MAPK en varios tipos celulares. Los efectos del estradiol a través del RE α son regulados por un mecanismo no genómico que involucra la activación de una óxido -nitríco sintetasa endotelial por el estrógeno a través de la ruta MAPK y fosfatidil-inositol 3 cinasa/Akt (Mendelsohn, 2000; Simoncini et. al., 2000).

En osteoblastos y osteoclastos la ruta MAPK es activada por el E2 el cual puede estar involucrado en el incremento de efectos antiapoptóticos de la hormona (Kousteni et. al., 2001).

Razandi en el 2000 detectó la presencia del RE α y el RE β en la membrana de células de ovario de Hámster Chino y determinó que los REs están unidos a proteínas G y son capaces de inducir una variedad de señales de transducción incluyendo la inducción de la proliferación celular.

Se han encontrado evidencias de que existen formas de RE en la membrana celular distintas a las existentes en el núcleo en sistema nervioso (Gu et. al., 1999) y que estos receptores de membrana están acoplados a proteínas G (Benten et. al., 2001). Se ha propuesto que en éste mecanismo la acción hormonal puede ser independiente de los receptores nucleares. (Hall et. al., 2001)



Esquema 5: Mecanismos de acción del estradiol (E) en la célula blanco. En la ruta clásica o ligando dependiente (\rightarrow) el estradiol se une al receptor (R) y este complejo se une a los elementos de respuesta a estrógenos (ERE) en el DNA. En la ruta (2) ligando independiente el receptor es estimulado por el factor de crecimiento epidérmico (EGF) (\rightarrow) el receptor es fosforilado y se une a los ERE. En la ruta tres o independiente de ERE (\rightarrow) el complejo estradiol-receptor se unen al DNA en sitios AP1 ■■■■ por medio de dos proteínas denominadas FOS y JUN. En estas tres rutas después de la unión al DNA se continúa con la síntesis y maduración de mRNA el cual después se dirige al retículo endoplasmático para iniciar la síntesis de proteínas y con esto generar una respuesta fisiológica en los tejidos. En la ruta cuatro (\rightarrow) el estradiol se une al receptor en el citoplasma y se desencadena una respuesta fisiológica (Hall et. al. 2001)

EFFECTOS DE LOS ESTRÓGENOS SOBRE LOS NÚCLEOS CELULARES.

Una vez que los estrógenos han actuado en los órganos blanco, se desencadenan respuestas fisiológicas en el núcleo celular, que tienen lugar durante la primera hora después de un tratamiento con estrógenos, estas respuestas se hacen patentes de diferentes formas:

- a).- Aumento en la tasa de síntesis de los tres tipos de RNA (m RNA, rRNA, tRNA) (Mueller et. al., 1958; Greenman et. al., 1965; Wicks et. al., 1965; Means y Hamilton, 1966; O' Maller et. al., 1968; Wilson, 1963; Hamilton, 1968; Malkinson, 1980; Beato, 1989; Milan et. al., 1992).
- b).- Aumento en la síntesis de proteínas cromosómicas no histónicas (Mueller, 1960, Hamilton 1962, Noteboom y Gorski 1963 O' Malley et. al. 1969)
- c).- Aumento de la actividad tanto de la RNA polimerasa nucleolar (RNA polimerasa I), que cataliza la formación del RNA ribosomal, como de la RNA polimerasa nucleoplasmica (polimerasa II) que cataliza la formación del mRNA (Gorski, 1964; Glasser et. al., 1972; Mohla et. al., 1972)
- d).- Inducción de salida de los RNA mensajeros nucleares y ribonucleoproteínas al citoplasma, (Vázquez Nin et. al., 1979; Thampan, 1985,1988).

III.- RECEPTOR DE ESTROGENOS NO ACTIVADO (naRE)

A mediados de la década de los noventa se dio a conocer la existencia de un nuevo receptor de estrógenos, que tiene un peso molecular aproximado de 66 kDa el cual se encuentra unido a la membrana plasmática de células de útero de cabra en su forma no activa (naRE) (Karthikeyan y Thampan, 1994, 1996), y determinaron que éste receptor es una glucoproteína que se une a estradiol, que es una tirosina cinasa capaz de autofosforilarse (Anuradha et. al, 1994) y que no tiene la capacidad de unirse al DNA (Karthikeyan y Thampan, 1994; Thampan et. al 2000).

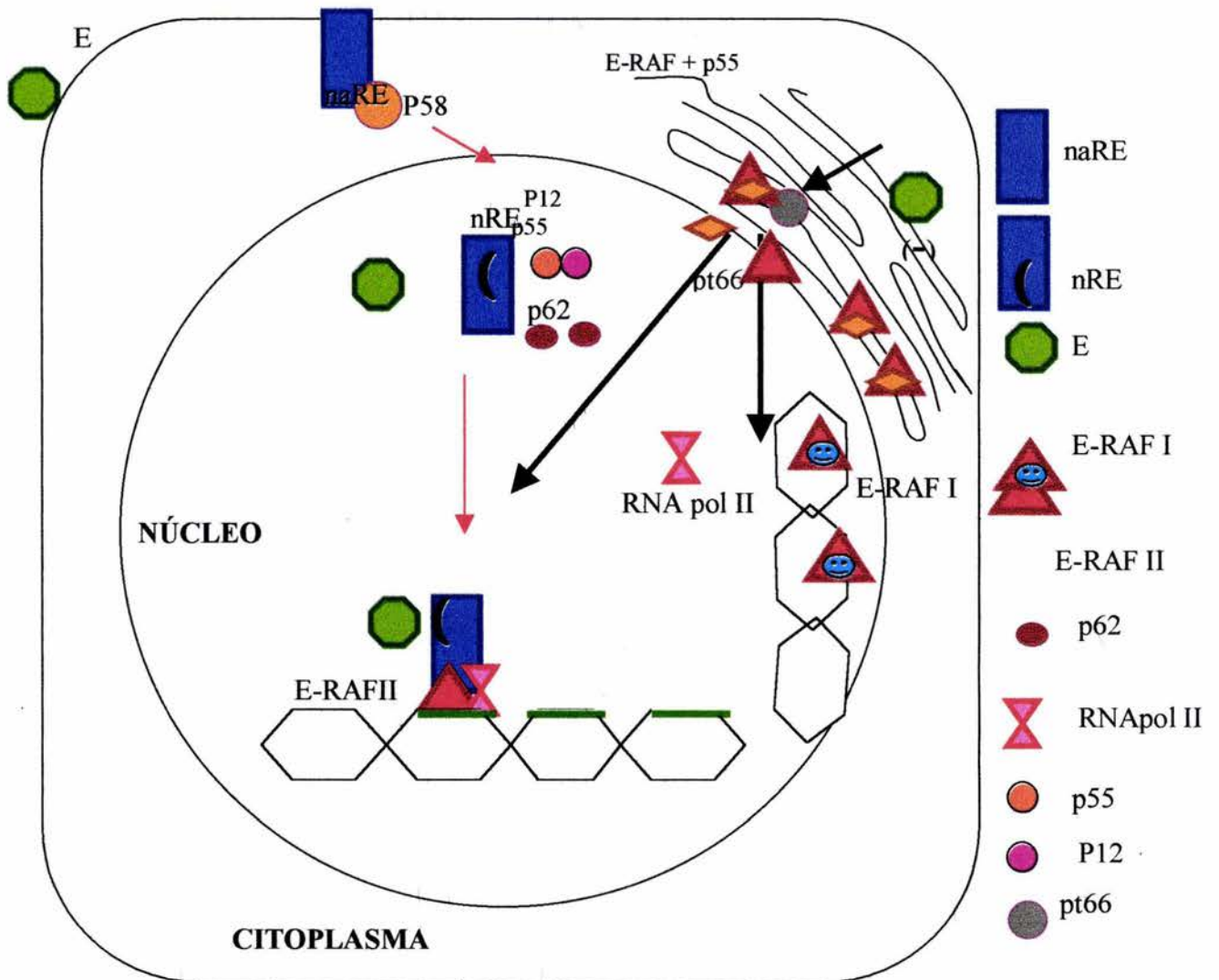
A partir del descubrimiento del naRE, se han realizado nuevos experimentos utilizando técnicas bioquímicas, que han servido como base para que Thampan y su grupo de colaboradores, pudieran proponer un modelo para explicar, el mecanismo de transporte del naRE, desde la membrana citoplasmática hasta el DNA en el núcleo celular. En este modelo propone lo siguiente (Esquema 6):

La exposición a estradiol de células de útero provoca la disociación del naRE de la membrana citoplásmica para ser transportado al núcleo (Karthikeyan y Thampan, 1996), el receptor se une a una proteína de 58 kDa., que reconoce la SLN del receptor y se ancla a los filamentos de actina, en estas condiciones el estradiol se une al receptor y se dirigen hacia el núcleo celular, en este transporte están involucradas las proteínas Hsp70 y Hsp 90, se cree que además intervienen vesículas cubiertas de clatrina, aunque no se sabe exactamente de que manera intervienen en el proceso de transporte del naRE (Sebastián y Thampan, 2002 a y b; Padma y Thampan, 2000; Padma et. al., 2000; Sreeja y Thampan, 2004a). El complejo p58-naRE se une a la importina α (p55) y a la importina β (p12) del complejo de poro por medio de la proteína p66, las importinas se encargan de la translocación del naRE (Sreeja y Thampan, 2004 b). En el momento de entrar al núcleo, el naRE sufre una desglucosilación por la proteína p62 transformando al naRE en nRE II (Jaya et. al., 2000), nRE II tiene dos formas de actuar en el núcleo:

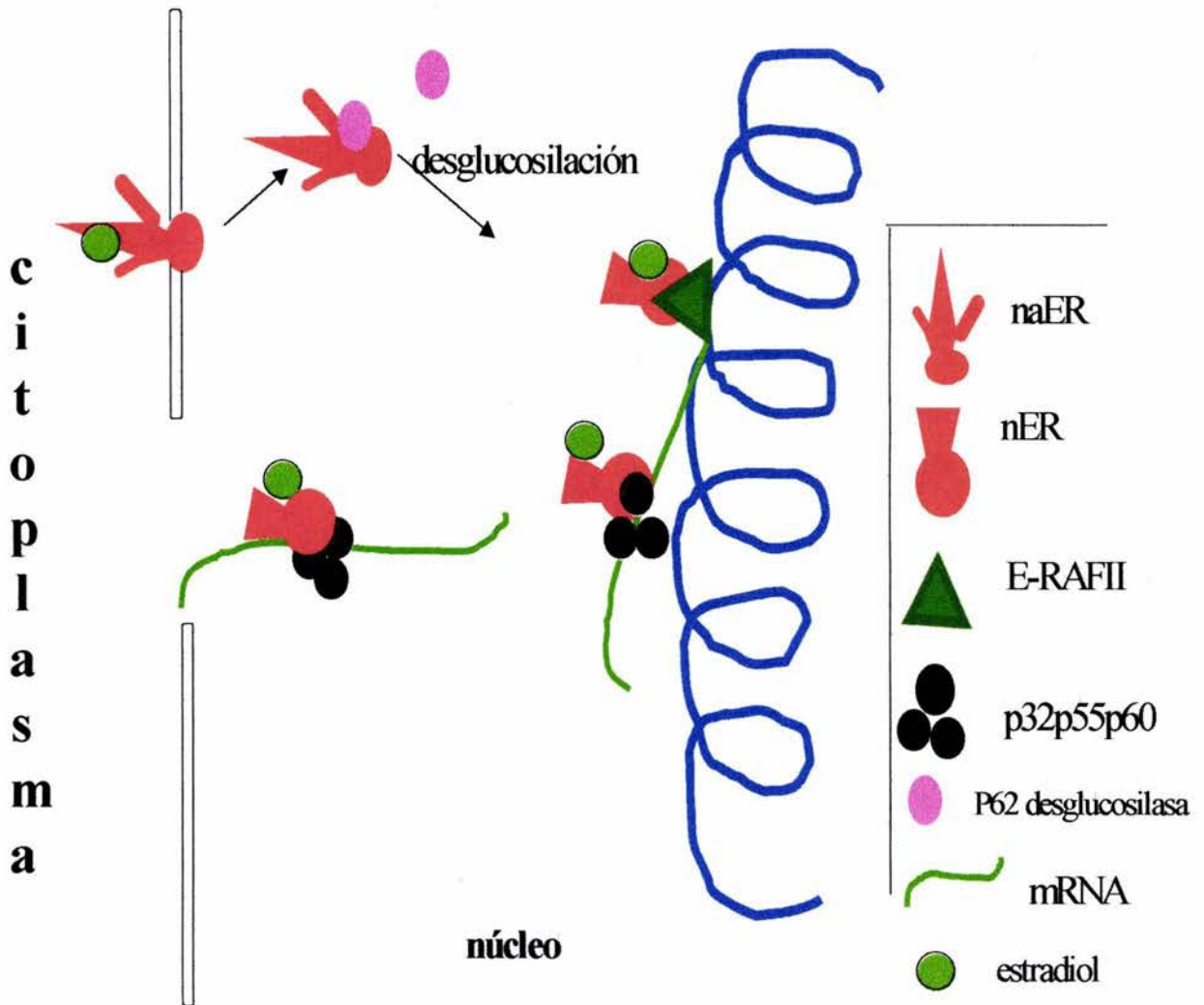
1. - Formando el complejo, E-RAF II – nRE - RNA polimerasa II (Karthikeyan y Thampan 1994, 1996; Jaya et. al., 2000). El E-RAF II tiene un dominio de unión al DNA que requiere el nRE II, por lo tanto una vez formado el complejo se une a los ERE de genes blanco,

desestabilizando la doble cadena del ADN para inducir la transcripción (Esquema 6) (Thampan y Clark, 1981; Thampan, 1989).

2- Una vez realizada la transcripción de los mRNA, nER se une a los complejos ribonucleoproteicos pequeños nucleares por medio de tres proteínas p32, p55 y p60, la formación del complejo nRE-II p32, p55, p60 es dependiente de la actividad de ATPasa y Mg^{++} , y en presencia de estradiol participa en la exportación de mRNA al citoplasma celular (Esquema7) (Thampan, 1985; Thampan, 1988; Sebastian y Thampan, 2002 b).



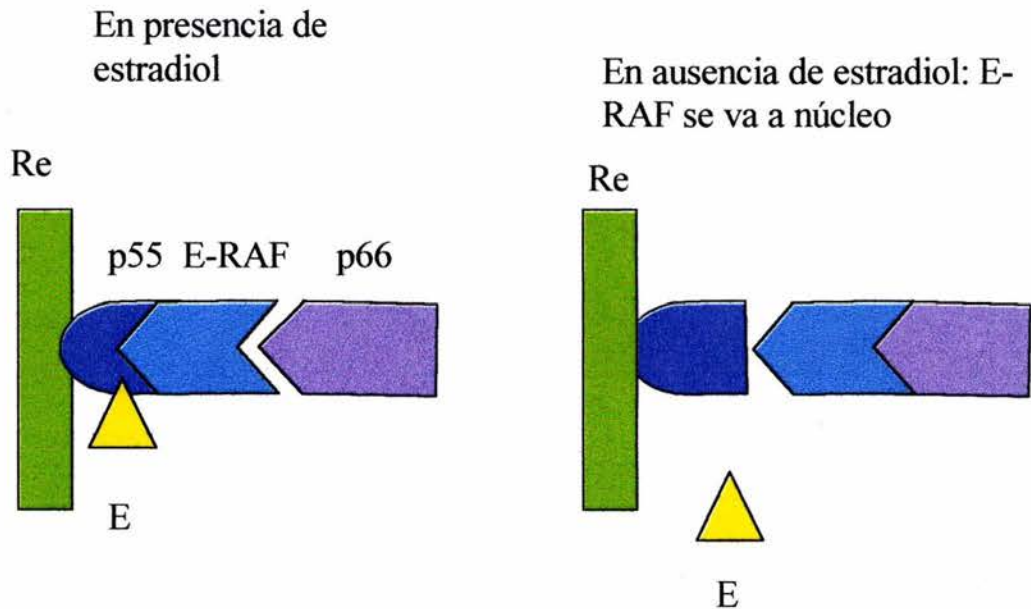
Esquema 6: Mecanismo teórico de transporte del naRE de la membrana celular al núcleo. En presencia de estradiol el naRE se libera de la membrana plasmática (→) y se une a la proteína p58 que reconoce la señal de localización nuclear y lo transporta hasta el núcleo, en donde se une a la proteína p66 que reconoce a las importinas α (p55) y β p12, una vez dentro del núcleo sufre una deglucosilación por la proteína p62 y se transforma en el receptor de estrógenos nuclear (nRE) para formar un complejo proteico con RNA pol II y el factor de activación del receptor estrogénico (E-RAF II). Por otra parte, en ausencia de estradiol E-RAF se libera del retículo endoplasmático y de p55 (→) para unirse a la proteína de transporte pt66 y se dirigen al núcleo celular, en el cual E-RAF tiene dos funciones, 1) unirse al complejo de activación de la transcripción y 2) permanecer como E-RAF I que interviene en el silenciamiento génico.



Esquema 7: Mecanismo teórico de exportación de los mRNA efectuado por el receptor nuclear nER. Una vez que el receptor estrogénico no activado (naER) entra al núcleo, sufre una desglucosilación por la proteína p62 y lo transforma en el receptor nuclear nER, el cual permanece unido al estradiol. En el núcleo cumple dos funciones, la primera es formar un complejo con el factor de activación E-RAF e inducir la transcripción y la segunda es unirse a las proteínas p32, p55 y p60 para participar en la exportación de los mRNA.

IV.- FACTOR DE ACTIVACIÓN DEL RECEPTOR DE ESTRÓGENOS NO ACTIVADO (E-RAF)

La existencia del E-RAF en el útero de mamífero se demostró desde 1981, (Thampan y Clark, 1981) y fue purificado en 1987, es una proteína que tiene un peso aproximado de 55 kDa (Thapman, 1987), el sitio primario de localización es el retículo endoplasmico, al cual está anclado por una proteína de 55 kDa (p55) (Kumar et. al. 1999). Se ha observado que cuando la concentración de estradiol decrece en células de útero, la interacción entre la proteína p55 del retículo endoplásmico y E-RAF se debilita, esto trae como consecuencia que el E-RAF se una a la proteína de transporte tp66, se libere del retículo endoplásmico y se dirija al núcleo (Esquema 8) (Thampan et. al., 2000).



Esquema 8: Localización del factor de activación del receptor de estrógenos no activado (E-RAF) en el citoplasma. En presencia de estradiol (E) E-RAF se encuentra anclado al retículo endoplásmico por la proteína p55, cuando el estradiol se encuentra ausente la unión de E-RAF y p55 se debilita y la proteína de transporte p66 se encarga de llevar a E-RAF al núcleo celular.

El factor de activación E-RAF se ha caracterizado con la ayuda de la proteasa neutra activadora de calcio, con la cual se ha determinado que E-RAF está formado por dos fragmentos proteicos α y β de peso molecular de 32 y 30 kDa. respectivamente, el fragmento α tiene la capacidad de unirse al DNA, también de formar un dímero con naRE así como la facultad de unirse al

colesterol. El fragmento β tiene el dominio de la señal de localización nuclear (SLN), aunque solo es incapaz de entrar al núcleo. Ambos fragmentos tienen la función de ATPasa (Kumar et. al. 1999).

La proteína E-RAF no tiene la capacidad de unirse al estradiol en el citoplasma (Thampan et. al. 2000).

El factor de activación E-RAF existe en dos formas funcionales dentro del núcleo, E - RAF I estabiliza la doble hélice e inhibe la transcripción, E-RAF II desestabiliza la doble hélice del DNA favoreciendo la transcripción (Esquema 6). De esta forma E-RAF participa en la regulación de la expresión génica (Thampan 1989; Kumar et al 1999; Govind y Thampan 2001). Ambas proteínas tienen características inmunológicas idénticas (Thampan 1989).

Cuando el colesterol se une a E-RAF impide la entrada de éste último al núcleo celular e inhibe la capacidad de E-RAF para unirse al nER II (Thampan et. al 2000)

V.- ULTRAESTRUCTURA DEL NÚCLEO EN INTERFASE

La interfase es el período en que las células no están dividiéndose y no suceden cambios visibles con el microscopio óptico, pero se sabe que existe una gran actividad, ya que es en esta etapa en la que se realiza la transcripción, el procesamiento y el transporte de precursores del RNA (Weislander, 2004). En esta etapa el núcleo es el organelo más grande de las células eucariontes y mide entre 5 y 10 μm de diámetro (Esquema 9) (Echeverría y Vázquez, 1995).

ENVOLTURA NUCLEAR

El núcleo es el sitio que sirve como depósito 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 nucleocitoplásmico de moléculas y complejos macromoleculares y sirve como sitio de anclaje para la cromatina en la etapa de interfase (Spector, 2003; Driel y Roel-Fransz, 2004). La membrana externa es continua con el retículo endoplásmico 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 retículo endoplásmico, la membrana nuclear externa y la interna están fusionadas en diferentes puntos, formando los poros nucleares. Estos poros están ocupados por complejos macromoleculares ensamblados denominados complejos de poro nucleares (NPC) (Kiseleva, 2004), los cuales controlan el pasaje de moléculas hacia dentro y hacia 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 demostrado que existe el paso de proteínas y RNAs entre el núcleo y el citoplasma por medio de los poros nucleares (Rabut et. al., 2004).

LÁMINA NUCLEAR

Entre la membrana interna de la envoltura nuclear y la cromatina perinucleolar se encuentra la lámina nuclear, es una capa electrodensa de 10 nm., que contiene polipéptidos y filamentos orientados ortogonalmente, estos últimos son muy parecidos a los filamentos intermedios.

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, también interviene en la regulación del ciclo celular, la diferenciación y el desarrollo celular (Gruenbaum et. al., 2003).

CROMATINA

La cromatina contiene el material genético o DNA de las células. Se encuentra de dos formas, compacta y dispersa o laxa (Esquema 9). La cromatina compacta contiene la información genética que es útil a otras células del organismo, o para la formación del mismo durante el desarrollo embrionario y aún para otros momentos funcionales de la misma célula (Angus y Earnshaw, 1998). La cromatina en la etapa de interfase se encuentra distribuida en territorios cromosomales (Spector, 2003). La cromatina laxa o extendida es la cromatina potencialmente activa e involucra la condensación de un cromosoma, el caso más conocido es la condensación de un cromosoma X o cuerpo de Barr (Spector, 2003; Driël y Fransz, 2004).

ESTRUCTURAS RIBONUCLEOPROTEICAS

Las estructuras formadas por ribonucleoproteínas están involucradas en el proceso de transcripción y maduración del RNA mensajero (Monneron y Bernhard, 1969; Fakan, 1976 a y b; Vázquez Nin y Echeverría, 1996). La nueva molécula de RNA se une a proteínas constituyendo partículas ribonucleoproteicas heterogéneas nucleares (hnRNP o pre-mRNA), las cuales sufren un proceso de maduración antes de salir del núcleo como RNA mensajero, (Echeverría y Vázquez Nin, 1995). Esta maduración consiste en la adición de un capuchón o “cap” en el extremo 5’ de la molécula de RNA, la adición de una “cola” de ácido poliadenílico (poli A) en el extremo 3’ y el proceso de “splicing”, que consiste en la eliminación de secuencias denominadas intrones, (Jiménez- García y Spector, 1993).

En el proceso de splicing intervienen ribonucleoproteinas pequeños nucleares (snRNP's) conocidas como U1, U2, U4, U6, U5 y factores que intervienen en el ensamblaje del espleciosoma, estos factores pertenecen a una familia de proteínas que tienen secuencias ricas en serina-arginina y por tal motivo se les nombra proteínas SR que reconocen RNA (Cazalla et. al., 2002; Sanford et. al., 2003; Graveley et. al., 2004), entre estas se encuentran SF2/ASF, SC35, SRrp86, SRrp40, SRrp35 , Cyclin L, SRp20, SRp55, SRp20, SRp75 y p54 (Longman

et. al. 2000, Barnard y Patton, 2000; Cowper et. al., 2001; Dickinson et. al., 2002; Barnard et al., 2002).

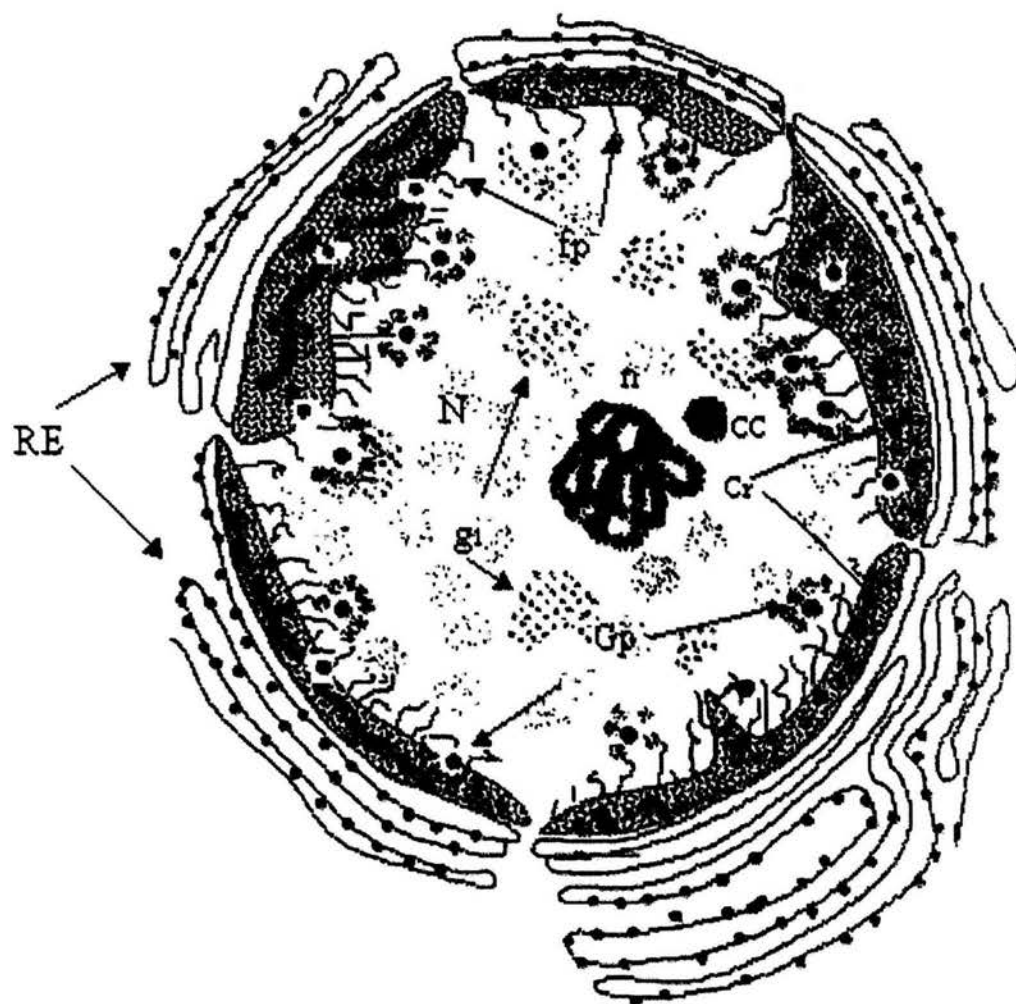
En el núcleo se pueden observar las siguientes estructuras : a).- Gránulos intercromatinianos, b).- Gránulos pericromatinianos, c).- Fibras pericromatinianas, d).- Cuerpos de Cajal y e).- Nucleolo. Estas estructuras están formadas por RNA y proteínas (Esquema 9).

a).- Gránulos intercromatinianos

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 et. al., 1989). Se sabe que son sitios de acumulación de partículas de ribonucleoproteicas de bajo peso molecular ricos en uridina (snRNP) (Spector et al., 1993; Puvion et. al., 1984). Estas snRNP son esenciales en el proceso de splicing que da como resultado la maduración de los mRNAs, al igual que las proteínas SC-35, SF2 (Spector, 1993; Melcak y Raska, 1996). Se ha propuesto que los cúmulos de gránulos intercromatinianos juegan un papel en el transporte y distribución de la maquinaria de splicing (Jiménez-García y Spector, 1993).

b).- Gránulos pericromatinianos

Los gránulos pericromatinianos (GPC) están formados por ribonucleoproteínas (Monneron y Bernhard, 1969). Tienen un diámetro de 40 a 45 nm., están rodeados de un halo claro de 25 nm, se encuentran localizados en la periferia de los cúmulos de cromatina y además se pueden localizar en el área intercromatiniana, se ha propuesto que podrían ser sitios de almacenamiento y / o transporte del RNA mensajero (Vázquez Nin y Bernhard, 1971; Vázquez Nin et. el., 1979; Melcak y Raska, 1996; Pombo y Cook, 1996). Los GPC se observan electrodensos, cuando se emplea la técnica de contraste EDTA, su contraste es incrementado en tanto que la cromatina es blanqueada, esto facilita localizarlos en el área periférica a la cromatina.



Esquema 9.- Estructura del núcleo celular. Cromatina (Cr), nucleolo (n), gránulos intercromatinianos,(gi) gránulos pericromatinianos (gp), fibras pericromatinianas fp), retículo endoplásmico (Re), Cuerpos de Cajal (CC) (Modificado de Bernhard, 1969).

c).- Fibras pericromatinianas

Las fibras pericromatinianas fueron descritas por Monneron y Bernhard en 1969. Se encuentran rodeando a la cromatina periférica en algunas de sus áreas, las propiedades de contraste de estas fibras son iguales a las otras estructuras ribonucleoproteicas. Las fibras pericromatinianas tienen un diámetro que varía entre 3 y 5 nm, pueden presentar diferentes grados de enrollamiento que llegan a formar cuerpos irregulares y finalmente gránulos esféricos originando a los gránulos pericromatinianos y los gránulos de Balbiani, (Vázquez Nin y Bernhard, 1971). Se ha sugerido que las fibras pericromatinianas pueden representar el RNA heterogéneo (RNAhn) en proceso de transcripción o recién sintetizado (Fakan et al., 1976 a y b) en estas fibras se realiza el proceso de splicing ya que se han localizado factores de splicing como SC-35 (Jiménez García y Spector, 1993; Spector, 1993).

d).- Cuerpos de Cajal

Están formados por proteínas y RNA, y fueron identificados por Cajal en 1903. Su estructura es de tipo fibrilar (Spector, 1993), tienen un diámetro de 0.3 a 0.5 μm y 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, parecen ser manojos de fibras finas de 5 nm de grosor, las cuales están irregularmente entrecruzadas a lo largo del eje de las fibras. Algunas veces se encuentran en continuidad con la cromatina que rodea al nucleolo y cerca de los cúmulos de gránulos intercromatinianos (Monneron y Bernhard, 1969). La DNAasa no tiene ningún efecto visible en los cuerpos de Cajal (Puvion y Puvion, 1996).

e).- Nucleolo

El nucleolo es una estructura ribonucleoproteica que ocupa el 25% del volumen total del núcleo, aunque no tiene una membrana que lo delimite es muy denso y resalta al observar células en el microscopio óptico así como en el electrónico, en las células animales se encuentra rodeado por cromatina perinucleolar, la cual está conectada con regiones de cromatina intranucleolar (Echeverría, 2001). El nucleolo es el sitio donde se encuentra el DNA que sirve como molde a partir del cual se sintetizan los pre-RNAs ribosomales (salvo el 5S rRNA), a

estas secuencias de DNA se les denomina regiones organizadoras nucleolares (NOR). También es el lugar de maduración y ensamble de los pre-RNAs ribosomales (Jiménez García y Spector, 1993; Stein et. al., 2003). Desde el punto de vista estructural, el nucleolo está formado por cuatro áreas organizadas componente fibrilar denso, centros fibrilares, área granular y cromatina nucleolar (Spector, 1993).

Los centros fibrilares están rodeados por el componente fibrilar denso, en los centros fibrilares se encuentra el DNA que forma la región organizadora nucleolar (NOR). Este es el sitio específico dentro del nucleolo en el cual el DNA sirve de matriz para transcribir las moléculas precursoras de los RNA ribosomales 18, 5.8 y 28 S, el snRNA U3, y del snRNA U6 (Shaw., 1995).

El componente granular al igual que el componente fibrilar denso son las áreas más grandes del nucleolo, en esta región 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, en este lugar se realiza la combinación de RNA con las proteínas nucleolares, tales como las argirofílicas, denominadas Ag-NOR (Busch, 1977; Hernández-Verdún et. al., 1993) el componente granular es el sitio de almacenamiento o acumulación de las moléculas prerribosomales (Spector, 1993; Shaw, 1995).

VI.- HIPÓTESIS DE TRABAJO

**LAS VARIACIONES DE LA CONCENTRACIÓN DE ESTRADIOL PRODUCEN
CAMBIOS EN LA ABUNDANCIA DE E-RAF EN EL NÚCLEO CELULAR**

VII .- OBJETIVO

LOCALIZAR EL FACTOR DE ACTIVACIÓN DEL RECEPTOR ESTROGÉNICO (E-RAF)
EN PRESENCIA Y AUSENCIA DE 17 β ESTRADIOL, EN DIFERENTES
COMPARTIMENTOS CELULARES POR INMUNOCITOQUÍMICA
ULTRAESTRUCTURAL

VIII.- MATERIAL Y MÉTODOS

Se utilizaron 21 ratas Wistar hembras de 2 meses de edad, que se dividieron en dos grupos, tres ratas intactas y 18 ratas que se ovariectomizaron. Después de 8 días, se separaron a tres ratas ovariectomizadas y a las 15 que quedaron se inyectaron con 3 μ g de estradiol intraperitoneal a cada una. Se formaron grupos de tres para ser sacrificadas en los siguientes tiempos: 3, 9, 18, 27 y 36 minutos después de administrado el estradiol. Tanto las ratas intactas como las ovariectomizadas y las ovariectomizadas e inyectadas con estradiol, después de anestesarlas, se disecaron y se tomaron muestras del útero de cada rata. Estas muestras se fijaron en paraformaldehído 4% y se procesaron para microscopía electrónica, se utilizaron dos resinas de inclusión: Resina epoxica (diagrama de flujo I) y LRW (diagrama de flujo II).

Una vez polimerizados los bloques de las 21 muestras, se realizaron cortes semifinos de una micra y se colocaron en portaobjetos cubiertos con poli L lisina, de Sigma en concentración 0.1% para realizar una inmunofluorescencia (diagrama de flujo III). El anticuerpo primario anti E-RAF hecho de una proteína purificada de cabra y desarrollado en conejo es una gammaglobulina policlonal, fue adquirido del Rajiv Gandhi Center for Biotechnology en la India a cargo del DR. Raghava Varman Thampan (Thampan, 1987). Se utilizó el anticuerpo secundario anti conejo acoplado con FITC de SIGMA.

También se hicieron cortes ultra finos de entre 60 a 90 nm. de grosor, estos últimos se montaron en rejillas de cobre y níquel cubiertas con formvar.

Las rejillas de níquel se utilizaron para realizar la inmunolocalización ultraestructural de E-RAF (Diagrama de flujo IV), el anticuerpo secundario que se utilizó fue GAR IgG acoplado con oro coloidal de 12 nm., después de realizar las inmunolocalizaciones se contrastaron las rejillas con acetato de uranilo 1 minuto y citrato de plomo 30 segundos. Se tomaron imágenes de 10 núcleos por cada rata en el microscopio electrónico Zeiss EM10, empleando un videoprinter. En esas imágenes se contó la densidad numérica de los granos de oro adheridos al segundo anticuerpo, utilizando una computadora provista con el programa Imagenia 5000. La densidad numérica está dada en número de granos de oro por micra cuadrada. Se realizó una estadística descriptiva para cada grupo de datos y un análisis de varianza.

El ruido de fondo se tomó en el lumen uterino adyacente a las células.

DIAGRAMA DE FLUJO I: INCLUSIÓN EN EPON

Fijación 4% de paraformaldehído 1.5 hr. en amortiguador de fosfatos



Lavados con amortiguador de fosfatos de 3x 10 minutos c/u



Etanol 60% 10 minutos



Etanol 70% 10 minutos



Etanol 80% 10 minutos



Etanol 90% 10 minutos



Etanol absoluto dos cambios de 20 minutos



Óxido de propileno dos cambios de 15 minutos



Óxido de propileno – epon concentración 1:1 por 24 hr.



Óxido de propileno – epon concentración 1:2 por 24 hr.



Inclusión en epon a 60 °C por 24 hrs.

DIAGRAMA DE FLUJO II: INCLUSIÓN EN LR WHITE

Fijación Paraformaldehido 4% en amortiguador de fosfatos por 1.5 hrs.

↓
Lavados en amortiguador de fosfatos 3x de 10 minutos c/u

↓
Etanol 30 % 1 hr.

↓
Etanol 50 % 1 hr.

↓
Etanol 70 % 1 hr.

↓
Etanol 90 % 1 hr.

↓
Etanol absoluto tres cambios de 1 hr. Cada uno

↓
Etanol absoluto – LRW concentración 2:1 por 3 hr.

↓
Etanol absoluto – LRW concentración 1:2 por 3 hr.

↓
LRW puro toda la noche

↓
LRW puro 3 hrs.

↓
Inclusión en LRW puro en cápsulas de gelatina, polimerizar en con luz ultravioleta a -20°C 24 hrs.

DIAGRAMA DE FLUJO III: TÉCNICA DE INMUNOFLUORESCENCIA PARA
EL ANICUERPO E – RAF

Cortes semifinos de 1 μ de grosor (Epon y LR White)

↓
Incubar en cámara húmeda en PBS + leche 0.05% + BSA + Tween 3 minutos.

↓
anti E-RAF en PBS + BSA + azida de sodio
concentración 1/50 a 4°C toda la noche

↓
Lavar con PBS-Tween

↓
Lavar con PBS por 15 minutos

↓
Incubar en PBS + leche 0.05% + BSA + Tween por 3 minutos

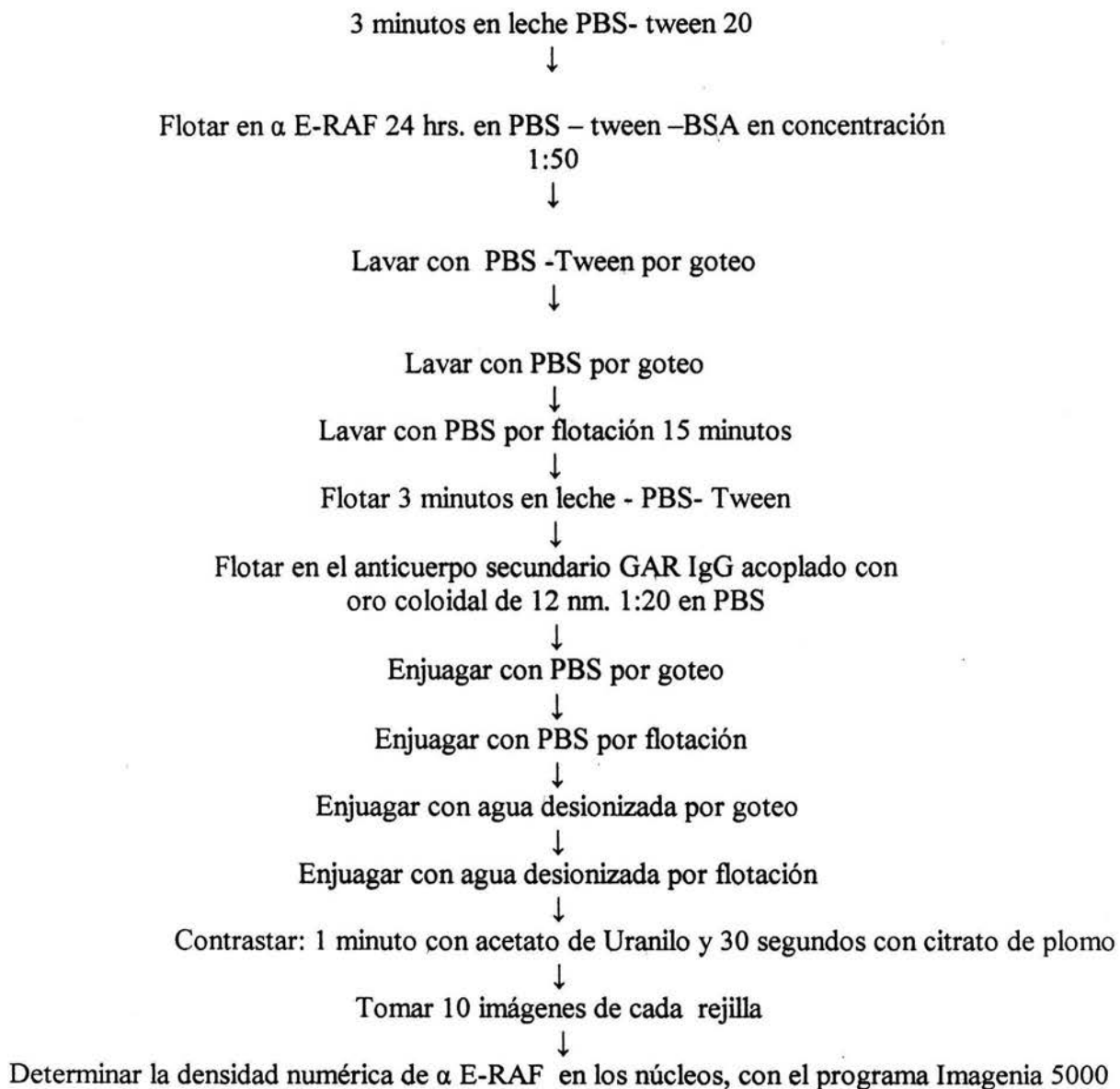
↓
Incubar en anticuerpo secundario (Goat anti-rabbit acoplado con FITC) diluido 1/50 en PBS
por 60 minutos protegido de la luz en cámara húmeda.

↓
Lavar con PBS por goteo

↓
Lavar con PBS por 15 minutos por flotación

↓
Montar con medio de montaje para fluorescencia.

DIAGRAMA DE FLUJO IV: TÉCNICA DE INMUNOLocalización
ULTRAESTRUCTURAL PARA EL ANTICUERPO E – RAF



IX.- RESULTADOS

Con la técnica de inmunofluorescencia se observó que E-RAF es una proteína preferencialmente nuclear, como se puede observar en la Figura 1, la inmunofluorescencia es positiva principalmente en la cromatina perinuclear y con menor intensidad en el espacio intercromatiniano, en ratas intactas, ovariectomizadas y ovariectomizadas tratadas con estradiol. Las células epiteliales de las ratas normales, tienen núcleos ovalados, la cromatina se observa en sus dos formas, dispersa y compacta, la cromatina compacta es escasa y se encuentra en la periferia de los núcleos, así como periferia del nucleolo, como se puede observar en la figura 2A.

En las ratas ovariectomizadas el epitelio uterino presenta células con núcleos ovalados, pero con frecuencia se observan de forma irregular con invaginaciones y la cromatina compacta parece ser más abundante con respecto de las normales, figura 2B.

En las ratas tratadas con estradiol se observa una recuperación en la morfología de las células epiteliales uterinas, los núcleos son ovalados y la cromatina laxa parece ser más abundante, figura 2C.

Con la inmunolocalización ultraestructural en las ratas normales, ovariectomizadas y tratadas con estradiol, se determinó que E-RAF es una proteína que se encuentra tanto en citoplasma como en el núcleo celular, esto se puede observar en las figuras 4, 8, 12 y 13.

En el citoplasma E-RAF está asociada a sitios en los que se encuentran polirribosomas y ribosomas como lo muestran las figuras 12 y 13. Asimismo, se observa de manera general que en los núcleos hay mayor marca en comparación con los citoplasmas, con estas observaciones se pueden confirmar los resultados obtenidos con inmunofluorescencia y reafirmar que E-RAF es una proteína preferencialmente nuclear Fig. 3, 5, 7 y 8.

En los núcleos la marca de anti E-RAF se encuentra localizada tanto en cromatina compacta, como en la semicompacta, en los sitios en los que se encuentran las fibras pericromatinianas y en el espacio intercromatiniano como se observa en las figuras 3, 5, 6 y 8, también se localizó con frecuencia en los poros nucleares figura 3 y 8.

Los nucleolos se encuentran generalmente libres de marca, pero en la cromatina perinucleolar se observa la marca de anti E-RAF como se puede observar en las Figuras 3, 4, 7, 8, 9 y 11.

En los núcleos de células epiteliales de las ratas normales anti E-RAF se encuentra en la cromatina que rodea al nucleolo, en los espacios intercromatinianos y en la cromatina

perinuclear como se puede observar en la figura 3. y en el citoplasma se observa en sitios en los cuales se observan ribosomas como se observa en la figura 12.

En las ratas ovariectomizadas, se observó mayor cantidad de granos de oro como se puede apreciar en la figura 4 y 10, esta observación se pudo confirmar con la determinación de la densidad numérica de los granos de oro como se reporta en la tabla 3 y en la gráfica 1.

Después de obtener la densidad numérica de los granos de oro de anti E-RAF en todos los grupos, se realizó una estadística descriptiva de estos datos, la cual nos muestra que en ausencia de estradiol la densidad numérica de E-RAF en los núcleos aumenta en las ratas ovariectomizadas y al aplicarles estradiol la densidad numérica presenta una tendencia a la normalidad, como se puede observar en la tabla 3 y en la gráfica 1.

Al hacer un análisis de varianza de la densidad numérica de anti E-RAF entre los núcleos de las ratas normales con los diferentes grupos tratados con estradiol, se observó que no existen diferencias significativas entre ellos como se puede ver en la tabla 4 . En la gráfica 1 se puede observar que conforme pasa el tiempo después de la inyección de estradiol la densidad numérica de E-RAF se aproxima a la de las ratas ovariectomizadas.

En las ratas normales la densidad numérica de E-RAF tiene un promedio de $18.01 \text{ gr}/\mu^2$ y en las ovariectomizadas el promedio subió, de forma significativa hasta $33.60 \text{ gr}/\mu^2$ como se pudo comprobar al aplicar el análisis de varianza tabla 5.

En las ratas tratadas con estradiol en tiempos de 3 y 9 minutos la densidad numérica disminuye de manera significativa con respecto de las ovariectomizadas, hasta 13.15 y $12.8 \text{ gr}/\mu^2$ respectivamente, como se puede observar en la tabla 4.

En las ratas expuestas a estradiol durante 18, 27 y 36 minutos la media se eleva a $20 \text{ gr}/\mu^2$ $19.84 \text{ gr}/\mu^2$, $23.84 \text{ gr}/\mu^2$ respectivamente, al aplicar el análisis de varianza entre estos grupos tratados con estradiol y las ovariectomizadas se determinó que no existen diferencias significativas entre los grupos, esto nos indica que al aplicar estradiol se observa una tendencia hacia el estado ovariectomizado tabla 4.

Se contaron los granos de oro localizados fuera de las células y se tomaron como ruido de fondo. Se hizo una estadística descriptiva y un análisis de varianza mostrados en la tabla 6, 7 y en la gráfica 1. En ellas podemos observar que el promedio mayor se encuentra en las ratas ovariectomizadas, que es de $3.9 \text{ gr}/\mu^2$ y el menor de $1.16 \text{ gr}/\mu^2$ en las ratas con exposición de 27 minutos de estradiol. Al realizar un análisis de varianza de los granos de oro situados fuera de

las células, en ratas normales, ovariectomizadas y tratadas con estradiol, podemos observar que no hay diferencias significativas como se ve en la tabla 7, por lo tanto podemos decir que la densidad del ruido de fondo se mantuvo de manera constante y no influyó en los datos de los núcleos. Al realizar el análisis de varianza entre los datos de núcleos y de ruido de fondo, se observa que existe una diferencia significativa, esto nos indica que se trata de poblaciones diferentes Tabla 7.

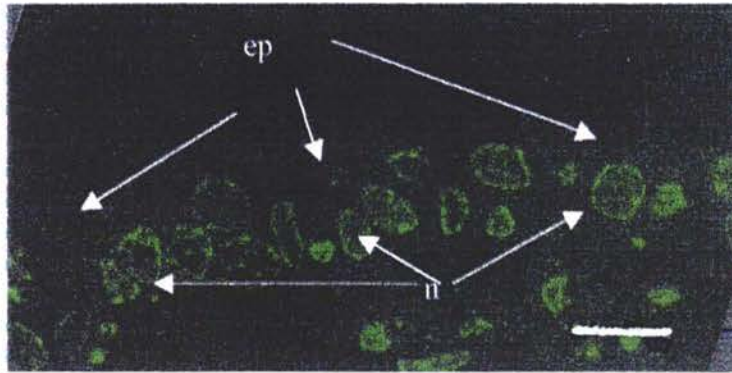


Figura 1. Epitelio endometrial de rata normal (ep). Immunolocalización fluorescente de anti E-RAF con el anticuerpo secundario GAR IgG acoplado con FITC. La fluorescencia se observa principalmente en los núcleos celulares (n) de las células epiteliales y de manera preferencial en la cromatina perinuclear 12 500x. Barra 1 μ

Figura 2 A.- Núcleo (N) de célula epitelial de útero de rata intacta, la cromatina (Cr) se observa en sus dos formas, compacta y dispersa, la cromatina compacta es escasa y se encuentra en la periferia de los núcleos así como periferia del nucleolo (n), Citoplasma (C), Ur- Pb, 11000x. Barra 1 μ

Figura 2B. - Núcleo (N) de célula epitelial de rata ovariectomizada de forma irregular con invaginaciones (I) y la cromatina compacta parece ser más abundante con respecto de las intactas (Cr), Citoplasma (C), Mitocondrias (m), nucleolo (n). Ur – Pb. 16000x. Barra 1 μ

Figura 2 C.- Núcleo de rata tratada 18 minutos con estradiol. Se observa una recuperación en la morfología de las células epiteliales uterinas, los núcleos son ovalados (N) y la cromatina compacta es menos abundante con respecto de las ovariectomizadas (Cr), nucleolo (n), Citoplasma (C), Mitocondrias (m), Ur – Pb. 20000x. Barra 1 μ

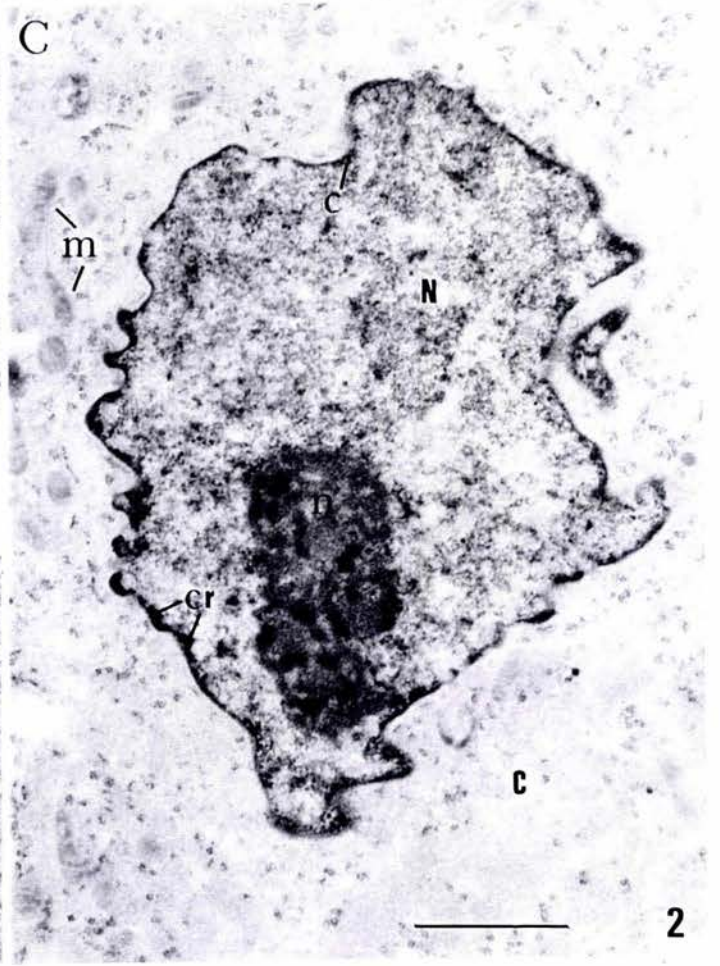
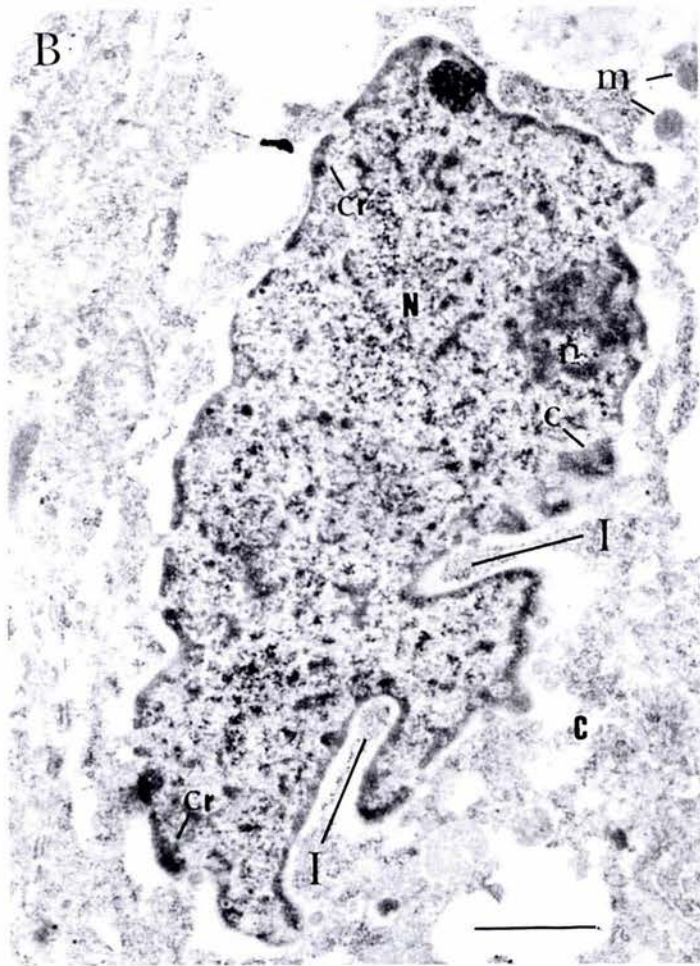
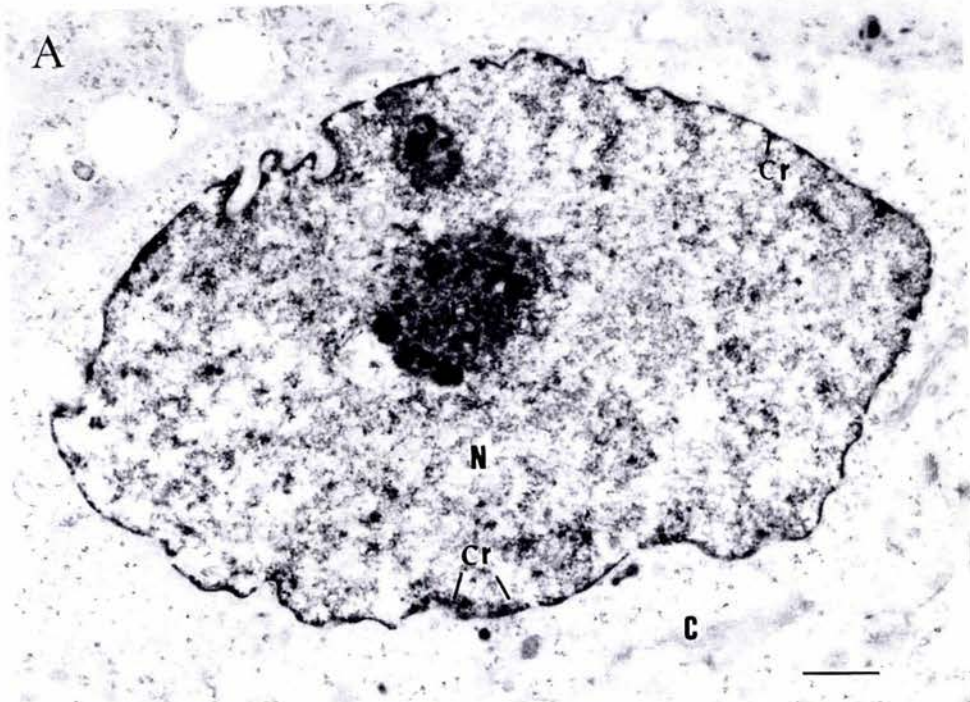


Figura 3: Micrografía de núcleo de célula epitelial de útero de rata intacta. Anti E-RAF (↑) se observa con mayor frecuencia en la cromatina perinuclear y en el espacio intercromatiniano. El nucleolo (n) se encuentra libre de marca, pero se pueden observar granos de oro en la cromatina que lo rodea, citoplasma (C), Ur-Pb, 75,000x. Barra 0.5μ

Figura 4. Micrografía de célula epitelial de útero de rata ovariectomizada Anti E-RAF(↑) se encuentre en la cromatina perinuclear y en el espacio intercromatiniano. El nucleolo (n) se encuentra libre de marca, pero se pueden observar granos de oro en la cromatina que lo rodea. Se puede observar marca en los poros nucleares (p). En el citoplasma (C) también se observan granos de oro. Núcleo (N). Ur-Pb, 67000x. Barra 0.5μ

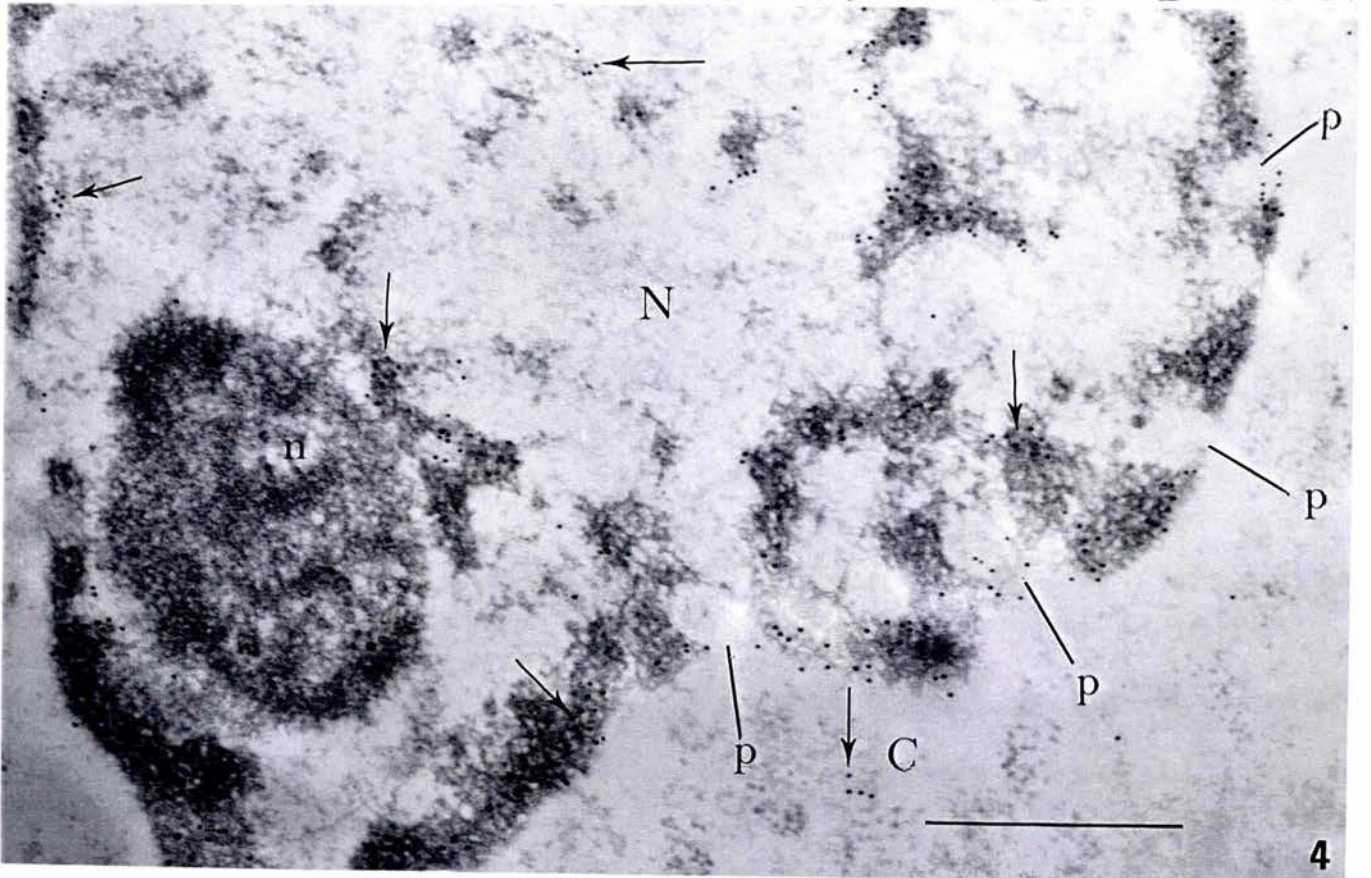
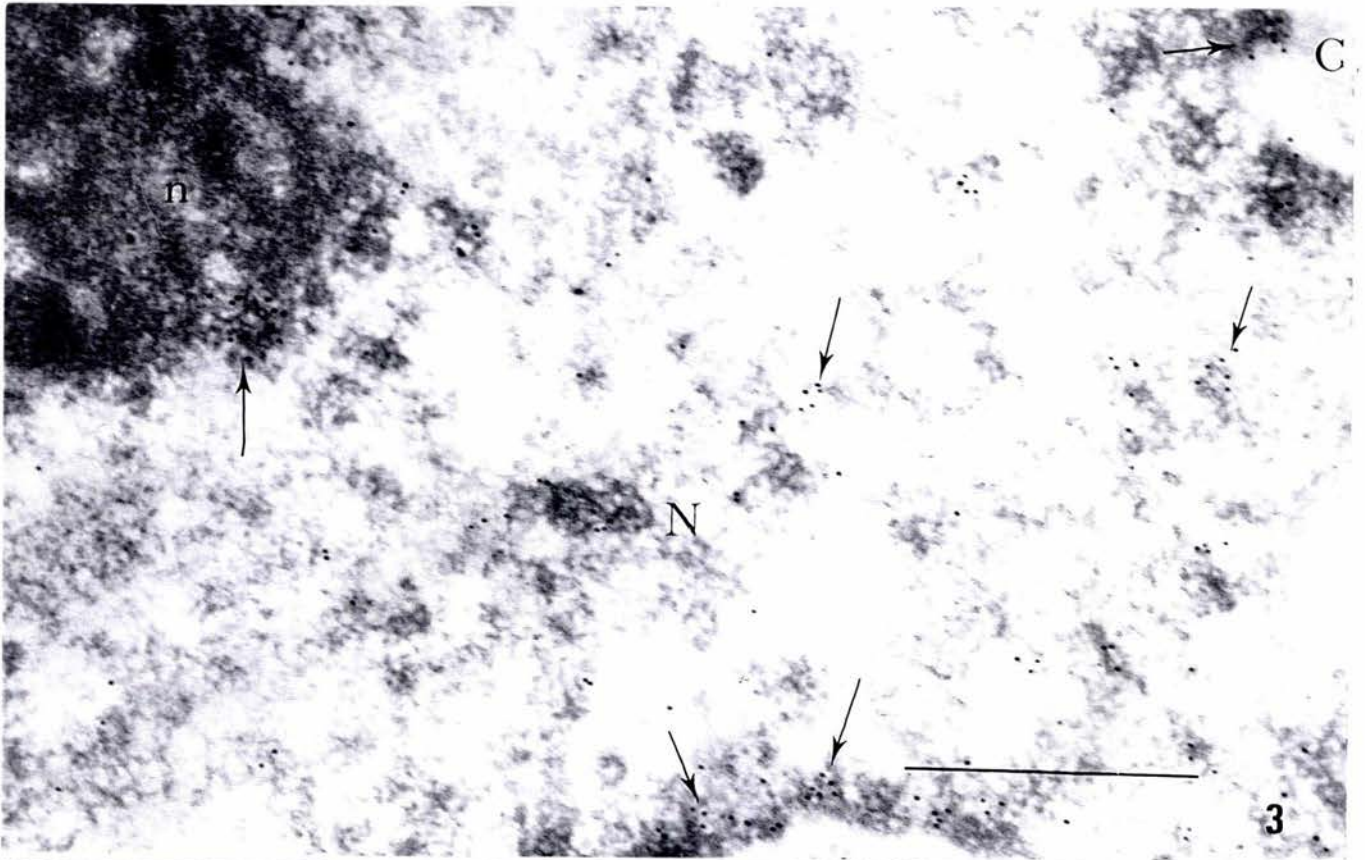


Figura 5: Micrografía de célula epitelial de útero de rata ovariectomizada tratadas por 3 minutos con estradiol. Anti E-RAF (↑) se observa con mayor frecuencia en la cromatina perinuclear, en el espacio intercromatiniano, en esta imagen se observan granos de oro rodeando un poro nuclear (p), también podemos identificar algunos gránulos pericromatinianos (Gp). Ur. Pb 52500x. Barra 0.5μ

Figura 6: Micrografía de célula epitelial de útero de rata ovariectomizada tratadas con estradiol por 9 minutos. Anti E-RAF (↑) se observa en la cromatina perinuclear y en el espacio intercromatiniano. En el citoplasma (C) también se observa marca la cual parece estar sobre algún tipo de estructuras. Ur. Pb. 52 500x. Barra 0.5μ

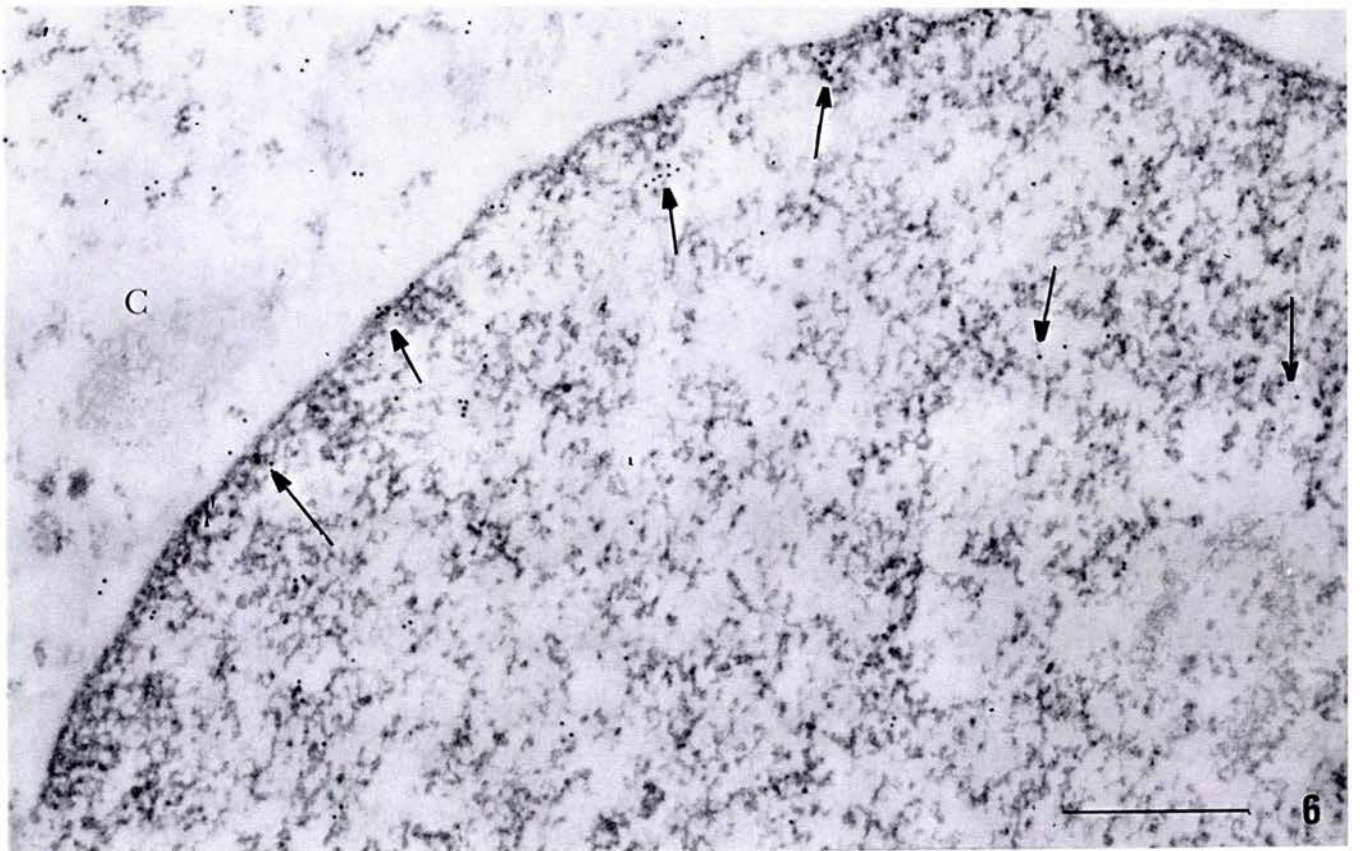
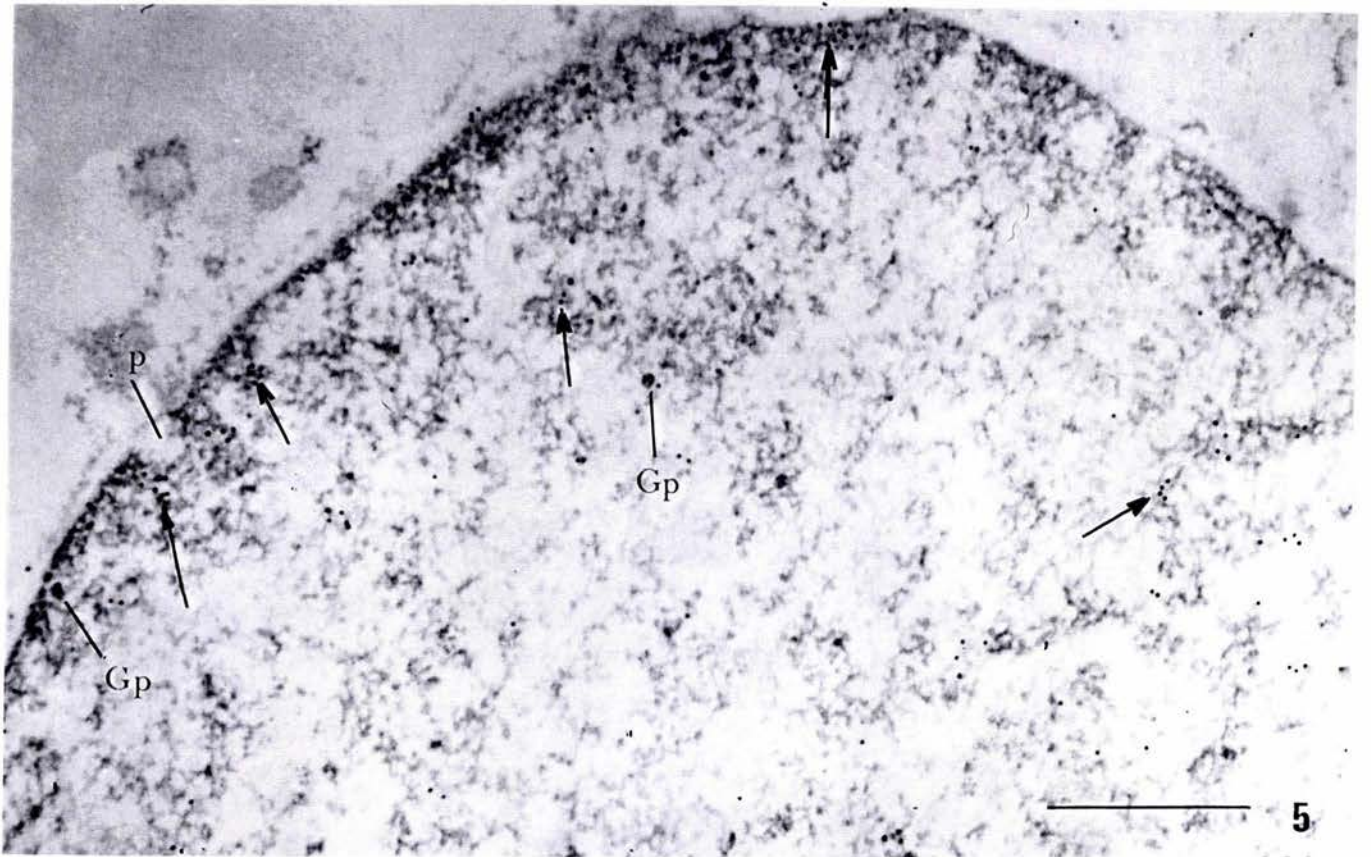


Figura 7: Micrografía de célula epitelial de útero de rata ovariectomizada tratadas con estradiol por 18 minutos. Anti E-RAF (\uparrow) se observa con mayor frecuencia en la cromatina perinuclear, en el espacio intercromatiniano. El nucleolo (n) se encuentra libre de marca, pero se pueden observar granos de oro en la cromatina que lo rodea. En el citoplasma (C) también se observan granos de oro asociados a ribosomas, en retículo endoplasmico que rodea al núcleo (cabezas de flechas), Núcleo (N). Ur-Pb. 85000x. Barra 0.5 μ

Figura 8: Micrografía de célula epitelial de útero de rata ovariectomizada tratadas con estradiol por 27 minutos. Anti E-RAF (\uparrow) se observa con mayor frecuencia en la cromatina perinuclear, en el espacio intercromatiniano. El nucleolo (n) se encuentra libre de marca, pero se pueden observar granos de oro en la cromatina que lo rodea. En el citoplasma (C) también se observan granos de oro asociados a ribosomas (cabezas de flechas). Núcleo (N). Ur-Pb. 85000x. Barra 0.5 μ

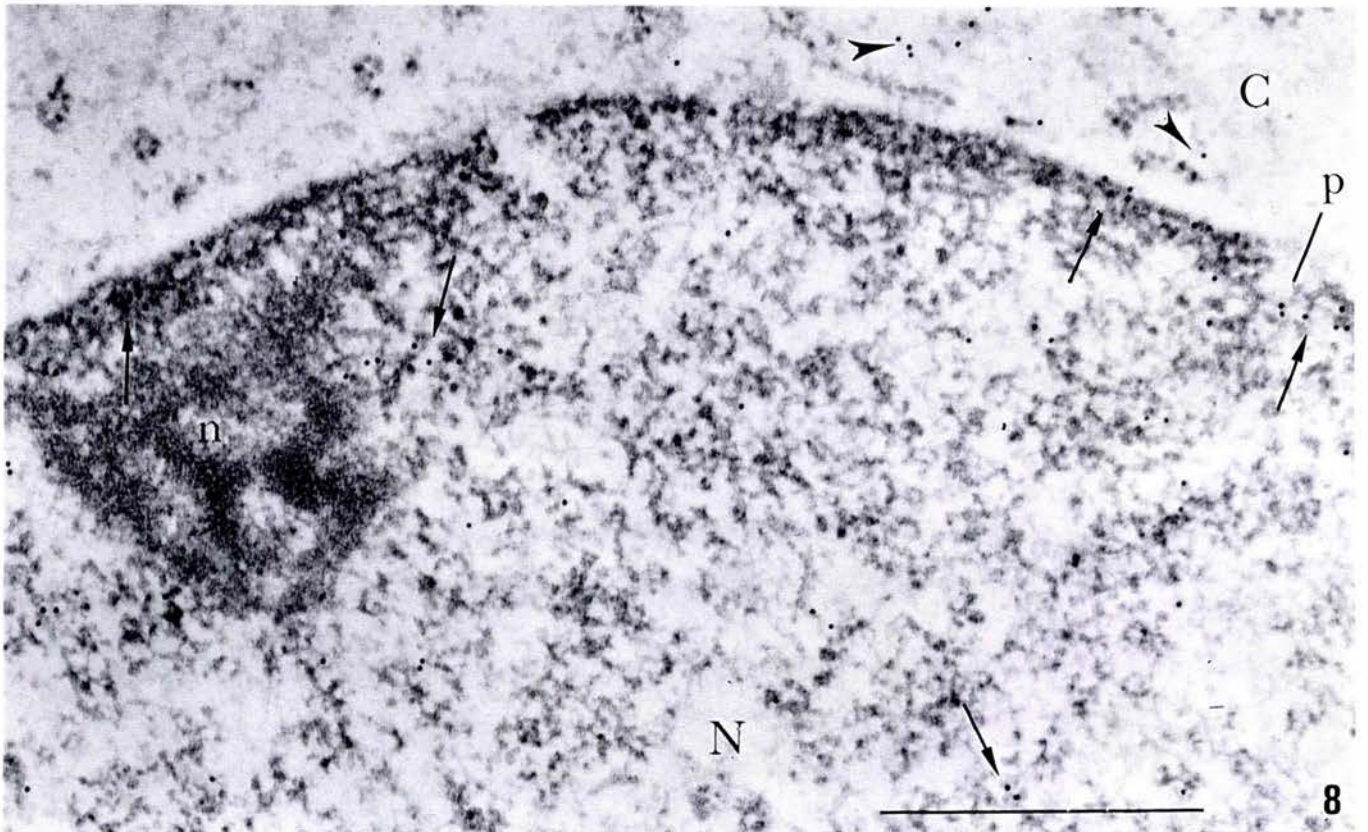
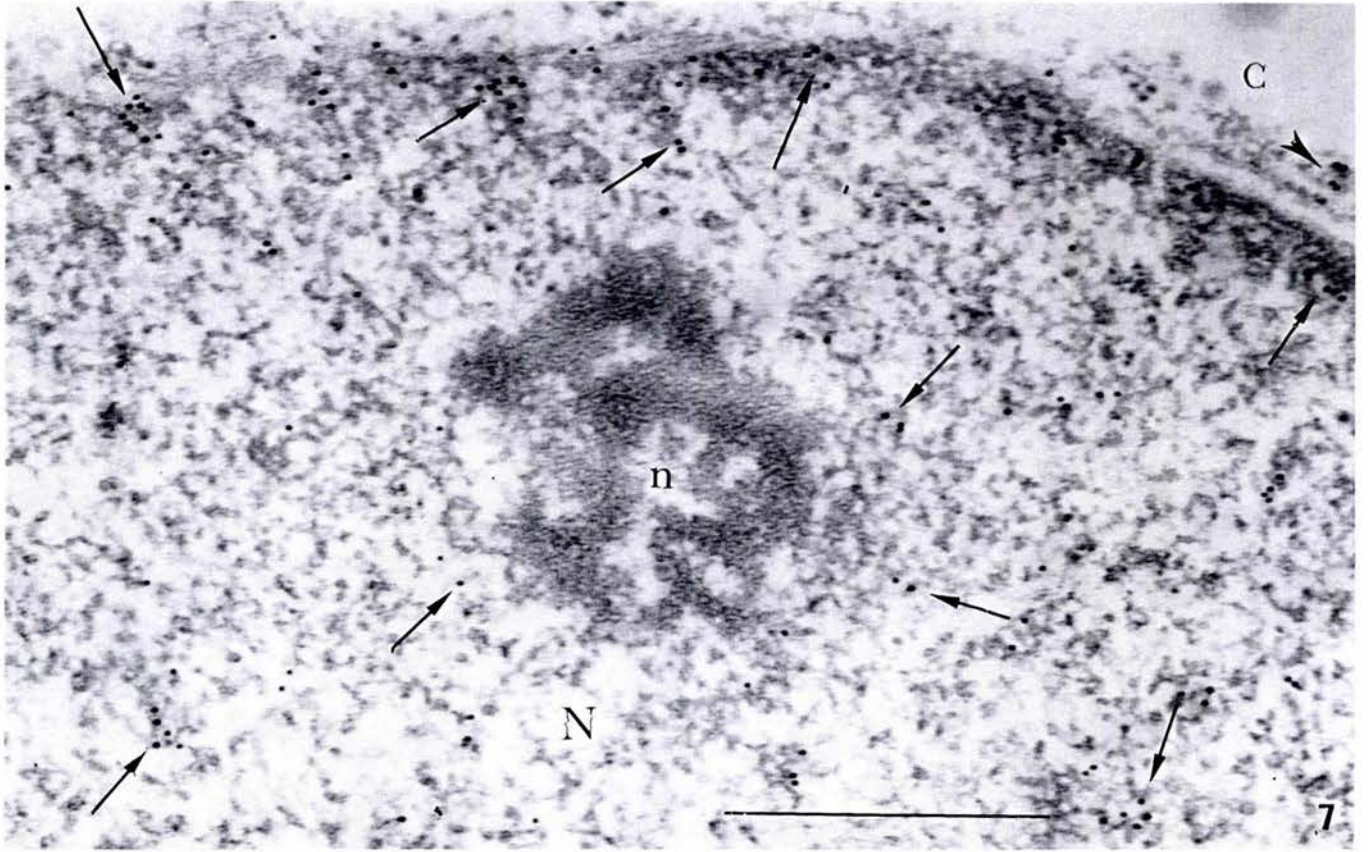


Fig 9: : Micrografía de célula epitelial de útero de rata ovariectomizada tratadas con estradiol por 36 minutos. Anti E-RAF (↑) se observa con mayor frecuencia en la cromatina perinuclear, en el espacio intercromatiniano. El nucleolo (n) se encuentra libre de marca, se observan granos de oro en la cromatina perinucleolar. Citoplasma (C). Núcleo (N). Ur-Pb. 77 500x. Barra 0.5μ

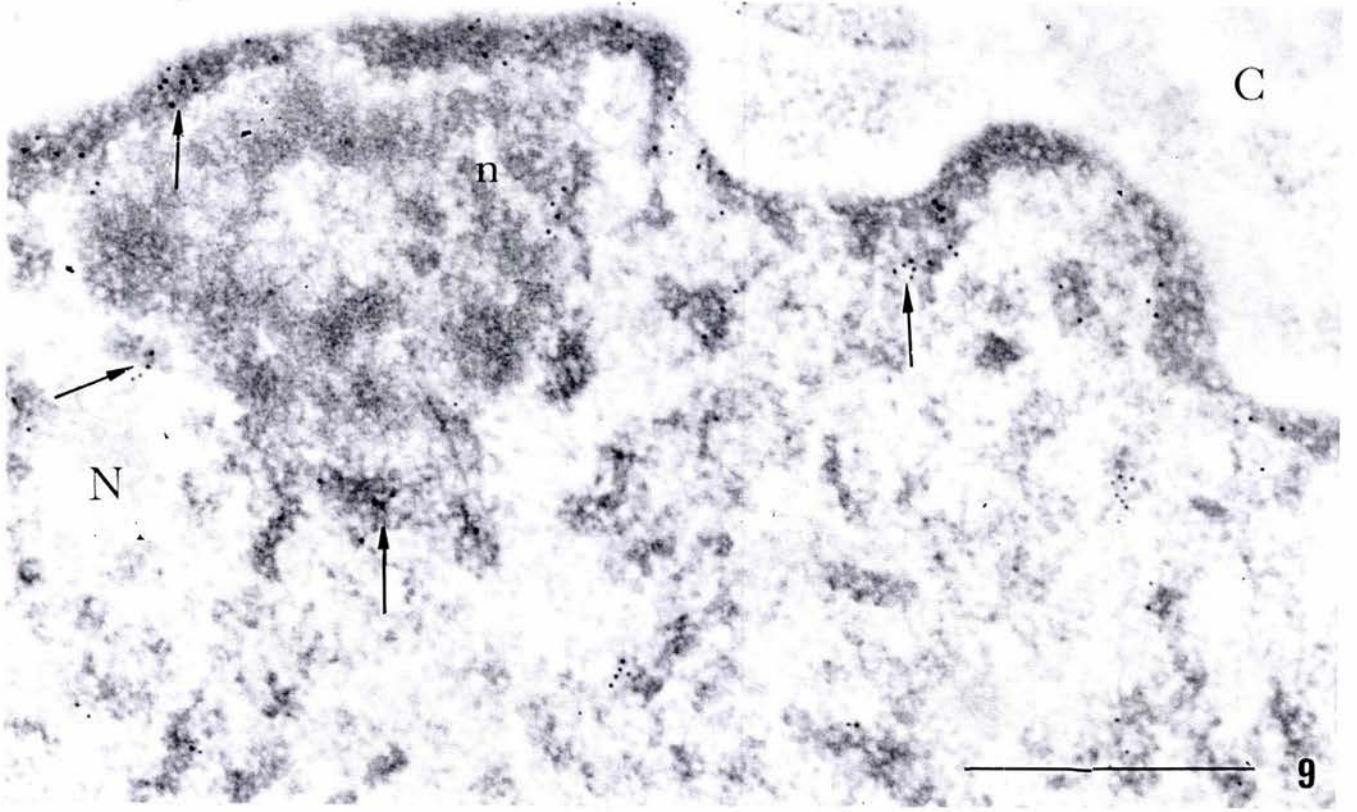


Figura 10: Micrografía de célula epitelial de útero de rata ovariectomizada. Anti E-RAF

(→), se encuentra en el núcleo (N) en cromatina que rodea a los poros, en el espacio intercromatiniano, en la cromatina perinuclear. En el citoplasma (C) también se observan algunos granos en la periferia de núcleo. En esta micrografía también se observan algunos gránulos pericromatinianos (gp). Ur-Pb. 75 000x. Barra 0.5 μ

Figura 11: Micrografía de núcleo de célula epitelial de útero de rata ovariectomizada (N). Anti E-RAF (→) se encuentra en la cromatina que rodea al nucleolo. En el nucleolo (n) no se observan granos de oro. Ur-Pb. 75 000x. Barra 0.5 μ

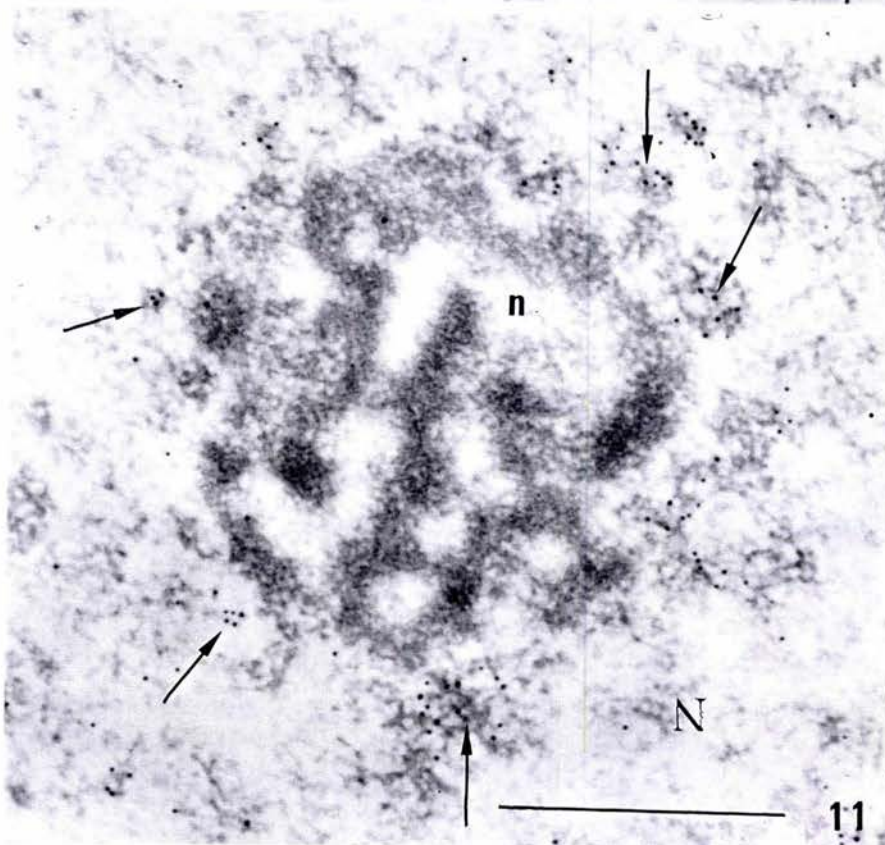
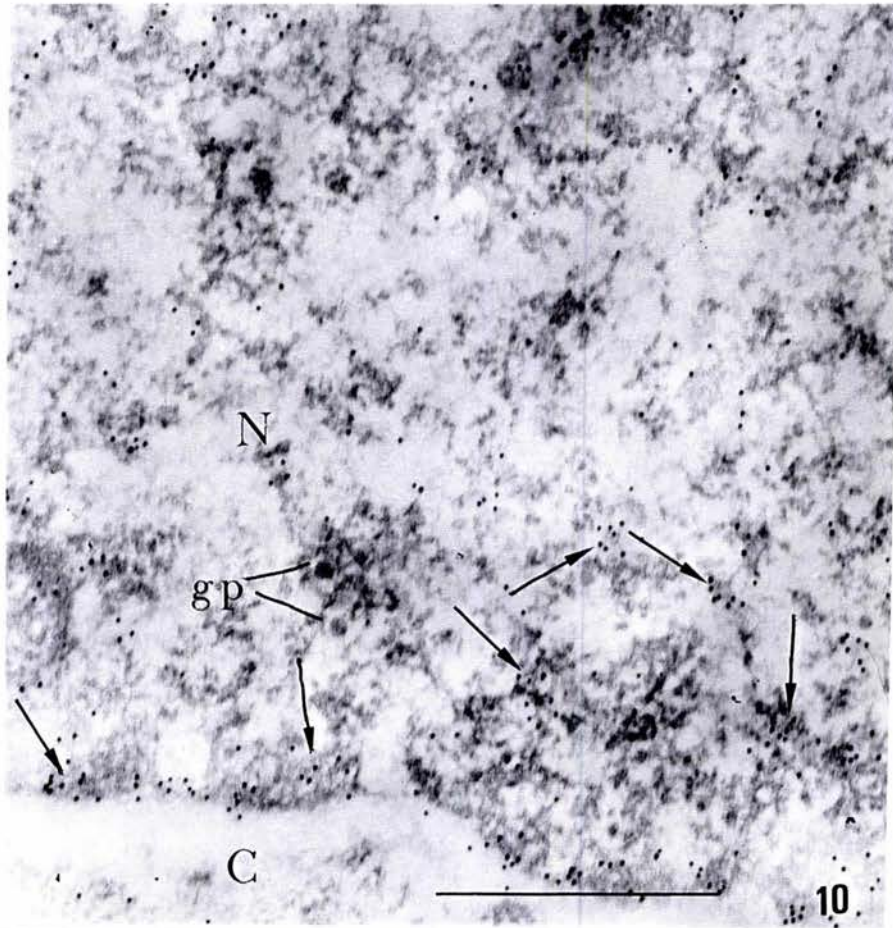


Figura 12: Micrografía de citoplasma de célula epitelial de útero de rata intacta. Anti E-RAF (→) se encuentra en regiones en las que hay ribosomas y polirribosomas (cabeza de flecha), Citoplasma (C). Ur. Pb. 85 000x. Barra 0.5 μ

Figura 13: Micrografía del citoplasma de una célula epitelial de útero de rata ovariectomizada. Anti E-RAF (→) se encuentra en regiones donde los ribosomas son abundantes, también se encuentran asociados a polirribosomas, (cabezas de flecha), Citoplasma (C). Ur-Pb, 85 000x. Barra 0.5 μ

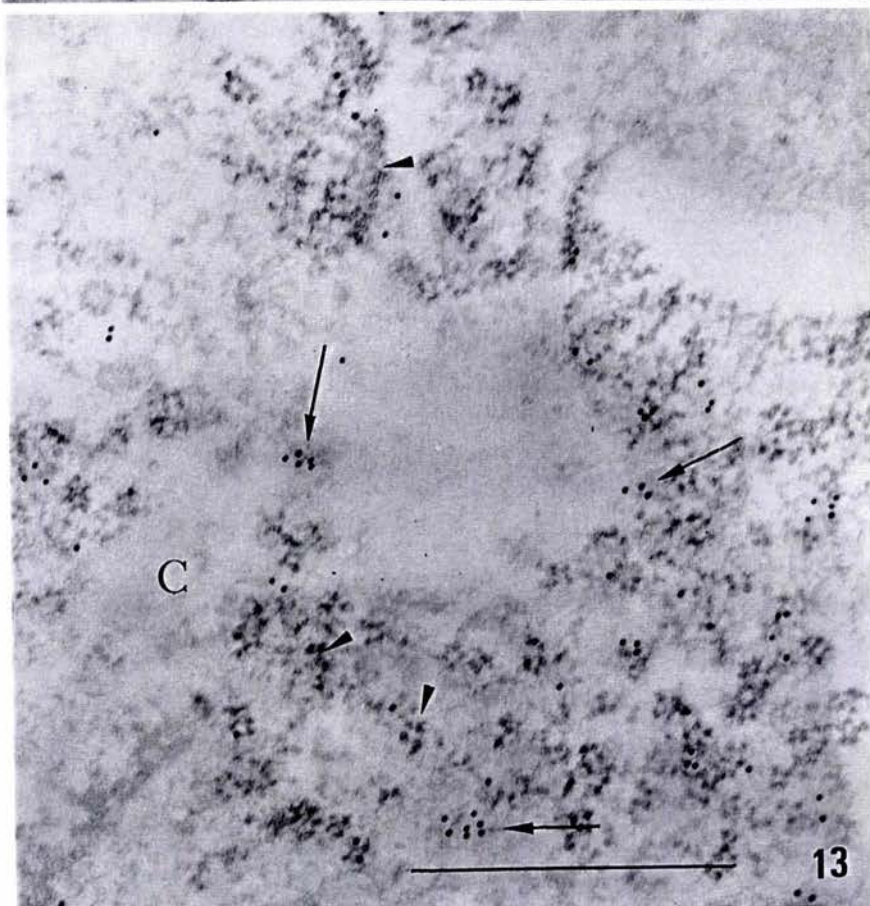
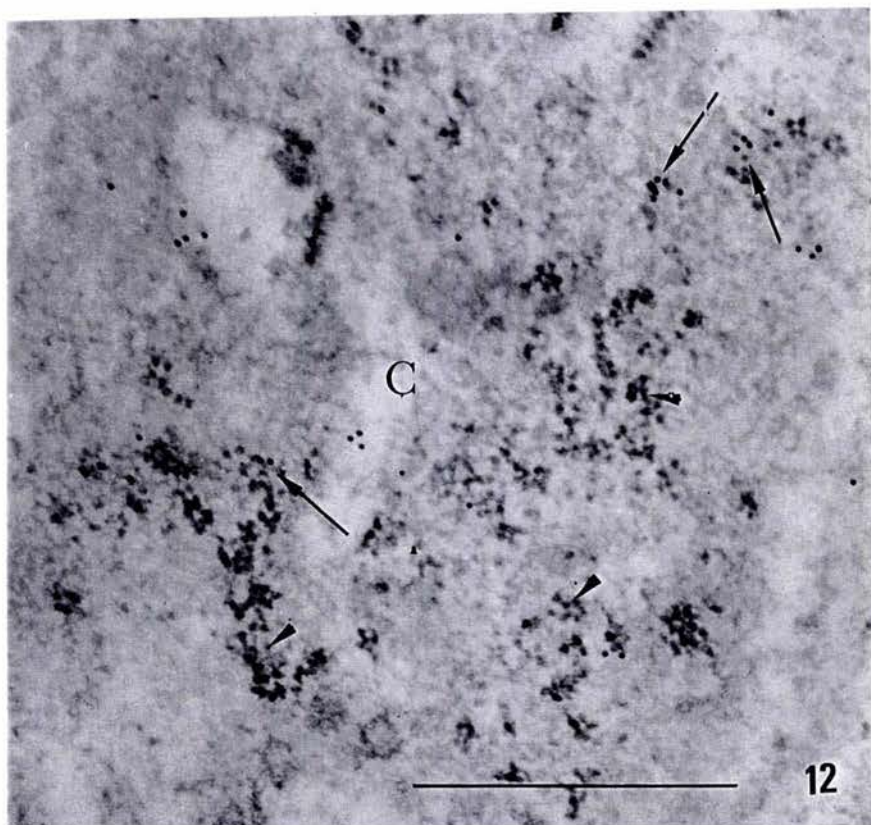


Tabla 3: Estadística descriptiva

Densidad numérica de granos de oro (que localizan a E-RAF)
por micra cuadrada en los núcleos de células epiteliales de útero de ratas normales,
ovariectomizadas, y ovariectomizadas tratadas con estradiol durante 3,9,18,27 y 36 minutos.

NÚCLEOS							
	Normal es*	ovariectomizadas					
		0 min.*	3min.*	9 min.*	18 min.*	27 min.*	36min.*
Tamaño de la muestra (N)	31	24	29	34	28	25	30
Promedio	18.01	33.70	13.15	12.8	20.70	19.84	23.84
Varianza	38.2	69.5	22.98	18.58	49.08	18.66	41.66
Desviación estándar	6.18	8.34	4.78	4.31	7.01	7.18	6.45

*3 ratas por grupo

Grafica 1

Densidad numérica de anti E-RAF en núcleos y ruido de fondo de células epiteliales de útero de ratas normales (N), ovariectomizadas (O), y tratadas con estradiol durante 3,9,18,27 y 36 minutos.

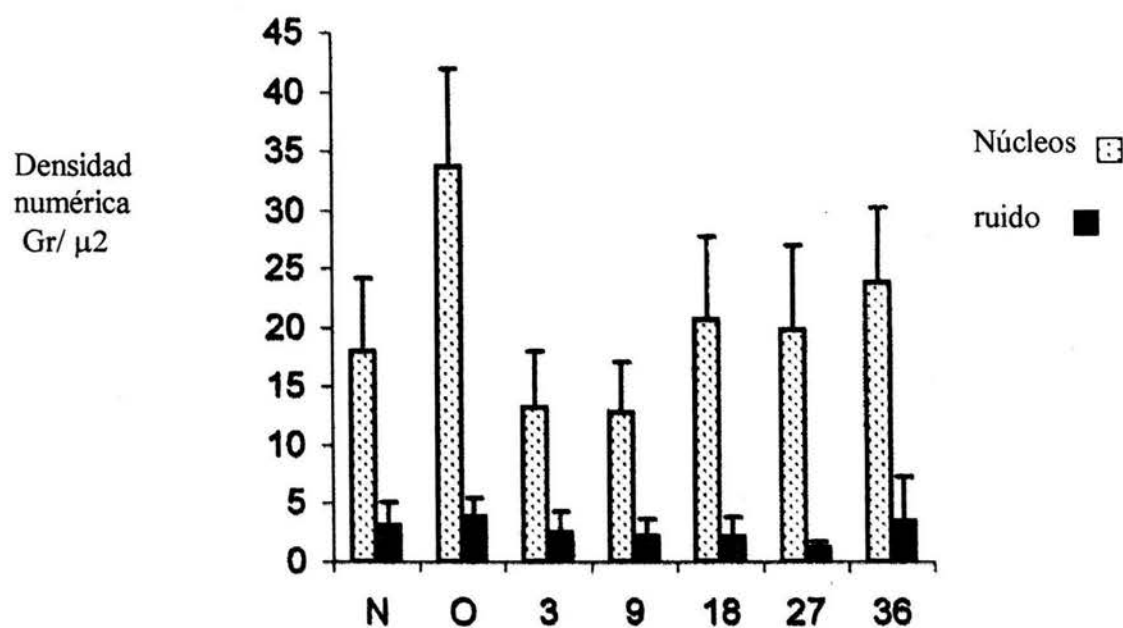


Tabla 4

Comparación por análisis de varianza de núcleos de ratas normales con los de diferentes grupos experimentales de ratas ovariectomizadas ($p < 0.05$)

Normales con	Valor de F	Nivel de significancia	
3 minutos	2.7	00.10	No significativo
9 minutos	3.7	5×10^{-2}	No significativa
18 minutos	1.94	00.16	No significativo
27 minutos	.001	00.90	No significativo
36 minutos	3×10^{-3}	00.90	No significativas

Tabla 5

Comparación por análisis de varianza de núcleos entre ratas ovariectomizadas con los diferentes grupos ($p < 0.05$)

Ovariectomizadas con	Valor de F	Nivel de significancia	Diferencia
Normales	0.742	-8×10^{-3}	significativa
3 minutos	23.99	-5×10^{-3}	significativa
9 minutos	9.57	-3×10^{-4}	significativa
18 minutos	00.33	00.50	No significativa
27 minutos	01.92	00.17	No significativa
36 minutos	02.19	00.10	No significativa

Tabla 6
 Estadística descriptiva
 Densidad numérica del ruido de fondo en la inmunolocalización
 ultraestructural de anti E-RAF por micra cuadrada

Ruido de fondo en granos / micra cuadrada (gr/ μ^2)							
	Normales	Ovariectomizadas	3min.	9 min.	18 min.	27 min.	36 min.
Tamaño de la muestra	40	27	23	20	32	23	27
Promedio	3.11	3.9	2.24	2.4	2.07	1.16	3.5
Varianza	4.04	2.4	2.0	3.05	2.09	0.27	15.1
Desviación estándar	2.01	1.57	1.41	1.74	1.71	0.52	3.8

Tabla 7

Comparación por análisis de varianza de la densidad numérica de núcleos, ruido de fondo y entre núcleos y ruido de fondo ($p < 0.05$)

	Valor de F	Nivel de significancia	Diferencias
NÚCLEOS	34.145	1×10^{-3}	Significativas entre grupos
RUIDO DE FONDO	2.17	.047	No significativas entre grupos
NÚCLEOS CON RUIDO DE FONDO	198.79	1×10^{-3}	significativas

X.- DISCUSIÓN

La ovariectomía como mecanismo para suprimir la producción de 17β estradiol y eliminar los efectos que esta hormona provoca en el útero se ha utilizado en trabajos anteriores (Vázquez Nin et. al. 1978, 1979; Thampan 1985; Juárez 1999). En el presente trabajo se pudo observar que en los núcleos de células epiteliales uterinas, la cromatina compacta es más abundante en ratas ovariectomizadas que en las normales y al aplicar estradiol a las ratas ovariectomizadas la cromatina laxa es la más abundante como se ha detectado en trabajos anteriores. Estas observaciones demuestran que la ovariectomía se realizó correctamente.

De acuerdo con los análisis de varianza, realizados en las inmunolocalizaciones ultraestructurales E-RAF presentó cambios con la presencia o ausencia de estradiol, por tanto E-RAF es una proteína que tiene una respuesta al estradiol y al estar localizada en la cromatina compacta y semicompacta podría estar involucrada en los procesos de activación e inhibición de la transcripción como es planteado por Thampan en trabajos anteriores (Thampan 1989; Karthikeyan y Thampan 1996; Thampan et. al. 2000).

En el 2001 Govind y Thampan, propusieron un modelo sugiriendo que E-RAF II es una proteína que se transporta del citoplasma al núcleo celular y que se une al receptor a estradiol para formar un complejo E-RAF-RE-RNA polimerasa II (Thampan y Clark 1981) y así dar inicio a la transcripción. Los resultados del presente trabajo demostraron que E-RAF es más abundante en los núcleos que en los citoplasmas y está asociado a la cromatina, por tanto apoyan las propuestas anteriores, los citados autores también plantean que E-RAF se localiza en el citoplasma, asociado a ribosomas; en el presente trabajo se observaron imágenes en las cuales anti E-RAF se encuentra localizado en el citoplasma, de manera preferencial en los lugares donde hay ribosomas y en especial en el retículo endoplasmico rugoso, lo cual está de acuerdo con las observaciones realizadas por los mencionados autores.

En los núcleos localizamos, anti E-RAF en la cromatina compacta y semicompacta y en las regiones asociadas a las fibras pericromatinianas. En trabajos anteriores se determinó que E-RAF se puede encontrar en dos formas funcionales E-RAF I y E-RAF II (Thampan 1987, y 1989), las cuales son inmúlogicamente idénticas; la primera estabiliza al DNA y la segunda tiene la función opuesta, lo cual explica la localización de anti E-RAF tanto en la cromatina

compacta estabilizando el DNA, como en la semicompacta favoreciendo la transcripción. (Thampan 1989).

Años atrás se demostró que las fibras pericromatinianas representan RNA heterogéneo nuclear recién sintetizado (RNAhn) (Monneron y Bernhard, 1969; Fakan et. al., 1976; Puvion y Puvion-Dutilleul, 1996). De acuerdo con Thampan E-RAF II se une al DNA y al nER II que también está unido a la RNA polimerasa II para inducir la transcripción (Thampan 1987; Karthikeyan y Thampan, 1996; Thampan et. al., 2000), por tanto la localización de E-RAF en las fibras pericromatinianas nos lleva a pensar que efectivamente E-RAF interviene en el mecanismo de transcripción.

La entrada y salida de proteínas del núcleo celular sólo se realiza a través de los complejos de poro nucleares, E-RAF es transportado por proteínas asociadas al complejo de poro nuclear como la p38(Govind et. al., 2003 a), de tal manera que la localización de anti E-RAF en sitios cercanos a los poros y en los poros mismos, podemos considerarla como la expresión de este proceso,

El análisis cuantitativo de los cambios en la distribución de E-RAF, inducidos por la presencia y ausencia de estradiol, muestran que la ovariectomía provocó un aumento en la concentración de E-RAF en los núcleos celulares, estos resultados están de acuerdo con las observaciones de trabajos anteriores donde se propone que en ausencia de estradiol, E-RAF se separa del retículo endoplasmico y se dirige a los núcleos celulares (Thampan et. al., 2000; Govind et. al., 2003b).

El aumento de la concentración de E-RAF en el núcleo de las ratas ovariectomizadas se debe probablemente a que como Thampan sugiere es una proteína que interviene en la regulación de la expresión génica, probablemente E-RAF en las ratas ovariectomizadas interviene en el apagado de genes relacionados con estradiol o bien que en estas condiciones E-RAF se almacena en el núcleo, por lo tanto podemos considerar que a esto se debe que las ratas ovariectomizadas la marca es mayor que en las ratas intactas.

Al aplicar estradiol a las ratas ovariectomizadas, durante tres y nueve minutos se observó una disminución de la concentración de E-RAF en los núcleos, y a medida que el tiempo de estradiol se aumenta a 18, 27 y 36 minutos la concentración de E-RAF se asemeja más a la ratas ovariectomizadas, posiblemente estos cambios pueden ser el reflejo de la disminución de estradiol circulante, dado que se suministró en forma de hemisuccinato que se metaboliza rápidamente.

Es importante notar que se podrían realizar nuevos experimentos, como podrían ser inmunolocalizaciones dobles de E-RAF con naRE, en las mismas condiciones que se utilizaron para este trabajo, con el fin de obtener mayores datos sobre el mecanismo de entrada y de acción del nuevo receptor .

También se podría colocalizar tanto a E-RAF como a naRE con RNA polimerasa II y así tener mayores bases para pensar que efectivamente el nuevo receptor y su cofactor E-RAF están implicados en la transcripción.

XI .- CONCLUSIONES

En el núcleo E-RAF se localiza en fibras pericromatinianas, mostrando su probable función de activación génica, también se observa en la cromatina compacta posiblemente indicando su segunda función que es el silenciamiento génico y cerca de los poros nucleares como señal del transporte nuclear.

En el citoplasma E-RAF se localiza en regiones cercanas al RER.

La densidad numérica de E-RAF dentro del núcleo varía en función de la presencia de estradiol, en las ratas ovariectomizadas aumenta con respecto de las normales.

En las ratas ovariectomizadas tratadas con estradiol en periodos cortos (de tres y nueve minutos) la densidad disminuye significativamente y en periodos prolongados (18, 27 y 36 minutos) la densidad se acerca al valor de la densidad de las ratas ovariectomizadas.

XII.- BIBLIOGRAFÍA

- Angus I. L., Earnshaw W. C. (1998). Structure and function in the nucleus. *Science*. 280, 547-553.
- Anuradha P., Kha M. S., Karthikeyan and Thampan V. R. (1994). The nonactivated estrogen receptor (neER) of the Goat uterus is a tyrosine kinase *Arch. Biochem. Biophys.* 309, 2: 195-204
- Anzick S.L., Kononen, J., Walker R.L., Azorsa D.O., Tanner M.M., Guan X.Y., Sauter G., Kallioniemi O.P., Trent J.M., and Meltzer P.S. (1997). AIB1, a steroid receptor coactivator amplified in breast and ovarian cancer. *Science*. 277: 965-968.
- Barnard D. C., Li J., Peng R., Patton JG., (2002). Regulation of alternative splicing by SRp86 through coactivation and repression of specific SR proteins. *RNA* 8 (4):526-33.
- Barnard DC. and Patton JG. (2000). Identification and characterization of a novel serine-arginine-rich splicing regulatory protein. *Mol. Cell. Biol.* 20 (9):3049-57.
- Beato M. (1989). Gene regulation by steroid hormones. *Cell*. 56: 335- 344.
- Benten W. P M., Stephan Ch., Lieberherr M., and Wunderlich F. (2001). Estradiol signaling via sequestrable surface receptors. *Endocrinology* 142: 1669 - 1677.
- Bernhard W. (1969). A new staining procedure for electron microscopical cytology. *J. Ultrastructur Res.* 27: 250- 265.
- Blanco J. C., Minucci S., Lu J., Yang XJ., Walker KK., Chen H., Evans R. M., Nakatani Y. & Ozato K. (1998). The histone acetylase PCAF is a nuclear receptor coactivator. *Genes and Development*. 12: 1638–1651.
- Burakov, D., Wong, C.W., Rachez, C., Cheskis, B.J., and Freedman, L.P. (2000). Functional interactions between the estrogen receptor and DRIP205, a subunit of the heteromeric DRIP coactivator complex. *J. Biol. Chem.* 275: 20928-20934
- Burris P. T. and McCabe R. B E. (2001). Nuclear receptors and Genetic Disease. Academic Press, capítulo 1 y 3 pp 1-57 and 97- 136
- Busch H. (1977). Receptors and hormone action. Edit. O Malley B. W., Birnbaumer L. Academic Press. N. Y. 1: 32-97.
- Carrer H.F., Cambiasso M.J., Brito V., Gorosito S., (2003). Neurotrophic factors and estradiol interact to control axogenic growth in hypothalamic neurons. *Ann. N. Y. Acad. Sci. Steroids and the nervous system.* 1007:306 -316

Cazalla D., Zhu J., Manche L., Huber E., Krainer AR., Caceres JF. (2002). Nuclear export and retention signals in the RS domain of SR proteins. *Mol. Cell. Biol.* 22 (19): 6871-82.

Chakravarti D., LaMorte V. J., Nelson M.C., Nakajima T., Schulman I.G., Juguilon H., Montminy M., and Evans R.M. (1996). Role of CBP/P300 in nuclear receptor signalling. *Nature*. 383: 99-103

Chelsky D., Ralph R., and Jpnak G. (1989). Sequence requirement for synthetic peptide mediated translocation to the nucleus. *Mol. Cell. Biol.* 9: 2489-2492.

Chen H., Lin R.J., Schiltz R.L., Chakravarti D., Nash A., Nagy L., Privalsky M.L., Nakatani Y. and Evans R.M. (1997). Nuclear receptor coactivator ACTR is a novel histone acetyltransferase and forms a multimeric activation complex with P/CAF and CBP/p300. *Cell* 90: 569-580.

Chen D., Ma H., Hong H., Koh S.S., Huang S.M., Schurter B.T., Aswad D.W. and Stallcup M.R. (1999). Regulation of transcription by a protein methyltransferase. *Science*. 284: 2174-2177.

Clark C. R. (1987). Steroid hormone receptors their Intracellular localization. Ellis Horwood International publishers in science and technology Series I biomedicine. Chap. 1 : 13-95

Collingwood T. N., Urnov F. D. and Wolffe A. P. (1999). Nuclear receptors: coactivators, corepressors and chromatin remodeling in the control of transcription. *J. Mol. Endocrinol.* 23: 255-275.

Connor E. C., Norris D. J., Broadwater G., Willson M. T., Gottardis M. M. , Dewhirstm M.W. and McDonnell P. D. (2001). Circumventing tamoxifen resistance in breast cancers using antiestrogens that induce unique conformational changes in the estrogen receptor. *Cancer Res.* 61: 2917-2922.

Cosman F., Dempster D. and Lindsay R. (1997). Clinical effects of estrogens and antiestrogens on the skeleton and skeletal metabolism. In: R. Lindsay D.W. Dempster and V. C: Jordan (eds.) *Estrogens and Antiestrogens. Basic and Clinical Aspects* pp. 151-164. Lipincott- Raven, Philadelphia.

Couse F. J., Lindzey J., Grandien K., Gustafsson J-Å, and Korach. K. S. (1997). Tissue distribution and quantitative analysis of estrogen receptor α (ER α) and estrogen receptor- β (ER β) messenger ribonucleic acid in the wild-type and ER α -knockout mouse. *Endocrinology.* 138: 4613 - 4621.

Cowper A.E., Caceres J. F., Mayeda A. and Sreaton G. R. (2001). Serine-arginine (SR) protein-like factors that antagonize authentic SR proteins and regulate alternative splicing. *J. Biol. Chem.* 276 (52): 48908-14.

Curtis W. S., Washburn T., Sewall Ch., DiAugustine R., Lindzey J., Couse F. J., and Korach S. K. (1996). Physiological coupling of growth factor and steroid receptor signaling pathways:

Estrogen receptor knockout mice lack estrogen-like response to epidermal growth factor. *Proc Natl. Acad. Sci. U.S.A.* 93: 12626-12630.

Dickinson L. A., Edgar A. J., Ehley J. and Gottesfeld J. M. (2002). Cyclin L is an RS domain protein involved in pre-mRNA splicing. *J. Biol. Chem.* 277 (28): 25465-25473.

Driel V. R. and Roel-Fransz P. (2004). Nuclear architecture and genome functioning in plants and animals: what can we learn from both. *Exp. Cell. Res.* 296:86-90.

Darimont B. D., Wagner R. L., Apriletti J.W., Stallcup M.R., Kushner P. J., Baxter J. D., Fletterick R. J. and Yamamoto K. R. (1998). Structure and specificity of nuclear receptor-coactivator interactions. *Genes and Development.* 12: 3343-3356.

DeFranco B. D. (2002). Navigating steroid hormone receptors through the nuclear compartment. *Mol. Endocrinol.* 16: 1449-1455.

Echeverría M. O. M., González M. A., Traish M. A., Wotiz H. H., Ubaldo E. and Vázquez Nin H. (1994). Immunoelectron microscopic localization of estradiol receptor in cell of male and female reproductive and non-reproductive organs. *Biol. Cell.* 81: 257-265.

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

Echeverría M. O. M. and Ontiveros Ll. F. (2001). Biología del núcleo celular. Coordinación de servicios editoriales. Facultad de Ciencias U.N.A..M.

Eddy E. M., Washburn T. F., Bunch D. O, Goulding E. H., Gladen B. C., Lubahn D.B. and Korach K. S. (1996). Targeted disruption of the estrogen receptor gene in male mice causes alteration of spermatogenesis and infertility. *Endocrinol.* 137: 4796-4805.

Enmark E., Huikko M. P., Nilsson., Gustafsson J. A. (1996 a). Cloning of a novel estrogen receptor expressed in rat prostate and ovary. *Proc. Nat. Acad. Sci. USA* 93: 5925-5930.

Enmark E., Pelto-Huikko M., Grandien K., Lagercrantz S., Lagercrantz J, Fried G., Nordenskjöld M. and Gustafsson J-Ar (1996 b). Human estrogen receptor β – gene structure, chromosomal localization, expression pattern. *J. Clin. Endocr. Metab.* 82: 4258-4265.

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

Fakan S., Leser G. and Martin T. (1984). Ultrastructural distribution of nuclear ribonucleoprotein as visualized by immunocytochemistry in thin section *J. Cell Biol.* 98: 358-363.

Fantl J.A., Cardozo L. D., Ekberg J., Mc Clish D. K., And Heimer G. (1994). Estrogen therapy in the management of urinary incontinence in postmenopausal women. A metanalysis. *Obstet. Gynecol.* 83: 12-18.

Font de Mora J. and Brown M. (2000) AIB1 Is a conduit for kinase-mediated growth factor signaling to the estrogen receptor. *Mol. Cell. Biol.* 20: 5041-5047.

Ge R. S., Shan L. X. and Hardy M. P. (1996). Pubertal development of leydig cells In: A. H. Payne M. P. Hardy and L. D: Russell The Leydig Cell. Pp159-172. Cache River Press Clearwater Florida.

Glasser S. R., Chytil F. and Spelsberg T. C. (1972). Early effects of estradiol 17 β on the chromatin and activity of the deoxyribonucleic acid-dependent ribonucleic acid polymerases (I and II) of the rat uterus. *J. Biochem.* 130: 947-957.

Gorski, J (1964). Early estrogen effects on the activity of uterine ribonucleic acid polymerase. *J. Biol. Chem.* 239:889-892.

Govind P. A. and Thampan V. R. (2001). Proteins interacting with the mammalian estrogen receptor: proposal for an integrated model for estrogen receptor mediated regulation of transcription. *J. Cell. Biochem.* 80: 571-579.

Govind P.A., Sreeja S. and Thampan V. R. (2003a). Proteins that mediate the nuclear entry of the goat uterine estrogen receptor activation factor (E-RAF) : Identification of a molecular basis for the inhibitory effect of progesterone on estrogen action. *J. Cell. Biochem.* 89:108-119.

Govind P.A., Sreeja S. and Thampan V. R. (2003b). Estradiol dependent anchoring receptor of the goat uterine estrogen receptor activation factor (E-RAF) at the endoplasmic reticulum by a 55 kDa anchor protein (ap55) *J. Cell. Biochem.* 89: 94-107.

Graveley B. R. (2004). A protein interaction domain contacts RNA in the prespliceosome. *Mol. Cell.* 13(3):302-304.

Greene G. L, Gilna P., Waterfield M., Baker A. Hort Y. and Shine J. (1986). Sequence and expression of human estrogen receptor complementary DNA. *Science* 231:150-154.

Green S., Walter P., Kumar V., Krust A., Bornert J.M., Argos P., and Chambon P. (1986). Human estrogen receptor cDNA: sequence, expression and homology to v-erb-A. *Nature.* 320:134-139.

Greenman D. L., Wicks W. D. And Kenney F. T. (1965). Stimulation of ribonucleic acid synthesis by steroid hormones II. High molecular weight components. *J. Biol. Chem.* 240: 4420- 4426.

Gruenbaum Y Goldman R. D. Meyuhas R. Mills E. Margalit A. Fridkin A Dayani Y Prokocimer M. Enosh A.(2003). The nuclear lamina and its functions in the nucleus. *Int. Rev. Cytol.* 226: 1-62

Gu Q., Korach S. K. and Moss L. R. (1999). Rapid Action of 17 β -Estradiol on kainate-induced currents in hippocampal neurons lacking intracellular estrogen receptors. *Endocrinology*. 140: 660-666.

Gustafsson J-Å (1999). Estrogen receptor β a new dimension in estrogen mechanism of action. *J. Endocrinol.* 163: 379-383.

Halachmi S., Marden E., Martin G., MacKay H., Abbondanza, C. and Brown M. (1994). Estrogen receptor- associated proteins: possible mediators of hormone-induced transcription. *Science*. 264: 1455-1458.

Hall M. J., Couse F. J., and Korach S. K. (2001). The multifaceted mechanisms of estradiol and estrogen receptor signaling. *J. Biol. Chem.* 276: 36869-36872.

Hamilton H. (1962). Inhibition of protein synthesis and some quantifications of early estrogen action and response. *Science*. 138: 989- 997.

Hamilton T. H. (1968). Control by estrogen of genetic transcription and traslation binding to chromatin and stimulation of nucleolar RNA synthesis are primary events in the early estrogen action. *Science*. 161: 649- 661.

Hanstein B., Eckner R., DiRenzo J., Halachmi S., Liu H., Searcy B., Kurokawa R. and Brown M. (1996). p300 is a component of an estrogen receptor coactivator complex. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 93: 11540-11545.

Hart L. L. and Davie R. J. (2001). The estrogen receptor: more the average transcription factor. *Biochem. Cell. Biol.* 80: 335-341.

Heery M. D., Kalkhoven E., Hoare S. and Parker G. M. (1997). A signature motif in transcriptional co-activators mediates binding to nuclear receptors. *Nature* 87: 733–736.

Heinzel T., Laviusky R.M., Mullen T.M., Soderstrom M., Laherty C.D., Torchia J.T., Yang W. M., Brard C., Ngo S.G., Davie J.R., Seto E., Eisenman R.M., Rose D.W., Glass C. K. and Rosenfeld M.G. (1997). A complex containing N-CoR, mSin3 and histone deacetylase mediates transcriptional repression. *Nature* 387: 43–48

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

Hess R. A., Bunick D. and Lee K. H. (1997). A role of estrogens in the male reproductive system. *Nature*. 390: 509-512.

- Hiller S. G., (1994). Current concepts of the roles of follicle stimulating hormone and luteinizing hormone in folliculogenesis. *Hum. Reprod.* 9: 188–191.
- Hiller S. G. (2001). Gonadotropic control of ovarian follicular growth and development *Mol. and Endoc.* 179: 39–46.
- Hong H., Kohli K., Garabedian M.J. and Stallcup M.R. (1997). GRIP1 a transcriptional coactivator for the AF-2 transactivation domain of steroid, thyroid, retinoid, and vitamin D receptors. *Mol. Cell. Biol.* 17: 2735-2744.
- Hu Y.F.H., Lau K.M., Ho S. M. and Russo J. (1998). Increased expression of estrogen receptor β in chemically transformed human breast epithelial cells. *Int. J. Oncol.* 12: 1225–1228.
- Jacq X., Brou C., Lutz Y., Davidso, L., Chambon P. and Tora L., (1994). Human Taf1130 is present in a distinct TFIID complex and is required for transcriptional activation by the estrogen receptor. *Cell* 79: 107-117.
- Jaya P., Premkumar, and Thampan V. R. (2000). Free leucine dissociates homo and heterodimers formed between proteins containing leucine heptad repeats. *Biochem. Biophys. Acta* 10413: 1 – 9.
- Jiménez-García L. F. and Spector D. L. (1993). In vivo evidence that transcription and splicing are coordinated by a recruiting mechanism. *Cell* 73: 47-59.
- JoAnne S. R., Russell D.L., Robker R.L., Dajee M., Allisto, T.N., (1998). Molecular mechanisms of ovulation and luteinization. *Mol. Cell Endocrinol.* 145: 47–54.
- Jordan C. V. and Morrow M. (1999). Tamoxifen, raloxifene, and the prevention of breast cancer. *Endocrine. Rev.* 20: 253-278.
- Juárez Chavero S. (1999). Tesina de especialidad: Efecto del 17 β estradiol sobre la densidad de gránulos intercromatinianos en ratas ovariectomizadas. Facultad de Ciencias Laboratorio de Microscopía Electrónica, U. N. A. M.
- Kalderon D., Richardson, W. D., Markham, A. F. and Smith A. E. (1984). Sequence requirement for nuclear localization of simian virus 40 large T antigen. *Nature.* 311: 33-38.
- Karthikeyan N. and Thampan V. R. (1994). A DNA- binding (R-I) and a non- DNA-binding (R-II) estrogen receptor in the goat utrine nucleus: purification and characterization. *Arch. Biochem. Biophys.* 309: (2) 205-213.
- Karthikeyan N. and Thampan V. R. (1996). Plasma membrane is the site of localization of the non activated estrogen receptor in the goat uterus: Hormone binding causes receptor internalization. *Arch. Biochem. and Biophys.* 325: (1) 47–57.
- Kawata M., Matsuda K., Nishi M., Ogawa H., Ochiai I. (2001). Intracellular dynamics of steroid hormone receptor. *Neuroscience. Res.* 40: 197-203.

- Kinyamu H K. and Archer T. K. (2004). Modifying chromatin to permit steroid hormone receptor-dependent transcription. *Biochem. Biophys. Acta* 1677: 30-45.
- Kiseleva E., Allen D T, Rutherford S., Bucci M., Wente R. S. and Goldberg W. M. (2004). Yeast nuclear pore complexes have a cytoplasmic ring and internal filaments. *J. Structural Biol.* 145, 3: 272-288.
- Klein-Hitpass L., Shorpp M., Wagner U. and Ryffel G. U. (1986). An estrogen responsive element derived from the 5' flanking region of the *Xenopus vitellogening A2* gene functions in transfected human cells. *Cell.* 46: 1053-1061.
- Klein-Hitpass L. Ryffel G. U. Heitlinger E. and Cato A.C.B. (1988). A13 bp palindrome is a functional estrogen responsive element and interacts specifically with estrogen receptor. *Nucl. Acid. Res.* 16: 647-663.
- Klein-Hitpass L., Tsai S. Y., Green G.L., Clark J. H., Tsai M. J., and O' Malley B. W. (1989) Specific binding of estrogen receptor to the estrogen response element. *Moll. Cell. Biol.* 9: 43-49.
- Klinge M. C. (2001). Estrogen receptor interaction whit estrogen response elements. *Nucl. Acid. Res.* 29: (14) 2905-2919.
- Kressler D., Schreiber N. S., Knutti D. and Kralli A. (2002). The PGC-1 related protein PERC is a selective coactivator of estrogen receptor α . *J. Biol. Chem.* 277: 13918-13925.
- Krust, A., Green S., Argon P., Kumar V., Walter P., Bornert J.M., and Chambon P. (1986). The chicken oestrogen receptor sequence: homology whit V-erbA and the human oestrogen and glucocorticoid receptors. *EMBO J.* 5: 891-897.
- Koh S. S., Chen D., Lee Y.H., and Stallcup R. M. (2001). Synergistic enhancement of nuclear receptor function by p160 coactivators and two coactivators with protein methyltransferase activities *J. Biol. Chem.* 276: 1089-1098.
- Kolodziejczyk J., Gregoraszczyk E. L., Leibovich H., Gertler A. (2001). Different action of ovine GH on porcine theca and granulosa cells proliferation and insulin-like growth factors I- and II- stimulated estradiol production. *Reprod. Biol.* 1 (1): 33-41.
- Kousteni S., Bellido T., Plotkin L.I., O'Brien C.A., Bodenne D.L. Han L., Han K., DiGregorio G.B., Katzenellenbogen J.A., Katzenellenbogen B.S., Roberson P.K., Weinstein R. S, Jilka R. L., and Manolagas S. C. (2001). Nongenotropic sex-nonspecific signaling through the estrogen or androgen receptors: Dissociation from transcriptional activity. *Cell* :104 (5) 719 –730.
- Kuipier G. G. Carlquist J. M. and Gustafsson J-A. (1998 a). Estrogen is a male and female hormone. *Sci. Med-* 5: 36-45.

Kuiper G. G., Carlsson B., Grandien J., Enmark E., Haggblan, J., Nilsson S. and Gustafsson J.A. (1997). Comparison of the ligand binding specificity and transcript tissue distribution of estrogen receptors α and β . *Endocrinol.* 138: 863-870.

Kuipier G. G., Enmark E., .Pelto- Huikko M., Nilsson S., and Gustafsson J- A. (1996). Cloning of a novel estrogen receptor expressed in rat prostate and ovary. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* 93: 5925-5930.

Kuiper G. G., Shughrue P. J., Merchenthaler I. and Gustafsson, J.A. (1998b). The estrogen receptor beta subtype: a novel mediator of estrogen action in neuroendocrine systems. *Front. Neuroendocrinol.* 19: 253-286.

Kumar V., and Chambon P. (1988) The estrogen receptor binds tightly to its responsive element as a ligand- induced homodimer. *Cell* 55: 145-156.

Kumar M. P., Bhaskar L. and Thampan R.V. (1999). Structural Characterization of the goat uterine estrogen receptor activation factor using an endogenous calcium activated neutral protease. *Mol. Cell. Endocrinol.* 152: 57-64.

Kushner J P., David A., Agard G. L., Greene S. T., Scanlan K. A., Shiao M. R., Uht and Webb P. (2000). Estrogen receptor pathways to AP-1. *J. Steroid. Biochem. Mol. Biol.* 74 (5): 311-317

Li H., Gomes P.J., and Chen J.D. (1997). RAC3, a steroid/nuclear receptor-associated coactivator that is related to SRC-1 and TIF2. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 94: 8479-8484.

Liu D., Zhang Z., Gladwell W. and Teng T. CH. (2003). Estrogen stimulates estrogen-related receptor α gene expression through conserved hormone response elements. *Endocrinol.* 144: (11) 4894-4904.

Longman D., Johnstone I. L. and Caceres J. F. (2000). Functional characterization of SR and SR-related genes in *Caenorhabditis elegans*. *EMBO J.* 19: (7) 1625-37.

Lubahn D. B. Moyer J.S. Golding T. S. Couse J. F. Korach K. S. and Smithies O. (1993). Alteration of reproductive function but not prenatal sexual development after insertional disruption of the mouse estrogen receptor gene. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* 90: 11162-11166.

Malkinson A. M. (1980). Acción hormonal. Cuadernos de Biología ed. Omega S. A. Barcelona Chap. 1-3. pp 1-74.

Martínez- Balbas M. A., Bannister A. J., Martin K., Haus- Seuffert P., Meisterernst M. and Kouzarides T (1998). The acetyltransferase activity of CBP stimulates transcription. *EMBO J.* 17: 2886-2893.

Mader S., Leroy P., Chen J. Y. and Chambon P., (1993). Multiple parameters control the selectivity of nuclear receptors for their response elements selectivity and promiscuity in

response element recognition by retinoic acid receptors and retinoid X receptor *J. Biol. Chem.* 168: 591-600.

McDonnell D. P. (1999). The Molecular Pharmacology of SERM. *Trends Endocrinol. Metab.* 10: 301-311.

McDonnell D.P., Clemm D.L., Hermann T., Goldman M.E., and Pike J.W. (1995). Analysis of estrogen receptor function in vitro reveals three distinct classes of antiestrogens. *Mol. Endocrinol.* 9: 659-669.

McKenna N. J., Lanz, R.B. and O'Malley B. W. (1999). Nuclear receptor coregulators: cellular and molecular biology. *Endocr. Rev.* 20: 321-344

McKenna J. N. and O'Malley W. B (2002). Combinatorial control of gene expression by nuclear receptors and coregulators. *Cell* 108: 465-474.

McKenna N.J., Nawaz Z., Tsai S.Y., Tsai M. Y. and O'Malley B.W. (1998). Distinct steady-state nuclear receptor coregulators complexes exist in vivo. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 95: 11697-11702.

Means A. R. and Hamilton T. H. (1966). Early estrogen action: concomitant stimulations within two minutes of nuclear RNA synthesis and uptake of RNA precursor by the uterus. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 56: 1594-1598.

Medina A. M., Moreno Díaz De La Espina S., Martín M. and Fernández Gómez E. (1989). Intercromatin granules in plant nuclei. *Biol. Cell* 67: 331-339.

Melcak I. and Raska I. (1996). Structural organization of the pre-mRNA splicing commitment: a hypothesis. *J. Structur. Biol.* 117: 189- 194.

Mendelsohn E. M. (2000). Mechanisms of estrogen action in the cardiovascular system. *J Steroid Biochem. Mol. Biol.* 337-343.

Milan K., Bagchi Ming-Jer T., Bert W. O. M. and 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.

Mohla S. De Sombre E. R. and Jensen E. V. (1972). Tissue- specific stimulation of RNA synthesis by transformed estradiol receptor complex. *Biochem. Biophys. Res Commun.* 46: 661-667.

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

Montano M. M., Muller V., Trogaugh A. and Katzenellenbogen B. S. (1995). The carboxy-terminal F domain of the human estrogen receptor: role in the transcriptional activity of the

- receptor and the effectiveness of antiestrogens as estrogen antagonists. *Mol. Endocrinol.* 9: 814-825.
- Mosselman S. Polman J. and Dijkema R. (1996). ER β : identification and characterization of a novel human estrogen receptor. *FEBS Lett.* 392: 49-53.
- Mueller G. C., Herranen A. M. and Jervell K. F. (1958). Studies on the mechanism of action of estrogens. *Recent. Progr Horm. Res.* 14: 95- 101
- Mueller G. C. (1960). Biochemical parameters of estrogen action In: G.Pincus and E. P. Vollmer. *Biological Activities of Steroids in Relation to Cancer.* (eds.) Acad. Press New York, pp. 129-145
- Nilsson S., Makela S., Treuter E., Tujague M., Thomsen J., Andersson G., Enmark E., Pettersson K., Warner M., Gustafsson J. A. (2001). Mechanisms of estrogen action. *Physiological Rev.* 81: (2) 1535-1565.
- Nirmala P. B. and Thampan R.V. (1995a). Ubiquitination of the rat uterine estrogen receptor: dependence on estradiol. *Biochem. Biophys. Res. Comm.* 213: 24-31.
- Nirmala P. B. and Thampan R.V. (1995b). A 55 KDa. Protein (p55) of the goat uterus mediates nuclear transport of the estrogen receptor I. Purification and characterization. *Arch. Biochem. Biophys.* 319: 551-561.
- Norman A. W. and Litwack G. D. (1997) *Hormones* ed. 2^a edit. Academic Press. Chap 1 and 2, pp 1-85.
- Noteboom W. D. and Gorski J. (1963). An early effect of estrogen on protein synthesis *Proc. Natl. Acad. Sci. U S A.* 50: 250-255.
- O'Malley B. W. Aronow A. Peacock A. C. and Dingman C. W. (1968). Estrogen-dependent increase in transfer RNA during differentiation of the chick oviduct. *Science.* 162: 567-568.
- O'Malley B. W., McGuire W. L., Kohler P.O. and Korenman S. G: (1969). Studies on The mechanism of steroid hormone regulation of synthesis of specific proteins *Rec. Prog. Horm. Res.* 25: 105-160.
- Onate S.A., Tsai S.Y., Tsai M.J., and O'Malley B.W. (1995). Sequence and characterization of a coactivator for the steroid hormone receptor superfamily. *Sci.* 270: 1354- 1357
- Onate S. A., Boonyaratanakornkit V. and Spencer T. E. (1998). The steroid receptor coactivator-1 contains multiple receptor interacting and activation domains that cooperatively enhance the activation function 1 (AF1) and AF2 domains of steroid receptor. *J. Biol. Chem.* 273: 12101-12108.
- Orti E. Bodwell J. E. and Munck A. (1992). Phosphorylation of steroid hormone receptors. *Endocrine Rev.* 13: 105-128.

- Olefsky M. J. (2001). Nuclear receptor series. *J. Biol. Chem.* 276: 36863-36864.
- Osterlund M., Kuiper G. G., Gustafsson J. A. and Hurd. Y. L. (1998). Differential distribution and regulation of estrogen receptor α and β mRNA within the female rat brain. *Mol. Brain. Res.* 54: 175-180.
- Padma S. A. and Thampan R. V. (2000). Interdependence between a 55 KDa Protein (p55) and a 12 KDa. Protein (p12) in facilitating the nuclear entry of goat uterine estrogen receptor under cell-free conditions. *Biol. Chem.* 381: 285- 294.
- Padma A. S., Renil M., Thampan R. V. (2000). Protein- protein interactions that precede the nuclear entry of goat uterine estrogen receptor under cell – free conditions. *J. Cell. Biochem.* 78: 650–655.
- Paech K., Webb P., Kuiper G. J. M., Nilsson S. and Gustafsson J. A. (1997). Differential ligand activation of estrogen receptors ER α and ER β at Ap-1 sites. *Science.* 277: 1508-1510.
- Pappas T.C., Gametchu B. and Watson C. S. (1995). Membrane estrogen receptors identified by multiple antibody labeling and impeded-ligand binding. *FASEB J.* 9: 404-410.
- Pietras R. J., Nemere I., Szego M. C. (2001). Steroid Hormone Receptors in Target cell membranes. *Endocrinol.* 14: 417-427.
- Pike Ashley C.W., Brzozowski A., Marek J. W., Hubbard E., Ann- Thorsell Gerd, - Li Yi, Gustafsson J. A, and Carlquist M. (2001). Structural insights into the mode of action of a pure antiestrogen. *Structure.* 9:145-153.
- Pombo A. and Cook P.R., (1996). The localization of sites containing nascent RNA and splicing factors. *Exp. Cell Res.* 229: 201-203.
- Pratt W.B. and Toft D.O. (1997). Steroid receptor interactions with heat shock protein and immunophilin chaperones. *Endocrine. Rev.* 18:306-360.
- Puvion E., Viron A. and Xu X. F. (1984). High resolution autoradiographical detection of RNA in the interchromating granules of DRB treated cells. *Exp. Cell.* 43: 147-150
- Puvion E. and Puvion-Dutilleul 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.
- Rabut G, Lénárt P. and Ellenberg J. (2004) Dynamics of nuclear pore complex organization through the cell cycle. *Curr. Opin. Cell Biol.* 16, 3: 314-321.
- Ramirez V. D. and Zheng (1996). Membrane Sex-Steroid Receptors in the Brain. *Frontiers in Neuroendocrinology.* 17: 402-439.

Rosenfeld G. M. and Glass K. Ch. (2001). Coregulator codes of transcriptional regulation by nuclear receptors *J. Biol. Chem.* 276: 36865-36868

Rowan G. B., Weigel L. N., and O'Malley W. B. (2000). Phosphorylation of steroid receptor coactivator-1. identification of the phosphorylation sites and phosphorylation through the mitogen-activated protein kinase pathway. *J. Biol. Chem.* 275: 4475-448.

Russell K. S., Haynes M. P., Sinha D., Clerisme E., and Bender J. R (2000). Human vascular endothelial cells contain membrane binding sites for estradiol, which mediate rapid intracellular signaling. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* 97: 5930-5935.

Sadovsky Y., Webb. P., López G., Baxter J.D., Fitzpatrick P..M., Gizang-Ginsberg E., Cavailles V., Parker M.G. and Kushner P.J. (1995). Transcriptional activators differ in their responses to overexpression of TATA-box-binding protein. *Mol. Cell. Biol.* 15: 1554-1563.

Sanford JR., Longman D., Caceres J. F. (2003). Multiple roles of the SR protein family in splicing regulation. *Prog. Mol. Subcell. Biol.* 31:33-58

Schwerket, C., Klotzbucher M., Sachs M. Ulber V. and Klein-Hitpass L. (1995). Identification of a transactivation function in the progesterone receptor that interacts with the TAFII110 subunit of the TFIID complex. *J. Biol Chem.* 270: (2)1 21331-21338.

Sebastian T. and Thampan R.V. (2002a). Nuclear estrogen receptor II (nER) is involved in the estrogen dependent ribonucleoprotein transport in the goat uterus: I. Localization of nERII in snRNP. *J. Cell. Biochem.* 84: 217-226.

Sebastian T., Thampan R.V. (2002b). Nuclear estrogen receptor II (nER) is involved in the estrogen dependent ribonucleoprotein transport in the goat uterus: II. Isolation and characterization of three small nuclear ribonucleoprotein proteins which bind to nER-II. *J. Cell. Biochem.* 84: 227-236.

Shang Y., Hu X., DiRenzo J., Lazar M.A. and Brown, M. (2000). Cofactor dynamics and sufficiency in estrogen receptor-regulated transcription. *Cell* 103: 843-852.

Shao D. And Lazar M. A. (1999). Modulating nuclear receptor function: may the phos be with you. *J. Clin. Invest.* 103: 1617-1618.

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

Shyamala G. and Gorski J. (1969). Estrogen receptor in the rat uterus: studies on the interaction of cytosol and nuclear binding sites. *J. Biol. Chem.* 244: 1097-1103.

Simoncini T., Hafezi-Moghadam A., Brazil P D., Ley K., Chin W. W. and Liao K J. (2000). Interaction of oestrogen receptor with the regulatory subunit of phosphatidylinositol-3-OH kinase. *Nature* 407: 538-541.

Singh S., Shaul W. P. and Gupa P. D. (2002). Conventional estrogen receptors are found in the plasma membrane of vaginal epithelial cells of the rat. *Steroids* 67: 757-764.

Smith C. L. (1998). Cross-talk between peptide growth factor and estrogen receptor signaling pathways. *Biol Reprod* 58: 627-632.

Smith L. C., Nawaz Z, and O'Malley W. B. (1997). Coactivator and corepressor regulation of the agonist/antagonist activity of the mixed antiestrogen, 4-hydroxytamoxifen. *Mol. Endocrinol.* 11: 657-666.

Smith S. S. (1994). Female sex steroid hormone: from receptors to networks to performance actions on the sensorimotor system. *Prog. Neurobiol.* 44: 55-86.

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

Spector L. S. (2003). The Dynamics of chromosome organization and gene regulation *Ann. Rev. Biochem* 72: 573-608.

Spencer T. E., Jenster G. Burcin M. M. .Allis D, Zhou J, Mizzen A C., Mckenna J N, Onate A. S., Tsai Y. .S., Tsai M. R. and O'malley B. (1997). Steroid receptor coactivator-1 is a histone acetyltransferase. *Nature.* 389:194-198.

Sreeja S. Thampan R. V. (2004a). Estradiol-mediated internalisation of of the non-activated estrogen receptor from the goat uterine plasma membrane: Identification of the proteins involved. *Mol. Cell. Biochem.* 259: 131- 140

Sreeja S. Thampan R. V. (2004b). Proteins which mediated the nuclear entry of goat uterine non activated estrogen receptor (naER) following near internalization from the plasma membrane. *Mol. Cell. Biochem.* 259: 141 - 148.

Stampfer M. J. and Colditz G. A. (1991). Estrogen replacement therapy and coronary heart disease: a quantitative assessment of the epidemiologic evidence. *Prev. Med.* 20: 47-63.

Stein G.S., Zaidi S. K., Braastad C. D., Montecino M., Wijnen A. J., Choi J-H., Stein J.L., Lian J.B. and Javed A. (2003). Functional architecture of the nucleus: organizing the regulatory machinery for gene expression, replication and repair. *Trends in Cell Biol.* 13,11:584-592.

Stenoien L. D., Nye C A., Mancini G. M., Patel K., Dutertre M., O'Malley W. B., Smith L. C., Belmont S. A., and Mancini A. M. (2001). Ligand-mediated assembly and real-time cellular dynamics of estrogen receptor α -coactivator complexes in living cells. *Mol. Cell. Biol.* 21: 4404-4412.

Stenoien D. L., Mancini M. G., Patel K., Allegreto E. A., Smith C.L., Mancini M. A. (2000). Subnuclear trafficking estrogen receptor- α and steroid receptor coactivator-1. *Mol. Endocrinol* 14: 518-534.

- Swift H. (1959). Studies on nuclear fine structure. *Brook-have Symp. Biol.* 12: 134 - 152.
- Shyamala G. and Gorski J. (1969). Estrogen receptor in the rat uterus. Studies on the interaction of cytosol and nuclear binding sites *J. Biol. Chem.* 244: 1097-1103.
- Talwar G. P. Segal S. J. Evans A. and Davidson O. W. (1964). The binding of estradiol in the uterus: a mechanism for derepression of RNA synthesis. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 52: 1059-1066.
- Tasset D., Tora. L., Fromental C., Scheer E. and Chambon P. (1990). Distinct classes of transcriptional activating domain function by different mechanisms. *Cell* 62: 1177-1187.
- Thampan R. V. (1985). The nuclear binding of estradiol stimulates ribonucleoprotein transport in the rat uterus. *J. Biol. Chem.* 260: 5420-5426.
- Thampan R. V. (1987). A 62 KDa protein functions as estrogen receptor activation factor (E-RAF) in the goat uterus. *Mol Cell Endocrinol.* 53: 119-130.
- Thampan R. V. (1988). Estradiol- stimulated nuclear ribonucleoprotein transport in the rat uterus: a molecular basis. *Biochemistry* 27: 5019-5026.
- Thampan R. V. (1989). Molecular aspects of estrogen receptor activation factor (E-RAF) function. *Mol. Cell. Endocrinol.* 64: 19-34.
- Thampan R.V. and Clark J. H. (1981) An oestrogen receptor activator protein in rat uterine cytosol. *Nature* 290: 152- 154.
- Thampan R. V., Zafar A., Iman N. S., Sreeja S., Suma K., Vairamani M. (2000). Cholesterol inhibits the nuclear entry of estrogen receptor activation factor (E – RAF) and its dimerization with the nonactivated estrogen receptor (naER) in goat uterus. *J. Cell. Biochem.* 77: 382–395.
- Toft. D. and Gorski J. (1966). A receptor molecule for estrogens: isolation from the rat uterus and preliminary characterization. *Proc Natl, Acad. Sci. USA* 55: 1574-1581.
- Torchia, J., Rose, D.W., Inostroza, J., Kamei, Y., Westin, S., Glass, C.K., and Rosenfeld, M.G. (1997). The transcriptional co-activator p/CIP binds CBP and mediates nuclear-receptor function. *Nature* 387: 677-684.
- Tsai M. J. and O' Malley B. W. (1994). Molecular mechanism of action of steroid/thyroid receptor superfamily members. *Ann. Rev. Biochem* 63: 451- 486
- Tsai S. Y. Carlstedt- Duke J. Weigel N. L. (1988). Molecular interactions of steroid hormone receptor with its enhancer element: evidence for receptor dimer formation. *Cell* 55:361-369.
- Tsai S. Y., Srinivasan G., Allan G. F., Thompson E. B., O' Malley B. W. and Tsai M.J. (1990). Recombinant human glucocorticoid receptor induces transcription of hormone response genes in vitro. *J. Biol. Chem.* 265: 17055-17061.

Tzukerman M.T., Esty A., Santiso-Mere D., Danielian P., Parker M. G., Stein R B., Pike J W., and McDonnell D. P. (1994). Human estrogen receptor transactivational capacity is determined by both cellular and promoter context and mediated by two functionally distinct intramolecular regions. *Mol. Endocrinol.* 8: 21-30.

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

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

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

Voegel J. J., Heine M. J., Zechel C., Chambon P. and Gronemeyer H. (1996). TIF2 a 160 kDa transcriptional mediator for the ligand-dependent activation function AF-2 of nuclear receptors. *EMBO J.* 15: 3667-3675.

Walter P., Green S., Greene G., Krust A., Bornert J. M., Jeltsch J. M., Staub A., Jensen E, Scrace G, and Waterfield M. (1985). Cloning of the human estrogen receptor cDNA. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 82: (23) 7889-7893.

Watters J. J, Chun T-Y, Kim Y-N, Bertics P. J., and Gorski J. (2000). Estrogen modulation of prolactin gene expression requires an intact mitogen-activated protein kinase signal transduction pathway in cultured rat pituitary cells. *Mol. Endocrinol.* 14: 1872-1881.

Watson. C. S. and Gametchu B. (1999). Membrane-initiated steroid actions and the proteins that mediate them. *Proc. Soc. Exp. Biol. Med.* 220: 9- 19.

Webb P., Nguyen P., Shinsako J., Anderson C., Feng W., Nguyen P M., Chen D., Huang S-M., Subramanian S., McKinerney E., Katzenellenbogen S. B., Stallcup R M., and Kushner J P. (1998). Estrogen receptor activation function 1 works by binding p160 coactivator proteins. *Mol. Endocrinol.* 12: 1605-1618.

Wehling M. (1997). Specific, nongenomic actions of steroid hormones. *Ann. Rev. Physiol.* 59: 365-393.

Weigel N. L. (1994). Receptor phosphorylation In: Mechanism of steroid Hormone regulation of gene transcription (eds.) Tsai M. J. and B. O' Malley . R. G. Landes Austin Texas. pp. 93-110.

White R., Leonaardsson G., Roswell G., Jacobs I., Milligan S., and Parker M. (2000). The nuclear receptor co-repressor Nrip1 (RIP140) is essential for female fertility. *Nat. Med.* 6: 1368-1374.

Wicks W. D., Greenman D. L. and Kenney F. T. (1965). Stimulation of ribonucleic acid synthesis by steroid hormones. I. Transfer ribonucleic acid *J. Biol. Chem.* 240: 4414-4419.

Wieslander L. (2004). The cell nucleus. *Exp. Cell. Res.* 296: 1-2.

Wilson J. D. (1963). The nature of the RNA response to estradiol administration by the uterus of the rat. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 50: 93-100.

Yen S.S.C. (1977). The biology of menopause. *J. Reprod. Med.* 18: 287-296.