



**UNIVERSIDAD NACIONAL AUTÓNOMA
DE MÉXICO**

FACULTAD DE CIENCIAS

**Estudio comparativo de células epiteliales
endometriales de ratas normales, castradas y con
reposición de 17- β estradiol**

T E S I S

QUE PARA OBTENER EL TÍTULO DE:

BIÓLOGA

P R E S E N T A:

MARIANA ORTEGA LEDEZMA



**DIRECTORA DE TESIS:
DRA. OLGA MARGARITA ECHEVERRÍA MARTÍNEZ**

CIUDAD UNIVERSITARIA, CDMX, 2022



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.

HOJA DE DATOS DEL JURADO

1. DATOS DEL ALUMNO:

Apellido paterno:	Ortega
Apellido materno:	Ledezma
Nombre (s):	Mariana
Teléfono:	5537168354
Universidad Nacional Autónoma de México	Universidad Nacional Autónoma de México
Facultad de Ciencias	Facultad de Ciencias
Carrera:	Biología
Número de cuenta:	312267302

2. DATOS DE LA TUTORA Y SECRETARIA DEL JURADO:

Grado:	Dra.
Apellido paterno:	Echeverría
Apellido materno:	Martínez
Nombre (s):	Olga Margarita
Correo:	omem@ciencias.unam.mx

3. DATOS DEL SINODAL Y PRESIDENTE DEL JURADO:

Grado:	Dra.
Apellido paterno:	Rivas
Apellido materno:	Manzano
Nombre (s):	Patricia
Correo:	prma@ciencias.unam.mx

4. DATOS DEL SINODAL Y VOCAL DEL JURADO:

Grado:	Dra.
Apellido paterno:	Escobar
Apellido materno:	Sánchez
Nombre (s):	María Luisa
Correo:	escobarluisa@ciencias.unam.mx

5. DATOS DEL SINODAL 1

Grado:	Dra.
Apellido paterno:	González
Apellido materno:	Morán
Nombre (s):	María Genoveva
Correo:	geno@ciencias.unam.mx

6. DATOS DEL SINODAL 2

Grado:	Dra.
Apellido paterno:	González
Apellido materno:	Oliver
Nombre (s):	Angélica
Correo:	goliver@ciencias.unam.mx

7. DATOS DEL TRABAJO ESCRITO

Título:	Estudio comparativo de células epiteliales endometriales de ratas normales, castradas y con reposición de 17- β estradiol.
Número de páginas:	82
Año:	2022

Agradecimientos Institucionales

A la Universidad Nacional Autónoma de México por brindarme la oportunidad de realizar mis estudios en el Colegio de Ciencias y Humanidades plantel Oriente y en la Facultad de Ciencias. Es un honor haberme formado profesionalmente como bióloga en esta casa de estudios.

Al Consejo Nacional de Ciencia y Tecnología (CONACyT) por el apoyo económico otorgado durante dos años como ayudante del investigador Emérito del Sistema Nacional de Investigadores, el Dr. Gerardo Hebert Vázquez Nin.

Al laboratorio de Microscopía electrónica de la Facultad de Ciencias UNAM por abrirme sus puertas a través del taller de Biología Celular y Molecular de la reproducción sexual y por permitirme llevar a cabo mi trabajo de tesis de licenciatura.

A los proyectos PAPIIT IN227919 y PAPIIT IN215922 por el apoyo financiero.

A mi tutora de tesis la Dra. Olga Margarita Echeverría Martínez, gracias por haber confiado en mí y ofrecerme su dirección académica, por su paciencia y tiempo dedicado en este proyecto. Gracias por sus conocimientos, consejos y sugerencias para poder hacer posible esta tesis.

A la Dra. María Luisa Escobar Sánchez por su apoyo incondicional. Gracias por sus conocimientos brindados y su instrucción en las técnicas realizadas en este trabajo; por su tiempo y dedicación cada vez que la necesitaba y, sobre todo, gracias por su amistad. Nunca me voy a cansar de agradecerle.

A la M. en C. Silvia Juárez Chavero por su asesoría en los cortes del material biológico, en las técnicas de tinción para microscopía óptica y de contraste para microscopía electrónica. Gracias por su apoyo y bonita amistad.

Al Dr. Israel Muñoz Velasco por su asistencia en el procesamiento de imágenes, por su apoyo, consejos y amistad.

A los miembros del jurado Dra. Patricia Rivas Manzano (Presidente), Dra. Genoveva González Morán (Sinodal 1) y a la Dra. Angélica González Oliver (Sinodal 2), por su tiempo dedicado a la revisión de mi trabajo de tesis, gracias por sus observaciones y sugerencias.

Agradecimientos personales

A mi familia por todo el apoyo incondicional, por siempre apoyarme a alcanzar todas mis metas y creer en mi en todo momento. A mi madre y mis hermanos que siempre han estado conmigo día a día, ustedes han vivido lo mejor y peor de mí, gracias por estar presentes en todo momento y hacer más amenos aquellos días amargos con cada una de sus ocurrencias, son mi todo.

A mis perros Daisy, Chispita y Terry por nunca dejarme sola, por alegrar todos mis días y, sobre todo, por su amor incondicional.

A César por su amor y paciencia, por siempre estar conmigo, incluso en mis peores días. Por apoyarme y motivarme a seguir cumpliendo mis metas.

A mis amigos Brenda, Merab, Ulises, Blanca y Brian por tantos años de amistad, por tantos momentos de risas y alegría, por sus consejos y apoyo, cada uno de ustedes forjo una parte importante de mi en distintas etapas de mi vida.

A mi amiga Laura que, aunque ya no estés en este plano terrenal, siempre serás mi primer y gran amiga de la carrera, gracias por tan gratos momentos y por siempre creer en mi.

A mis amigos del laboratorio Lupita y Abraham por su bonita y sincera amistad, por hacer de mi última etapa de la carrera, la más divertida.

Abreviaturas

Abreviatura	Nombre
DNA	Ácido desoxirribonucleico
RNA	Ácido ribonucleico
mRNA	Ácido ribonucleico mensajero
rRNA	Ácido ribonucleico ribosomal
tRNA	Ácido ribonucleico de transferencia
Apaf-1	Factor de activación de la proteasa apoptótica 1
ATP	Adenosina trifosfato
Bcl-2	<i>B-cell lymphoma 2</i>
CO	Monóxido de carbono
DISC	Complejo de señalización, inductor de muerte
DR	Receptor de muerte
E₂	17-β estradiol
FAD/MORT	Fas asociada a través del dominio de muerte
FasL	Fas ligando
FSH	Hormona folículo estimulante
GnRH	Hormona liberadora de gonadotropinas
GPC	Gránulos pericromatinianos
HMGB1	Proteína B1 del grupo de alta movilidad
LH	Hormona luteinizante
MCP	Muerte celular programada
NADPH450	Nicotinamida adenina dinucleótido fosfato 450
NGS	Suero de cabra
PBS	Solución salina amortiguadora con fosfatos
PBS-BSA-TWEEN	Solución salina amortiguadora con fosfatos, albúmina de suero bovino y detergente tween
PBS-TWEEN	Solución salina amortiguadora con fosfatos y detergente tween
PDCD5	Proteína de muerte celular 5
RE	Receptor estrogénico
RE-α	Receptor estrogénico alfa
RNP	Ribonucleoproteínas
ROS	Especies reactivas al oxígeno
Smac/DIABLO	Segundo activador de caspasas derivado de mitocondria
TAJ/TROY	Receptor único de la familia TNF
TNF	Factor de necrosis tumoral
TNFR	Receptor del factor de necrosis tumoral
TRADD	Proteína asociada al receptor TNF-1
TRAIL	Ligando inductor de apoptosis relacionado con TNF
TUNEL	Etiquetado de extremo de dUTP mediado por TdT
Ur/Pb	Uranilo/Plomo
UTP	Uridina trifosfato

Índice

1. Resumen	1
2. Introducción	2
2.1. Útero	2
2.1.1. Perimetrio (serosa o adventicia)	3
2.1.2. Miometrio (muscular)	4
2.1.3. Endometrio (mucosa)	4
2.2. Ciclo estral y eje hipotálamo-hipófisis gonadal	6
2.3. Estrógenos	10
2.3.1. Receptor de estradiol	12
2.4. Núcleo celular	14
2.5. Nucleolo	16
2.6. Muerte celular	18
2.6.1. Apoptosis	19
2.6.1.1. Vía extrínseca	21
2.6.1.2. Vía intrínseca	22
2.6.2. Autofagia	23
2.6.3. Necrosis	24
2.6.4. Paraptosis	25
3. Antecedentes	29
4. Justificación	30
5. Hipótesis	31
6. Objetivo general	31
6.1. Objetivos particulares	31
7. Material y métodos	32
8. Resultados	37
9. Discusión	60
10. Conclusiones	67
11. Referencias	68

1. Resumen

Se realizó un estudio comparativo sobre células endometriales de útero de rata con y sin tratamiento de la hormona 17- β estradiol para analizar su morfología, así como su vitalidad con el fin de comprender la respuesta de las células epiteliales uterinas bajo diferentes tratamientos.

Se fijaron muestras de útero de ratas jóvenes adultas de la cepa Wistar normales, castradas, castradas tratadas con estradiol durante 2 horas y castradas tratadas con estradiol durante 8 horas, se incluyeron en epón y posteriormente se realizaron cortes semifinos de este material. Estos se tiñeron con azul de toluidina para posteriormente realizar un estudio morfológico y cuantitativo. Se realizó un conteo de células del epitelio endometrial que estaban en proceso de muerte celular y en mitosis. También, se midió el tamaño tanto de las células como de su núcleo y nucleolo.

El estudio morfológico y cuantitativo reveló en primer lugar, que la castración altera la morfología de las células epiteliales habiendo una recuperación de la misma con tratamiento de 2 y 8 horas de estradiol, pero sin volver a su estado normal. En cuanto a la cuantificación, en el epitelio de útero de rata castrada, hay un mayor porcentaje de células en proceso de muerte respecto al epitelio de rata normal y con el tratamiento de estradiol tanto de 2 y 8 horas, hay una disminución de este porcentaje de muerte. Por otro lado, el porcentaje de actividad mitótica es mayor en células epiteliales de rata normal, sin embargo, en las células de ratas castradas, esta actividad disminuye y sólo aumenta con tratamiento de 8 horas de estradiol. También se llevaron a cabo inmunolocalizaciones del anticuerpo caspasa 3-activa en cortes de útero de rata fijados en *Lowicryl* para monitorear la muerte celular por apoptosis en el epitelio, ya que es una de las proteínas responsables de los cambios morfológicos y bioquímicos en células apoptóticas. En estos resultados se observó que hay presencia de muerte celular por apoptosis, pero también existe otro mecanismo de muerte parecido a la paraptosis que anteriormente no había sido descrito en el epitelio de útero de rata.

2. Introducción

2.1. Útero

El útero es un órgano que forma parte del sistema reproductor femenino. Este órgano está suspendido de la pared dorsal del cuerpo por el mesometrio, que comparte ligamentos que transportan sangre y vasos linfáticos, así como abundantes nervios. La rata no tiene un verdadero cuerpo uterino, posee un útero bicornio que consiste de dos cuernos uterinos separados, pero parcialmente fusionados de manera caudal. El diámetro de cada cuerno uterino de este roedor, es de aproximadamente 1.75 mm (Boyd *et al.*, 2018; Picut & Remick, 2016).

Las funciones del útero consisten en recibir al blastocito para su implantación, proteger, alimentar y proporcionar un medio adecuado para su desarrollo; también funge como regulador de la función ovárica durante el estro. Los cambios que sufre el útero en su morfología son causados por la variación en los niveles hormonales ováricos (Boyd *et al.*, 2018; Wynn & Jollie, 1989).

La pared uterina está dividida en tres capas (Fig. 1): perimetrio (serosa o adventicia), miometrio (muscular) y endometrio (mucosa).

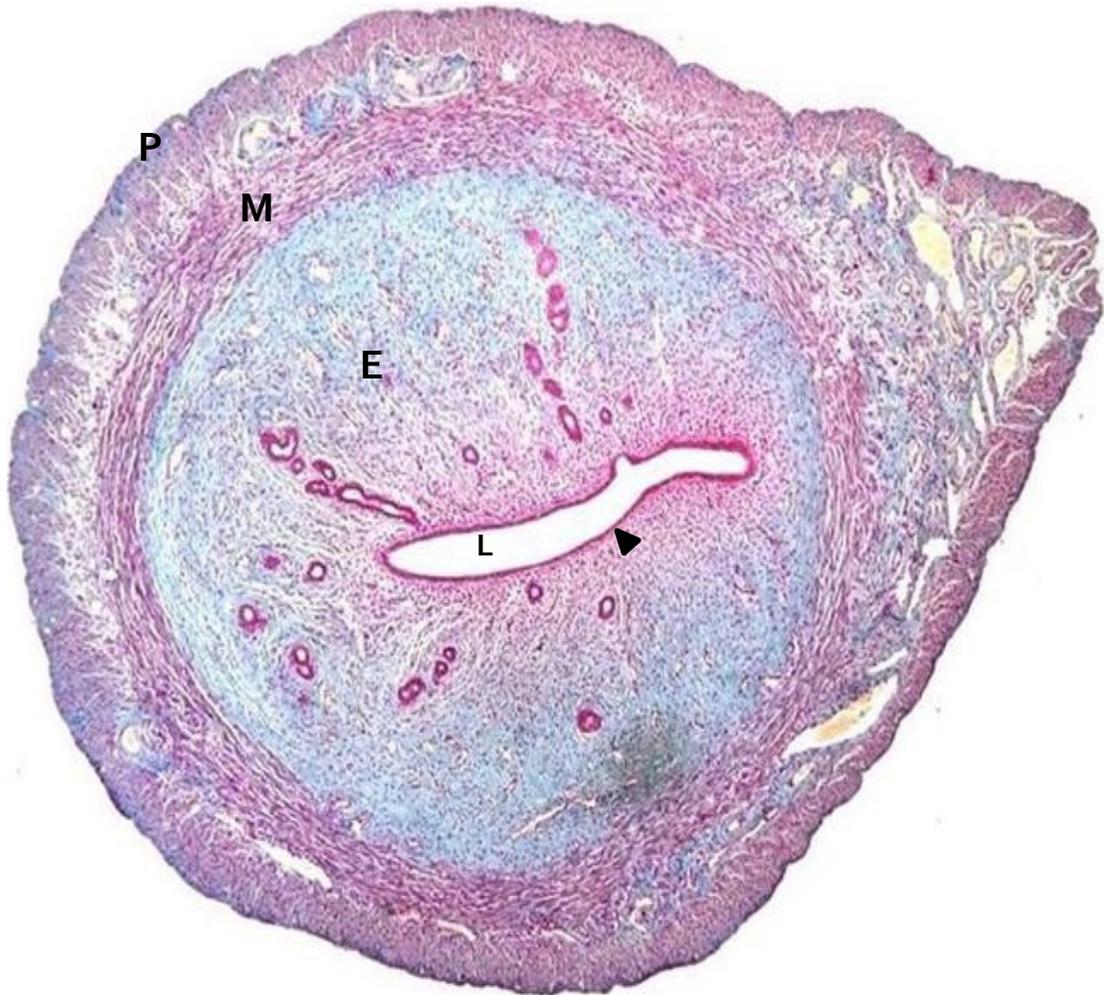


Figura 1. Corte histológico de útero de rata. Epitelio endometrial (punta de flecha), Endometrio (E), Miometrio (M), Perimetrio (P) y Lumen (L). (Recuperado en 2022 de <http://www.histoemb.fmed.edu.uy/node/224>)

2.1.1. Perimetrio (serosa o adventicia)

El perimetrio es la capa serosa o peritoneal que cubre el cuerpo del útero y consiste en una capa delgada de tejido conectivo laxo recubierta por una capa de células mesoteliales en el que se pueden encontrar fibras musculares lisas, vasos sanguíneos, vasos linfáticos y nervios (Ham & Cormack, 1984; Krause, 2005).

2.1.2. Miometrio (muscular)

El útero está mayormente constituido por el miometrio o capa muscular y está compuesta por fibras de músculo liso separadas por tejido conectivo que contiene fibroblastos, fibras colágenas y reticulares, mastocitos y macrófagos. El músculo forma tres capas que no están bien definidas: interna, media y externa. Las capas interna y externa son delgadas, están formadas por células musculares lisas dispuestas de forma circular y longitudinal, respectivamente. La capa media es más gruesa y la disposición de las células musculares lisas no muestra regularidad. Esta capa también contiene grandes arterias, vasos linfáticos y venas (Ham & Cormack, 1984; Krause, 2005).

2.1.3. Endometrio (mucosa)

El endometrio es una membrana mucosa que reviste el cuerpo y fondo del útero, su estructura y función cambia en respuesta al ciclo ovárico. Consiste en una lámina propia (estroma endometrial) de tejido conectivo y una capa epitelial de superficie. (Boyd, 2018; Ham & Cormack, 1984; Krause, 2005).

El estroma contiene glándulas endometriales, que son glándulas tubulares simples ramificadas que se extienden hasta el miometrio, estas glándulas están sostenidas por una red de tejido conectivo en el que se dispersan linfocitos, leucocitos granulares y macrófagos. El endometrio se compone de dos zonas: la capa superficial o zona funcional y la capa profunda o zona basal. La zona funcional está constituida por un epitelio de revestimiento de tipo cilíndrico simple y por una capa de tejido conjuntivo vascularizado; esta zona se degenera total o parcialmente durante el ciclo estral. La zona basal es una capa delgada de tejido conjuntivo laxo vascularizado con menos células que la funcional y permanece persistente durante todo el ciclo (Krause, 2005 & Linares *et al.*, 2010).

El epitelio glandular comienza a desarrollarse como invaginaciones del epitelio luminal que invaden progresivamente el estroma en forma de yemas, lo que

finalmente da como resultado una extensa red de glándulas epiteliales que se extienden hasta el miometrio. La génesis de las glándulas uterinas implica la diferenciación y gemación de glándulas endometriales del epitelio luminal, la penetración del estroma uterino por los conductos de las glándulas y el extenso enrollamiento y ramificación de las mismas (Gray *et al.*, 2001 & Cooke *et al.*, 2012).

El endometrio es un tejido muy dinámico que experimenta diferentes procesos para recibir el óvulo fecundado. En mamíferos que presentan ciclo estral definido, el endometrio se somete a procesos de regeneración, diferenciación y regresión por apoptosis de la capa funcional. Estos, están influidos por complejos mecanismos neuroendocrinos relacionados con la secreción ovárica de estradiol y progesterona (Sánchez *et al.*, 2007).

Con la ovariectomía, se elimina la fuente primaria de estrógeno y progesterona endógenos, lo que da como resultado un endometrio atrófico delgado que contiene pocas glándulas y un epitelio luminal disminuido en número y tamaño. La administración de estrógenos (E₂) produce una regeneración rápida y sustancial del endometrio, con proliferación y restauración del epitelio luminal, aumento del número de glándulas, proliferación de células epiteliales y del estroma (Gargett, Nguyen & Ye, 2012).

Gargett, Nguyen & Ye, 2012 reportan que las células glandulares comienzan a proliferar cuando ya se ha completado la reparación epitelial luminal en un momento en que los niveles de estrógeno son muy bajos por lo que, sugieren que, las células madre/progenitoras desempeñan un papel menor en la regeneración regular del epitelio luminal y glandular de los ratones en ciclo y que las células epiteliales maduras pueden autoduplicarse para reponer las células epiteliales sensibles al estrógeno agotadas por una falta del mismo.

Las células madre/progenitoras están ubicadas en regiones perivasculares, cerca de la unión endometrial-miometrial (Fig. 2). Una célula progenitora epitelial recibe señales proliferativas indirectas de una célula de nicho estromal subepitelial

adyacente, que puede liberar factores de crecimiento (EGF, TGF α) que promueven la actividad de la unidad formadora de colonias epiteliales. Se postula que las células progenitoras se autorenuevan y diferencian en respuesta a los estrógenos para mantener la población progenitora y regenerar las glándulas endometriales y el epitelio luminal en cada ciclo menstrual y estral (Gargett, Nguyen & Ye, 2012).

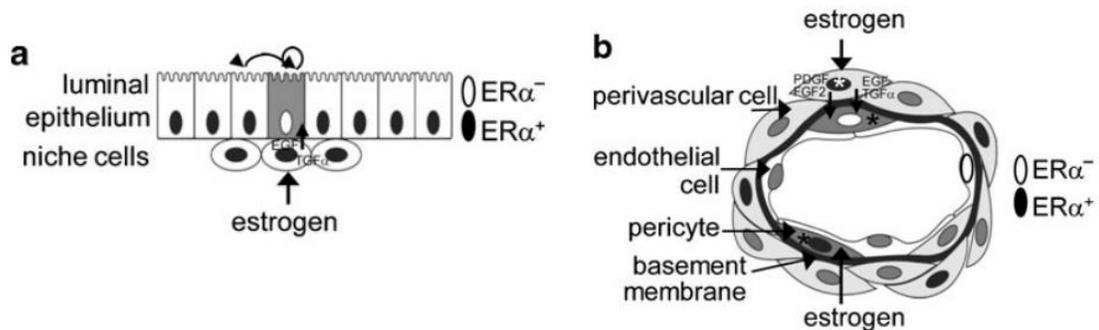


Figura 2. a) Nichos de células madre/progenitoras endometriales. Las células ER α ⁻ se autorenuevan y diferencian (flechas curvas) en respuesta a los estrógenos para mantener la población progenitora y regenerar glándulas endometriales y el epitelio luminal. b) Células madre/estromales mesenquimales endometriales. Estas células inician la proliferación en respuesta al estrógeno, son responsables de la angiogénesis y la regeneración del estroma endometrial durante la fase proliferativa del ciclo estral (Tomado de Gargett, Nguyen & Ye, 2012).

2.2. Ciclo estral y eje hipotálamo-hipófisis gonadal

Los ciclos reproductivos en las hembras de mamíferos no-primates, son llamados ciclos estrales. En la rata, tiene una duración aproximada de 4-5 días, cada ciclo consta de cuatro etapas: proestro, estro, metaestro y diestro (Fig. 3). Estos ciclos se caracterizan por el crecimiento de uno o varios folículos ováricos. Los folículos son la unidad fundamental del ovario y son las estructuras que comandan los procesos reproductivos y las fases del ciclo estral. El folículo contiene al ovocito, célula germinal femenina, que se desarrolla y alcanza la madurez ovulatoria dentro del mismo. El folículo ovárico tiene las funciones de producir hormonas y ovocitos aptos para ser fecundados (Filipiak, Viqueira & Bielli, 2016).

El ciclo estral está bajo el control hipotálamo-hipofisiario. La maduración del ovocito ocurre fundamentalmente por estimulación mediada por la hormona folículo estimulante (FSH). Los folículos ováricos a su vez secretan estrógenos que tienen efecto de retroalimentación positiva sobre la secreción de la hormona luteinizante (LH) por la adenohipófisis, alcanzándose un pico de LH al final del proestro, disparando así la ovulación. Los estrógenos inducen acumulación de fluido en el útero. Tras el estro, los folículos que han liberado óvulos se transforman en cuerpos lúteos durante la fase de diestro. En el útero se inicia en diestro la degeneración epitelial, incluida la regresión glandular por apoptosis si no ha habido fertilización del óvulo. Al final de la fase de diestro, vuelve a comenzar la maduración de otros folículos ováricos y a regenerar epitelio endometrial uterino (De la Cruz & Pásaro, 1998).

El hipotálamo secreta la hormona liberadora de las gonadotropinas (GnRH), la cual, actuando sobre las células gonadotropas de la hipófisis anterior, estimula la secreción de dos hormonas: la FSH y la LH. Actuando conjuntamente, estas dos gonadotropinas estimulan la formación de gametos y la producción de las hormonas gonadales involucradas en la reproducción de los animales (Frías & Ortega, 2013).

En la hembra la FSH estimula el crecimiento de los folículos ováricos y la producción de estrógenos por las células foliculares. Por su parte, la LH estimula la maduración final de los folículos ováricos. La producción de estrógenos, desencadena la ovulación y favorece la formación del cuerpo lúteo y la secreción de progesterona por esta estructura (Frías & Ortega, 2013).

Los estrógenos provocan una mayor vascularización y flujo sanguíneo en el útero. El desarrollo del epitelio y de las glándulas endometriales, incrementan el tono del músculo uterino y lo sensibilizan para responder a la oxitocina y a las prostaglandinas; también aumentan los niveles de anticuerpos y la protección local contra la infección. La progesterona también tiene como órgano blanco al útero, en

el cual favorece el desarrollo adicional del epitelio y de las glándulas endometriales y estimula su secreción (Frías & Ortega, 2013).

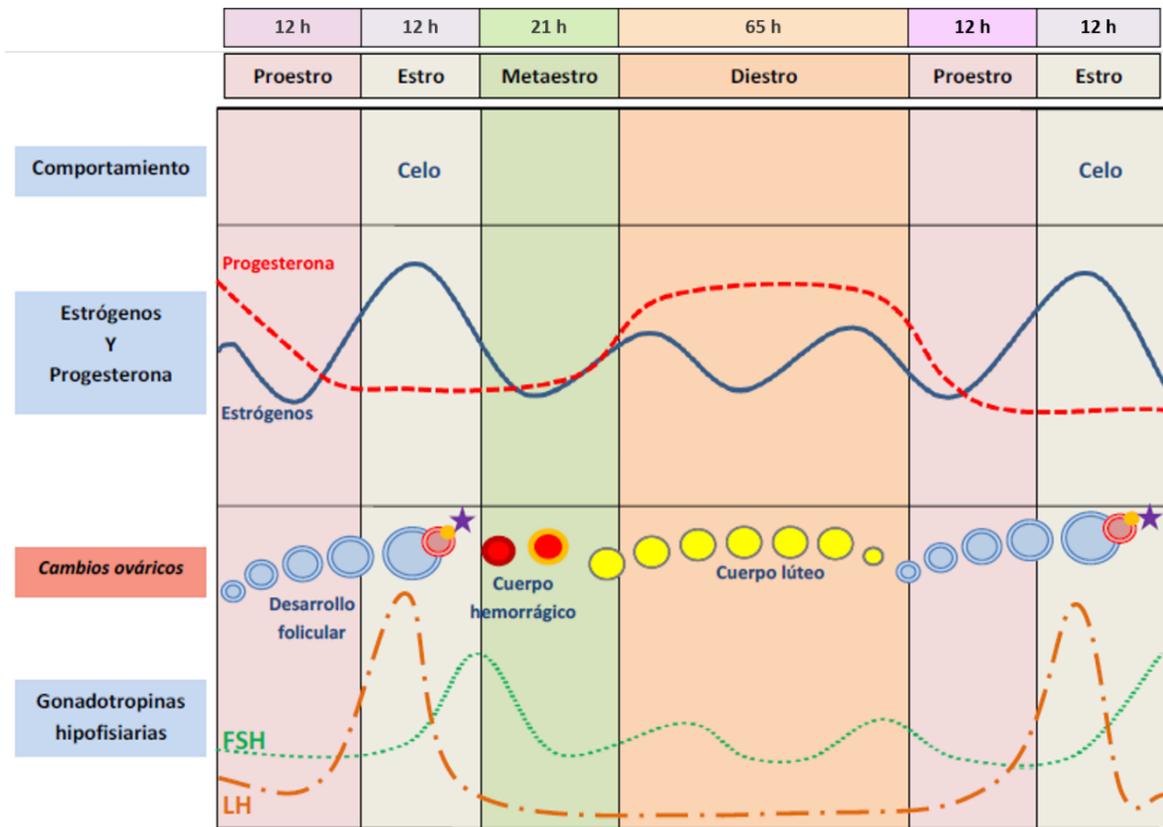


Figura 3. Cambios hormonales durante el ciclo estral de la rata. La duración del ciclo es de aproximadamente 4 días y medio (Tomado y modificado de Frías & Ortega, 2013).

En las hembras de mamíferos se distingue entre el ciclo menstrual de los primates y el ciclo estral de los mamíferos no-primates (Eckert *et al.*, 1988). Una de las diferencias principales consiste en que, en el ciclo menstrual, el endometrio uterino se descama y se produce una degeneración del tejido que involucra tanto procesos de necrosis como de apoptosis provocando hemorragia, proceso que se conoce como menstruación. Dicha menstruación está ausente en las hembras de mamíferos no-primates donde el endometrio uterino se elimina parcialmente en cada ciclo estral (De la Cruz & Pásaro, 1998).

La morfología del endometrio del roedor cambia según la etapa del ciclo estral:

La etapa del estro comienza con la degeneración celular por apoptosis, en las glándulas del estroma en primer lugar y después, continua en el epitelio donde se hace más notoria. Al inicio de esta etapa hay una disminución de la mitosis en el epitelio de revestimiento y ausencia de leucocitos, al final del estro, parte de la actividad mitótica del epitelio regresa y los leucocitos comienzan a infiltrarse entre las células epiteliales de la superficie y las vacuolas citoplasmáticas se hacen visibles. También, al final de esta fase, la mayor parte del epitelio queda desprendido permaneciendo solo pequeños remanentes que sirven como áreas de reserva para la posterior regeneración del epitelio superficial endometrial. Estas áreas de regeneración se agrandan rápidamente durante el diestro I y para el segundo día del diestro, la cavidad uterina esta nuevamente cubierta por epitelio (Bertalanffy & Lau, 1963 & Mendoza-Rodríguez *et al.*, 2003).

En el metaestro, no hay dilatación luminal y el epitelio endometrial uterino muestra continua degeneración celular apoptótica, pero también un marcado retorno de la actividad mitótica epitelial, por lo que ambos procesos (muerte y proliferación) se ven juntos. Las células epiteliales tienen por lo general una corta vida y un elevado índice de regeneración producida por divisiones celulares a partir del estrato basal. La mayoría de las células epiteliales mueren por apoptosis, pero inusualmente, una minoría muere por necrosis. En esta etapa, también hay una infiltración prominente de leucocitos (Bertalanffy & Lau, 1963 & Russel, 2008).

Al comienzo del diestro, los cuernos uterinos están revestidos por un epitelio cilíndrico bajo que muestra en ocasiones, células degeneradas. Hay pocas mitosis en el epitelio de revestimiento al comienzo de la etapa y hay un aumento en la actividad mitótica durante la progresión de la fase. En esta etapa, la pared uterina se colapsa y se observa infiltración de leucocitos y cambios regenerativos en el endometrio. A diferencia de los humanos, quienes son animales que tienen ciclos menstruales, la mucosa uterina se fagocita en lugar de desprenderse durante el diestro (Boyd, 2018; Russel, 2008).

Durante el proestro, el útero está distendido y el epitelio progresa hacia células cilíndricas altas. Se observan frecuentes mitosis en las células epiteliales y degeneración celular limitada tanto en las glándulas endometriales como en el epitelio. Se presenta poca infiltración de leucocitos y las figuras mitóticas desaparecen al final de la etapa. La vasculatura endometrial se vuelve más prominente, y el estroma puede mostrar algo de edema y la luz generalmente se dilata notablemente hacia el final de la etapa (Boyd, 2018; Russel, 2008).

Por otro lado, el epitelio que recubre las glándulas uterinas permanece cuboidal durante todo el ciclo estral. Estas células son más grandes en el diestro cuando elaboran y almacenan material de secreción, en cambio, durante el celo tardío, las células son más pequeñas después de haber descargado dicho material. Los lúmenes glandulares son más pequeños durante el diestro. Las glándulas se muestran distendidas y a menudo presentan secreciones mucosas durante el proestro y el estro temprano. Las mitosis de las células glandulares ocurren en metaestro y la tasa mitótica disminuye gradualmente durante el diestro cuando las células elaboran secreciones y es aún más baja en la siguiente etapa secretora de las células (Bertalanffy & Lau, 1963).

2.3. Estrógenos

El útero es un tejido blanco para el estrógeno y se expresan niveles significativos de éste, estimulando la división celular en todos los componentes tisulares uterinos: epitelio de revestimiento y glandular, estroma y miometrio. Los estrógenos ejercen sus acciones en los compartimentos uterinos a través de las proteínas del receptor estrogénico alfa (RE- α). Este receptor contiene 6 dominios funcionales, similares a los de otros miembros de la superfamilia de receptores esteroideos. El complejo de receptor-estrógeno se une al DNA y estabiliza a otro complejo de proteínas que incluyen a la RNA polimerasa y otras proteínas necesarias para el inicio eficaz de la síntesis de RNA (Quarmby & Korach, 1983; Winuthayanon *et al.*, 2010).

Los estrógenos son secretados por el ovario de las hembras de mamíferos no preñadas y otras cantidades menores son producidas por las glándulas suprarrenales. De los estrógenos, el más activo y potente producido por el organismo, es el 17- β estradiol (Brahmachari, 2015).

El estradiol es una molécula esteroide de 18 carbonos, que contiene un anillo fenólico A (un anillo aromático con un grupo hidroxilo en el carbono 3) y un grupo β -hidroxilo o cetona en la posición 17 del anillo D. El anillo A es la principal característica estructural, de la cual depende la unión selectiva y de alta afinidad a receptores de estrógenos (Wawrzak, 1988), (Fig. 4).

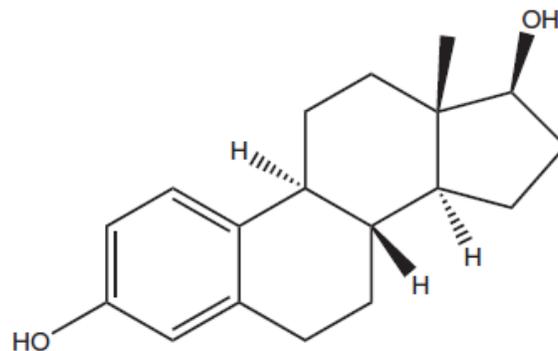


Figura 4. Estructura del 17- β estradiol (Tomado de Brahmachari, 2015).

Este estrógeno, estimula la proliferación del epitelio uterino y es esencial para la morfogénesis del epitelio, citodiferenciación y actividad secretora. Las hormonas esteroides modulan numerosas actividades de las células blanco, modificando la actividad genética de las mismas mediante la unión del complejo receptor-hormona con el DNA y con varias proteínas dentro del núcleo (Yamamoto, 1985).

Los cambios morfológicos en el útero durante el ciclo estral incluyen la proliferación del epitelio en respuesta al incremento de los niveles de estradiol antes de la ovulación, siendo regulada por la progesterona y la degeneración parcial después de la misma. Tras la estimulación de estrógenos, las células epiteliales uterinas dan inicio a la síntesis de ADN y división celular de los remanentes de epitelio que quedan después de la etapa de estró (Sandow *et al.*, 1979; Quarmby & Korach, 1984; Sato *et al.*, 1997; Huang *et al.*, 2012).

Se ha demostrado que, en células epiteliales endometriales de ratas castradas, la muerte celular más frecuente es por apoptosis (Sato *et al.*, 1997). También se ha visto que la castración produce una marcada disminución en tamaño nucleolar y reducción de áreas granulares del nucléolo, pero a partir de 2 horas después de la inyección con estradiol el tamaño nucleolar incrementa y las áreas granulares solo presentan pequeños cambios con este tiempo (Vázquez-Nin *et al.*, 1978).

2.3.1 Receptor de estradiol

Los estrógenos llevan a cabo su función mediante receptores, de los cuales, han sido bien descritos dos factores de transcripción activados por ligando: el receptor de estrógenos- α (RE- α) y el receptor de estrógenos- β (RE- β) (Sánchez-Suarez & Benítez-Bribiesca, 2003).

Los RE pertenecen a la superfamilia de receptores nucleares (RN), los cuales son factores de transcripción que regulan la expresión génica de manera dependiente de su unión al ligando y en respuesta específica a señales fisiológicas y patológicas (Sánchez-Suarez & Benítez-Bribiesca, 2003; Noriega-Reyes & Langley, 2008). Estos receptores son codificados por diferentes genes y su expresión varía dependiendo del tipo de tejido. El RE- α es expresado principalmente en órganos reproductivos como útero, mama y ovarios, así como en el hígado y en el sistema nervioso central. Por otro lado, el RE- β se expresa en mayor medida en hueso, endotelio, pulmones, tracto urogenital, ovario, sistema nervioso central y próstata (Sánchez-Suarez & Benítez-Bribiesca, 2003; Cahua-Pablo, Flores-Alfaro & Cruz, 2016).

El receptor α y β , están formados por una sola cadena de 565 y 530 aminoácidos, respectivamente. Estos receptores están conformados por seis dominios denotados de la A a la F, codificados por 8-9 exones (Fig. 5). El dominio amino-terminal (región A/B) es la más variable tanto en tamaño como en secuencia de aminoácidos, tiene una región de activación transcripcional independiente de ligando (AF-1). Los dominios de unión al DNA (DBD o región C) contienen dos dedos de zinc que son altamente conservados, se une a secuencias específicas en el promotor o a los

sitios *enhancer* de genes regulados por estrógenos. El dominio bisagra (región D) cumple una función importante en la dimerización de estos receptores y en la unión de proteínas de choque térmico. La región carboxilo-terminal del receptor constituye el dominio de unión a ligando (LDB o región E/F), tiene una región de activación transcripcional dependiente de hormonas (AF-2) por lo que reconoce a los estrógenos naturales como 17β-estradiol. Todos los receptores de esteroides, incluyendo el ER-α, son fosforilados después de la unión a sus ligandos respectivos patológicas (Sánchez-Suarez & Benítez-Bribiesca, 2003; Noriega-Reyes & Langley, 2008).

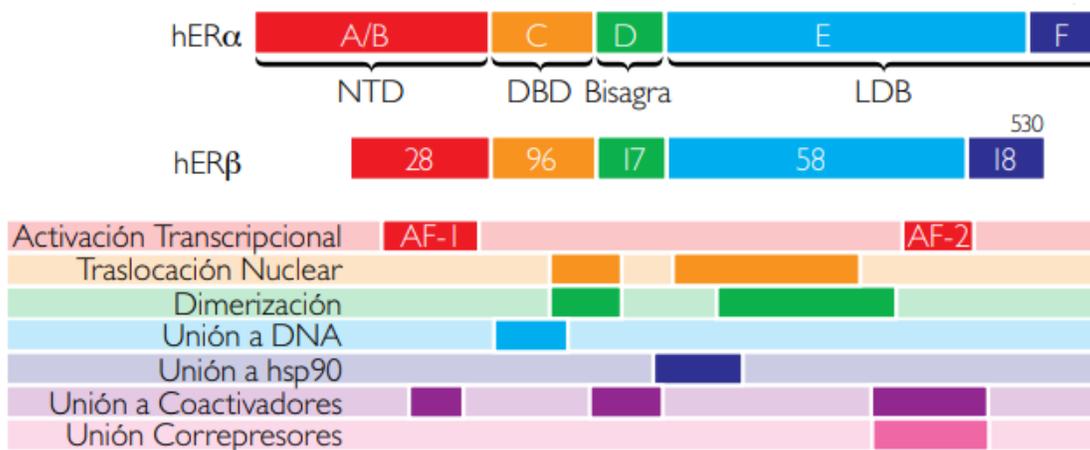


Figura 5. Estructura de los receptores de estrógeno α y β (Tomado de Noriega-Reyes & Langley, 2008).

Actualmente, se han descrito cuatro mecanismos mediante los cuales el RE regula el crecimiento y proliferación celular: I. La activación transcripcional de genes blancos ocurre mediante la unión de ligando que activa al ER induciendo su interacción con el DNA. II. En ausencia de ligando, la activación de ER y sus proteínas es inducida por cinasas de las redes de señalización de factores de crecimiento. III. El ER unido a su ligando puede activar promotores mediante su unión a otros factores de transcripción. IV. Activación de otras cascadas de transducción de señales por medio de un receptor estrógeno-regulado anclado a la membrana (Noriega-Reyes & Langley, 2008).

El nivel de expresión del RE varía en función del ciclo estral, alcanzando su punto máximo durante el proestro de acuerdo con la elevación de E₂ circulante para provocar una respuesta proliferativa y disminuye a niveles basales después de la ovariectomía (Winuthayanon *et al.*, 2010; Wood *et al.*, 2007).

2.4. Núcleo celular

El núcleo contiene el material genético constituido por el ácido desoxirribonucleico (DNA) y el ácido ribonucleico (RNA). Este organelo se halla delimitado por una envoltura nuclear formada por dos membranas concéntricas. La envoltura nuclear está sostenida por dos redes de filamentos proteicos: una, denominada lámina nuclear que sostiene a la membrana nuclear interna y otra rodea a la membrana nuclear externa (Alberts & Bray, 2006).

Existen numerosos poros nucleares a través de los cuales se producen los intercambios entre el núcleo y el citoplasma. Por medio de los poros, se exportan las subunidades grandes y pequeñas del RNA ribosomal, igualmente, a través de estas estructuras salen al citoplasma los RNA mensajeros (mRNA) para ser traducidos en proteínas, las cuales entran al núcleo atravesando los poros nucleares para cumplir su función. El núcleo de una célula que no está dividiéndose (célula en interfase), está formado por cromatina, nucléolo, nucleoplasma y la envoltura nuclear, además, por una región intercromatiniana y una región pericromatiniana (Echeverría & Vázquez-Nin, 1995; Vázquez-Nin *et al.*, 2003; Ross & Pawlina, 2015).

En el núcleo celular interfásico existe una distribución de distintas estructuras de naturaleza ribonucleoproteica. Las partículas ribonucleoproteicas que no forman parte del nucléolo están relacionadas principalmente con el mRNA y su procesamiento, desde su transcripción hasta el *splicing*. Estos componentes ribonucleoproteicos involucran principalmente 4 estructuras características: gránulos pericromatinianos (GPC), gránulos intercromatinianos, fibras

pericromatinianas (RNA recién sintetizado) y cuerpos espiralados (Echeverría & Ontiveros, 2001).

Los gránulos pericromatinianos se encuentran en todos los núcleos celulares interfásicos de las células eucariontes y están involucrados tanto en el almacenamiento como transporte del núcleo al citoplasma de RNA maduro en equilibrio entre la transcripción y su migración al citoplasma. La abundancia de GPC depende de la relación entre la velocidad de síntesis de RNA y su migración al citoplasma. El número de GPC también varía inversamente con la concentración de estradiol durante el ciclo estral en ratas normales. Son descritos como cuerpos esféricos que se localizan cerca de conglomerados de cromatina compacta, tienen 30 a 50 nm de diámetro y están rodeados de un halo claro de 20 a 25 nm. Los GPC se originan por el enrollamiento de una fibra pericromatiniana (Vázquez-Nin & Bernhard, 1971; Vázquez-Nin *et al.*, 1997; Echeverría & Ontiveros, 2001; Vázquez-Nin *et al.*, 2003; Biggiogera, 2007).

Las fibras pericromatinianas están situadas preferencialmente en la periferia de algunos grumos de cromatina compacta, aunque también puede hallarse en el nucleoplasma y contienen el RNA premensajero. Los gránulos intercromatinianos están ubicados en la región intercromatiniana y son reservorios de ácidos nucleicos y proteínas que constituyen la maquinaria bioquímica de *splicing*. Los cuerpos espiralados están formados por fibras de 40 a 60 nm de espesor, se encuentran en la región intercromatiniana y están asociados al nucléolo (Echeverría & Vázquez-Nin, 1995; Vázquez-Nin *et al.*, 2003).

2.5. Nucléolo

El nucléolo existe en todas las células eucariontes y es la estructura ribonucleoproteica (RNP) más grande de la célula, es un subcompartimento

altamente organizado, sin membrana y unido al núcleo (Echeverría & Vázquez, 1995; Gerbi *et al.*, 2003). En esta estructura se encuentra la maquinaria necesaria para la biogénesis de las subunidades ribosomales (Hernández-Verdum, 2005; Boisvert *et al.*, 2007). Este proceso implica la síntesis de proteínas, procesamiento y maduración de los ribosomas (Gerbi *et al.*, 2003).

Los ribosomas son estructuras ribonucleoproteicas citoplasmáticas que constituyen la parte más importante de la maquinaria de la síntesis de proteínas de la célula (Echeverría & Vázquez-Nin, 1995).

La síntesis del ARN ribosomal y la formación de las subunidades ribosomales, las cuales son funciones principales del nucléolo, ocurren en distintas subregiones del mismo. Estas subregiones son llamadas: centros fibrilares, el componente denso fibrilar y el componente granular, así como por los espacios nucleolares (intersticios y/o vacuolas) (Vázquez-Nin, Echeverría & Jiménez 2003; Echeverría & Ontiveros, 2001; Boisvert *et al.*, 2007).

En eucariontes, la expresión de genes tiene lugar a través de la síntesis de una molécula precursora de mRNA (pre-mRNA) que requiere, de manera esencial, ser procesada para su maduración, salida del núcleo y traducción a proteína en el citoplasma (Segura-Valdez *et al.*, 2007).

Los RNA en eucariontes, son sintetizados a partir del DNA genómico por medio del proceso denominado transcripción, el cual es la generación de una sola cadena de RNA idéntica a una de las cadenas del DNA. La síntesis de ribosomas requiere el esfuerzo coordinado de las RNA polimerasas I, II y III dependientes de DNA (Soberón, 2003; Cavanaugh *et al.*, 2004).

Se han identificado tres clases de RNA: el RNA mensajero (mRNA), el RNA de transferencia (tRNA), el RNA ribosomal (rRNA).

El mRNA codifica para una sola proteína; es sintetizado en el núcleo y requiere ser transportado al citoplasma para su traducción (Soberón, 2003). Cabe mencionar que trabajos de Echeverría, Santini & Vázquez-Nin (1991) y Vázquez-Nin *et al.* (1997) reportaron que la exportación de mRNA al citoplasma incrementa inmediatamente después de la administración de hormonas como el estradiol y que ese incremento tiene lugar antes del aumento en la tasa de transcripción.

La maduración del mRNA se basa en la adición de una cola de poli-A que consiste en aproximadamente 50-250 nucleótidos de adenina, esto constituye la modificación del extremo 3' del mRNA maduro. Además, durante el proceso de maduración, ocurre un evento nombrado *splicing* que involucra en primer lugar, la eliminación de secuencias no codificantes denominadas intrones y después, la unión de secuencias codificantes llamadas exones. Esta reacción de corte y empalme es catalizada por un gran complejo de ribonucleoproteínas (RNPs) llamado espleiceosoma. En células eucariotas, las RNPs son parte de la transcripción y de la maquinaria del *splicing*, y están siempre organizadas como estructuras reconocibles morfológicamente (Jiménez-García *et al.*, 2004; Biggiogera *et al.*, 2007; Segura-Valdez *et al.*, 2007).

El rRNA es un elemento fundamental en el mecanismo de la traducción, ya que esta clase de RNA son elementos constitutivos y conformacionales de los ribosomas. La RNA polimerasa I que se encuentra localizada en el nucléolo, transcribe el gen de rRNA que codifica el precursor 45S de los rRNA 28S, 18S y 5.8S. La RNA polimerasa II participa en la transcripción del pre-mRNA o RNA heterogéneo nuclear (hnRNA, algunos tipos de pequeños RNA (U1, U2, U3, U4, U5, etc.) y del rRNA 5S; los rRNA 18S, 28S y 5.8S se asocian con el rRNA 5S y con las proteínas asociadas a ribosomas para formar un complejo denominado preribosoma 80S, éste se procesa adicionalmente para generar las subunidades ribosómicas 40S y 60S (Soberón, 2003; Cavanaugh *et al.*, 2004).

La RNA polimerasa III participa en la transcripción del pre-tRNA. Los tRNA son los RNA más pequeños y su función es la de activar aminoácidos durante la síntesis de proteínas (Soberón, 2003; Cavanaugh *et al.*, 2004).

2.6. Muerte celular

La muerte celular es un proceso importante durante el desarrollo de los organismos dado que mantiene un balance entre la proliferación y diferenciación celular, así como la renovación de tejido celular en la edad adulta. La reproducibilidad en tiempo y espacio en el que se lleva a cabo este proceso ha dado lugar a la denominación de muerte celular programada (MCP) ya que este tipo de muerte, está diseñada para controlar la masa celular de algunos órganos e interviene en el recambio continuo de epitelios, su precisión obedece a factores ambientales del organismo. La MCP es generalmente definida como una serie de pasos morfológicos y bioquímicos dirigidos a las células en proceso de muerte. La MPC también tiene lugar en los organismos adultos para controlar la masa celular de algunos órganos, igualmente está involucrado en el recambio continuo de algunos epitelios. A partir de estudios de morfología de células muertas, se han identificado formas distintas de eliminación celular: apoptosis, autofagia y necrosis (Fig. 6). Recientemente se ha descrito otro tipo de muerte celular, que es la paraptosis (Castro & Covarrubias, 2003; Escobar *et al.*, 2011; Torres *et al.*, 2016).

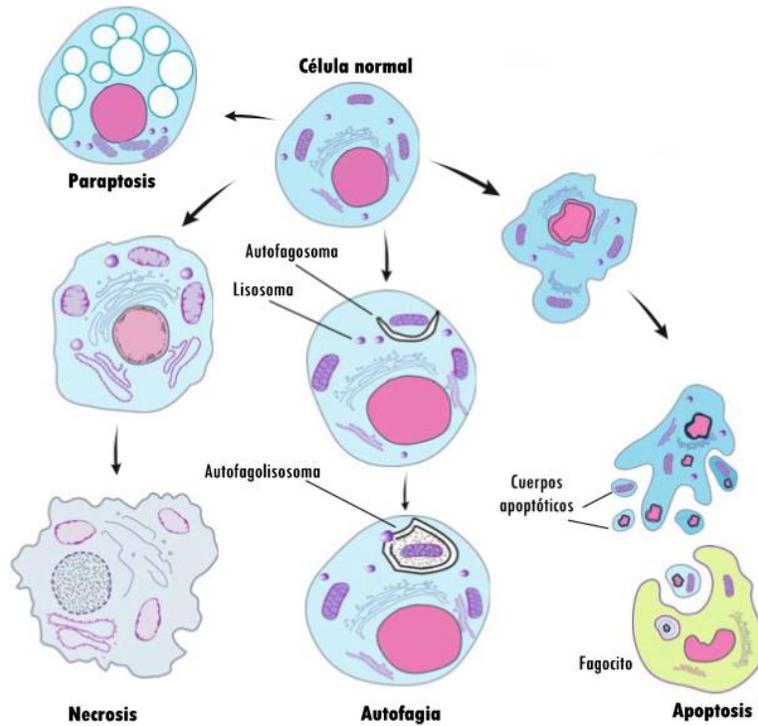


Figura 6. Características morfológicas de diferentes tipos de muerte celular
(Modificado de Saikumar & Venkatachalam, 2009)

2.6.1. Apoptosis

La apoptosis, término acuñado por Kerr *et al.* (1972) para describir un patrón morfológico específico en células en proceso de muerte, es una forma de muerte celular programada que puede ser desencadenada tanto por estímulos extrínsecos como intrínsecos. Es un mecanismo necesario para remover células individuales que no son necesarias o que presentan una función anormal. La principal característica de la apoptosis es eliminar células sin inducir una respuesta inflamatoria local. Dentro del aspecto morfológico, se puede encontrar: la formación de ampollas por parte de la membrana, contracción del citoplasma, condensación de la cromatina (*picnosis*), fragmentación nuclear e intranucleosomal del DNA, formación de cuerpos apoptóticos que contienen organelos intactos y fragmentos nucleares, los cuales finalmente serán fagocitados. Este mecanismo es altamente complejo, involucra una secuencia de señalización intracelular a través de diversas

proteínas y factores regulatorios, algunos inhibitorios y otros inductores de la muerte (Vinatier *et al.*, 1996; Meresman, 2009; Escobar *et al.*, 2011).

Las alteraciones degenerativas en el epitelio uterino durante el estro incluyen la muerte celular por apoptosis que también se encuentra después de la ovariectomía por la ausencia de E₂ (Fig. 7) (Sandow *et al.*, 1979).

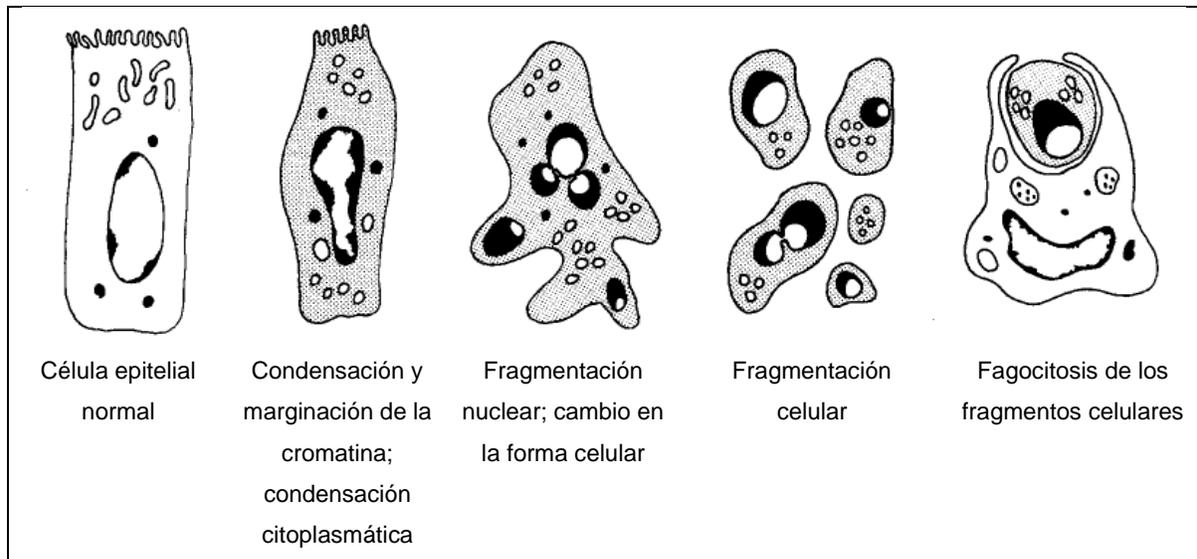


Figura 7. Esquema de los cambios morfológicos que caracterizan a la apoptosis en el epitelio endometrial (Tomado y modificado de Sandow *et al.*, 1979).

Bioquímicamente, la muerte celular apoptótica es ejecutada por una serie de proteasas llamadas caspasas. La familia de las caspasas esta caracterizada por la presencia de residuos de cisteína en su sitio activo. Se sintetizan como precursores inactivos que se convierten en la forma activa por su rotura proteolítica, una vez activadas, las caspasas producen la hidrolisis a partir de residuos de ácido aspártico en la proteína sustrato. De esta forma, la activación inicial de una caspasa provoca una reacción en cadena que conduce a la activación de otras caspasas y a la muerte de la célula (Cascales, 2003; García & Vecino, 2003; Escobar *et al.*, 2011). Una cascada de caspasas desempeña un papel ejecutor central al escindir varias proteínas citosólicas y nucleares en células de mamíferos que cumplen roles en la división celular, en el mantenimiento de la estructura del citoesqueleto, en la

replicación y en la reparación del DNA, así como en el empalme de RNA y otros procesos celulares (Saikumar & Venkatachalam, 2009).

En mamíferos, se han descrito dos vías de activación de las caspasas: extrínseca (mediada por receptores de muerte y sus ligandos) e intrínseca (mitocondrial) (Fig. 8).

2.6.1.1. Vía extrínseca

La vía extrínseca o vía de receptores involucra a la familia de receptores de muerte (DRs) que se encuentran en la membrana citoplasmática y ligandos de muerte tales como el factor de necrosis tumoral- α (TNF- α), Fas ligando (FasL/CD95 ligando) y ligando inductor de apoptosis relacionado con TNF (TRAIL) para sus receptores de superficie celular afines TNFR1, CD95/Fas, TRAIL-R1, TRAIL-R2. La unión en la superficie celular del receptor de la muerte con su ligando específico da como resultado la trimerización del receptor, y el reclutamiento de proteínas adaptadoras como la proteína asociada al receptor TNF-1 (TRADD) y Fas asociada a través del dominio de muerte (FADD o MORT1) implica interacciones homofílicas proteína-proteína. Este complejo provoca el reclutamiento de la caspasa-8 y caspasa-10, lo que resulta en la formación de un complejo multiproteico llamado complejo de señalización inductor de muerte (DISC). DISC actúa como un controlador celular y en presencia de estímulo, comienza la oligomerización de sus constituyentes para formar la plataforma oligomérica activa, en la que se produce la unión del ligando. Todo el proceso de reclutamiento y oligomerización de caspasa-8 en el DISC da como resultado la activación autocatalítica de caspasa-8 y/o caspasa-10. La caspasa-8 activa inicia la denominada cascada de caspasas, procesando a la caspasa-3, que resulta en su activación y otorga la señal a endonucleasas para la ejecución de la muerte celular (Meresman, 2009, Saikumar & Venkatachalam, 2009; Escobar *et al.*, 2011).

2.6.1.2. Vía intrínseca

Esta vía que es disparada por eventos tales como daño al DNA y por agentes tóxicos, es también llamada vía mitocondrial. La vía intrínseca induce la oligomerización del factor de activación de la proteasa apoptótica citosólica-1 (Apaf-1) y la formación de apoptosomas por la liberación de citocromo-c desde las mitocondrias. La mayoría de los mecanismos apoptóticos que tienen lugar en la mitocondria están regulados por el equilibrio entre los miembros de la familia Bcl-2. Dentro de esta familia podemos encontrar proteínas proapoptóticas como Bax y Bak, factores apoptogénicos como citocromo-c y Smac/DIABLO (Zhang & Paria, 2006; Meresman, 2009; Escobar *et al.*, 2011).

La vía intrínseca está comprometida por la regulación transcripcional o postranscripcional de las proteínas de la familia Bcl-2 que impactan directamente en la permeabilización de la membrana externa mitocondrial. La activación de proteínas proapoptóticas de esta familia, produce un poro en la membrana externa de las mitocondrias que permite la liberación de numerosas proteínas del espacio intermembranal; entre ellas, el citocromo-c. En caso de concretarse la salida del citocromo-c del espacio intermembranal mitocondrial, ocurre la oligomerización del factor de activación de Apaf-1 y da como resultado la formación del apoptosoma, un heptamero compuesto por siete moléculas adaptadoras de Apaf-1, cada una unida a una molécula de citocromo-c y un dímero del iniciador caspasa-9. Este complejo, a su vez, recluta y activa a procaspasa-9 por medio de un cambio alostérico y dimerización, luego, esta caspasa activa a las caspasas ejecutoras -3 y -7. El apoptosoma hidroliza la procaspasa-3 a caspasa-3 activa, la cual, se encarga de desencadenar las últimas fases de la apoptosis (Chipuk & Green, 2005; Pérez & Eliécer, 2012; Meresman, 2009; Escobar *et al.*, 2011).

La muerte celular autofágica involucra la degradación de proteínas en ausencia prolongada de nutrientes, como fuentes de energía y la remoción de organelos dañados para su posterior reposición. También, se ha demostrado que la activación de la autofagia es un mecanismo de supervivencia celular frente a diversas condiciones de estrés, incluyendo el estrés oxidativo, la inflamación, la agregación de proteínas, el estrés del retículo endoplásmico, el estrés metabólico, la presencia de patógenos y alteraciones de la función mitocondrial (Peña-Sanoja & Bautista, 2013; Maciel-Herrerías & Cabrera-Benítez, 2016).

Las células en las primeras etapas de la autofagia contienen varias vacuolas autofágicas y tanto el nucleoplasma como el citoplasma aparecen ligeramente oscurecidos, aunque la estructura nuclear todavía parece normal. Las mitocondrias y el retículo endoplásmico a veces se dilatan, y el aparato de Golgi a menudo se agranda. La membrana plasmática pierde especializaciones como microvellosidades y complejos de unión. Durante las etapas tardías, aumentan tanto el número como el tamaño de las vacuolas (Escobar *et al.*, 2011).

2.6.3. Necrosis

La necrosis es definida como muerte celular accidental no apoptótica. Este tipo de muerte se presenta como resultado de una catástrofe bioenergética a causa del agotamiento del ATP a un nivel incompatible con la supervivencia celular, cuando hay alteraciones de las funciones dependientes de oxígeno y del ciclo de los ácidos tricarboxílicos, privación de nutrientes o cuando hay cambios extremos de temperatura (Fink & Cookson, 2005; Golstein & Kroemer, 2007; Ramírez & Rojas, 2009).

Los agentes comunes en la muerte celular necrótica, independientemente del estímulo, son las especies de calcio y especies reactivas al oxígeno (ROS). ROS inicia el daño a los lípidos, las proteínas y el ADN generando disfunción mitocondrial, desregulación del equilibrio iónico y pérdida de la integridad de la membrana (Vanlangenakker *et al.*, 2008).

Se ha entendido que las células necróticas llevan consigo una serie de eventos que conducen a la vacuolización del citoplasma, ruptura de la membrana citoplasmática y la consecuente salida de material intracelular a la matriz extracelular, lo que desencadena una respuesta inflamatoria en los tejidos circundantes atribuible a la liberación de contenidos celulares y moléculas proinflamatorias (Sánchez, 2001; Edinger & Thomson, 2004; Golstein & Kroemer, 2007; Ramírez & Rojas, 2009).

A diferencia de las células apoptóticas, las células que mueren por necrosis exhiben con frecuencia cambios en la morfología nuclear pero no la condensación organizada de cromatina, además, sufren autólisis con liberación de enzimas y desencadenan así una reacción inflamatoria que atrae leucocitos y proteínas plasmáticas. La autólisis incluye todos los cambios que dependen de alteraciones en los componentes celulares: disolución progresiva de la cromatina, pérdida de la basofilia por esparcimiento de las ribonucleoproteínas, pérdida de los compartimientos celulares y la tumefacción de las mitocondrias. Finalmente, tiene lugar la fagocitosis de los restos celulares por los macrófagos (Edinger & Thomson, 2004; Ramírez & Rojas, 2009).

2.6.4. Paraptosis

La paraptosis, es un tipo de muerte celular no apoptótica e independiente de caspasa que ha sido descrita recientemente. Se mostró que este mecanismo también es programado porque requiere de expresión génica (Sperandio *et al.*, 2000).

Las características morfológicas y bioquímicas de la paraptosis son distintas de la apoptosis. La paraptosis es caracterizada principalmente por un proceso de vacuolización citoplasmática que comienza por un alargamiento físico del retículo endoplásmico, hinchazón y aglomeración de mitocondrias; ausencia tanto de cromatina compacta, fragmentación nuclear, así como carencia de cuerpos apoptóticos (Zhang *et al.*, 2015; Khalili & Radosevich, 2018).

La vacuolización citoplasmática también es observada en paraptosis, sin embargo, no se observan vacuolas autofágicas y no es afectada por inhibidores de la muerte celular autofágica. Por otro lado, en este tipo de muerte celular, la membrana permanece intacta a diferencia de otras vías de muerte (Sperandio *et al.*, 2000; Khalili & Radosevich, 2018).

La paraptosis es negativa para el ensayo de TUNEL y caspasa-3 activa, además, es un proceso independiente de Apaf-1. La activación de dicha caspasa, es considerada una de las principales características de la apoptosis, sin embargo, se ha reportado que está ausente en la muerte celular paraptótica (Sperandio *et al.*, 2000; Yumnam *et al.*, 2014; Torres *et al.*, 2016).

Yumnam *et al.* (2014) describieron que la paraptosis está mediada por proteínas quinasas activadas por mitógeno y puede también ser desencadenada por TAJ/TROY, el cual es miembro de la superfamilia del receptor del factor de necrosis tumoral (TNFR). La sobreexpresión de TAJ/TROY da como resultado una regulación positiva significativa de PDCD5 endógeno celular, una proteína promotora de apoptosis que también puede promover la muerte celular paraptótica inducida por TAJ/TROY. Por lo tanto, PDCD5 es un regulador importante tanto de la apoptosis como de la paraptosis (Eby *et al.*, 2000; Wang *et al.*, 2003; Bröker *et al.*, 2007).

La hinchazón en la morfología celular es el resultado del desequilibrio iónico, la retención de agua y finalmente, la lisis osmótica. El contenido intracelular como la adenosina trifosfato (ATP), la uridina trifosfato (UTP), la proteína B1 del grupo de alta movilidad (HMGB1), las proteínas de choque térmico y varias proteasas se liberan y actúan como "señales de peligro", promoviendo una extensa inflamación celular (Khalili & Radosevich, 2018).

El mecanismo de inducción de la paraptosis fue estudiado por Hoa *et al.* (2009) en células del glioma humano a través de la interrupción homeostática iónica y la activación de canales potásicos de gran conductancia dependientes de calcio

(canales BK). Estos canales están regulados indirectamente por el oxígeno y por dos proteínas enzimáticas: la nicotinamida adenina dinucleótido fosfato 450 (NADPH450) reductasa, y la hemoxigenasa-2, que producen un mensajero secundario, monóxido de carbono (CO), en respuesta al oxígeno. Los canales BK se han encontrado en el retículo endoplásmico y en las mitocondrias, lo que podría explicar por qué estos dos orgánulos están específicamente afectados en la paraptosis.

El mecanismo molecular de la muerte celular que conduce a la paraptosis según Hoa *et al.* (2009) implica varios pasos:

El evento iniciador es la producción de ROS por contacto de los macrófagos con células del glioma U251 que expresan el factor estimulante de colonias de macrófagos. Después de este contacto, ROS produce CO por la hemoxigenasa y P450. El monóxido de carbono causa la apertura de los canales de BK en la membrana celular, retículo endoplásmico y mitocondrias, resultando en un flujo hacia los espacios membranares. El sodio ingresa a la célula, seguido de agua, para producir inflamación celular y vacuolización, enseguida, se activan los mecanismos homeostáticos celulares para expulsar el exceso de Na⁺. Para eliminar el exceso de Na⁺ y mantener la homeostasis iónica, la célula necesita más ATP lo que lleva a un lento agotamiento del mismo.

En otro estudio, Sperandio *et al.* (2004) mostraron que la paraptosis inducida por el receptor del factor de crecimiento 1 (IGF1R) está mediada por dos vías de señalización: la proteína quinasa activada por mitógeno (MAPK) y la quinasa N-terminal C-Jun (JNK1). Los autores también describieron el primer inhibidor de la paraptosis, AIP-1/Alix, una proteína multifuncional que es importante en la transducción de señales y en última instancia, la integridad celular. La activación de JNK y MAPK por IGF1R se redujo por la sobreexpresión de AIP1/Alix. La función de AIP1/Alix no está completamente definida, pero puede cooperar en la activación de la apoptosis y tener un papel potencial en la regulación de la paraptosis.

Otro grupo de investigadores como Jambrina *et al.* (2003), describieron un modelo distinto de muerte celular rápida desencadenada por sobrecarga de Ca^{2+} intracelular causando disfunción y daño mitocondrial que conduce a la muerte celular paraptótica en las células Jurkat (línea celular de leucemia linfoide aguda) a través de la expresión del receptor vanilloide subtipo 1 (VR1), que es un canal específico de Ca^{2+} operado por el receptor.

3. Antecedentes

El endometrio, atraviesa por eventos de remodelación celular que consiste en la muerte por apoptosis y renovación por proliferación, respondiendo a los cambios en la secreción hormonal (Fig. 9) (Sandow *et al.*, 1979). En diferentes trabajos de Vázquez- Nin *et al.*, 1978, 1979, 1991 y 1997 ya se habían descrito los cambios morfológicos de los núcleos y nucleolos de las células epiteliales uterinas de rata y las respuestas rápidas que sufren estos con y en ausencia de estradiol. Sin embargo, no se habían realizado estudios a nivel citoplasmático y con tiempos más prolongados de estradiol.

En este trabajo, se evaluaron los cambios morfológicos que sufre el epitelio uterino de rata Wistar tanto a nivel estructural como ultraestructural en presencia y ausencia de estradiol.

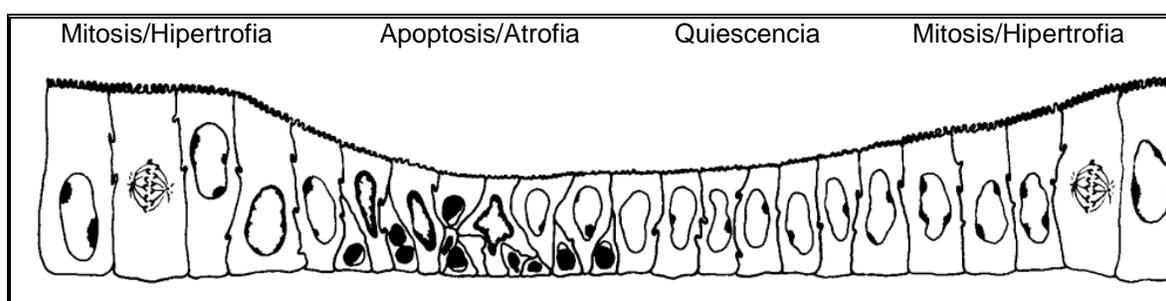


Figura 9. Esquema de los cambios morfológicos que sufre el epitelio endometrial uterino a lo largo del ciclo estral murino (Tomado y modificado de Sandow *et al.*, 1979).

4. Justificación

El epitelio uterino de rata ha sido ampliamente estudiado a nivel ultraestructural, sin embargo, también es importante conocer las diferentes características estructurales que sufre este tejido bajo distintos tratamientos. Diversos estudios indican que el recambio celular en el epitelio uterino está mediado por los cambios hormonales. Se ha observado que la vía principal de eliminación de las células epiteliales en el útero es la apoptosis, aunque algunos autores han observado indicios de necrosis. Considerando que actualmente se conocen varios tipos de muerte que pueden ser identificables a nivel ultraestructural, es importante hacer un análisis profundo y detallado de la forma de eliminación celular en un modelo experimental en ratas ovariectomizadas y reinyectadas con estradiol, para caracterizar los cambios ultraestructurales que originan la privación de hormonas, así como la reconstitución de las mismas.

5. Hipótesis

La proliferación y eliminación del epitelio uterino es regulado principalmente por la secreción ovárica de la hormona 17- β estradiol. Por lo que se espera que, en organismos castrados y re-inyectados con estradiol, se pueda documentar los posibles cambios estructurales y ultraestructurales que sufren las células epiteliales bajo estas condiciones.

6. Objetivo general

Analizar los cambios morfológicos y ultraestructurales que sufren las células epiteliales uterinas de rata bajo diferentes tratamientos: normal, castrada e inyectada con la hormona 17- β estradiol a las 2 y 8 horas después de la castración.

6.1. Objetivos particulares

- Describir la morfología óptica y ultraestructural de células epiteliales endometriales de útero de rata normal, castrada e inyectada con la hormona E₂.
- Realizar mediciones de las células epiteliales endometriales relacionando el tamaño del núcleo con respecto al citoplasma en las diferentes condiciones experimentales.
- Comparar el número de nucléolos presentes en células epiteliales endometriales de ratas normales, castradas e inyectadas con E₂.
- Cuantificar células en proceso mitótico en cada uno de los tratamientos.
- Identificar la presencia de alteraciones morfológicas notables que sugieran la proximidad de la muerte y comparar su frecuencia en el epitelio endometrial de ratas normales, castradas e inyectadas con E₂.
- Determinar en los niveles de microscopia óptica y electrónica mediante inmunolocalizaciones de la proteína caspasa 3-activa, la posible participación de apoptosis.
- Por medio de las características ultraestructurales de las células alteradas, identificar otros tipos de muerte.

7. Material y métodos

a) Obtención de las muestras

En total, se utilizaron muestras de 12 ratas adultas jóvenes vírgenes de la cepa Wistar de 250 gr de peso aproximadamente. Éstas se dividieron en cuatro grupos de tres individuos cada uno:

- Primer grupo: 3 ratas sin ningún tratamiento, cuyos úteros se fijaron a los 21 días después de iniciado el experimento.
- Segundo grupo: 3 ratas cuyos úteros se fijaron 21 días después de haber sido ovariectomizadas.
- Tercer grupo: 3 ratas con 21 días de haber sido ovariectomizadas a las que se les inyectó 1 ml de 17- β estradiol en concentración de 20 μ g/ml de manera intraperitoneal y cuyos úteros fueron fijados 2 horas después de la inyección.
- Cuarto grupo: 3 ratas con 21 días después de la ovariectomía a las que se les aplicó 1 ml de 17- β estradiol en concentración de 20 μ g/ml de forma intraperitoneal y cuyos úteros fueron fijados 8 horas después de la inyección.

Las muestras de útero se obtuvieron de la parte media de los cuernos uterinos y posteriormente, se fijaron.

La manipulación de las ratas fue siguiendo la Norma Oficial Mexicana NOM-062-ZOO-1999 "Especificaciones técnicas para la producción, cuidado y uso de animales de laboratorio" (NOM, 1999).

Dicho material fue procesado y almacenado anteriormente bajo el Proyecto "Acervo de bloques almacenados en el Laboratorio de Microscopía Electrónica de la Facultad de Ciencias, UNAM" con número de folio PI_2019_09_001 y aprobado por la Comisión de ética y responsabilidad Científica de la Facultad de Ciencias.

b) Inclusión en Epón

Las muestras de útero fueron fijadas con una mezcla de fijadores compuesta por glutaraldehído al 2.5% y paraformaldehído al 4% en PBS durante 1.5 horas, a temperatura ambiente. Se hicieron 3 lavados con PBS de 10 min cada uno. Posteriormente, las muestras fueron deshidratadas con alcoholes de diferentes concentraciones (etanol 30%, 50%, 60%, 70%, 80%, 96%) dejándolas 10 minutos en cada uno. Después, se dejaron en etanol absoluto, 2 cambios de 20 minutos cada uno. La deshidratación se terminó con 2 cambios de óxido de propileno durante 15 minutos cada uno. Luego, se preincluyeron en epón-óxido de propileno con una proporción 1:1 durante 24 horas. Posteriormente, se dejaron en epón-óxido de propileno proporción 2:1 durante 24 horas y, por último, se incluyeron en moldes de plástico con resina epón, dejando polimerizar 48 horas en una estufa a 60°C.

c) Inclusión en *Lowicryl K4M*

Las muestras fueron fijadas con paraformaldehído al 4% en PBS durante 1.5 horas a 4°C. Se realizaron 3 lavados con PBS de 10 min cada uno a 4°C. Después, las muestras fueron deshidratadas con alcoholes graduales (metanol 30%, 50%, 60%, 70%, 80%) dejándolas 10 min en cada uno a una temperatura de -20°C. Posteriormente, se colocaron en metanol 90% durante 30 minutos a -20°C. Luego, se hizo una preinclusión de metanol-*Lowicryl* (1:1) y metanol-*Lowicryl* (1:2) durante 60 minutos cada uno a una temperatura de -20°C. Por último, se dejó en resina pura a -20°C durante toda la noche, se incluyeron en cápsulas de gelatina con *Lowicryl* se polimerizaron en una cámara de luz ultravioleta durante 48 horas a -20°C y 24 horas a temperatura ambiente en cámara de luz ultravioleta.

d) Inclusión en epón

Las muestras de útero fueron fijadas en una mezcla conformada de glutaraldehído

al 2.5% y paraformaldehído al 4% en PBS durante 1.5 horas, a temperatura ambiente. Se hicieron 3 lavados con PBS de 10 min cada uno. Posteriormente, las muestras fueron deshidratadas con alcoholes con diferente concentración (etanol 30%, 50%, 60%, 70%, 80%, 96%) dejándolas 10 minutos en cada uno. Después, se dejaron en etanol absoluto, 2 cambios de 20 minutos cada uno y 2 cambios con óxido de propileno de 15 minutos cada uno. Luego, se preincluyeron en epón-óxido de propileno con una proporción 1:1 durante 24 horas. Posteriormente, se dejaron en epón-óxido de propileno proporción 2:1 durante 24 horas y, por último, se incluyeron en moldes de plástico con resina epón, dejando polimerizar 48 horas en una estufa a 60°C.

e) Cortes ultrafinos

El material incluido en *Lowicryl* y epón se cortó en un ultramicrotomo *Leica Ultracut R* a espesores de 800 nm para cortes semifinos y de 60-80 nm para cortes ultrafinos.

Los cortes semifinos se colocaron en portaobjetos, se fijaron con calor, y posteriormente se tiñeron con azul de toluidina al 1%, los portaobjetos pasaron por una fuente de calor hasta que se formara un halo verde metálico. Finalmente, se enjuagaron con agua destilada y se secaron con calor.

Los cortes ultrafinos del material incluido en epón se colocaron en rejillas de cobre y los cortes ultrafinos del material incluido en *Lowicryl* en rejillas de níquel. Los cortes del material incluido en epón se contrastaron con la técnica general acetato de uranilo 3% y citrato de plomo 0.3% por 20 y 10 minutos respectivamente. Los cortes del material incluido en *Lowicryl*, se utilizaron para realizar las inmunolocalizaciones de la proteína caspasa 3-activa y posterior contraste con acetato de uranilo 3% durante 15-20 segundos.

f) Inmunolocalización de la caspasa 3-activa en cortes de *Lowicryl*

Los cortes colocados en rejillas de níquel fueron suspendidos en una serie de gotas de diferentes soluciones. En primer lugar, se colocaron en PBS durante 3 minutos

y después en NGS (1/50) por media hora. Pasado este tiempo, se incubó en una solución 1/100 de anticuerpo anticaspasa-3 activa en PBS-BSA-Tween, a temperatura de 37°C durante 2 horas. Luego, se realizó una serie de lavados, primero PBS-Tween por goteo y enseguida, 3 lavados de PBS por flotación de 5 minutos cada uno. Después, las rejillas se colocaron en NGS 1/50 durante 10 minutos, transcurrido este tiempo, se dejó en *Multilink* durante 20 minutos y a continuación, se realizó otra serie de lavados, uno con PBS por goteo y 3 lavados con PBS por flotación durante 1 minuto cada uno, igualmente se dejó en NGS 1/50 durante 10 minutos para después incubar a temperatura ambiente durante 20 minutos con el anticuerpo Proteína A acoplado a oro de 20 nm. De la misma manera, se hizo un lavado con PBS por goteo, 3 lavados con PBS por flotación de 5 minutos cada uno y 3 lavados con agua bidestilada de 5 minutos cada uno.

g) Captura y procesamiento de imágenes

Las imágenes de los cortes semifinos para el análisis morfométrico fueron capturadas con una cámara digital DXM1200F acoplada a un microscopio de campo claro *Nikon Eclipse E600* y analizadas con la ayuda del software *ImageJ/FIJI*.

Las imágenes de cortes ultrafinos fueron observadas y capturadas en un microscopio electrónico de transmisión *Jeol 1010* con cámara digital *Hamamatsu (CCD-300-RC, MT 1)*.

Todas las imágenes obtenidas fueron procesadas con los programas *Microsoft PhotoDraw* versión 2 y *Adobe Photoshop CC 2019*.

h) Cuantificación

Con ayuda del software *ImageJ/FIJI*, se analizaron los cortes semifinos. Se contaron células del epitelio endometrial que presentaban alteraciones que pudieran indicar algún proceso de muerte celular y las que evidenciaban figuras mitóticas. También

se midió la altura tomando en cuenta desde la base hasta el ápice, tanto de las células como de su núcleo. Por último, se contó el número de nucléolos presentes en cada célula. Para todo lo anterior, se evaluaron 300 células epiteliales por cada tratamiento, utilizando un aumento total de 600X.

Se consideraron células en proceso de muerte cuando presentaban cromatina compacta, condensación citoplasmática, fragmentación nuclear o presencia de cuerpos apoptóticos y, por otro lado, también se tomaron en cuenta células con zonas tan alteradas en el citoplasma que parecieran espacios vacíos. Las células mitóticas se identificaron por su forma esférica y cromatina condensada o bien, cuando presentaban cromosomas en alguna fase de división.

i) Análisis estadístico

Los resultados del conteo se expresaron como índice de células en mitosis e índice de células con alteración morfológica del total de células epiteliales.

Las diferencias estadísticas entre medias se determinaron mediante el análisis de varianza ANOVA de una vía con una posterior prueba de comparación múltiple Tukey ($P < 0.05$).

8. Resultados

Descripción morfológica

Las preparaciones teñidas con azul de toluidina en cortes semifinos nos permitieron evaluar las condiciones morfológicas del epitelio uterino de las ratas con los diferentes tratamientos. En el epitelio de útero de rata normal, las células tienen forma cilíndrica, predomina la cromatina laxa, el núcleo es ovoide y presentan más de un nucleolo. Entre las células del epitelio, también se hallan algunas células epiteliales con cromatina compacta y con algunas alteraciones como disminución en el tamaño celular y vesículas alargadas en el espacio citoplasmático (Fig. 10).

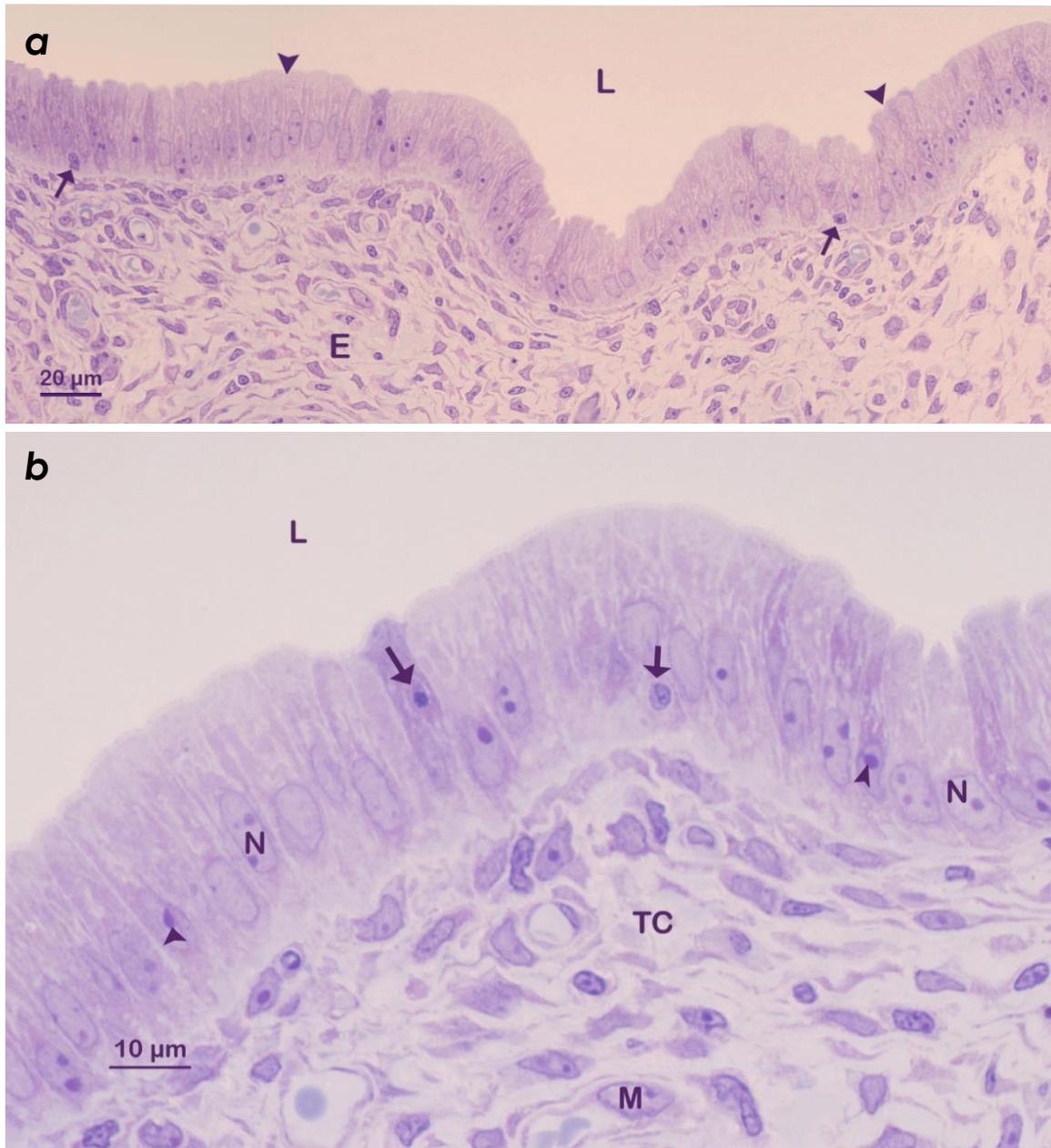


Figura 10. Cortes semifinos de epitelio uterino de ratas normales. Tinción: azul de toluidina. **a)** Vista panorámica en donde se observa el endometrio (E), se muestra la continuidad del epitelio (puntas de flecha) y el lumen del cuerno uterino (L), además se señalan algunas células con cromatina compacta (flechas). **b)** Aumento de **a)** en donde se pueden observar los núcleos (N) y nucléolos (punta de flecha) de las células, el tejido conectivo (TC), células del tejido conectivo (M) y algunas células epiteliales alteradas en posible proceso de muerte (flecha).

En el epitelio uterino de ratas castradas se aprecia una disminución en la altura del epitelio. La mayoría de los núcleos de las células son esféricos, aunque, también se encuentran núcleos ovoides. Se presenta abundante cromatina compacta en las células, sobre todo, en la periferia y algunos grumos distribuidos en el interior del núcleo. También se logran observar algunos cuerpos apoptóticos entre las células epiteliales y los nucléolos de las células son poco visibles dado su tamaño pequeño (Fig. 11).

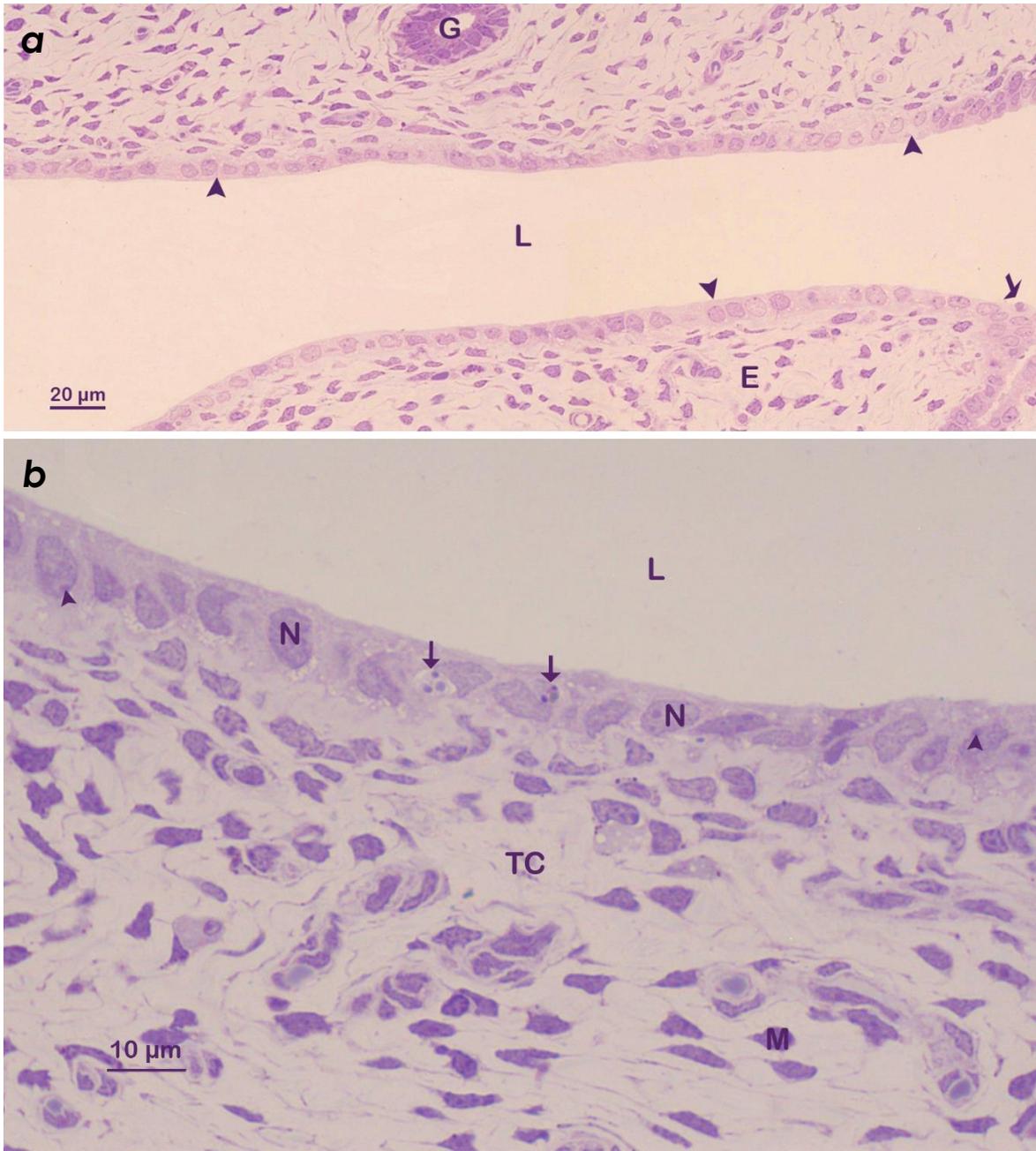


Figura 11. Células del epitelio uterino de rata castrada. Corte semifino teñido con azul de toluidina. **a)** Imagen de bajo aumento que muestra una vista panorámica del endometrio (E) donde se visualiza el epitelio (puntas de flecha) el cual, es más aplanado que el de las ratas normales, también se señala una glándula uterina (G), el lumen (L) y una célula con cromatina compacta (flecha). **b)** aumento de **a)** que permite visualizar las células epiteliales con escaso citoplasma y núcleos grandes e irregulares; así mismo, se observan algunos cuerpos apoptóticos en ese mismo tipo celular (flechas). Se aprecian otras estructuras como el nucleolo (puntas de flecha), el núcleo (N), la distribución del tejido conectivo (TC) y las células del tejido conectivo (M).

En las ratas castradas y tratadas con estradiol durante 2 hrs, se aprecia que las células epiteliales presentan un citoplasma hialino. Hay cambios notables en los núcleos ya que tienen una ligera recuperación en su morfología con respecto a las castradas y no inyectadas con estradiol. En el núcleo, la cromatina compacta disminuye considerablemente y también se observan algunas figuras mitóticas (Fig. 12).

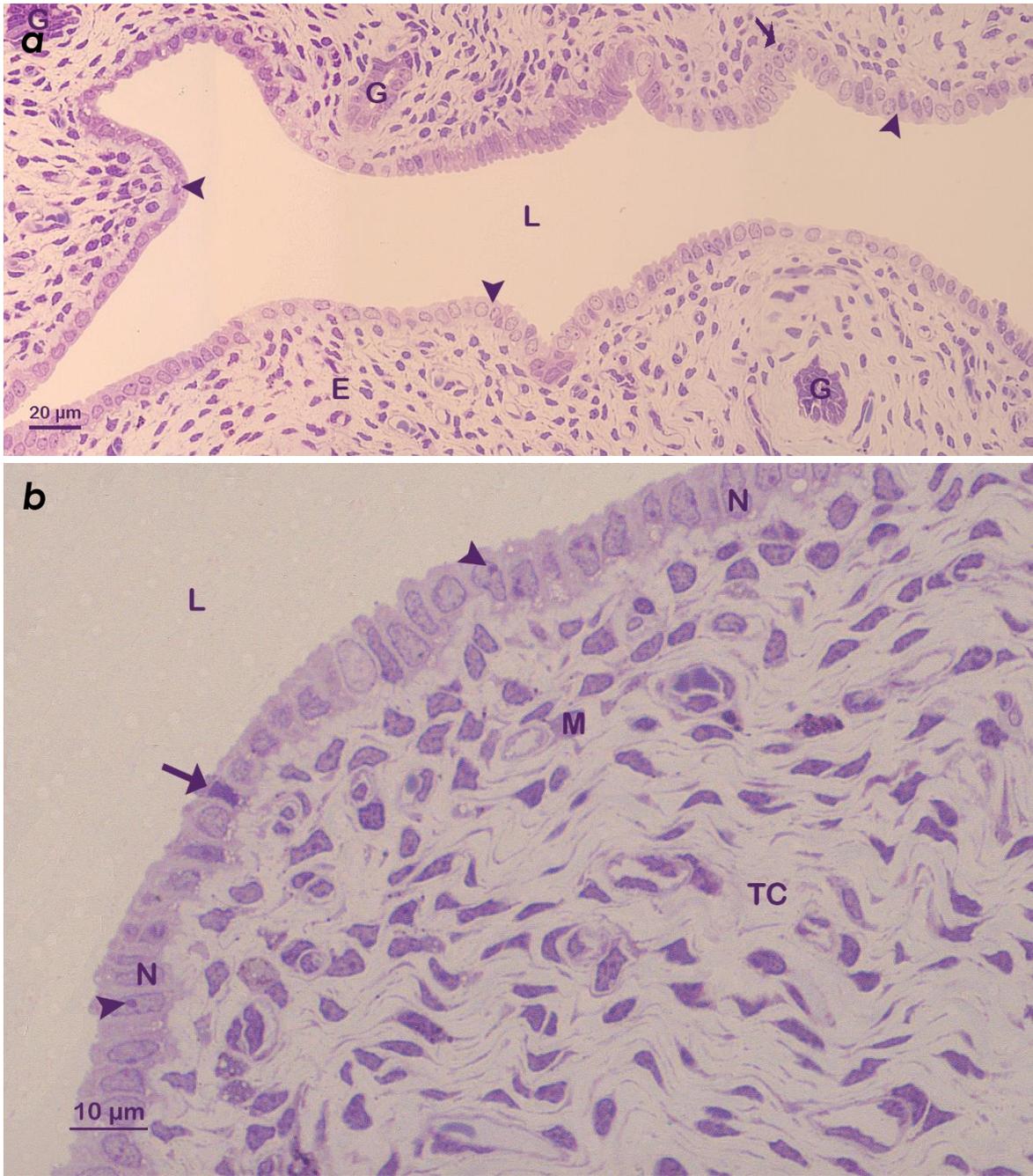


Figura 12. Epitelio uterino de rata castrada tratada durante 2 horas con estradiol. Cortes semifinos teñidos con azul de toluidina. **a)** Vista panorámica del endometrio (E) donde se visualiza algunas glándulas (G) y el lumen (L). Las células epiteliales muestran un citoplasma claro (puntas de flecha) y se puede distinguir alguna célula alterada (flecha). **b)** Detalle del epitelio que permite distinguir la morfología de las células, su núcleo (N) y nucleolos (puntas de flecha) y alguna figura mitótica (flecha). TC: tejido conectivo, M: células del tejido conectivo.

En las células de las ratas que tienen tratamiento de 8 horas de estradiol (Fig. 13), se observó una mayor recuperación morfológica en relación con las otras condiciones. Las células comienzan a tomar su característica forma cilíndrica y los núcleos presentan morfología ovoide, aunque no logran su normalidad total, ya que, el citoplasma aun con este tiempo de tratamiento, se observa anormal con cromatina todavía compacta y la base de las células se muestra irregular.

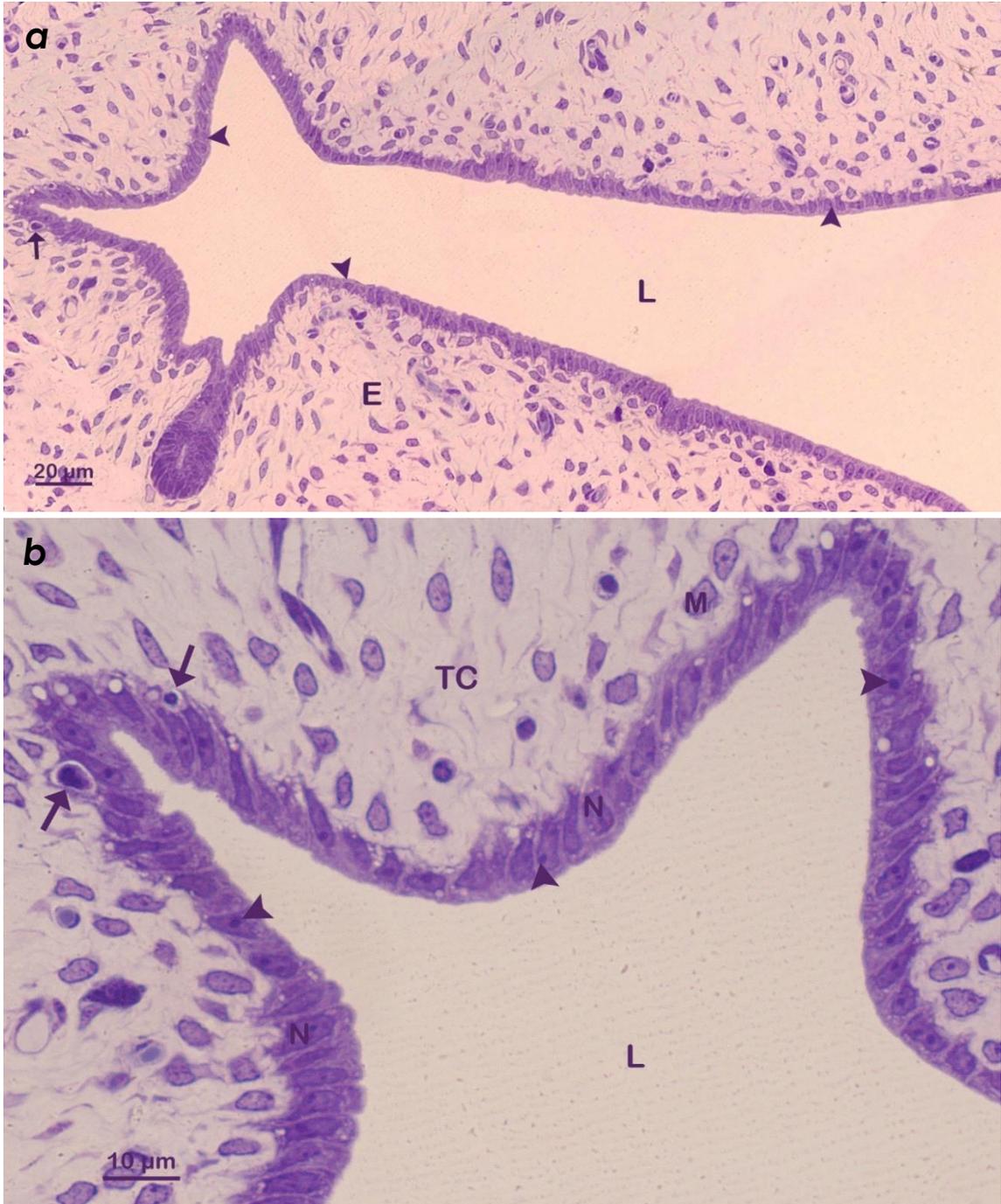


Figura 13. Cortes semifinos de epitelio de útero de rata castrada con tratamiento de 8 horas con estradiol. Tinción: azul de toluidina. **a)** Imagen de bajo aumento que permite apreciar la morfología general del tejido. Las células epiteliales se observan muy teñidas (puntas de flecha) y con mayor altura que en las condiciones de castración y del tratamiento post-inyección de estradiol durante 2 hrs. E: endometrio, L: lumen, flecha: cuerpo apoptótico. **b)** Aumento de **a)** en que se identifica el citoplasma de las células epiteliales fuertemente teñido y sus nucleolos (puntas de flecha), así como algunos cuerpos apoptóticos (flechas). M: células del tejido conectivo, N: núcleo, TC: tejido conectivo.

Los datos cuantitativos evidenciaron que las células epiteliales de los organismos que no recibieron ningún tratamiento (normales), poseen una longitud del citoplasma que mide en promedio 29.3 μm , el núcleo 9.37 μm y el nucléolo 1.4 μm (Fig. 14). Por otro lado, en el epitelio de rata castradas, hay una reducción del citoplasma, núcleo y nucléolo bastante notable, llegando a medir hasta 8.2 μm , 4.7 μm y 0.7 μm , respectivamente (Fig. 14).

Las ratas castradas e inyectadas con diferentes tiempos de estradiol, evidenciaron una paulatina recuperación en la altura del epitelio (Fig. 14), ya que después de 2 hrs con tratamiento, el citoplasma mantiene una altura pequeña de 8.6 μm en promedio, por lo que no hay diferencia significativa en comparación al tamaño del citoplasma de células epiteliales de rata castrada y sus núcleos miden aproximadamente 5.9 μm . El 87% de estas células posee un sólo nucléolo de 0.74 μm en promedio, los cuales, son significativamente más grandes comparados con los de epitelio de rata castrada. Y a las 8 hrs de tratamiento con estradiol, la altura del citoplasma tiene un promedio 6.98 μm . A pesar de ello, hay diferencia significativa en el tamaño de los núcleos y nucléolos con 8 hrs de E₂ respecto a los de células de ratas castradas, ya que llegan a alcanzar una altura de 5.19 y 0.99 μm , respectivamente.

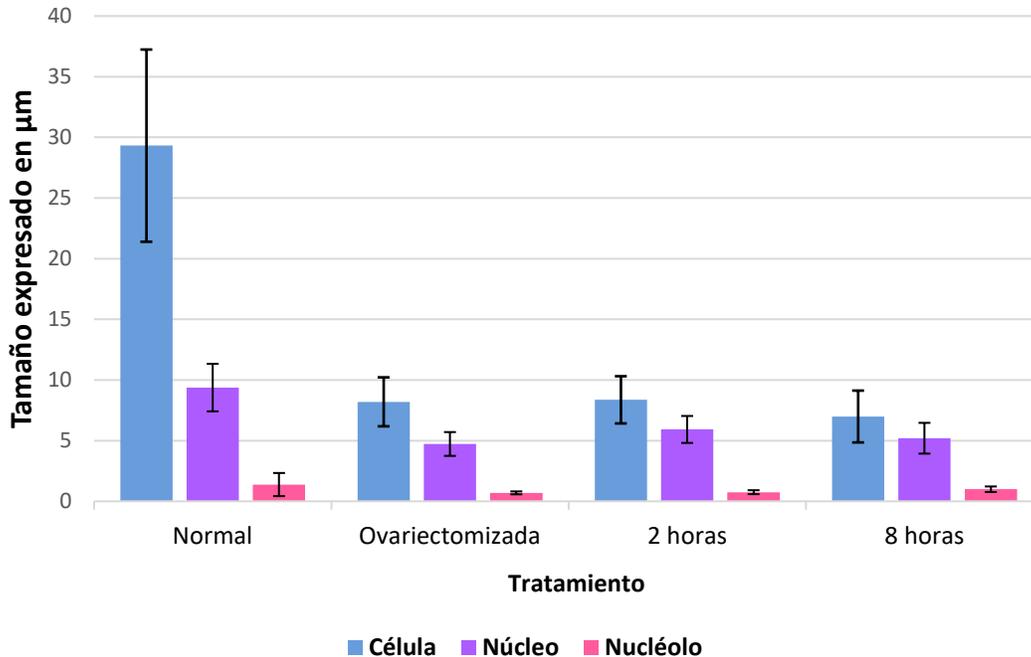


Figura 14. Tamaño celular, nuclear y nucleolar de células de epitelio de útero de ratas en diferentes condiciones experimentales. Para las mediciones se tomaron en cuenta 300 células epiteliales por cada tratamiento. Las barras representan la desviación estándar. Para el análisis de los datos, se realizó el análisis de varianza ANOVA de una vía con una posterior prueba de comparación múltiple Tukey ($p < 0.05$) observándose diferencias significativas en el tamaño del núcleo entre todos los tratamientos. También se observaron diferencias significativas entre los 4 tratamientos en cuanto al tamaño del citoplasma y nucleolo, excepto entre el grupo de ratas castradas y ratas tratadas con dos horas de estradiol en donde no se encontraron diferencias significativas.

Cuantificación de nucléolos

Se realizó un conteo del número de nucléolos en cada una de las células tomadas en cuenta para cada tratamiento ($n=100$). En células normales se encontraron 75 células con 1 solo nucléolo, 22 con 2 nucléolos y 3 con 3 nucléolos; en células de ratas castradas se contabilizaron 71 células con 1 nucléolo, 22 con 2 nucléolos y 7 con 3 nucléolos, respecto a las células de ratas tratadas con 2 horas de estradiol, se hallaron 87 con un nucléolo, 12 con 2 nucléolos y 1 sola célula con 3 nucléolos; en cuanto a las células de ratas tratadas durante 8 horas con estradiol, se

observaron 91 células con 1 nucléolo, 7 con 2 nucléolos y solo 2 células con 3 nucléolos (Fig. 15).

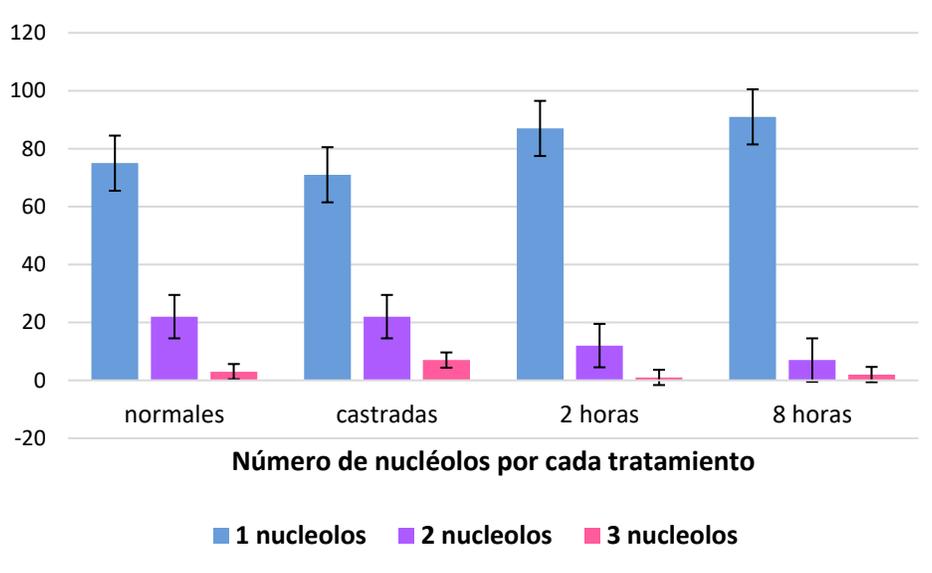


Figura 15. Número de nucléolos presentes en cada una de las 100 células cuantificadas para cada tratamiento. Las barras representan la desviación estándar.

Cuantificación de células mitóticas

La proliferación celular se hace presente en el epitelio uterino, sin embargo, se observó poca actividad mitótica entre los epitelios uterinos de los diferentes tratamientos habiendo 4% en el epitelio de rata normal, 2% en el epitelio de rata castrada, 3% y 5% en el epitelio de rata castrada con tratamiento de 2 y 8 horas con estradiol, respectivamente. No se encontraron diferencias significativas entre los índices mitóticos de los diferentes tratamientos (Fig. 16).

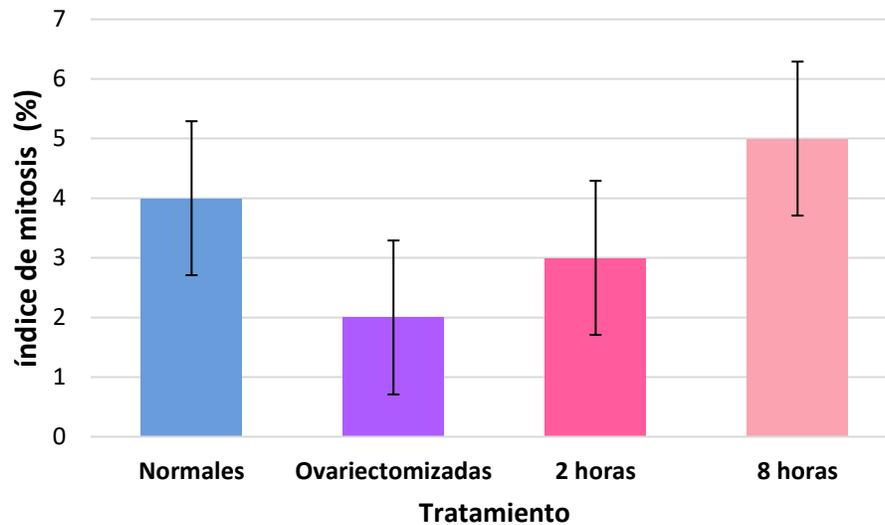


Figura 16. Porcentaje de células en proceso de mitosis presentes en el epitelio endometrial uterino en cada tratamiento (n=100 células). Las barras representan la desviación estándar.

Cuantificación de células con morfología alterada

En el epitelio uterino también existen células con morfología alterada o bien, con características morfológicas pertenecientes a la muerte celular apoptótica. Entre estas características se encuentra la cromatina compacta (núcleos picnóticos), fragmentación citoplasmática y nuclear. Igualmente, se hacen presentes células en las que el núcleo tiene apariencia normal y cuyas alteraciones se encuentran en el citoplasma.

En las células epiteliales de las ratas normales y de las ratas ovariectomizadas, se observó un mayor índice de células con morfología alterada respecto al epitelio de útero de rata con tratamiento de estradiol (Fig. 17). Se presentaron valores de 31%, 22%, 18% y 15% de células alteradas con algún grado de muerte celular en el epitelio de rata normal, castrada, castrada con tratamiento de 2 y 8 horas de 17- β estradiol, respectivamente.

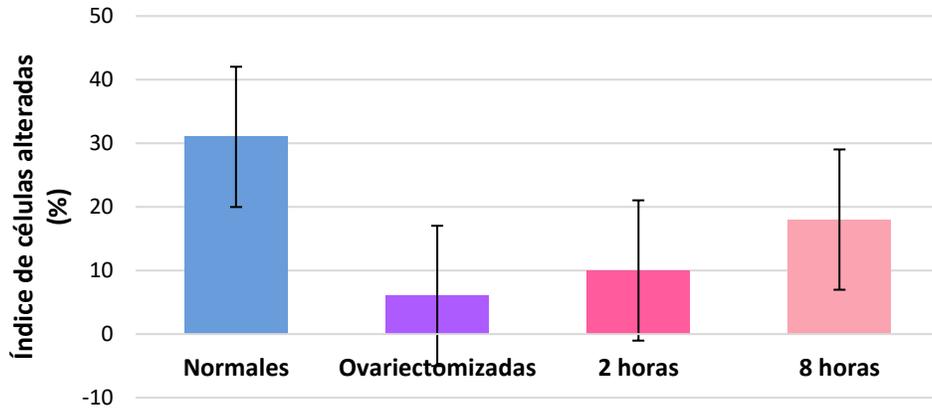


Figura 17. Porcentaje de células con morfología alterada o con características de apoptosis presentes en el epitelio endometrial uterino en cada tratamiento (n=100 células). Las barras representan la desviación estándar.

Descripción ultraestructural

A nivel ultraestructural se distinguieron cambios morfológicos en los núcleos del epitelio uterino en los diferentes tratamientos. En las células epiteliales de útero de rata normal se observan núcleos alargados (Fig. 18a) con nucléolos bien definidos (Fig. 18b) así como células en alguna fase de apoptosis. Los núcleos de las células presentan poca cromatina adosada a la membrana interna de la envoltura nuclear.

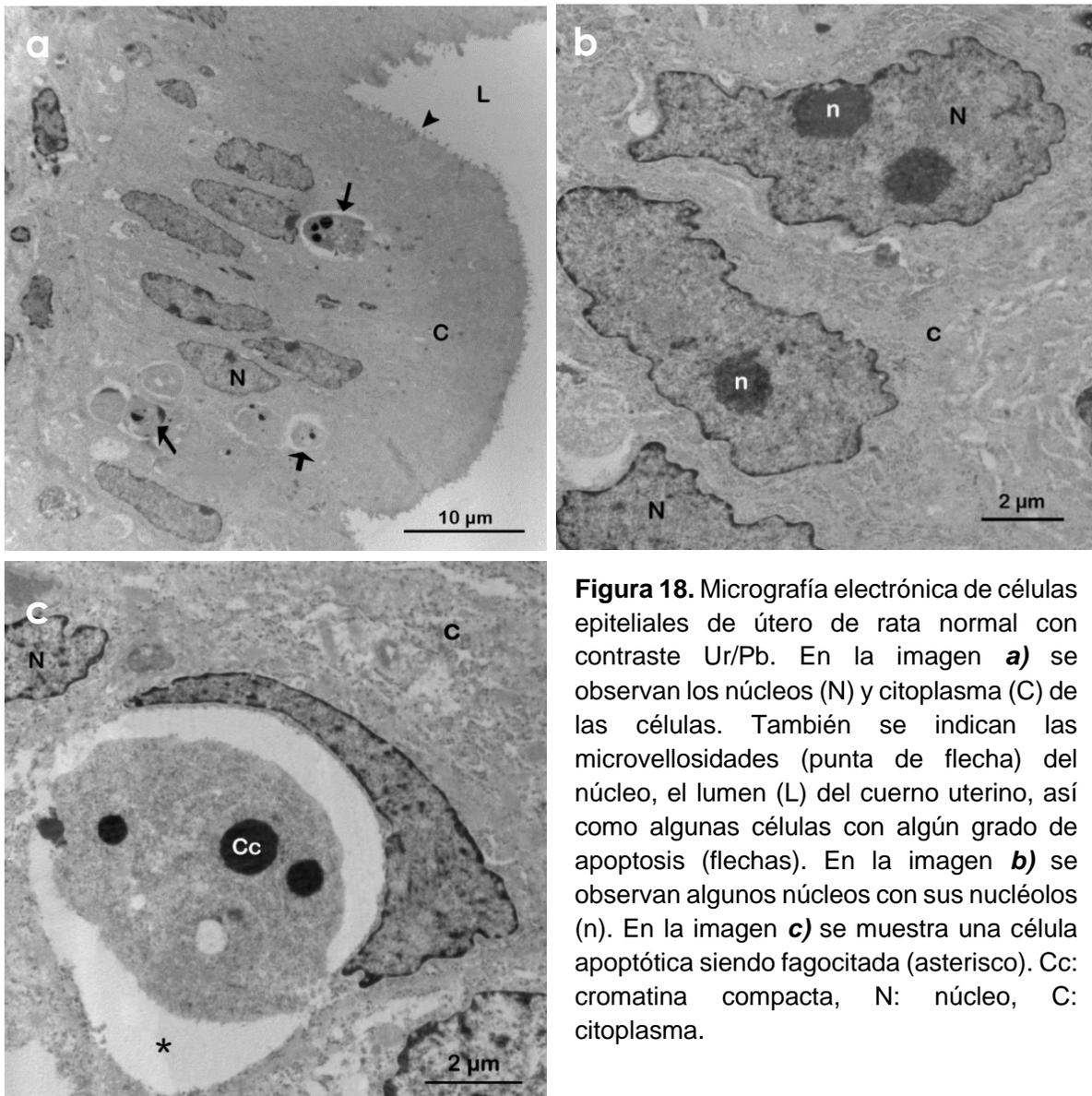


Figura 18. Micrografía electrónica de células epiteliales de útero de rata normal con contraste Ur/Pb. En la imagen **a)** se observan los núcleos (N) y citoplasma (C) de las células. También se indican las microvellosidades (punta de flecha) del núcleo, el lumen (L) del cuerno uterino, así como algunas células con algún grado de apoptosis (flechas). En la imagen **b)** se observan algunos núcleos con sus nucléolos (n). En la imagen **c)** se muestra una célula apoptótica siendo fagocitada (asterisco). Cc: cromatina compacta, N: núcleo, C: citoplasma.

El epitelio de útero de rata castrada presenta núcleos pequeños con respecto al control, la mayoría de ellos con morfología irregular y con cromatina compacta, los nucléolos son apenas visibles y se presenta un alto grado de vacuolización en el citoplasma de las células (Fig. 19).

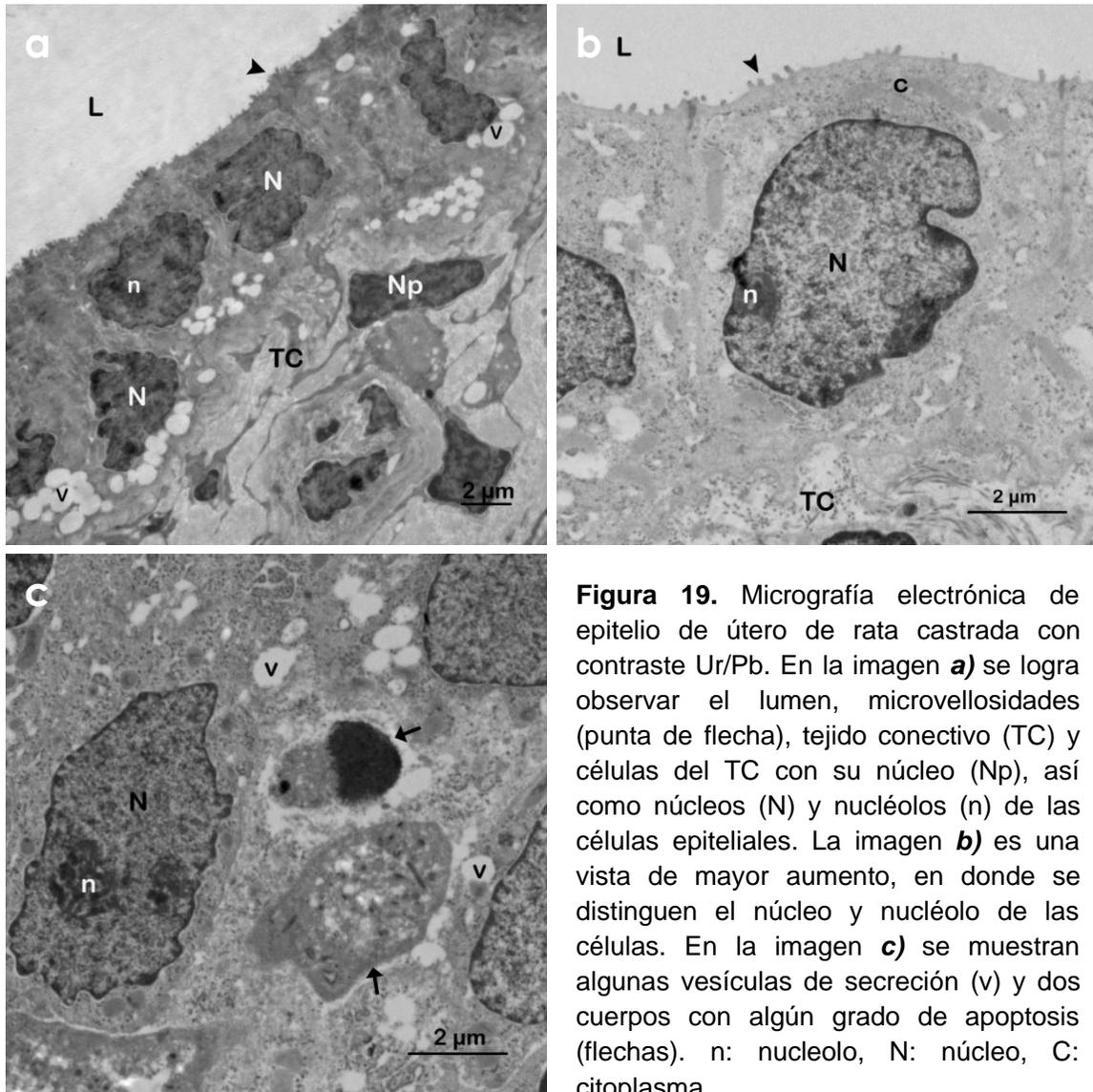


Figura 19. Micrografía electrónica de epitelio de útero de rata castrada con contraste Ur/Pb. En la imagen **a)** se logra observar el lumen, microvellosidades (punta de flecha), tejido conectivo (TC) y células del TC con su núcleo (Np), así como núcleos (N) y nucléolos (n) de las células epiteliales. La imagen **b)** es una vista de mayor aumento, en donde se distinguen el núcleo y nucléolo de las células. En la imagen **c)** se muestran algunas vesículas de secreción (v) y dos cuerpos con algún grado de apoptosis (flechas). n: nucleolo, N: núcleo, C: citoplasma.

En las células epiteliales de rata castrada con tratamiento de dos horas de estradiol, se observa una recuperación en la morfología de los núcleos ya que se muestran más alargados (Fig. 20a) respecto a los de ratas castradas. Sin embargo, siguen presentando algún grado de compactación en la periferia del núcleo. Los nucléolos se muestran más visibles y definidos (Fig. 20b). Aún se siguen presentando células en diferentes etapas de apoptosis.

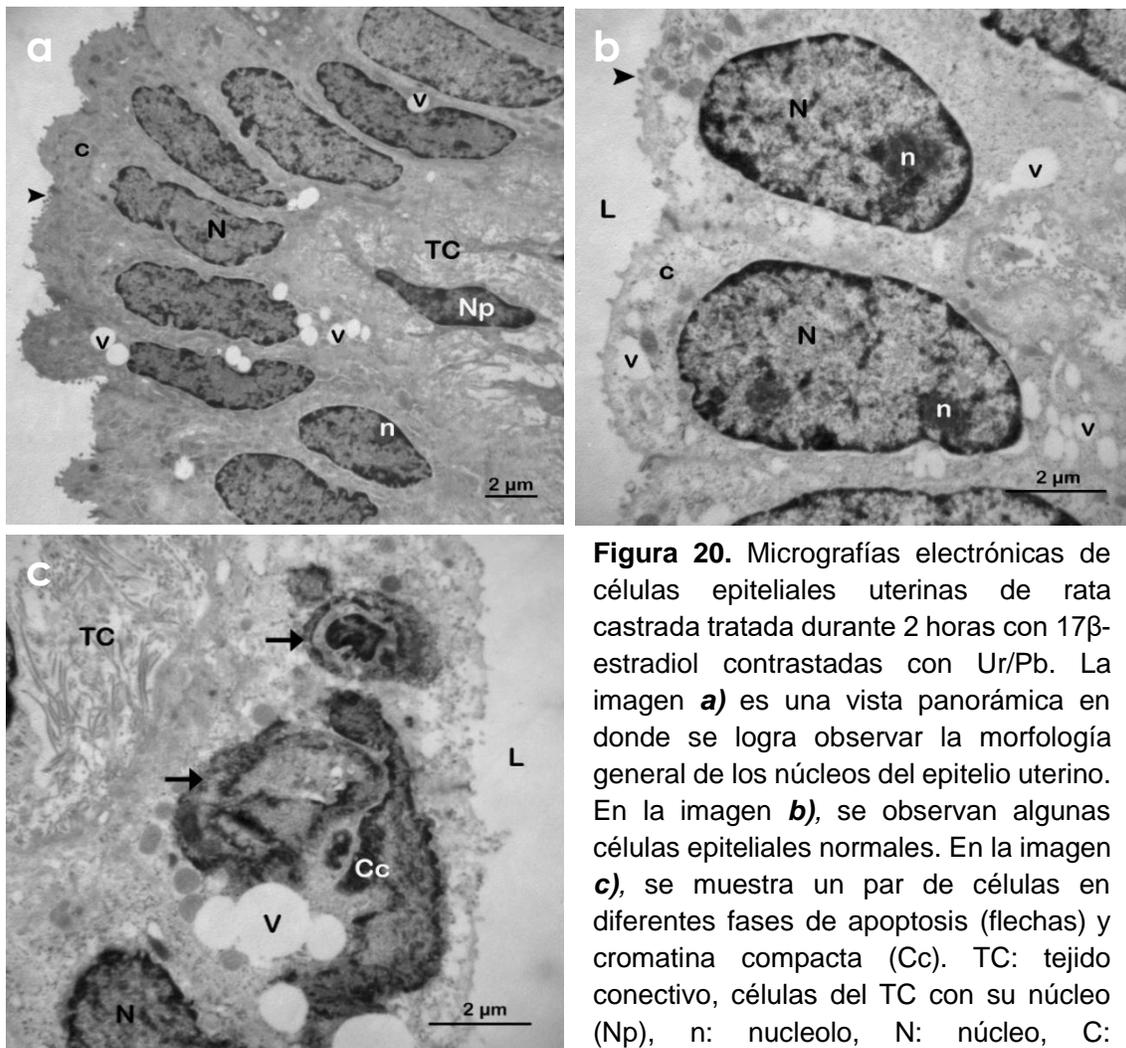


Figura 20. Micrografías electrónicas de células epiteliales uterinas de rata castrada tratada durante 2 horas con 17β -estradiol contrastadas con Ur/Pb. La imagen **a)** es una vista panorámica en donde se logra observar la morfología general de los núcleos del epitelio uterino. En la imagen **b)**, se observan algunas células epiteliales normales. En la imagen **c)**, se muestra un par de células en diferentes fases de apoptosis (flechas) y cromatina compacta (Cc). TC: tejido conectivo, células del TC con su núcleo (Np), n: nucléolo, N: núcleo, C: citoplasma, v: vesículas de secreción.

En el epitelio de rata castrada con tratamiento de 8 horas de estradiol, los núcleos son más parecidos a los de rata control (Fig. 21a), hay una disminución de la cromatina compacta y los nucléolos se hacen más grandes y menos compactados respecto a los de rata castrada tratada con 2 horas de estradiol. Las células que se encuentran es proceso de muerte celular, poseen características pertenecientes a apoptosis (Fig. 21c).

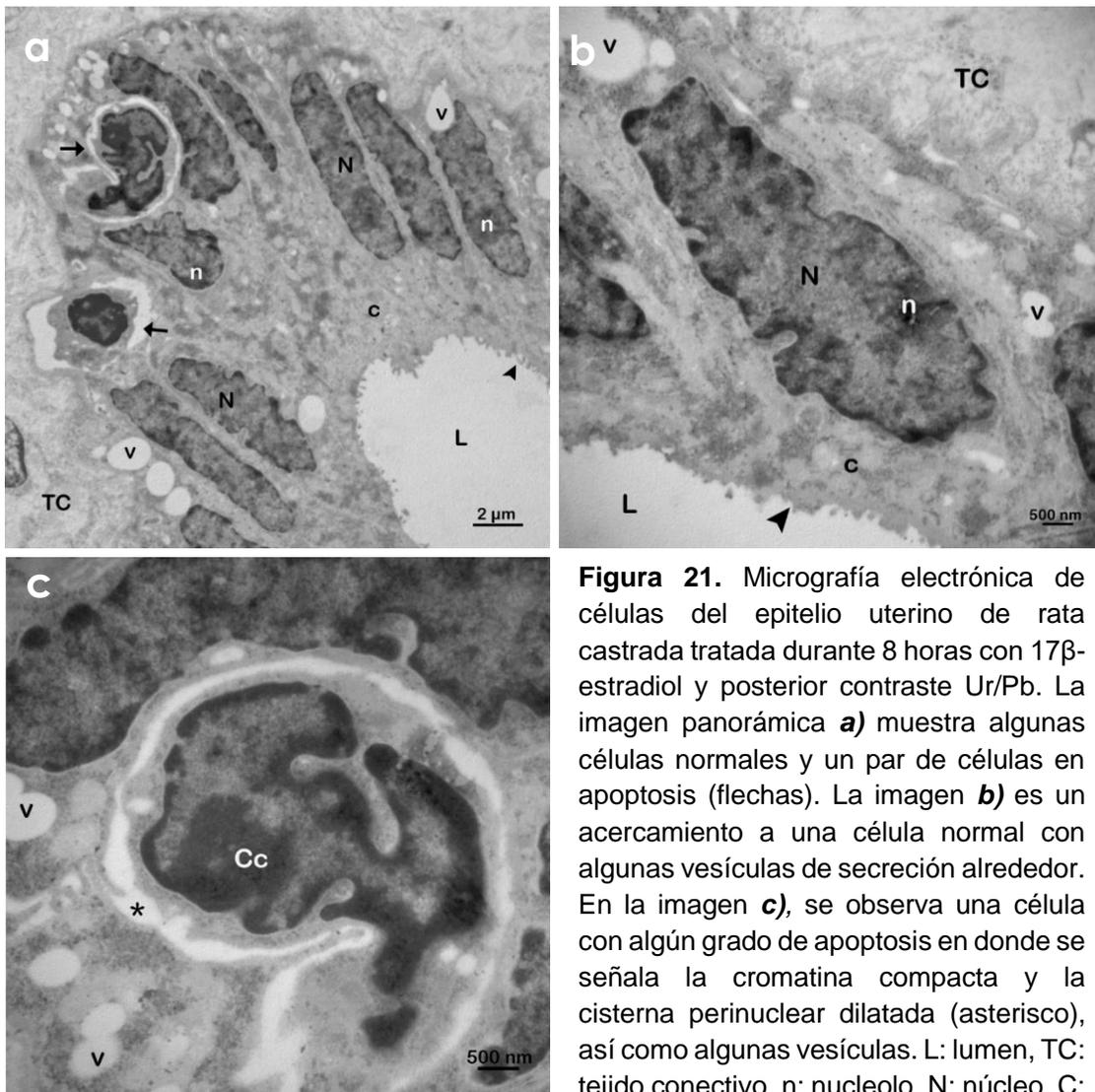


Figura 21. Micrografía electrónica de células del epitelio uterino de rata castrada tratada durante 8 horas con 17β -estradiol y posterior contraste Ur/Pb. La imagen panorámica **a)** muestra algunas células normales y un par de células en apoptosis (flechas). La imagen **b)** es un acercamiento a una célula normal con algunas vesículas de secreción alrededor. En la imagen **c)**, se observa una célula con algún grado de apoptosis en donde se señala la cromatina compacta y la cisterna perinuclear dilatada (asterisco), así como algunas vesículas. L: lumen, TC: tejido conectivo, n: nucleolo, N: núcleo, C: citoplasma, v: vesículas de secreción, punta de flecha: microvellosidades.

Inmunolocalización de la proteína caspasa 3-activa

Para corroborar la presencia de la muerte celular por apoptosis, se hicieron inmunodetecciones a nivel ultraestructural de caspasa-3 activa. Estas inmunolocalizaciones fueron realizadas en cortes ultrafinos de rata normal y rata castrada, ya que es en esta condición en la que se encontró un mayor índice apoptótico respecto al epitelio de ratas con tratamiento hormonal. En los resultados observados, se halló un marcaje positivo en núcleos que contenían cromatina en alto grado de compactación (Fig. 22 y 25). También se observaron células con algún estado de muerte cuyas características eran diferentes a las de una célula apoptótica típica, el núcleo de estas células se notaba aparentemente normal y no presentaba cromatina compacta, sino que se hallaban con un alto grado de vacuolización citoplasmática además de aglomeración de mitocondrias hinchadas, este tipo de células dieron negativo al marcaje de caspasa-3 activa (Fig. 23, 24 y 26).

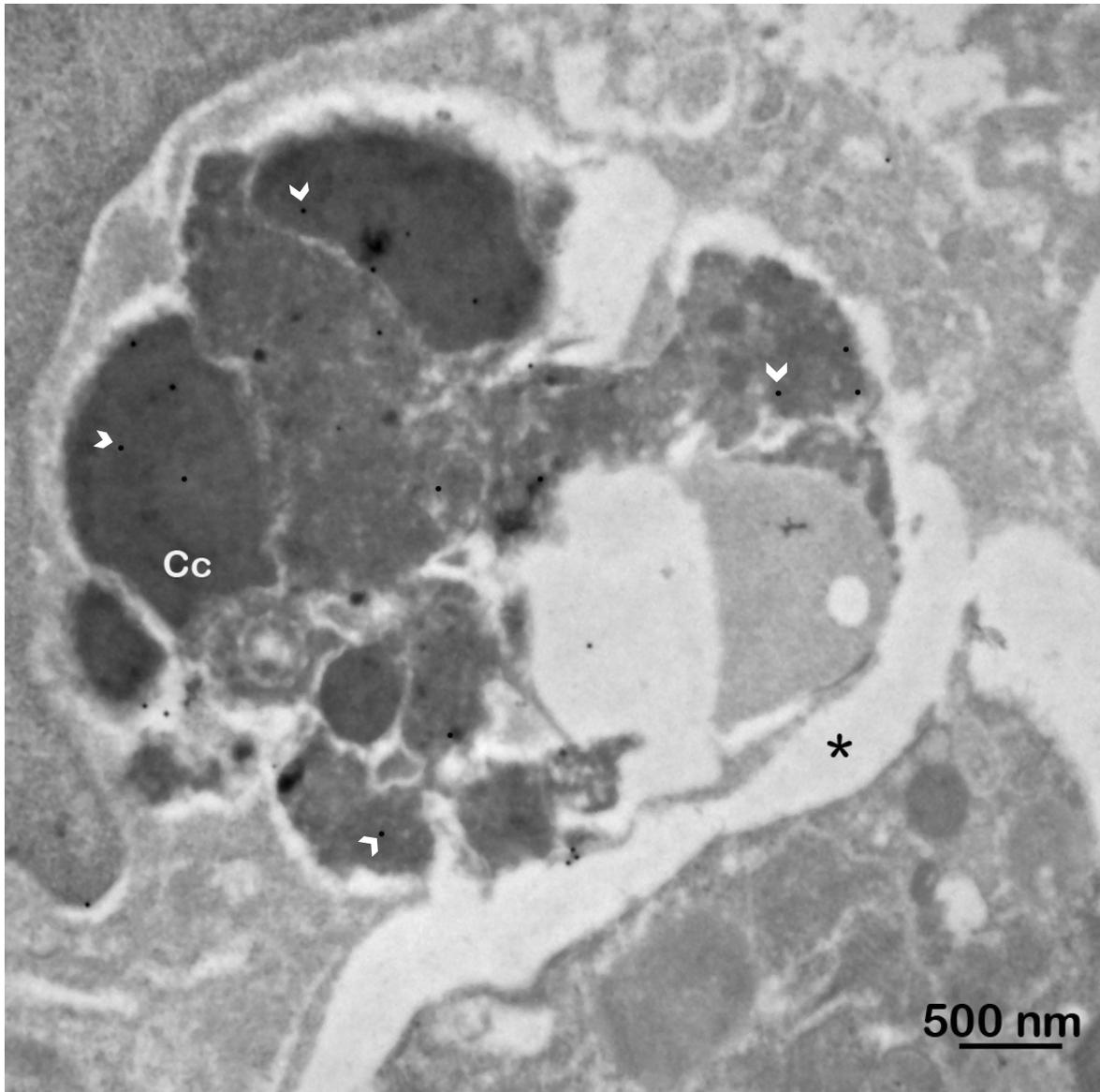


Figura 22. Micrografía electrónica de útero de rata normal en donde se inmunolocalizó a la proteína caspasa-3 activa. En la imagen se observa una célula en proceso de apoptosis con cromatina altamente compacta (Cc) y también se observa el espacio que deja la célula por la misma compactación celular (asteriso). Los granos de oro (punta de flecha) que evidencian la presencia de caspasa-3 activa, se distribuyen en la célula fuertemente compactada, no así en la célula fagocítica.

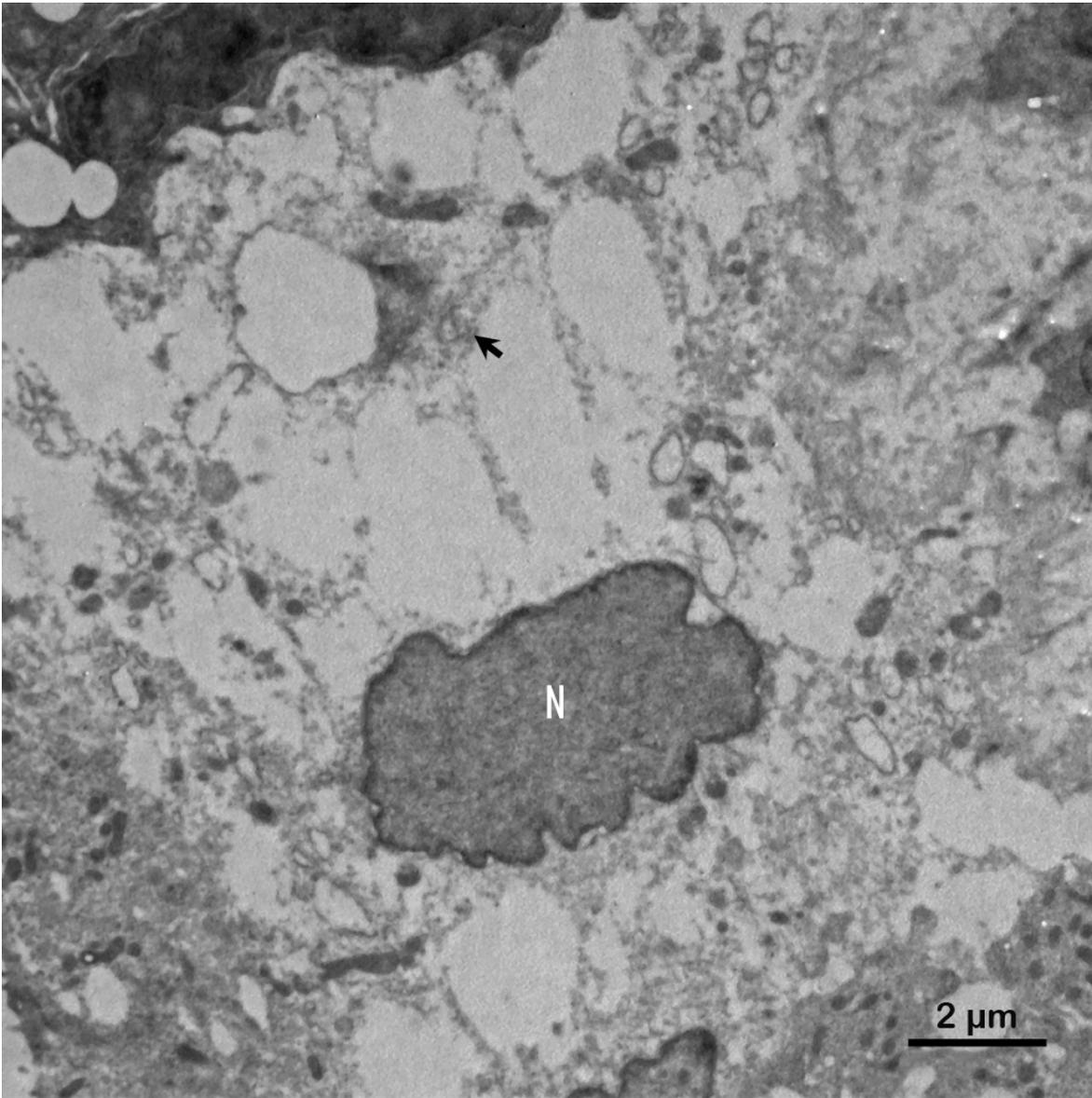


Figura 23. Micrografía electrónica de útero de rata normal en donde se inmunolocalizó a la proteína caspasa-3 activa. El marcaje fue negativo en esta célula. En la imagen se observa el núcleo (N) de una célula con alto grado de vacuolización citoplasmática y apenas sujeta a algunos restos citoplasmáticos (flecha).

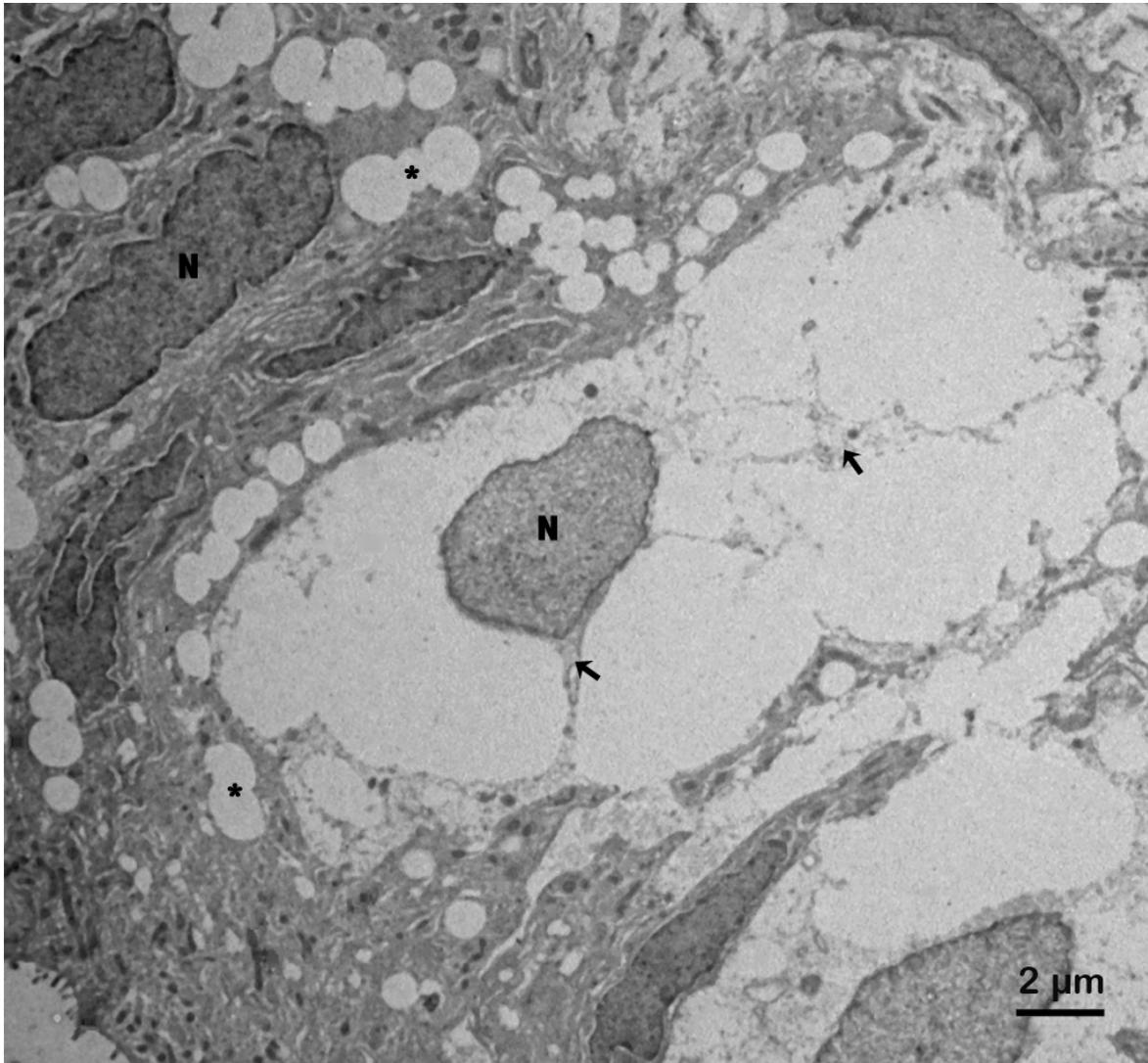


Figura 24. Micrografía electrónica de útero de rata normal en donde se inmunolocalizó a la proteína caspasa-3 activa en el epitelio uterino. Se observa que esta célula dio negativo a la técnica. En la imagen se muestra el núcleo de la célula con alto grado de vacuolización citoplasmática y apenas sujeta a algunos restos citoplasmáticos (flecha).

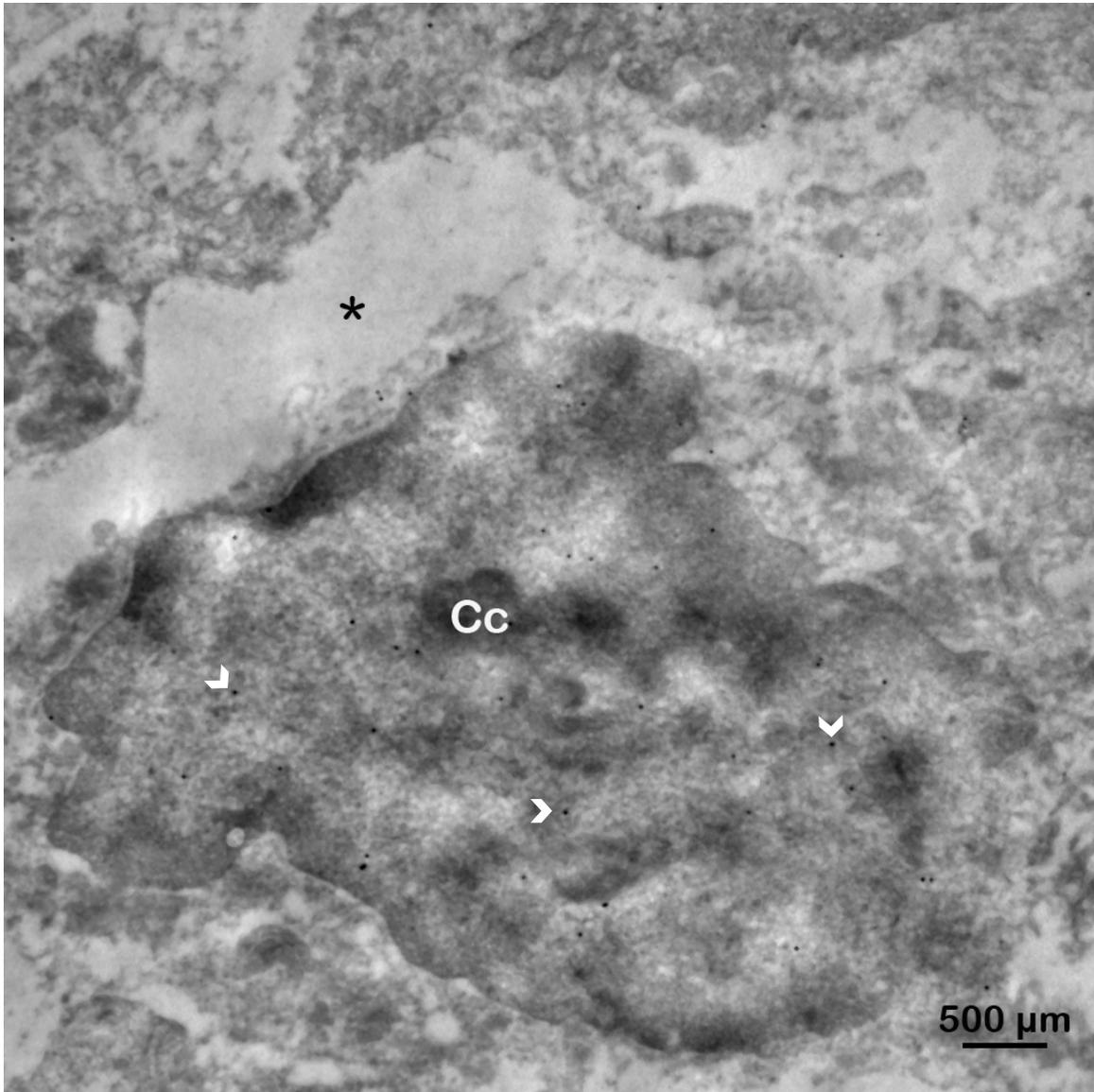


Figura 25. Micrografía electrónica de útero de rata castrada en donde se realizó una inmunolocalización de la proteína caspasa-3 activa. La célula dio positivo a la técnica (cabeza de flecha). En la imagen se observa una célula en proceso de apoptosis con cromatina altamente compacta (Cc) y también se observa el espacio dejado por la misma compactación celular (asterisco).

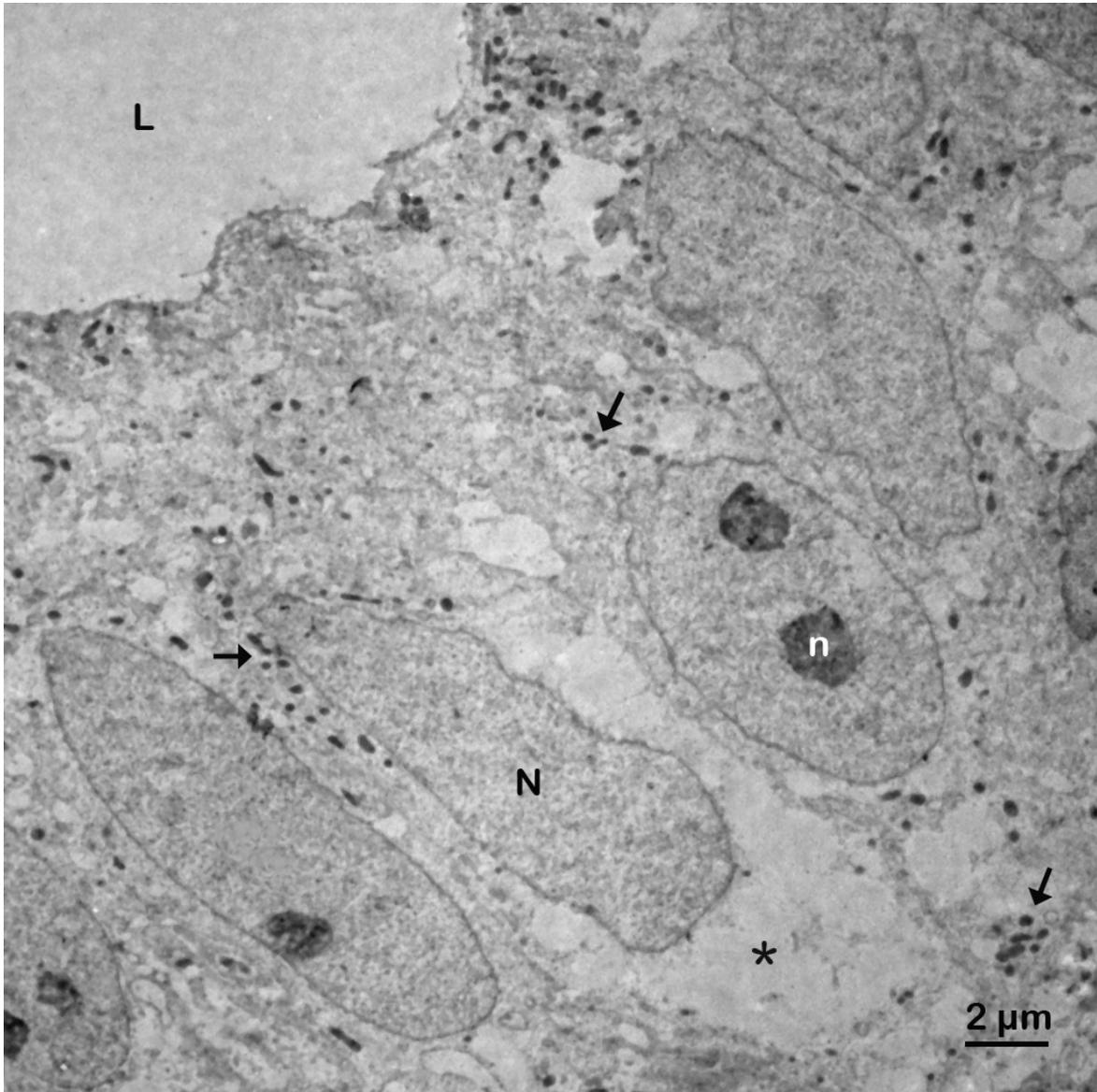


Figura 26. Micrografía electrónica de útero de rata castrada en donde se realizó una inmunolocalización de la proteína caspasa-3 activa. La técnica dio negativo. En la imagen se observan tres células, una de ellas está en proceso de muerte celular y se muestra con un alto grado de vacuolización citoplasmática (asterisco) así como mitocondrias hinchadas y aglomeradas (flechas), las otras dos células se encuentran menos alteradas, pero con núcleos bien definidos. N: núcleo, n: nucleolo.

9. Discusión

El epitelio es un tejido muy dinámico, el cual experimenta procesos de proliferación, secreción, degeneración y regeneración celular, que se deben a mecanismos neuroendocrinos relacionados con la secreción ovárica de 17- β estradiol (Sandow *et al.*, 1979; Quarmby & Korach, 1984; Sato *et al.*, 1997). En el presente trabajo, se pudieron comparar y describir los cambios morfológicos ante la ausencia y presencia de dicha hormona en ratas adultas

Descripción morfológica (forma y tamaño)

Entre los cambios morfológicos observados en este trabajo destacan principalmente el tamaño tanto del citoplasma como del núcleo y nucléolo de las células epiteliales de rata normal y de rata castrada, habiendo una notable disminución en las castradas y una ligera recuperación en cuanto al tamaño cuando había un tratamiento hormonal posterior a la castración. La acción del estradiol sobre el núcleo y nucléolo del epitelio endometrial ha sido bien documentada. Sin embargo, no se había estudiado extensamente los cambios que sufre el citoplasma de dichas células bajo diferentes niveles hormonales.

Las observaciones sobre el tamaño nucleolar concuerdan con estudios realizados anteriormente por Tachi *et al.* (1972, 1974) quienes mencionan que los nucléolos de células epiteliales de rata castrada son pequeños y compactos, en cambio, los de rata castrada tratada con estradiol son grandes y prominentes. En 1978, Vázquez-Nin *et al.* realizaron una investigación en la que demostraron que la supresión de hormonas altera las estructuras nucleares y una sola aplicación de estradiol no produce características normales. Sin embargo, la fracción del volumen nucleolar aumenta con la inyección de estradiol después de 2 horas en adelante, lo cual, es congruente con los resultados obtenidos en el presente trabajo ya que se observó un aumento significativo en el tamaño del nucléolo de células con tratamiento con respecto a las castradas.

El E₂ modula sus acciones mediante el complejo receptor-hormona RE. En ausencia de hormona, el RE está secuestrado dentro de los núcleos de las células diana en

un complejo inhibidor de multiproteínas (Hall & McDonnell, 1999). Las acciones del E₂ en la membrana resultan principalmente de la unión de este esteroide a los REs, que activan rápidamente los sistemas de señalización celular durante la unión a ligando, generando segundos mensajeros (Kelly & Levin, 2001). La fosforilación de RE- α en respuesta a E₂ y a través de las vías de señalización del segundo mensajero, incrementa la actividad transcripcional de los receptores de estrógeno y sin esta hormona, el RE se presenta predominantemente en forma desfosforilada (Lannigan, 2003). La unión de E₂ al RE induce un cambio conformacional en el dominio de unión a la hormona del receptor mejorando la dimerización del receptor y su unión a secuencias de ADN específicas, lo que estimula la transcripción de genes; en su unión al ADN el RE requiere interactuar con coactivadores para formar el complejo que constituye la plataforma sobre la que se ensamblarán las proteínas de la maquinaria transcripcional (Craig, 2003; Smith & O'Malley, 2004). La mayor parte del RE- α se localiza en núcleos, específicamente en la región de intercromatina de células blanco de hormonas y una de sus funciones es actuar como factor de transcripción activado por ligando el cual requiere localización nuclear. En un estudio con células MCF-7 (línea celular de tumor de mama humano) encontraron que el estradiol induce la translocación nuclear de RE- α después de 30 min, seguida de una disminución del receptor nuclear a nivel basal en 1 hr y sugirieron que la disminución observada en la localización nuclear de ER α es causada por la exportación del receptor (Lombardi *et al.*, 2008).

Se ha demostrado que el estradiol estimula la síntesis de ARN nuclear y su transporte al citoplasma y paralelo a estos eventos, ocurre una disminución de gránulos pericromatinianos. Por el contrario, la castración provoca la inhibición de síntesis de ARN y, por tanto, aumenta la cantidad de GP (Hamilton, 1968, Vázquez-Nin, *et al.*, 1979 & Echeverría, *et al.*, 1980). Las fibras de pericromatina contienen ARNm inmaduro sometido a procesamiento y los GP están involucrados en el almacenamiento de ARNm maduro de alto peso molecular premensajero o ARNm parcialmente procesado, y los gránulos de intercromatina, están relacionados con el empalme de ARN premensajero (Vázquez-Nin *et al.*, 1991; González-Oliver *et al.*, 1997). En Vázquez-Nin *et al.* (1991) se menciona que los cambios más críticos

inducidos por el E₂ en la transcripción, así como el transporte de ARN previamente sintetizado, ocurren durante la primera hora después de su administración, también se ha sugerido que el estradiol estimula de forma independiente la síntesis de ARN y su transporte al citoplasma (Vázquez-Nin *et al.*, 1978; Echeverría *et al.*, 1994).

Después de que el ARN haya sido sintetizado y transportado al citoplasma, el volumen nuclear comienza a cambiar. Es por ello que la incorporación de uridina tritiada (se ha de recordar que la uridina marca células que están sintetizando ARN) antecede a los cambios en el volumen del núcleo. Esto puede explicarse por el tiempo necesario para aumentar el contenido de ARN y proteína del nucléolo hasta el punto de hacer medible el aumento de volumen. Esto está respaldado por el hallazgo de que el volumen del nucléolo es proporcional a su contenido de ARN y proteína (Vázquez-Nin *et al.*, 1978, 1979, 1986). Así como la actividad sintética y el contenido de ARN de los nucléolos son proporcionales al volumen nucleolar total, también se presentan diferentes equilibrios entre la tasa de síntesis de pre-ARNr y la exportación del ARNm maduro al citoplasma (Vázquez-Nin *et al.*, 1986). En correlación con nuestros resultados, vemos que tras la ovariectomía se inhibe la síntesis de ARN ya que el tamaño del nucléolo se reduce a la mitad en comparación al tamaño nucleolar de células de las ratas control. En el caso del tamaño nucleolar de células de ratas tratadas con estradiol, se observa un aumento significativo en comparación al de ratas castradas, lo que indica que a partir de 2 h de tratamiento con E₂ se incrementa la actividad transcripcional de las células. Sin embargo, pese a que hay crecimiento nucleolar en las células con tratamiento de 8 h con E₂, tanto el núcleo como el citoplasma disminuyen su tamaño, esto podría indicar un deterioro en el transporte de ARN a partir de las 2 horas con el tratamiento.

La reducción de la transcripción provocada por la ovariectomía y su activación causada por la administración de estradiol en ratas castradas, también están acompañadas por la formación de áreas de cromatina semicondensada en núcleos de células endometriales (Echeverría *et al.*, 1994). De acuerdo a lo anterior, la cantidad de cromatina compacta de las células epiteliales endometriales de rata, es proporcional a la cantidad de estradiol presente en el epitelio ya que, en los

resultados presentados en las células de ratas castradas, se observó mayor cantidad de cromatina condensada alrededor del núcleo a diferencia de las células de ratas tratadas con estradiol. Sin embargo, cuando mayor era el tiempo de tratamiento con la hormona, la cromatina volvía a condensarse; esto alude a la idea de que las células epiteliales de ratas castradas tratadas con estradiol, tienen mayor actividad transcripcional durante las primeras horas del tratamiento puesto que la descondensación de la cromatina compacta se produce simultáneamente con el aumento en la actividad transcripcional (Vázquez-Nin *et al.*, 1978).

Por otra parte, también se puede observar que hay una notoria pérdida de la forma cilíndrica de las células del epitelio de rata castrada a comparación de las normales y una notable recuperación de la misma cuando las ratas son tratadas con estradiol. Es bien conocido que las células dependientes de hormonas se encogen, sufren atrofia y quedan inactivas como es el caso de las células epiteliales uterinas de rata ovariectomizada, por lo tanto, se puede inferir que 8 horas con tratamiento de estradiol es parcialmente suficiente para revertir las consecuencias de la ovariectomía. En estudios con útero de ratones ovariectomizados encontraron que pese al tratamiento con E₂, se reduce en gran medida el tiempo de generación de las células, principalmente la fase G₁ donde hay crecimiento celular con síntesis de proteínas y ARN (Quarmby & Korach, 1984; Pollard *et al.*, 1987). Lo anterior explicaría por qué las células no alcanzan su normalidad morfológica aún después del tratamiento con E₂, y por lo tanto sería necesario estudiar el comportamiento que tienen las células con mayores tiempos de tratamiento ya que, aunque a las 8 horas la célula tiende a recuperar sus parámetros morfológicos normales, no logra alcanzar su longitud normal y tampoco están completamente activas.

En cuanto al número de nucléolos en cada una de las células del epitelio uterino bajo las diferentes condiciones experimentales, se encontró que la mayoría de las células contabilizadas poseían un solo nucléolo y solo en una cantidad mínima de células se observaron 3 nucléolos. Estudios de Vázquez-Nin *et al.* (1986) mencionan que no hay diferencias en la densidad de incorporación de uridina tritiada entre núcleos con un solo nucléolo o más, por tanto, existe una relación directa entre

el volumen nucleolar total y la síntesis total de pre-ARNr de la célula. Aunque, también observaron que tejidos con células binucleoladas con mayores volúmenes nucleolares y mayor incorporación de uridina tienen células comprometidas con el ciclo mitótico. Sin embargo, en nuestros resultados encontramos que las células epiteliales de ratas castradas tratadas con E₂ durante 8 h poseían mayoritariamente un solo nucléolo y en este mismo epitelio se encontró un mayor índice de mitosis respecto a las otras condiciones experimentales. No obstante, este índice no es significativo, esta insignificancia es congruente con diversos estudios donde se señaló que en ratas ovariectomizadas, una sola inyección de E₂ induce la síntesis de ADN epitelial luminal a las 12-16 h después del tratamiento, y la mitosis sigue a las 18-24 h (Martin y Finn, 1968, 1973; Sandow *et al.*, 1979; Zhang *et al.*, 1998).

Además de los efectos mitogénicos, el estrógeno también interviene en el control de la apoptosis (Winuthayanon *et al.*, 2010; Huang *et al.*, 2012). A nivel óptico, se evaluaron células con alteraciones morfológicas entre las que se destacan núcleos con cromatina compacta y fragmentación tanto del citoplasma como del núcleo. Estas alteraciones ya habían sido reportadas por diversos autores, quienes hacen alusión de que se trata de apoptosis y mencionan que este tipo de muerte celular es diferente a la necrosis por los cambios morfológicos en el núcleo. No obstante, sugieren que la apoptosis no es el único tipo de muerte celular presente en células epiteliales uterinas.

Los resultados de microscopía óptica arrojaron que en el epitelio de rata control y de rata ovariectomizada el índice de células con alteraciones morfológicas congruentes con apoptosis era mayor al de epitelio de ratas tratadas con E₂. Posteriormente, mediante la inmunolocalización de la proteína caspasa-3 activa nos permitió corroborar que la mayoría de esas alteraciones morfológicas observadas a nivel óptico correspondían a la muerte celular apoptótica. Se ha reportado que el índice apoptótico más alto en el epitelio luminal ocurre durante el día del estro en donde la tasa de secreción de estradiol en el plasma ovárico es baja, además, se ha observado que existe un aumento de proteínas proapoptóticas en esta etapa del ciclo (Leblanc *et al.*, 2003; Mendoza-Rodríguez *et al.*, 2003; Levine, 2015). La

ausencia de hormona por ovariectomía, provoca resultados similares a los de rata normal en estro.

Es conocido que la apoptosis intrínseca es controlada por algunas proteínas proapoptóticas y antiapoptóticas de la familia de proteínas Bcl-2, reguladoras de la apoptosis y ejecutada por proteínas caspasas. Así mismo, la familia Bcl-2 regula la liberación del citocromo c (Revisado en Budihardjo *et al.*, 1999 & Galluzi *et al.*, 2018). Diversos estudios en células MCF-7, han observado que la hormona E₂ induce la transcripción del gen Bcl-2 aumentando la expresión de la proteína Bcl-2 hasta 1.7 veces. Igualmente, el E₂ puede crear un entorno antiapoptótico mediante la inhibición de las proteínas pro-apoptóticas Bak y BAD. Diferentes trabajos señalan que estos efectos del E₂ se expresan una vez que se une al receptor (Leung & Wang, 1998; Perillo *et al.*, 2000; Choi *et al.*, 2001; Romaine & Jay, 2004). Los resultados obtenidos por parte del epitelio de rata castrada tratada con E₂ son congruentes con los de Gompel *et al.* (2000) ya que observaron un aumento bifásico en la expresión de Bcl-2 en células MCF-7 a las 2 y 8 h después del tratamiento con E₂, lo que coincide con la disminución en la incidencia de células con morfología alterada congruente con apoptosis reportada en este trabajo. A pesar de ello, Wu *et al.* (2003) mencionan que la mayoría de los genes modificados por la ovariectomía no muestran una regulación normal por el tratamiento de adición de estradiol, lo que puede reflejar la importancia de otros factores derivados del ovario para la homeostasis uterina.

Igualmente, en los resultados obtenidos a nivel óptico se encontraron células en el tejido epitelial endometrial de rata normal y de rata castrada en las que el núcleo estaba rodeado por un halo claro y que, a nivel ultraestructural, hacen pensar que corresponde a otro mecanismo de muerte celular similar a paraptosis, en donde las dilataciones alargadas que se presentan corresponden al retículo endoplásmico rugoso, también se encuentran grados altos de vacuolización y mitocondrias hinchadas y aglomeradas (Figura 22 y 24). Sperandio *et al.* (2000) había reportado que la muerte celular paraptótica es independiente de caspasa-3 activa. Lo anterior, sumado a que en nuestros resultados de inmunolocalización de la caspasa-3 activa

fueron negativos, son factores altamente sugerentes de una pérdida de las células del epitelio endometrial uterino de ratas normales y castradas por la vía de muerte paraptótica, la cual no había sido reportada en este tejido. Dado que este tipo de muerte celular solo se presentó en epitelio ausente de E₂ (ratas ovariectomizadas) o con niveles basales de E₂ (ratas en estro), se sugiere que esta hormona pueda regular este tipo de muerte con tratamiento de E₂.

10. Conclusiones

- ❖ Las células epiteliales de ratas castradas tratadas con estradiol, tienen mayor actividad transcripcional durante las primeras horas del tratamiento
- ❖ La ausencia de hormona por ovariectomía, provoca un índice alto de células con morfología alterada sugerente de muerte celular apoptótica.
- ❖ El tratamiento con estradiol de 2 horas en adelante muestra más cambios en el nucléolo que en el núcleo y citoplasma.

- ❖ A las 2 y 8 horas con tratamiento de E₂ hay menor incidencia de células con morfología alterada congruente con apoptosis.
- ❖ Se presenta un deterioro en el transporte de ARN a partir de las 2 horas con el tratamiento.
- ❖ El tratamiento con 8 horas de estradiol es parcialmente suficiente para revertir las consecuencias de la ovariectomía.
- ❖ El tratamiento con 8 horas de estradiol no es suficiente para observar un índice mitótico significativo.
- ❖ Es necesario estudiar el comportamiento que tienen las células con mayores tiempos de tratamiento.
- ❖ Se sugiere que la paraptosis sea una vía diferente de muerte celular epitelial endometrial, además de apoptosis y necrosis.

11. Referencias

- Alberts, B. & Bray, D. (2006). DNA y cromosomas. En *Introducción a la biología celular* (pp. 183-184). Editorial Médica Panamericana.
- Bajo, J. & Coroleu, B. (2009). Desarrollo mulleriano, ciclo endometrial, cervical y tubárico. En *Fundamentos de reproducción* (p. 32). Editorial Médica Panamericana.

- Bergman, M., Schachter, B., Karelus, K., Combatsiaris, E., García, T. & Nelson, J. (1992). Up-regulation of the uterine estrogen receptor and its messenger ribonucleic acid during the mouse estrous cycle: the role of estradiol. *Endocrinology*. 130(4), 1923-1930. <https://doi.org/10.1210/en.130.4.1923>
- Bertalanffy, F. D., & Lau, C. (1963). MITOTIC RATES, RENEWAL TIMES, AND CYTODYNAMICS OF THE FEMALE GENITAL TRACT EPITHELIA IN THE RAT. *Cells Tissues Organs*, 54(1-2), 39-81. <https://doi.org/10.1159/000142437>
- Biggiogera, M., Cisterna, B., Grazia, M., Soldani, C. & Pellicciari, C. (2007). Nuclear RNP and nucleolar-associated proteins during apoptosis: a politically correct form of segregation? *Dynamic Cell Biology*, 1(1), 65-71.
- Boisvert, F., Koningsbruggen, S., Navascués, J. & Lamond, A. (2007). The multifunctional nucleolus. *Nat Rev Mol Cell Biol*, 8, 574-585. <https://doi.org/10.1038/nrm2184>
- Boyd, K., Muehlenbachs, A., Rendi, M., García, R., y Gibson-Corley, K. (2018). Female reproductive system. En Treuting, P. M., Dintzis, S., & Montine, K. S. (Eds.), *Comparative Anatomy and Histology* (2da ed., pp. 303-334). Academic Press.
- Brahmachari, G. (2015). Selective Estrogen Receptor Modulators (SERMs) from Plants. En *Bioactive natural products* (pp. 375-376). Wiley-VCH.
- Bröker, L., Kruyt, F. & Giaccone, G. (2007). Cell death independent of caspases; a review. En *Novel microtubule-stabilizing agents preclinical and clinical studies*. (pp. 85-106).
- Budihardjo, I., Oliver, H., Lutter, M., Luo, X., & Wang, X. (1999). Biochemical Pathways of Caspase Activation During Apoptosis. *Annual Review of Cell and Developmental Biology*, 15(1), 269-290. <https://doi.org/10.1146/annurev.cellbio.15.1.269>

- Cahua, J., Flores, E., & Cruz, M. (2016). Receptor de estrógenos alfa en obesidad y diabetes. *Revista Medica del Instituto Mexicano del Seguro Social*, 54(4), 521–530.
- Cascales (2003). Bases moleculares de la apoptosis. *Anal. Real Acad. Nal. Farm.* 69(1), 36-64
- Castro, S. & Covarrubias, L. (2003). Muerte celular programada. En Jiménez, L. & Merchant, H. (Eds.), *Biología celular y molecular*. (pp. 617-661). Pearson Educación.
- Cavanaugh, A., Hirschler-Laszkiwicz, I & Rothblum, L. (2004). Ribosomal DNA Transcription in Mammals. En Olson, M. (Ed.), *The Nucleolus* (pp. 88-127). Texas: Kluwer Academic.
- Chipuk, J. E., & Green, D. R. (2005). Do inducers of apoptosis trigger caspase-independent cell death? *Nature Reviews Molecular Cell Biology*, 6(3), 268–275. <https://doi.org/10.1038/nrm1573>
- Choi, K., Kang, S., Tai, C., Auersperg, N., & Leung, P. (2001). Estradiol Up-Regulates Antiapoptotic Bcl-2 Messenger Ribonucleic Acid and Protein in Tumorigenic Ovarian Surface Epithelium Cells. *Endocrinology*, 142(6), 2351–2360. <https://doi.org/10.1210/endo.142.6.8144>
- Cooke, P. S., Buchanan, D. L., Young, P., Setiawan, T., Brody, J., Korach, K. S., Taylor, J., Lubahn, D. B., & Cunha, G. R. (1997). Stromal estrogen receptors mediate mitogenic effects of estradiol on uterine epithelium. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 94(12), 6535–6540. <https://doi.org/10.1073/pnas.94.12.6535>.
- Cooke, P. S., Ekman, G. C., Kaur, J., Davila, J., Bagchi, I. C., Clark, S. G., Dziuk, P. J., Hayashi, K., & Bartol, F. F. (2012). Brief Exposure to Progesterone During a Critical Neonatal Window Prevents Uterine Gland Formation in Mice¹.

- Craig, J. (2003). Antiestrogens and Selective Estrogen Receptor Modulators as Multifunctional Medicines. 1. Receptor Interactions. *Journal of Medicinal Chemistry*, 46(6), 883–908. <https://doi.org/10.1021/jm020449y>
- De la Cruz, R. & Pásaro, R. (1998). Control endocrino del ciclo reproductor en la rata: una experiencia docente utilizando un método de caracterización citológico. *Revista de enseñanza universitaria*. 545-554.
- Eby, M. T., Jasmin, A., Kumar, A., Sharma, K., & Chaudhary, P. M. (2000). TAJ, a Novel Member of the Tumor Necrosis Factor Receptor Family, Activates the c-Jun N-terminal Kinase Pathway and Mediates Caspase-independent Cell Death. *Journal of Biological Chemistry*, 275(20), 15336–15342. <https://doi.org/10.1074/jbc.275.20.15336>
- Echeverría, O. M., Maciel, A. G., Traish, A. M., Wotiz, H. H., Ubaldo, E., & Vázquez-Nin, G. H. (1994). Immuno-electron microscopic localization of estradiol receptor in cells of male and female reproductive and non-reproductive organs. *Biology of the Cell*, 81(3), 257–265. [https://doi.org/10.1016/0248-4900\(94\)90008-6](https://doi.org/10.1016/0248-4900(94)90008-6)
- Echeverría, O., Santini, R. P., & Nin, G. V. (1991). Effects of testosterone on nuclear ribonucleoprotein components of prostate epithelial cells. *Biology of the Cell*, 72(3), 223–229. <https://doi.org/10.1111/j.1768-322x.1991.tb03019.x>
- Echeverría, O. M., Vázquez-Nin, G. H., & Pedron, J. (1980). A rapid method for the isolation and culture of endometrial epithelial cells responsive to estradiol. *Cells Tissues Organs*, 106(1), 45–56. <https://doi.org/10.1159/000145168>
- Echeverría, O., González, A., Traish, A., Wotiz, H., Ubaldo, E. & Vázquez-Nin, G. (1994). Inmuno-electron microscopic localization of estradiol receptor in cells

of male and female reproductive and non-reproductive organs. *Biology of the cell*, 81(3), 257-265. [https://doi.org/10.1016/0248-4900\(94\)90008-6](https://doi.org/10.1016/0248-4900(94)90008-6)

Echeverría, O. & Vázquez Nin, G. (1995). *El núcleo celular interfásico*. Fac Ciencias, UNAM.

Echeverría, O. & Ontiveros, F. (2001). *Biología del Núcleo Celular*. Las prensas de ciencias. 126 pp.

Echeverría, O., Thampan, R., Juárez-Chavero, S., & Hernández-Pérez, A. (2009). Immunocytochemical study of estrogen receptor activation factor (E-RAF) and the proteins that interact with nuclear estrogen receptor II (nER II) in epithelial endometrial cells, in the presence and in the absence of estradiol. *European Journal of Histochemistry*, 49(1), 67-74. <https://doi.org/10.4081/929>

Edinger, A. L., & Thompson, C. B. (2004). Death by design: apoptosis, necrosis and autophagy. *Current Opinion in Cell Biology*, 16(6), 663–669. <https://doi.org/10.1016/j.ceb.2004.09.011>

Escobar, M. L., Echeverría, O. M., Ortiz, R., & Vázquez-Nin, G. H. (2008). Combined apoptosis and autophagy, the process that eliminates the oocytes of atretic follicles in immature rats. *Apoptosis*, 13(10), 1253–1266. <https://doi.org/10.1007/s10495-008-0248-z>

Escobar, M., Vázquez-Nin, G. & Echeverría, O. (2011). Apoptosis. En Vázquez-Nin, G., Escobar, M., De Felici, M., Echeverría, O. & Klinger F. (Eds.) *Cell death in mammalian ovary*. (pp. 63-80). Springer.

Escobar, M., Vázquez-Nin, G. & Echeverría, O. (2011). Autophagy. En Vázquez-Nin, G., Escobar, M., De Felici, M., Echeverría, O. & Klinger F. (Eds.) *Cell death in mammalian ovary*. (pp. 81-102). Springer.

Filipiak, Y., Viqueira, M. & Bielli, A. (2016). Desarrollo y dinámica de los folículos ováricos desde la etapa fetal hasta la prepuberal en bovinos. *Veterinaria (Montevideo)*, 52(202): 14-22.

- Fink, S. L., & Cookson, B. T. (2005). Apoptosis, Pyroptosis, and Necrosis: Mechanistic Description of Dead and Dying Eukaryotic Cells. *Infection and Immunity*, 73(4), 1907–1916. <https://doi.org/10.1128/iai.73.4.1907-1916.2005>
- Frías, M. & Ortega, M. (2013). *Manual de prácticas de fisiología veterinaria*. (pp. 69-78). FMVZ, UNAM.
- Galluzi, L. Vitale, I., Aaronson, S. *et al.* (2018). Molecular mechanisms of cell death: recommendations of the nomenclature committee on cell death. *Cell death differ.* 25: 486-541. <https://doi.org/10.1038/s41418-017-0012-4>
- García, M., & Vecino, E. (2003). Vías de señalización intracelular que conducen a la apoptosis de las células de la retina. *Archivos de la Sociedad Española de Oftalmología*, 78(7). <https://doi.org/10.4321/s0365-66912003000700004>
- Gargett, C. E., Nguyen, H. P. T., & Ye, L. (2012). Endometrial regeneration and endometrial stem/progenitor cells. *Reviews in Endocrine and Metabolic Disorders*, 13(4), 235–251. <https://doi.org/10.1007/s11154-012-9221-9>
- Gartner, L. & Hiatt, J. (2002). *Texto Atlas de Histología*. (pp. 450- 452). McGraw- Hill Interamericana.
- Gerbi, S. (2003). The nucleolus: a site of ribonucleoprotein maturation. *Current Opinion in Cell Biology*, 15(3), 318–325. [https://doi.org/10.1016/s0955-0674\(03\)00049-8](https://doi.org/10.1016/s0955-0674(03)00049-8)
- Golstein, P., & Kroemer, G. (2007). Cell death by necrosis: towards a molecular definition. *Trends in Biochemical Sciences*, 32(1), 37–43. <https://doi.org/10.1016/j.tibs.2006.11.001>
- Gompel, A. (2000). Hormonal regulation of apoptosis in breast cells and tissues. *Steroids*, 65(10–11), 593–598. [https://doi.org/10.1016/s0039-128x\(00\)00172-0](https://doi.org/10.1016/s0039-128x(00)00172-0)

- González-Oliver, A., Echeverria, B. O. M., Hernández-Pando, R., & Vazquez-Nin, G. H. (1997). Ultrastructural Study of the Nuclei of Normal, Dysplastic, and Carcinomatous Epithelial Cells of the Human Cervix Uteri. *Ultrastructural Pathology*, 21(4), 379–392. <https://doi.org/10.3109/01913129709021936>
- Gray, C. A., Bartol, F. F., Tarleton, B. J., Wiley, A. A., Johnson, G. A., Bazer, F. W., & Spencer, T. E. (2001). Developmental Biology of Uterine Glands¹. *Biology of Reproduction*, 65(5), 1311–1323. <https://doi.org/10.1095/biolreprod65.5.1311>
- Hall, J. M., & McDonnell, D. P. (1999). The Estrogen Receptor β -Isoform (ER β) of the Human Estrogen Receptor Modulates ER α Transcriptional Activity and Is a Key Regulator of the Cellular Response to Estrogens and Antiestrogens¹. *Endocrinology*, 140(12), 5566–5578. <https://doi.org/10.1210/endo.140.12.7179>
- Ham, A. & Cormack, D. (1984). *Tratados de histología* (8° edición, pp. 957- 959). Interamericana.
- Hamilton, T. H. (1968). Control by Estrogen of Genetic Transcription and Translation. *Science*, 161(3842), 649–661. <https://doi.org/10.1126/science.161.3842.649>
- Hernandez-Verdun, D. (2005). Nucleolus: from structure to dynamics. *Histochemistry and Cell Biology*, 125(1–2), 127–137. <https://doi.org/10.1007/s00418-005-0046-4>
- Hoa, N., Myers, M. P., Douglass, T. G., Zhang, J. G., Delgado, C., Driggers, L., Callahan, L. L., VanDeusen, G., Pham, J. T. H., Bhakta, N., Ge, L., & Jadus, M. R. (2009). Molecular Mechanisms of Paraptosis Induction: Implications for a Non-Genetically Modified Tumor Vaccine. *PLoS ONE*, 4(2), 1-16. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0004631>

- Huang, C. C., Orvis, G. D., Wang, Y., & Behringer, R. R. (2012). Stromal-to-Epithelial Transition during Postpartum Endometrial Regeneration. *PLoS ONE*, 7(8), 1-8. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0044285>
- Jambrina, E., Alonso, R., Alcalde, M., del Carmen Rodríguez, M., Serrano, A., Martínez-A., C., García-Sancho, J., & Izquierdo, M. (2003). Calcium Influx through Receptor-operated Channel Induces Mitochondria-triggered Paraptotic Cell Death. *Journal of Biological Chemistry*, 278(16), 14134–14145. <https://doi.org/10.1074/jbc.m211388200>
- Jiménez-García, E., Tapia-Vieyra, T. & Mas-Oliva, J. (2004). El esplaiceosoma: corte y empalme del pre-ARNm. *REB*, 23(2), 59-63.
- Kelly, M. J., & Levin, E. R. (2001). Rapid actions of plasma membrane estrogen receptors. *Trends in Endocrinology & Metabolism*, 12(4), 152–156. [https://doi.org/10.1016/s1043-2760\(01\)00377-0](https://doi.org/10.1016/s1043-2760(01)00377-0)
- Kerr, J. F. R., Wyllie, A. H., & Currie, A. R. (1972). Apoptosis: A Basic Biological Phenomenon with Wideranging Implications in Tissue Kinetics. *British Journal of Cancer*, 26(4), 239–257. <https://doi.org/10.1038/bjc.1972.33>
- Khalili, M. & Radosevich, A. (2018). Paraptosis. En James, A. & Radosevich, Ph. D., *Apoptosis and Beyond*, (pp. 343- 366). Wiley-BlackWell.
- Klinge, C. M. (2001). Estrogen receptor interaction with estrogen response elements. *Nucleic Acids Research*, 29(14), 2905–2919. <https://doi.org/10.1093/nar/29.14.2905>
- Krause, W. (2005). *Krauses's essential human histology for medical students* (3^o edición, pp. 244- 245). Universal publishers.
- Lannigan, D. A. (2003). Estrogen receptor phosphorylation. *Steroids*, 68(1), 1–9. [https://doi.org/10.1016/s0039-128x\(02\)00110-1](https://doi.org/10.1016/s0039-128x(02)00110-1)
- Leblanc, V., Dery, M., Shooner, C. & Asselin, E. (2003). Oposite regulation of XIAP and Smac/DIABLO in the rat endometrium in response to 17 β -estradiol at

estrus. *Reproductive biology and endocrinology*. 1, 1-12.
<https://doi.org/10.1186/1477-7827-1-59>

Leung, L. & Wang, T. (1998). Regulation of death promoter Bak expression by cell density and 17 β -estradiol in MCF-7 cells. *Cancer letters*. 124(1), 47-52.
[https://doi.org/10.1016/s0304-3835\(97\)00430-8](https://doi.org/10.1016/s0304-3835(97)00430-8).

Levine, J. (2015). Neuroendocrine control of the ovarian cycle of the rat. En: *Knobil and Neill's physiology of the reproduction*. (pp. 1199-1257)

Linares, N., Millán, Y., Garrido-Gracia, J., Gordon, A., Sánchez-Criado, J., Martín De Las Mulas González-Albo, J., & Aguilar, R. (2010). Utilidad de los agonistas, moduladores selectivos y antagonistas puros del receptor de estrógenos en estudios morfofuncionales del útero de la rata. *Anales de la Real Academia de Ciencias Veterinarias de Andalucía Oriental*, 23, 97–109.

Lombardi, M., Castoria, G., Migliaccio, A., Barone, M. V., di Stasio, R., Ciociola, A., Bottero, D., Yamaguchi, H., Appella, E., & Auricchio, F. (2008). Hormone-dependent nuclear export of estradiol receptor and DNA synthesis in breast cancer cells. *Journal of Cell Biology*, 182(2), 327–340.
<https://doi.org/10.1083/jcb.200712125>

Maciel-Herrerías, M., & Cabrera-Benítez, S. (2016). El papel de la autofagia en enfermedades pulmonares. *NCT Neumología y Cirugía de Tórax*, 75(3), 227–236. <https://doi.org/10.35366/67952>

Martin, L. & Finn. C. (1968) Hormonal regulation of cell division in epithelial and connective tissues of the mouse uterus. *Journal of Endocrinology*, 41(3), 363-371. <https://doi.org/10.1677/joe.0.0410363>

- Martin, L., Finn, C. & Trinder, G. (1973) Hypertrophy and hyperplasia in the mouse uterus after oestrogen treatment: an autoradiographic study. *Journal of Endocrinology*, 56(1), 133-144. <https://doi.org/10.1677/joe.0.0560133>
- Mendoza-Rodríguez, C. (2003). Pro-apoptotic signals of the bcl-2 gene family in the rat uterus occurs in the night before the day of estrus and precedes ovulation. *Molecular and Cellular Endocrinology*, 208(1–2), 31–39. [https://doi.org/10.1016/s0303-7207\(03\)00258-2](https://doi.org/10.1016/s0303-7207(03)00258-2)
- Meresman, G. (2009). Apoptosis y su impacto en la reproducción femenina. *Revista de la Sociedad Argentina de Endocrinología Ginecológica y Reproductiva (SAEGRE)*. 16(1), 4-15.
- Noriega-Reyes, M. Y., & Langley, E. (2008). Correguladores del receptor de estrógenos y su implicación en el cáncer mamario. *Cancerología*, 3, 29–40.
- Norma Oficial Mexicana (1999). Especificaciones técnicas para la producción, cuidado y uso de los animales de laboratorio. NOM-062-ZOO-1999. Diario Oficial de la Federación.
- Peña-Sanoja, M. & Bautista, J. (2013). *Autofagia y respuesta inmunitaria. Investigación clínica*. 54(3): 325-337.
- Pérez, M. & Eliécer, A. (2012). Apoptosis, mecanismo de acción. *Revista de ciencias médicas de Mayabeque*. 18(2), 1-16.
- Perillo, B., Sasso, A., Abbondanza, C., & Palumbo, G. (2000). 17 β -Estradiol Inhibits Apoptosis in MCF-7 Cells, Inducing bcl-2 Expression via Two Estrogen-Responsive Elements Present in the Coding Sequence. *Molecular and Cellular Biology*, 20(8), 2890–2901. <https://doi.org/10.1128/mcb.20.8.2890-2901.2000>
- Picut, C. & Remick, A. (2016). Female reproductive system. En Parker, G. & Picut, C., *Atlas of Histology of the Juvenile Rat*. (pp. 303-334). Elsevier Gezondheidszorg.

- Pollard, J., Pacey, J., Cheng, S., & Jordan, E. (1987). Estrogens and cell death in murine uterine luminal epithelium. *Cell and Tissue Research*, 249(3). <https://doi.org/10.1007/bf00217324>
- Quarmby, V. & Korach, K. (1984). The Influence of 17 β -Estradiol on Patterns of Cell Division in the Uterus. *Endocrinology*, 114(3), 694–702. <https://doi.org/10.1210/endo-114-3-694>
- Ramírez, M. & Rojas, M. (2009). La necrosis, un mecanismo regulado de muerte celular. *IATREIA*. 23(2), 166-177.
- Romaine, I. & Jay, W. (2004). Estradiol Abrogates Apoptosis in Breast Cancer Cells through Inactivation of BAD: Ras-dependent Nongenomic Pathways Requiring Signaling through ERK and Akt. *Molecular Biology of the Cell*. 15(7), 3266-3284. <https://doi.org/10.1091/mbc.e03-11-0823>
- Ross M, Pawlina W. (2015). El núcleo celular. En Ross M, Pawlina W. (Eds.), *Histología, texto y atlas, Correlación con Biología Molecular y Celular* (pp. 81-86). Editorial Médica Panamericana.
- Russel, F. (2008). The Female Rat Reproductive Cycle: A Practical Histological Guide to Staging. *Toxicologic Pathology*, 36(3), 375–384. <https://doi.org/10.1177/0192623308315665>
- Saikumar, P. & Venkatachalam, M. (2009). Apoptosis and Cell Death. En Cagle, P. & Allen, T. (Eds.) *Basic concepts of molecular pathology*. (pp 29-40). Springer.
- Sánchez, V. (2001). Mecanismos reguladores de la muerte celular no necrótica. *Revista Cubana Investigación Biomédica*. 20(4), 266-274.
- Sánchez-Suarez, P., & Benítez-Bribiesca, L. (2003). Receptores estrogénicos alfa y beta en cáncer de mama. *Acta Medica Grupo Angeles*, 1(3), 159–161.
- Sánchez, L., Puente, L., Lares, E. & Milla, H. (2007). Receptores de estrógenos en la hiperplasia y el adenocarcinoma de endometrio: estudio

inmunohistoquímico con análisis de imagen. *Revista de Ginecología y Obstetricia de México*. 75(9), 501-508

Sadow, B. A., West, N. B., Norman, R. L., & Brenner, R. M. (1979). Hormonal control of apoptosis in hamster uterine luminal epithelium. *American Journal of Anatomy*, 156(1), 15–35. <https://doi.org/10.1002/aja.1001560103>

Sato, T., Fukazawa, Y., Kojima, H., Enari, M., Iguchi, T. & Ohta, Y. (1997). Apoptotic cell death during the estrous cycle in the rat uterus and vagina. *The anatomical record*. 248, 76–83. [https://doi.org/10.1002/\(SICI\)1097-0185\(199705\)248:1<76::AID-AR9>3.0.CO;2-D](https://doi.org/10.1002/(SICI)1097-0185(199705)248:1<76::AID-AR9>3.0.CO;2-D).

Schuur, E. R., Loktev, A. V., Sharma, M., Sun, Z., Roth, R. A., & Weigel, R. J. (2001). Ligand-dependent Interaction of Estrogen Receptor- α with Members of the Forkhead Transcription Factor Family. *Journal of Biological Chemistry*, 276(36), 33554–33560. <https://doi.org/10.1074/jbc.m105555200>

Segura-Váldez, M., Negrete, C., Rodríguez, Y. Sáenz, A., Lara, R., De Jesús, J., Gómez, C. & Jiménez-García, L. (2007). Organización intranuclear de proteínas SR en vertebrados. *Revista Especializada en Ciencias Químico-Biológicas*, 10(2), 65-69.

Smith, C. L., & O'Malley, B. W. (2004). Coregulator Function: A Key to Understanding Tissue Specificity of Selective Receptor Modulators. *Endocrine Reviews*, 25(1), 45–71. <https://doi.org/10.1210/er.2003-0023>

Soberón, F. (2003). Las proteínas. En Jiménez, L. & Merchant, H. (Eds.), *Biología celular y molecular*, (pp. 43-62). PEARSON EDUCACIÓN.

Sperandio, S., de Belle, I., & Bredesen, D. E. (2000). An alternative, nonapoptotic form of programmed cell death. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 97(26), 14376–14381. <https://doi.org/10.1073/pnas.97.26.14376>

Sperandio, S., Poksay, K., de Belle, I., Lafuente, M. J., Liu, B., Nasir, J., & Bredesen, D. E. (2004). Paraptosis: mediation by MAP kinases and inhibition by AIP-

- 1/Alix. *Cell Death & Differentiation*, 11(10), 1066–1075.
<https://doi.org/10.1038/sj.cdd.4401465>
- Spornitz, U. M., Rinderknecht, B. P., Edelmann, A., Scheidegger, B., & Cairoli, F. (1994). Ultrastructure as a basis for dating of rat endometrium. *The Anatomical Record*, 238(2), 163–176. <https://doi.org/10.1002/ar.1092380203>
- Tachi, C., Tachi, S. & Lindner, H. (1972). Modification by progesterone of oestradiol-induced cell proliferation, RNA synthesis and oestradiol distribution in the rat uterus *Reproduction*, 31(1), 59–76. <https://doi.org/10.1530/jrf.0.0310059>
- Tachi, C., Tachi, S., & Lindner, H. R. (1974). Effects of Ovarian Hormones upon Nucleolar Ultrastructure in Endometrial Stromal Cells of the Rat. *Biology of Reproduction*, 10(4), 404–413. <https://doi.org/10.1095/biolreprod10.4.404>
- Torres-Ramírez, N., Escobar, M. L., Vázquez-Nin, G. H., Ortiz, R., & Echeverría, O. M. (2016). Paraptosis-like cell death in Wistar rat granulosa cells. *Development, Growth & Differentiation*, 58(8), 651–663. <https://doi.org/10.1111/dgd.12322>
- Vanlangenakker, N., Berghe, T., Krysko, D., Festjens, N., & Vandenabeele, P. (2008). Molecular Mechanisms and Pathophysiology of Necrotic Cell Death. *Current Molecular Medicine*, 8(3), 207–220. <https://doi.org/10.2174/156652408784221306>
- Vazquez-Nin, G. & Bernhard, W. (1971). Comparative ultrastructural study of perichromatin- and balbiani ring granules. *Journal of Ultrastructure Research*, 36(5–6), 842–860. [https://doi.org/10.1016/s0022-5320\(71\)90034-7](https://doi.org/10.1016/s0022-5320(71)90034-7)
- Vázquez-Nin, G. H., Echeverría, O. M., Molina, E., & Fragoso, J. (1978). Effects of ovariectomy and estradiol injection on nuclear structures of endometrial epithelial cells. *Cells Tissues Organs*, 102(3), 308–318. <https://doi.org/10.1159/000145651>

- Vázquez-Nin, G., Echeverría, O.M.; Pedron, J. (1979). Effects of estradiol on the ribonucleoprotein constituents of the nucleus of cultured endometrial epithelial cells. *Biol. Cell.* 35, 221-228.
- Vázquez-Nin, G., Echeverría, O. M., Zavala, G., Jiménez-García, L. F., Gozalez, M. A., & Parra, R. (1986). Relations between Nucleolar Morphometric Parameters and Pre-rRNA Synthesis in Animal and Plant Cells. *Cells Tissues Organs*, 126(3), 141–146. <https://doi.org/10.1159/000146203>
- Vázquez-Nin, G., Echeverría, O., Fakan, S., Traish, A., Wotiz, H., & Martin, T. (1991). Immunoelectron microscopic localization of estrogen receptor on pre-mRNA containing constituents of rat uterine cell nuclei. *Experimental Cell Research*, 192(2), 396–404. [https://doi.org/10.1016/0014-4827\(91\)90057-2](https://doi.org/10.1016/0014-4827(91)90057-2)
- Vázquez-Nin, G., Echeverría, O., Ortiz, R., Ubaldo, E., & Fakan, S. (1997). Effects of Hypophyseal Hormones on Transcription and RNA Export to the Cytoplasm. *Experimental Cell Research*, 236(2), 519–526. <https://doi.org/10.1006/excr.1997.3696>
- Vázquez-Nin, G., Echeverría, O. & Jiménez, L. (2003). El núcleo interfásico, morfología y función. En Jiménez, L.& Merchant, H. (Eds.), *Biología celular y molecular*, (pp. 341-381). PEARSON EDUCACIÓN.
- Vinatier, D., Dufour, P., & Subtil, D. (1996). Apoptosis: A programmed cell death involved in ovarian and uterine physiology. *European Journal of Obstetrics & Gynecology and Reproductive Biology*, 67(2), 85–102. [https://doi.org/10.1016/0301-2115\(96\)02467-0](https://doi.org/10.1016/0301-2115(96)02467-0)
- Wang, Y., Li, X., Wang, L., Ding, P., Zhang, Y., Han, W., & Ma, D. (2003). An alternative form of paraptosis-like cell death, triggered by TAJ/TROY and enhanced by PDCD5 overexpression. *Journal of Cell Science*, 117(8), 1525–1532. <https://doi.org/10.1242/jcs.00994>
- Wawrzak, Z., Duax, W. L., Strong, P. D., & Weisz, J. (1988). Steroid structure and function. Molecular conformation of 4-hydroxyestradiol and its relation to other

catechol estrogens. *Journal of Steroid Biochemistry*, 29(4), 387–392.
[https://doi.org/10.1016/0022-4731\(88\)90247-6](https://doi.org/10.1016/0022-4731(88)90247-6)

Winuthayanon, W., Hewitt, S. C., Orvis, G. D., Behringer, R. R., & Korach, K. S. (2010). Uterine epithelial estrogen receptor is dispensable for proliferation but essential for complete biological and biochemical responses. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 107(45), 19272–19277.
<https://doi.org/10.1073/pnas.1013226107>

Wood, G. A., Fata, J. E., Watson, K. L. M., & Khokha, R. (2007). Circulating hormones and estrous stage predict cellular and stromal remodeling in murine uterus. *Reproduction*, 133(5), 1035–1044. <https://doi.org/10.1530/rep-06-0302>

Wu, X. (2003). Gene Expression Profiling of the Effects of Castration and Estrogen Treatment in the Rat Uterus. *Biology of Reproduction*, 69(4), 1308–1317.
<https://doi.org/10.1095/biolreprod.103.015420>

Wynn, R. & Jollie, W. (1989). *Biology of uterus*, (2° edición, pp. 512-516). Plenum Publishing Corporation

Yamamoto, K. (1985). Steroid Receptor Regulated Transcription of Specific Genes and Gene Networks. *Annual Review of Genetics*, 19(1), 209–252.
<https://doi.org/10.1146/annurev.ge.19.120185.001233>

Yumnam, S., Park, H. S., Kim, M. K., Nagappan, A., Hong, G. E., Lee, H. J., Lee, W. S., Kim, E. H., Cho, J. H., Shin, S. C., & Kim, G. S. (2014). Hesperidin Induces Paraptosis Like Cell Death in Hepatoblastoma, HepG2 Cells: Involvement of ERK1/2 MAPK. *PLoS ONE*, 9(6), e101321.
<https://doi.org/10.1371/journal.pone.0101321>

Zhang, C., Jiang, Y., Zhang, J., Huang, J., & Wang, J. (2015). 8-p-Hdroxybenzoyl Tovarol Induces Paraptosis Like Cell Death and Protective Autophagy in Human Cervical Cancer HeLa Cells. *International Journal of Molecular Sciences*, 16(12), 14979–14996. <https://doi.org/10.3390/ijms160714979>

Zhang, Q., & Paria, B. C. (2006). Importance of Uterine Cell Death, Renewal, and Their Hormonal Regulation in Hamsters that Show Progesterone-Dependent Implantation. *Endocrinology*, 147(5), 2215–2227. <https://doi.org/10.1210/en.2005-1555>

Zhang, Z., Laping, J., Glasser, S., Day, P., & Mulholland, J. (1998). Mediators of Estradiol-Stimulated Mitosis in the Rat Uterine Luminal Epithelium1. *Endocrinology*, 139(3), 961–966. <https://doi.org/10.1210/endo.139.3.5794>