



UNIVERSIDAD NACIONAL AUTONOMA DE MEXICO

Facultad de Ciencias

**VARIACIONES EN EL VOLUMEN NUCLEAR Y
NUCLEOLAR EN CELULAS ENDOMETRIALES DE
RATA (Rattus rattus) DURANTE LOS PRIMEROS
DIAS DE LA PREÑEZ.**

T E S I S

Que para obtener el título de:

B I O L O G O

P r e s e n t a :

FRANCISCO RAMON BARBOSA SALAZAR

México

1984



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 está 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.

A Sara (el amor convertido en mujer).

A mis padres, Agustín (q.e.p.d.) y Rosa.

A mis hermanos Marisela y Pedro.

A todas las personas que por una u otra razón no tienen la oportunidad de cursar estudios universitarios.

Agradecimientos:

Al Dr. Gerardo H. Vázquez Nin por su sólido apoyo intelectual.

A la Dra. Olga M. Echeverría. Quien siempre me motivó. Su respaldo profesional y humano subyace en cada una de las páginas de este trabajo.

A la Biol. Leonor Peralta y a la M. en C. - María Cristina Márquez por la revisión del manuscrito.

A Guadalupe y Alicia por compartir conmigo momentos de oscuridad y confusión, preludio del amanecer.

A todos los profesores que a lo largo de mi historia escolar me dieron algo de sí mismos.

VARIACIONES EN EL VOLUMEN NUCLEAR Y NUCLEOLAR EN CELULAS EN-
DOMETRIALES DE RATA (Rattus rattus) DURANTE LOS PRIMEROS DIAS
DE LA PREÑEZ.

- I. Introducción.
- II. Núcleo interfásico.
 - II.1 Membrana nuclear.
 - II.2 Lamina densa.
 - II.3 Cromatina.
 - II.4 Nucleolo.
 - II.5 Nucleoproteínas.
- III. Hormonas esteroides.
 - III.1 Estrógenos.
 - III.2 Progesterona.
- IV. Endometrio y ciclo estral.
- V. Planteamiento del problema.
- VI. Material y métodos.
 - VI.1 De la especie animal.
 - VI.2 De la fijación.
 - VI.3 De la deshidratación.
 - VI.4 De la pre-inclusión é inclusión.
 - VI.5 De los cortes.
 - VI.6 Estadística.
- VII. Resultados.
- VIII. Discusión.
- IX. Conclusiones.
- X. Bibliografía.

I. INTRODUCCION.

Se conoce desde hace tiempo que una compleja dinámica hormonal bajo el control de las secreciones de la glándula hipofisis (vgr. las hormonas gonadotropinas) regula tanto el ciclo estral como la preñez en las hembras de mamíferos. Tal dinámica afecta principalmente al endometrio el cual periódicamente se prepara para recibir al óvulo o a los óvulos fecundados y brindarles protección y nutrición adecuadas para su mejor desarrollo.

Las hormonas que actúan de manera directa sobre el endometrio son los estrógenos y la progesterona.

Los estrógenos son secretados, a partir de la pubertad, por los folículos atrésicos y por las células de la teca interna de los folículos ováricos. La progesterona, por su parte, es sintetizada por el cuerpo lúteo; durante la preñez será también sintetizada por la placenta.

Pero, ¿qué tipo de interacción se lleva a cabo entre estas hormonas y las células endometriales?, ¿cuáles son las implicaciones estructurales de dicha interacción?

Se sabe, por ejemplo, que las células endometriales epiteliales y glandulares presentan moléculas receptoras para los estrógenos y para la progesterona en el núcleo y en el citosol. Es así como pueden formarse dentro de la célula complejos hormona-receptor los cuales pueden interactuar con el material genético y reprimir o derreprimir algunos genes específicos codificados en el ácido desoxirribonucleico (ADN) lo que puede implicar un mayor o menor nivel de síntesis de ácido ribonucleico (ARN) a partir del ADN, proceso conocido como transcripción.

De acuerdo a lo anterior, es de esperarse que los efectos más notorios a nivel macromolecular y subcelular se manifiesten en la estructura del núcleo celular ya que es precisamente en este organelo donde tiene lugar el proceso de transcripción.

Considerando lo señalado anteriormente se hará una breve reseña de lo que se conoce acerca del núcleo celular, de la función de las hormonas esteroideas y finalmente de la fisiología del endometrio. En este último caso se abordará el estudio del endometrio de roedores, fundamentalmente la rata.

II. NUCLEO INTERFASICO.

El término célula aparece por vez primera en la literatura científica en el año de 1665, fecha en la que el naturalista inglés Robert Hooke publica su obra MICROGRAPHIA en la cual describe sus observaciones microscópicas de restos de células de corcho (1). Pero no es sino hasta el año de 1831, cuando otro naturalista inglés, Robert Brown, anuncia que las células de la epidermis y del parénquima de las orquídeas poseen una estructura interna a la que él denominó núcleo (28). Desde entonces se ha comprobado que casi todas las células de los organismos "superiores" presentan, en una u otra etapa de su ciclo de vida, un núcleo celular definido mientras que las células de algunos organismos "inferiores" (vgr. bacterias y virus) no poseen núcleo. Así, se ha convenido en llamar a las células nucleadas como células eucarióticas ya las anucleadas como células procarióticas o simplemente eucariontes y procariontes, respectivamente.

Las células eucarióticas pueden presentar uno o más núcleos, por ejemplo, los hepatocitos presentan en algunas ocasiones 2 núcleos mientras que las fibras del músculo estriado son multinucleadas.

La forma del núcleo puede ser esférica, ovoide o irregular. En algunos casos se ha podido observar en los núcleos, movimientos de rotación y oscilación cuya naturaleza es desconocida (21).

El núcleo funciona como depósito del material genético de la célula al cual aísla del resto del citoplasma para asegurar una mayor estabilidad fisicoquímica del material hereditario. Entre los vertebrados los núcleos más grandes se observan en células de algunos anfibios y los más pequeños en células de algunas aves.

Variaciones en el volumen nuclear se presentan en diversos tejidos de la misma especie y aún del mismo organismo independientemente del contenido de ADN. Por ejemplo, en hepatoci-

tos se ha observado la presencia de núcleos claros y grandes y núcleos oscuros, pequeños e intensamente coloreados. Bioquímicamente se conoce que los núcleos claros y de gran volumen contienen más proteínas ácidas y presentan cromatina más dispersa. Asimismo, se ha determinado que estos núcleos sintetizan más activamente el ARN (21).

Como se sabe, casi todas las células presentan un ciclo de vida llamado ciclo celular en el que se reconocen dos períodos principales: un período de división o mitosis y un período de reposo (desde el punto de vista reproductivo) llamado interfase. Durante el período de mitosis el material genético o cromatina se encuentra fuertemente condensado en forma de estructuras conocidas como cromosomas. En tanto que durante la interfase, la cromatina se halla dispuesta de una manera poco condensada.

De acuerdo con los estudios llevados a cabo entre otros por J. B. Gurdon, se ha podido demostrar que los genes son sensibles a señales químicas provenientes del citoplasma celular por lo que la expresión génica de una célula depende, en parte, de la naturaleza de los compuestos presentes en el citoplasma y que puedan penetrar al núcleo (17). El núcleo se comunica a su vez con el citoplasma por medio de estructuras tales como los ribosomas, las partículas ribonucleoproteicas prerribosomales, ácidos ribonucleicos mensajeros, etc. De esta manera podemos apreciar que el núcleo interfásico está en comunicación permanente con su entorno y que no es una estructura aislada metabólicamente del citoplasma.

Hoy día se reconoce al núcleo celular como un importante organelo constituido por varios elementos. Así, Bouteille, et. al. (7) señalan que en estado interfásico un núcleo celular "ideal" presenta los siguientes elementos: 1) membrana nuclear, 2) lámina densa, 3) cromatina, 4) nucleolo(s) y 5) nucleoproteínas.

II.1 Membrana nuclear.

La estructura de la membrana nuclear solo puede ser observada con ayuda del microscopio electrónico, mediante la cual se ha determinado que está compuesta por dos unidades de membrana que contiene un espacio perinuclear de 10 a 50 nm de espesor. La membrana interna se encuentra generalmente asociada a la cromatina mientras que la membrana externa presenta en su cara citoplásmica ribosomas que probablemente formarán polisomas. La membrana externa se continúa, a veces, con el retículo endoplásmico por lo que en ocasiones se habla de una cisterna perinuclear al referirse a la membrana nuclear.

La membrana, como un todo, presenta interrupciones en su superficie denominados poros nucleares los cuales pueden ser de forma redonda o hexagonal de 40 a 100 nm. de diámetro (21). Los poros se encuentran enmarcados por estructuras de naturaleza proteica llamados anillos.

La membrana nuclear desaparece durante la primeras fases de la mitosis normal, pero durante la telofase se restablece a partir de cisternas de retículo endoplásmico que se agregan alrededor de los cromosomas (12).

La función más importante de la membrana nuclear parece ser la de presentar un barrera que impida la libre difusión nucleo-citoplásmica de iones y metabolitos como iones de sodio, potasio y cloro, de ribonucleoproteínas, de hormonas, etc. La energía necesaria para este transporte activo a través de la membrana la suministra el adenosín trifosfato (ATP).

Los poros nucleares se relacionan con canales de nucleoplasma localizados entre acúmulos de cromatina condensada (12) lo que permite pensar que existe un flujo de sustancias del núcleo al citoplasma y viceversa, a través de los poros.

II.2 Lámina densa.

La lámina densa es una capa de material fibrilar de naturaleza proteica que mide de 150 a 800 A de espesor. Se localiza entre la capa nuclear de la membrana y la cromatina periférica asociada a la membrana. La lámina densa es más delgada enfrente de los poros nucleares. Originalmente fué llamada lámina fibrosa y se estudió en invertebrados. Su función no ha sido aún aclarada (7).

II.3 Cromatina.

En 1879 el citólogo alemán Walter Flemming llamó cromatina a ciertas estructuras presentes en el interior del núcleo celular que se teñían con colorantes básicos de anilina (2). En la actualidad se conoce como cromatina a un complejo químico formado por ADN, proteínas, fosfolípidos, cationes y ARN. Precisamente es el ADN de la cromatina el portador de la información genética de un organismo determinado.

Desde hace tiempo se ha estudiado con detalle la estructura química de la cromatina. Por ejemplo, Hewish y Burgoyne sugieren que la cromatina está formada por subunidades repetidas, llamadas nucleosomas por Pierre Chambon. Aún más, Langmore y Wooleg describen a los nucleosomas como discos de 135 A de diámetro y 55 A de espesor (32).

Mediante la digestión enzimática de un nucleosoma se obtiene una partícula central que contiene las histonas H2A, H2B, H3 y H4 y 140 pares de bases de ADN. Las partículas centrales de los nucleosomas están unidas entre sí por ADN internucleosómico.

Morfológicamente, la cromatina se puede presentar en estado compacto o condensado y en estado laxo o no condensado. Ambos estados son interconvertibles. Heitz en 1928, llamó heterocro-

matina a la cromatina condensada y eucromatina a la cromatina laxa (15). La estructura básica en cuanto al ADN es la misma en ambos estados.

Desde el punto de vista de la replicación y de la transcripción nuclear, la heterocromatina representa segmentos inactivos mientras que la eucromatina representa segmentos activos. La relación heterocromatina-eucromatina es una expresión del grado de diferenciación y maduración de una célula. Durante estos procesos la eucromatina se convierte en heterocromatina con la correspondiente disminución de la síntesis de ARN. Como se señaló anteriormente, la cromatina se condensa durante la mitosis para originar los cromosomas.

II.4 Nucleolo.

Aspecto histórico.

El nucleolo es un pequeño organelo situado en el interior del núcleo. Fue descubierto por F. Fontana en 1781 (43) y desde entonces mucho se ha avanzado en su estudio.

A finales del siglo XIX, T.H. Montgomery pensaba en el nucleolo como una estructura esférica y homogénea con propiedades básicas y ácidas. M. Ogata en 1883, clasificó los nucleolos en dos clases: plasmasomas (nucleolos acidófilos) y cariosomas (nucleolos basófilos), estos últimos con caracteres de tinción semejantes al núcleo celular. Algunos años después, M. Jorgensen señaló que la condición acidófila o basófila de los nucleolos dependía del crecimiento celular o de la síntesis de proteínas, Gates y colaboradores concluyeron en la década de los 40's que el número máximo de nucleolos por célula en una especie es constante y está en correspondencia con el número de constricciones secundarias (NOR's: Nucleolar Organizer Region) presentes en los cromosomas.

Por los mismos años J. Brachet demostró que los nucleolos son ricos en ARN. Por su parte T. Caspersson demostró el mismo he-

cho utilizando la reacción de Feulgen para la cual el nucleolo presenta resultados negativos y concluyó que el ácido presente en el nucleolo es el ARN.

M. B. E. Godward en la década de los 50's señaló la presencia de filamentos en el nucleolo. Demostró asimismo la relación existente entre el organizador nucleolar, el cromosoma nucleolar y los filamentos nucleolares. C. Estable y R. Sotelo en 1951, distinguieron el nucleolonema filamentososo y la pars amorpha en el nucleolo. Finalmente Lettré y Siebs interpretaron la región filamentososa del nucleolo como la parte activa de los cromosomas.

Estado actual.

El nucleolo tiene un tamaño variable (entre una y tres micras) según el tipo celular y puede variar incluso en el mismo tipo de células dependiendo de las condiciones fisiológicas en que se encuentre la célula. Una función reducida del nucleolo se asocia con una disminución de su masa, principalmente de la zona central, adoptando una forma de anillo. Por el contrario, si la actividad nucleolar es alta, el tamaño nucleolar se incrementa. Por ejemplo, en células cancerosas, en células en crecimiento y en células glandulares cuyas secreciones son ricas en proteínas, el nucleolo es de gran tamaño (6). Este tipo de células presentan un alto grado de producción de ribosomas y sus nucleolos contienen una mayor cantidad de cromatina internucleolar condensada en pequeñas áreas de cromatina perinucleolar (39).

Ultraestructuralmente, el nucleolo consiste de dos partes: la pars granulosa y la pars fibrosa. La pars granulosa presenta gránulos de aproximadamente 150 0 200 A de diámetro mientras que la pars fibrosa está compuesta por fibras de 50 a 100 A de diámetro constituidas por varios tipos de ARN y proteínas. Parece ser que las fibras son precursoras de los gránulos (39).

Otras estructuras que se observan con el microscopio electrónico son: una matriz amorfa y centros fibrilares, cromatina y los nucleolini.

La cromatina puede localizarse peri e intranucleolarmente. La cromatina perinucleolar consiste de fibras de 20 Å de diámetro y se conecta con la cromatina intranucleolar por medio de bandas. Varios tipos de ADN se encuentran en el nucleolo, principalmente el ADN ribosomal, rDNA.

Proteínas nucleolares importantes son algunas histonas, polimerasas, proteínas ácidas reguladoras, exo y endonucleasas, etc. Los nucleolini son elementos fibrilares de 0.2 a 0.9 micrómetros de diámetro rodeados de partículas ribonucleoproteicas que migran hacia el citoplasma en forma de cuerpos nucleares. Son inactivos desde el punto de vista de la síntesis de ARN.

El nucleolo se forma a partir de sitios específicos de algunos cromosomas denominados organizadores nucleolares (NOR's) los cuales son zonas estrechas, constricciones poco teñibles. El número de NOR's presentes en un cromosoma no necesariamente representa el número de nucleolos que habrán de formarse ya que algunos quedan sin expresarse. Los NOR's aparentemente poseen ADN ribosomal o rDNA (9).

La función de los nucleolos es la de servir como sitio donde se lleve a cabo la transcripción de ADN a ARN y la síntesis de partículas ribonucleoproteicas precursoras de los ribosomas.

Existe un fenómeno conocido como maduración del ARN que sucede dentro de los nucleolos. La transcripción del ADN origina como primer resultado la síntesis de ARN's muy grandes en peso molecular llamados pre-rARN 48S y pre-rARN 41S que después son escindidos por algunas enzimas para dar origen a moléculas más pequeñas conocidas como ARN ribosomal 28S y ARN ribosomal 18S (39).

Como se puede apreciar, la función del nucleolo es de particular importancia en la síntesis de proteínas ya que es dentro

del nucleolo donde se realiza la transcripción y se sintetiza el ARN ribosomal necesario en la síntesis de proteínas. Tanto el ARN ribosomal como las partículas ribonucleoproteicas precursoras de los ribosomas emigran hacia el citoplasma para su utilización posterior. Los nucleolos de las células endometriales están a menudo en contiguidad con invaginaciones de la membrana nuclear lo que sugiere que este sistema facilita el paso de las subunidades ribosomales hacia el citoplasma. Tal sistema de invaginaciones parece ser estimulado por la progesterona (39).

II.5 Nucleoproteínas.

El núcleo celular presenta en su interior numerosas proteínas las cuales son sintetizadas en el citoplasma, concretamente en los ribosomas, y después fluyen hacia el interior del núcleo donde generalmente se conjugan con los ácidos nucleicos para formar nucleoproteínas, la mayor parte de las cuales se encuentran localizadas en la región intercromatiniana y en el nucleolo. Se ha sugerido que puede haber síntesis proteica dentro del núcleo ya que se ha visto que núcleos aislados de hepatocitos incubados IN VITRO incorporan aminoácidos; pero no se puede extrapolar lo mismo para núcleos IN VIVO (7).

Existen dos tipos de proteínas que forman parte de los complejos nucleoproteicos: las proteínas ácidas y las proteínas básicas.

Las proteínas ácidas son sintetizadas durante todo el ciclo celular y juegan un papel muy importante en la derrepresión génica. Entre las proteínas ácidas están las fosfoproteínas que se unen a la cromatina dispersa y a las enzimas que intervienen en la biosíntesis de los ácidos nucleicos y en el proceso de la glicólisis, como la 3-gliceraldehído deshidrogenasa, las nucleósidos trifosfatasa, las acetilasas, etc.

Las proteínas básicas están representadas por las histonas y las nucleoproteínas.

Las histonas son proteínas ricas en contenido de los aminoácidos arginina y lisina. Su peso molecular oscila entre 10,000 y 18,000 daltons. Son sintetizadas durante la fase S del ciclo celular. Están unidas al ADN por medio de enlaces iónicos. La proporción histonas-ADN es aproximadamente 1:1. La función principal de las histonas es la regulación de la actividad génica (12).

Por otro lado, las nucleoprotaminas son ricas en aminoácido arginina. Su peso molecular es de aproximadamente 4,000 daltons. Están unidos al ADN por medio de enlaces salinos. Durante la espermioteliósis (espermiogénesis) las nucleoprotaminas reemplazan a las histonas.

Otras proteínas se conjugan con moléculas de ARN dando origen a la formación de las llamadas partículas ribonucleoproteicas. Estas partículas pueden localizarse intra o extranucleolarmente. Entre las partículas ribonucleoproteicas extra nucleolares se encuentran:

- a) los gránulos pericromatinianos (PCG).
- b) los gránulos intercromatinianos (ICG).
- c) las fibras pericromatinianas (PCF).
- d) los cuerpos helicoidales (CB).

Los gránulos pericromatinianos tienen un diámetro de 40 a 45 A y están rodeados de un halo claro de aproximadamente 25 nm. de espesor. Se localizan principalmente en los extremos de masas de cromatina condensada o cerca de los poros nucleares (7). Parece ser que están constituidos por ARN mensajero y proteínas. Si se administra actinomicina D a las células -una sustancia que interfiere en la síntesis de ARN- el número de gránulos pericromatinianos aumenta.

Los gránulos intercromatinianos fueron descritos inicialmente por Swift en 1959 (7). Tienen un diámetro de 20 a 25 nm.

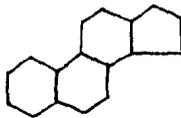
Su función es desconocida. Aparecen en grupos en áreas inter-cromatinianas, de ahí su nombre.

Las fibras pericromatinianas se localizan en los límites de la cromatina. Pudieran representar un producto ribonucleico del cromosoma. Las fibras pericromatinianas son precursoras de los gránulos pericromatinianos. Petrov y Bernhard sugirieron que las fibras pericromatinianas contienen en sí el ARN heterogéneo (7).

Los cuerpos helicoidales son estructuras fibrosas presentes sólo en algunos tipos de núcleos, por lo que no están bien estudiados.

III. HORMONAS ESTEROIDES.

Entre las sustancias hormonales existen algunas cuya naturaleza química es de tipo esteroide, es decir, en su estructura molecular está presente un anillo ciclopentano α -fenantreno como el siguiente: (40)



Todas las hormonas esteroideas tienen un peso molecular aproximadamente de 300 y son sintetizadas a partir de un mismo precursor: la molécula de colesterol. De su lugar de síntesis las hormonas esteroideas son vertidas en el torrente sanguíneo donde se unen a diversas macromoléculas. Su concentración en el plasma sanguíneo oscila entre 10^{-10} y 10^{-8} M (10) dependiendo del estado fisiológico del organismo.

No todas las células del organismo responden a las hormonas esteroideas sino solo las que poseen unas moléculas de naturaleza proteica, llamadas receptores, presenten en el citoplasma y en el núcleo. Así, Elwood Jensen en la década de los 60's demostró que las hormonas esteroideas son retenidas en gran cantidad por las células endometriales en comparación con otras células del cuerpo. De esta manera se dice que las células endometriales son células "blanco" de las hormonas esteroideas. Que las hormonas esteroideas actúan a nivel genético se desprende de los estudios realizados por Walter Stumpf en 1968 quien encontró que las hormonas esteroideas se acumulan en el núcleo de las células blanco (35).

Mecanismo de acción de las hormonas esteroideas.

El esquema más aceptado para explicar el mecanismo de acción

de las hormonas esteroideas es el siguiente (35):

Una molécula receptora presente en el citoplasma de la célula "blanco" en forma dimérica (con dos subunidades: A y B) se une a dos moléculas de la hormona la cual entra a la célula por difusión; se forma así el complejo hormona-receptor (H-R). Este complejo entra al núcleo donde se une a la cromatina en un sitio específico que se cree es la fracción AP_3 de las proteínas no histonas. Una vez unido a la cromatina, el receptor se disocia liberando la subunidad A la que actúa directamente sobre el ácido desoxirribonucleico (ADN).

El complejo H-R no requiere de una conversión metabólica para llevar a cabo su función sino que es en sí metabólicamente activo. Su unión con el ADN permite la expresión o la represión de algunos genes.

Después de estas breves generalidades se tratará sobre los estrógenos y la progesterona en particular.

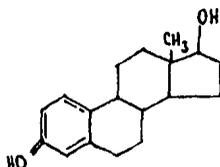
III.1 Estrógenos.

En el año de 1927 dos fisiólogos alemanes, Bernhard Zondeck y Selmar Aschheim, descubrieron que ratas y ratones hembras incrementaban su celo sexual cuando eran inyectadas con extractos de orina de mujer embarazada. Dos años más tarde A. Butenandt en Alemania y Edward Doisy en Estados Unidos, aislaron muestras puras de la sustancia que producía ese fenómeno y fué denominada estrona (2).

En el presente se conoce a la estrona, al estradiol y al estríol, entre otras hormonas, con el nombre genérico de estrógenos (hormonas que estimulan el estro o el deseo sexual en las hembras de mamíferos).

Los estrógenos son secretados por el folículo ovárico (principalmente por las células de la teca interna) y por la placen-

ta. La biosíntesis de los estrógenos se lleva a cabo a partir del colesterol vía progesterona y androstenediona (3). El tipo y cantidad secretada de estrógenos es característica de cada especie animal. El estrógeno más común es el estradiol-17 β : $C_{18}H_{24}O_2$:



Los estrógenos tienen un efecto pleiotrópico, es decir, son capaces de estimular la expresión de varios genes por lo que afectan a diversos procesos celulares. A continuación se señala una lista incompleta de los principales efectos de los estrógenos:

- 1) Estimula el crecimiento del tracto reproductor femenino.
- 2) Es importante para el buen desarrollo de las características sexuales secundarias de una especie.
- 3) Contribuye al deseo sexual de la hembra (estro o celo).
- 4) Incrementa la síntesis de ARN, ADN y proteínas (23).
- 5) Estimula la actividad de las enzimas ARN polimerasas I y II (44).
- 6) Provoca la hipertrofia e hiperplasia del tejido uterino (23).
- 7) Es responsable del aumento de entrada de agua al útero.
- 8) Incrementa la transcripción de algunos genes. Por ejemplo, en el oviducto de pollo los estrógenos estimulan la transcripción de ARN's mensajeros que codifican la síntesis de las proteínas ovoalbúmina y lisozima (26).
- 9) Activa la síntesis de informómeros (partículas ribonucleoproteicas que contienen ARN semejante al ADN (23).
- 10) Incrementa la entrada y la retención de albúmina en el ú

tero.

- 11) Incrementa el índice mitótico en el epitelio luminal y en menor grado, en el epitelio glandular (14).
- 12) Induce a las células a pasar del período G_1 al período S del ciclo celular (34).
- 13) Se ha sugerido que la formación de polisomas depende del nivel de estrógenos presente en la célula (34).
- 14) Incrementa el número y la masa nucleolar (8).
- 15) Altera la excitabilidad de la membrana (8).
- 16) Aumenta la síntesis de mucopolisacáridos (8).
- 17) Incrementa la concentración de iones de sodio dentro de la célula y disminuye la concentración de iones de potasio dentro de la misma (8).

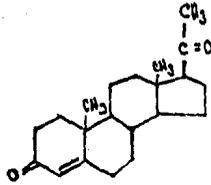
Como se puede apreciar los estrógenos ejercen una gran influencia sobre las células "blanco" a ellos. Podemos decir que los efectos principales de los estrógenos radican fundamentalmente en la regulación de la síntesis de ARN y que la traducción del ARN explica el incremento en la concentración de diferentes sustancias dentro de la célula.

III.2 Progesterona.

En el año de 1929, George W. Corner y William M. Allen, aislaron una sustancia a partir de cuerpos lúteos de coneja a la cual llamaron progesterona (11).

La progesterona es la hormona sexual femenina clásica. Es secretada por las células de la granulosa del cuerpo lúteo y del folículo, principalmente durante la segunda mitad del ciclo estral y por la placenta durante la preñez (3).

La molécula de progesterona consta de 21 átomos de carbono y su fórmula estructural es la siguiente:



La progesterona se forma por oxidación de la pregnenolona. Se encuentra también en la corteza supra-renal y en los testículos de algunos mamíferos, como el cerdo por ejemplo, donde probablemente actúa como precursor para la síntesis de otras hormonas esteroideas (33).

La progesterona estimula el crecimiento del endometrio (ya iniciado por la acción de los estrógenos en la primera mitad del ciclo estral), además provoca la retención tisular de agua y sales de sodio (33). Durante la secreción de la progesterona las células del endometrio retienen fuertemente los iones de calcio inhibiendo la contracción muscular del miometrio previniendo así la expulsión del embrión antes de término (11).

La progesterona provoca el aumento de iones de potasio y la disminución de iones de sodio en el interior de la célula, fenómeno inverso al provocado por los estrógenos.

La progesterona inhibe la actividad de las ARN polimerasas (44). En los mamíferos la progesterona disminuye el número de receptores celulares para los estrógenos inhibiendo así la interacción células blanco-estrógenos (35). La progesterona induce la producción de algunos compuestos en el epitelio luminal y glandular, secreciones que probablemente intervengan para crear un medio favorable para el desarrollo del ovocito cuando éste se encuentra en la luz del útero.

En altas dosis, la progesterona inhibe la mitosis de las células del epitelio luminal (14).

Se ha sugerido un cierto antagonismo entre los estrógenos y la progesterona; ya que mientras aquellos activan la capacidad de transcripción de la cromatina, la progesterona la inhibe (38).

Mecanismo de acción de la progesterona:

En el cobayo, la progesterona se une a proteínas específicas las cuales solo están presentes en la sangre durante la preñez y que son sintetizadas posiblemente por la placenta (29). La formación de receptores para la progesterona se lleva a cabo durante la fase folicular del ciclo estral; su número aumenta en hamsters ovariectomizados y tratados posteriormente con estrógenos, lo que sugiere que la formación de dichos receptores está bajo la influencia de los estrógenos. El número de receptores alcanza un valor máximo durante la fase de proestro (aproximadamente 30,000 por célula) y disminuye durante el estro y el metaestro (diestro I), (29). Asimismo, el número de receptores aumenta en el miometrio de rata a partir del día 3 y hasta el día 9 de la preñez; disminuye a partir del día 15 y se mantiene bajo hasta el término de la preñez (25).

IV. ENDOMETRIO Y CICLO ESTRAL.

El útero de los mamíferos está compuesto por tres capas: el perimetrio o serosa, el miometrio o capa muscular y el endometrio o mucosa glandular. Aquí solo se hablará sobre el endometrio.

Histológicamente, el endometrio consiste de un epitelio superficial de tipo columnar que presenta numerosas invaginaciones que originan a las glándulas uterinas tubulares las cuales secretan mucopolisacáridos. En la rata, las células del epitelio superficial son de dos tipos: ciliadas y secretoras. En el epitelio glandular la proporción de células secretoras es mayor.

El tejido subyacente al epitelio es una gruesa lámina propia conocida como estroma, que consiste de tejido conjuntivo y una substancia basal rica en glicógeno.

El endometrio funciona como el sitio de implantación del óvulo fecundado y forma la porción materna de la placenta. Se reconoce que el endometrio sufre cambios cíclicos en relación a la actividad hormonal durante el ciclo estral. Estos cambios pueden resumirse a tres: fase proliferativa, fase secretora y fase menstrual.

La fase proliferativa se presenta durante el crecimiento del folículo, cuando es abundante la secreción de estrógenos. El endometrio incrementa su grosor y aumentan las mitosis en las células del epitelio superficial y en el estroma. Aumenta también el número de glándulas uterinas.

Durante la fase secretora o fase luteínica, el endometrio sigue aumentando en grosor, probablemente debido a la imbibición de agua. Las células del epitelio superficial presentan un núcleo orientado hacia la luz uterina al aumentar la cantidad de glicógeno en el citoplasma.

La fase menstrual se presenta cuando ocurra la ovulación y los óvulos no son fecundados. El endometrio se retrae al dis-

minuir la secreción de estrógenos, las glándulas disminuyen en número y hay pérdida de fluido intersticial. En esta fase, en la especie humana y en algunos primates, se produce el desprendimiento de la capa funcional del endometrio, junto con sangre no coagulable. Se encuentran asimismo muchos leucocitos en el estroma.

Cuando ocurre la fecundación, el cuerpo lúteo comienza a secretar progesterona que, en acción conjunta con los estrógenos, induce la respuesta decidual en el endometrio. Esta reacción consiste en la transformación de las células del estroma en células poliédricas ricas en glicógeno. Este tejido llamado decidual proporciona el ambiente adecuado para la implantación del blastocisto.

Durante la reacción decidual se produce un aumento en la síntesis de ARN y de la masa tisular (16). Se cree que este fenómeno depende de la concentración de estrógenos durante la fase de proestro del ciclo estral de la rata y durante el día 3 de la preñez. No obstante, también se piensa que la progesterona juega un papel más importante en este proceso y que los estrógenos tan solo regulan los cambios inducidos por la progesterona (16).

Las hormonas esteroides son necesarias para que ocurra la implantación, sin embargo, no se sabe si actúan sobre el embrión o sobre el útero el cual, de ser así, secretaría algunas sustancias necesarias para la implantación (49).

Ciclo estral de la rata.

En las hembras de ratas cepa Wistar existe un ciclo estral característico. Su duración es de cuatro días y consta de cuatro fases cada una con una duración aproximada de un día (24 horas). La secuencia del ciclo estral es fácilmente determinada a partir de estructuras presentes en un frotis vaginal. Abajo se listan las fases del ciclo estral y sus características citológicas se

gún las observaciones microscópicas de frotis vaginales:

Metaestro (diestro I)	escasas células epiteliales del estrato medio (basófilas) y del superficial (acidófilas), abundantes leucocitos y moco.
Diestro (diestro II)	abundantes células epiteliales basales y <u>superficiales</u> , gran cantidad de leucocitos.
Proestro	células epiteliales basales pequeñas y <u>escasas células escamosas</u> .
Estro	numerosas células epiteliales <u>superficiales</u> , escamosas, anucleadas y queratinizadas.

V. PLANTEAMIENTO DEL PROBLEMA.

Se mencionó anteriormente, en la sección I, que el tamaño del núcleo celular es variable dependiendo de las condiciones fisiológicas en que se encuentra la célula y que el tamaño del nucleolo es mayor en células sujetas a una gran actividad de síntesis molecular.

También se mencionó que los estrógenos son capaces de alterar la actividad metabólica de la célula ya sea aumentando o disminuyendo la expresión génica. Por ejemplo, Laguens en 1964 demostró que los nucleolos de células de endometrio de ratas ovariectomizadas aumentan en número y tamaño cuatro horas después de haberseles administrado estradiol (24) y Zavala encontró que durante la fase de proestro del ciclo estral de la rata, cuando la concentración de estradiol es más alta, el volumen nucleolar aumenta tanto en células epiteliales luminales como en glandulares y que los gránulos pericromatinianos (partículas ribonucleoproteicas con probable función de almacenamiento) disminuyen, encontrándose una situación inversa durante la fase de diestro I o metaestro (51). De esto se desprende que las variaciones en la concentración de estradiol durante el ciclo estral provoquen cambios en la actividad sintética de las células endometriales y por consiguiente en el volumen nucleolar.

Acerca de la acción directa de la progesterona sobre las células endometriales se sabe poco, sin embargo, se sabe que en mamas la disminución de receptores celulares de estradiol es provocada por esta hormona la cual regula de esta manera la acción de los estrógenos (35).

Considerando lo anterior, si durante la preñez de la rata y en especial durante el período de pre-implantación el estradiol y la progesterona interactúan en las células endometriales, es probable que durante ese período el volumen nuclear y nucleolo-

lar, así como la relación entre ambos, sufran cambios de acuerdo a las variaciones en las concentraciones fisiológicas de dichas hormonas.

VI. MATERIAL Y METODOS.

VI.1 De la especie animal.

Lotes de ratas (Rattus rattus, cepa Wistar) proporcionados por el Bioterio de la Facultad de Medicina de la UNAM, fueron colocados en jaulas de plástico y sometidos a un ciclo diario de 14 horas de luz (6:00 a 20:00 horas) y 10 horas de oscuridad a una temperatura constante de aproximadamente 28°C y sin restricción alimenticia alguna. De esta manera se espera que la ovulación ocurra entre las 3 y las 7 horas a.m. (5).

El apareamiento se llevó a cabo colocando en una jaula hembras y machos en proporción 3:1 durante el período de oscuridad. Se aseguró que las hembras estuvieran en fase de proestro para garantizar la manifestación de la lordosis en presencia del macho.

En la mañana siguiente se efectuaron frotis vaginales utilizando un asa de tungsteno estéril, humedecida con una solución de cloruro de sodio (NaCl) 0.9 % y a pH de 7.2. En algunas ratas pudo observarse la presencia de un tapón vaginal (que consiste en líquido seminal coagulado dentro de la vagina por acción de enzimas de origen prostático) señal inequívoca de haberse efectuado la cópula. En otros casos hubo necesidad de observar al microscopio de contraste de fases los frotis vaginales con objeto de determinar la presencia de espermatozoides en los exudados.

Durante el desarrollo de este trabajo solo se procesaron ratas que presentaron tapón vaginal y/o gran cantidad de espermatozoides en el exudado vaginal.

El día que se detectó el tapón vaginal ó los espermatozoides fué designado como día 0 de la preñez. De esta manera se estableció un plan de trabajo que incluía ratas de 0, 1, 2, 3, 4 y 5 días post-coitum. La implantación de los ovocitos de rata ocurre durante los días 5 o 6 de la preñez (27).

VI.2 De la fijación.

Las ratas seleccionadas fueron sometidas a una fijación por vía intravascular, por el ventrículo izquierdo, utilizando un equipo de perfusión de 2 vías (19) por una de las cuales se administra la solución lavadora y por la otra el fijador. Ambas soluciones se hacen fluir libres de burbujas.

Los frascos que contienen las soluciones se colocan a una altura aproximada de 1.5 m. con respecto a la posición del animal para que el líquido pase por el organismo impulsado por una diferencia de presión.

La solución lavadora consistió de un amortiguador de cacodilato de sodio ($\text{Na}(\text{CH}_3)_2\text{AsO}_2 \cdot 3\text{H}_2\text{O}$) al 4 % y pH de 7.2. Se agregaron 0.5 ml. de heparina como anticoagulante y 3 ml. de xilocaína como vasodilatador, por cada 100 ml. de amortiguador. Esta solución se hizo llegar primero al animal a un ritmo aproximado de 1 gota/seg durante 2 minutos.

La solución fijadora consistió de 2 fijadores: paraformaldehído al 4 % y glutaraldehído al 1 % (22), disueltos en el mismo tipo de amortiguador usado en la solución lavadora (cacodilato de sodio). La solución fijadora se aplica al animal después de la solución lavadora. Se administró a un ritmo inicial lento de 2 gotas/seg durante 20 minutos. Aumentándose gradualmente después.

Una vez terminada la perfusión, se disecó el útero y pequeños trocitos del mismo fueron colocados en una solución limpia de fijador durante 90 minutos como mínimo.

VI.3 De la deshidratación.

La deshidratación de los tejidos se realizó colocando las muestras de útero en concentraciones gradualmente crecientes

de alcohol etílico (etanol). La rutina seguida para deshidratación de tejidos durante este trabajo fué la siguiente:

etanol 70%	20 minutos
etanol 80%	20 minutos
etanol 90%	20 minutos
etanol 96%	20 minutos
etanol 100%	30 minutos (3 cambios de 10 min. c/u).

Luego del último cambio de alcohol 100% se pasaron las muestras de tejido a una solución de óxido de propileno (C_3H_6O) durante 30 minutos (3 cambios de 10 minutos cada uno). Esto se hizo así ya que se utilizó una substancia de inclusión (EPON) poco soluble en etanol pero muy soluble en el óxido de propileno.

VI.4 De la pre-inclusión e inclusión.

La pre-inclusión se llevó a cabo colocando las muestras de tejido en una solución de óxido de propileno más la substancia de inclusión (EPON) en proporción 1:1 durante 24 horas por lo menos.

Para la inclusión propiamente dicha, se utilizó una substancia epóxica (EPON). Las muestras se colocaron en moldes con el EPON y se polimerizaron en una estufa a $60^{\circ}C$ durante 48 horas.

VI.5 De los cortes.

Los cortes ópticos se obtuvieron mediante el uso de un ultramicrotomo REICHERT/Ultracut. El grosor de los mismos se estimó si

siguiendo la escala de Peachey (38), siendo de aproximadamente 150-190 nm., con un color de interferencia cercano al púrpura. Los cortes se montaron en portaobjetos, se fijaron con calor moderado y se tiñieron con el colorante azul de toluidina. Este colorante es de naturaleza básica y no es específico ya que tiñe tanto al ADN como al ARN. Sin embargo, el contorno del núcleo y del nucleolo se distinguen bien.

Las mediciones del volumen nuclear y nucleolar se efectuaron bajo un microscopio AXIOMAT de la casa ZEISS provisto de micrómetro, a un aumento de 3,200X.

Se midieron 60 núcleos escogidos al azar de células epiteliales y 60 núcleos de células glandulares de dos ratas diferentes por cada día de la preñez. En las mismas células fueron medidos los nucleolos presentes en ellas.

La obtención del volumen nuclear y nucleolar se obtuvo a partir de una imagen bidimensional por medio de la siguiente fórmula:

$$V = \frac{4}{3} \pi (r^2 R)$$

donde: V = volumen

r = radio menor del núcleo (o del nucleolo)

R = radio mayor del núcleo (o del nucleolo)

VI.6 Estadística.

Los resultados obtenidos fueron analizados estadísticamente por medio de una prueba "t" de Student-Fischer para pequeñas muestras (41,52). Se ejemplifican a continuación los parámetros estadísticos utilizados en proceso de los datos obtenidos en las mediciones de los diámetros mayor y menor del núcleo, diámetros mayor y menor del nucleolo y número de nucleolos por

célula:

a) Media aritmética

$$\bar{X} = \frac{\sum X_i}{n}$$

b) Desviación estándar

$$s = \frac{\sum X_i^2 - n\bar{X}^2}{n - 1}$$

c) Error estándar

$$S.E. = \frac{s}{n}$$

d) Varianza combinada

$$s_p^2 = \frac{(n_{\bar{X}} - 1) s_{\bar{X}}^2 + (n_{\bar{Y}} - 1) s_{\bar{Y}}^2}{n_{\bar{X}} + n_{\bar{Y}} - 2}$$

$$e) t = \frac{\bar{X} - \bar{Y} - d}{s_p^2 \left(\frac{1}{n_{\bar{X}}} + \frac{1}{n_{\bar{Y}}} \right)}$$

donde:

\bar{X} y \bar{Y} = medias a comparar

d = diferencia hipotética

f) $\alpha = 0.95$ ($P < 0.05$)

g) grados de libertad = $n - 1$

h) t de tablas para $n = 60$: $t = 2.6$

Se compararon las medias de los resultados de los días 1,2,3, 4 y 5 con los resultados del día 0. De este modo, la significación de las variaciones está estimada en función del día cero. Dicha significación está dada por los valores de "t" que se encuentran fuera del intervalo de confianza: -2.6, 2.6 (para $n = 60$).

VII. RESULTADOS.

Epitelio luminal.

A semejanza de lo que sucede durante todas las fases del ciclo estral, durante los primeros días de la preñez de la rata las células endometriales luminales no manifiestan ningún cambio significativo (estadísticamente) en el volumen nuclear (Tabla I, Gráfica No. 1 y Figuras 1, 3, 6 y 7).

Por otra parte, el volumen nucleolar presenta valores bajos que son estadísticamente significativos, del día 3 en adelante hasta el día 5 (Tabla II y Gráfica No. 2).

La relación volumen nucleolar-volumen nuclear disminuye gradualmente del día 0 al día 5 de la preñez (Tabla III y Gráfica No. 3).

El promedio de nucleolos por célula en el epitelio luminal tiende a aumentar entre los días 0 y 4, pero disminuye el día 5. La diferencia de valores puede considerarse constante ya que estos oscilan alrededor de un valor medio de 1.47 nucleolos por célula (Tabla VII).

Epitelio glandular.

En el endometrio glandular se observó un fenómeno similar en cuanto al volumen nuclear durante el ciclo estral, sin embargo al iniciarse la preñez, sobretodo a partir del día 1, el volumen nuclear disminuye significativamente manteniéndose bajo en los 5 primeros días de la preñez (Tabla IV, Gráfica No. 4 y Figuras 2, 4, 5 y 8).

El volumen nucleolar es alto en los días 0 y 1, simulando un fenómeno parecido a una repetición del ciclo estral. Con todo, a partir del día 2 y hasta el día 5, el volumen nucleolar disminuye significativamente (Tabla V y Gráfica No. 5).

La relación volumen nucleolar-volumen nuclear (V_n/V_N) en el epitelio glandular presentó, como en el epitelio luminal, una

secuencia variable (Tabla VI y Gráfica No. 6).

El promedio de nucleolos por célula en el epitelio glandular presenta una tendencia a aumentar en el transcurso del período de preimplantación, presentando en los días 4 y 5 valores que sobrepasan el número de 2 nucleolos por célula (Tabla VII).

TABLA I.

Volumen nuclear en el epitelio luminal.
 μm^3 (micras cúbicas)

día	n	media	desv. estand.	error estand.
0	60	770.60	239.8727	31.2288
1	60	757.19	783.9401	101.2062
2	60	772.56	490.1316	63.3757
3	60	421.41	142.2924	18.5249
4	60	579.92	318.9623	46.0382
5	60	540.63	344.9677	52.0058

TABLA II.

Volumen nucleolar en el epitelio luminal.
 μm^3 (micras cúbicas)

día	n	media	desv. estand.	error estand.
0	60	13.8534	9.7994	1.2758
1	60	15.6271	12.2652	1.5834
2	60	15.6863	10.6737	1.3780
3	60	7.1081	4.3119	0.5614
4	60	10.2495	7.3114	1.0557
5	60	9.6496	8.6157	1.2567

TABLA III.

Relación volumen nucleolar-volumen nuclear en el epitelio luminal (μm^3).

día	n	media	desv. estand.	error estand.
0	60	0.0381	0.0342	0.0045
1	60	0.0323	0.0263	0.0034
2	60	0.0232	0.0153	0.0020
3	60	0.0199	0.0171	0.0022
4	60	0.0203	0.0179	0.0026
5	60	0.0222	0.0152	0.0022

TABLA IV.

Volumen nuclear en el epitelio glandular. (μm^3)

día	n	media	desv. estand.	error estand.
0	60	708.4887	480.9813	62.0944
1	60	506.7236	372.8630	49.3860
2	60	435.4299	220.0314	28.4059
3	60	432.3752	227.1874	30.6339
4	60	500.5492	333.1027	43.0034
5	60	459.4701	220.8079	26.5062

TABLA V.

Volumen nucleolar en el epitelio glandular.
 μm^3 (micras cúbicas)

día	n	media	desv. estand.	error estand.
0	60	20.7226	15.1017	1.9659
1	60	21.8563	17.2027	2.2785
2	60	10.1029	7.5068	0.9691
3	60	13.2963	10.5295	1.3826
4	60	12.0216	10.6956	1.3808
5	60	15.3910	13.5068	1.7553

TABLA VI.

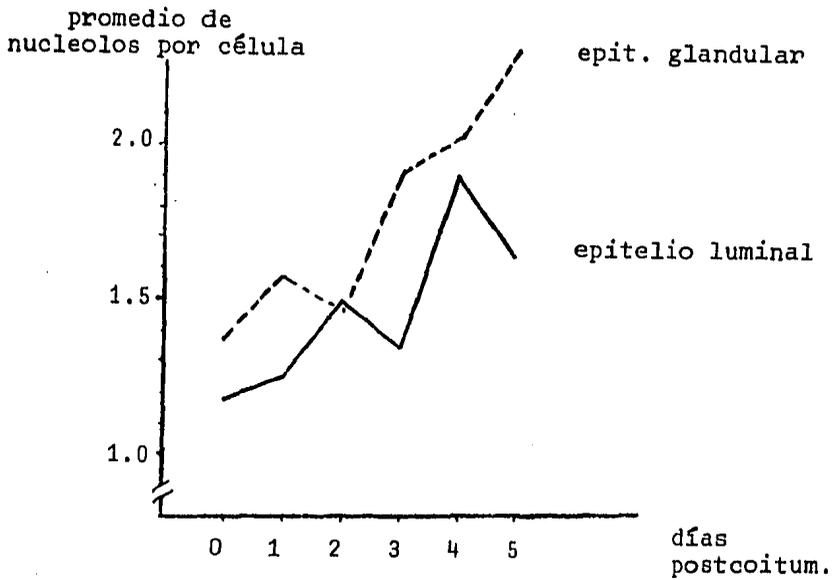
Relación volumen nucleolar-volumen nuclear
 en el epitelio glandular (μm^3).

día	n	media	desv. estand.	error estand.
0	60	0.0262	0.0263	0.0034
1	60	0.0561	0.0480	0.0062
2	60	0.0263	0.0195	0.0025
3	60	0.0366	0.0415	0.0055
4	60	0.0177	0.0138	0.0018
5	60	0.0603	0.1088	0.0142

TABLA VII.

Días postcoitum	promedio de nucleolos/célula	
	epit. luminal	epit. glandular
0	1.18	1.37
1	1.26	1.57
2	1.50	1.46
3	1.35	1.91
4	1.89	2.01
5	1.63	2.23
	X = 1.47	X = 1.76

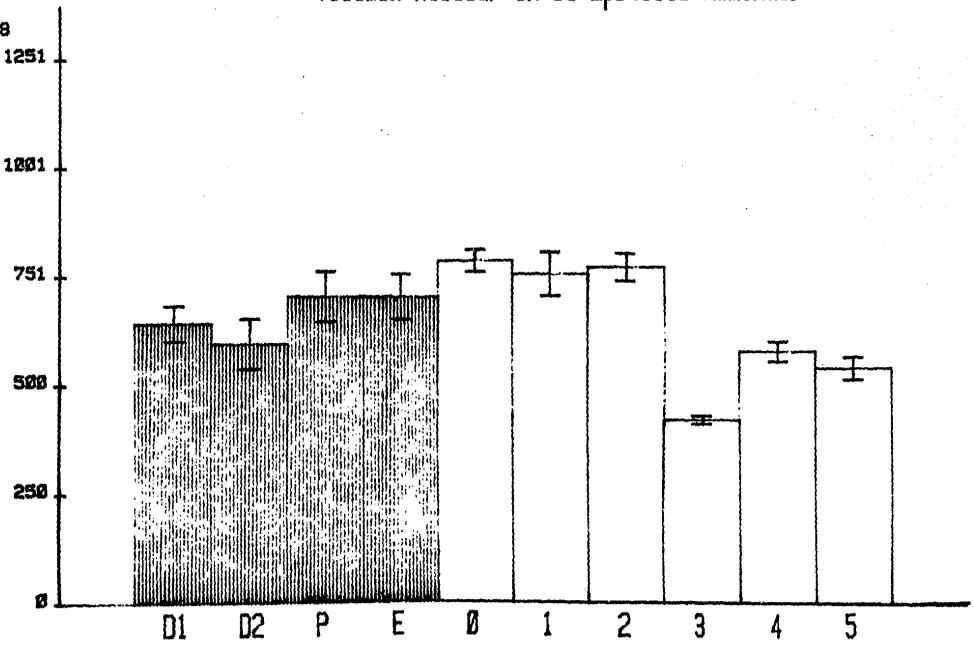
GRAFICA No. 9



Grafica No. 1

Volumen nuclear en el Epitelio Luminal.

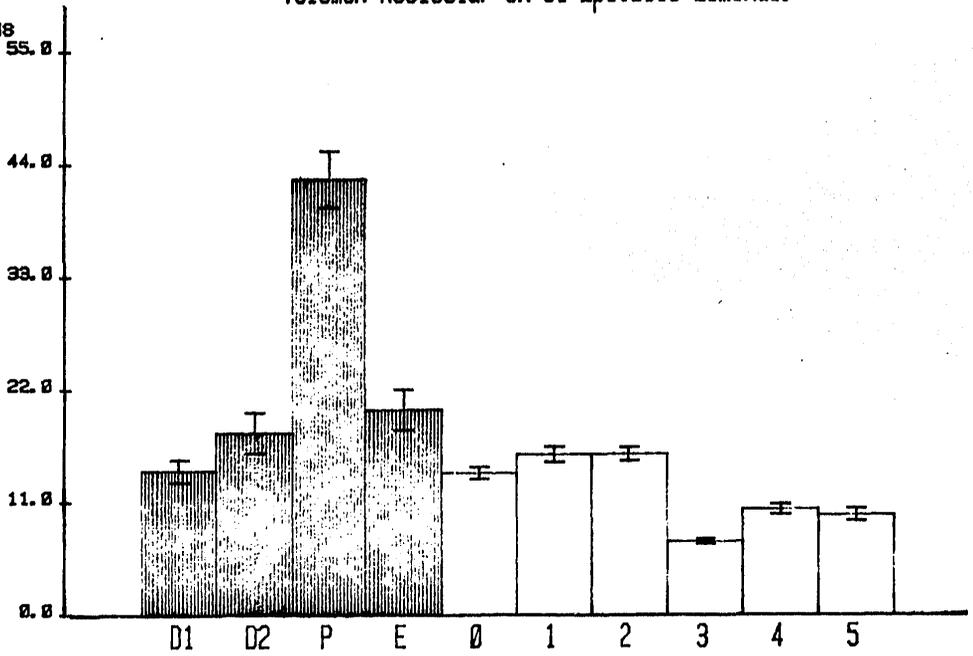
micras
cubicas



Grafica No. 2

Volumen nucleolar en el Epitelio Luminal.

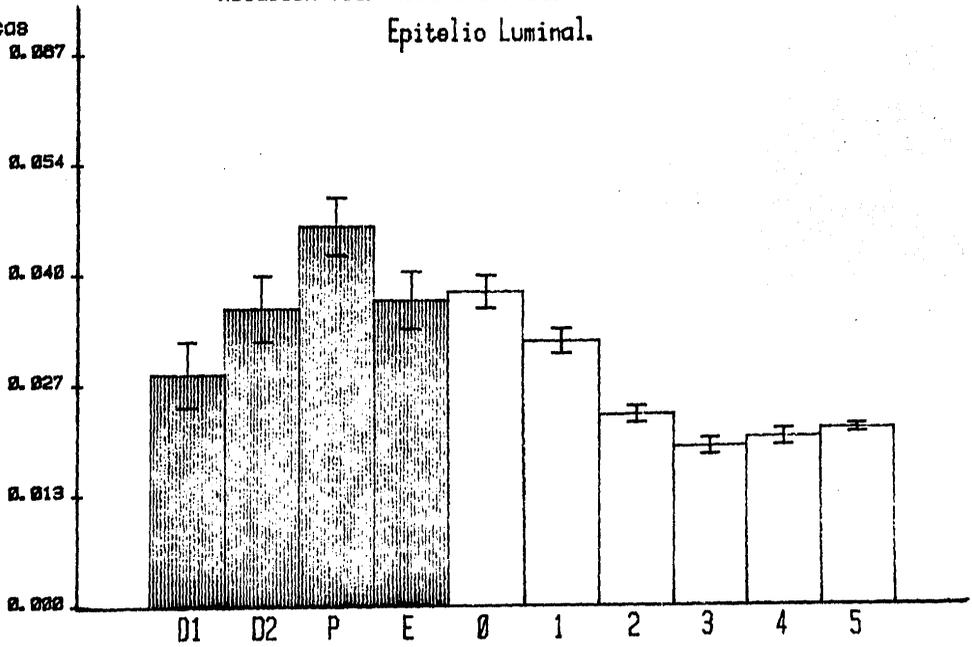
micras
cubicas



Grafica No. 3

Relacion vol. nucleolar/vol. nuclear en el Epitelio Luminal.

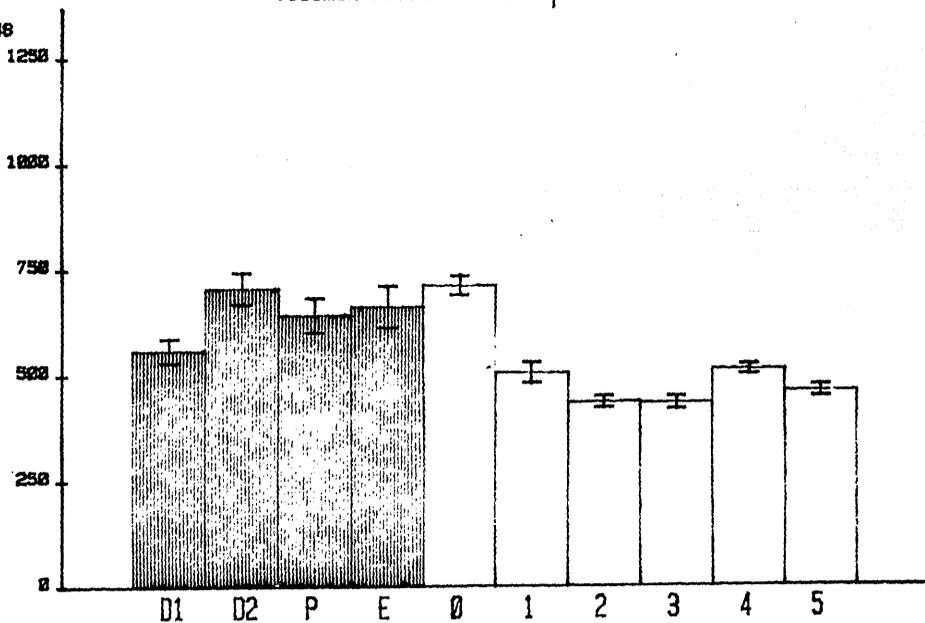
micras
cubicas



Grafica No. 4

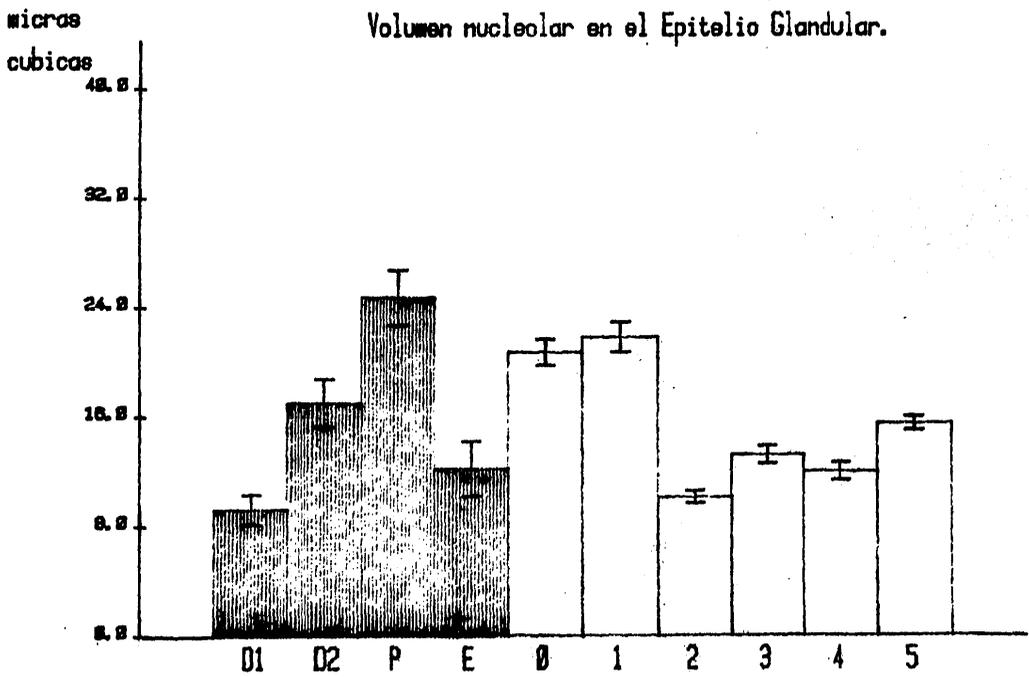
Volumen nuclear en el Epitelio Glandular.

micras
cubicas



Grafica No. 5

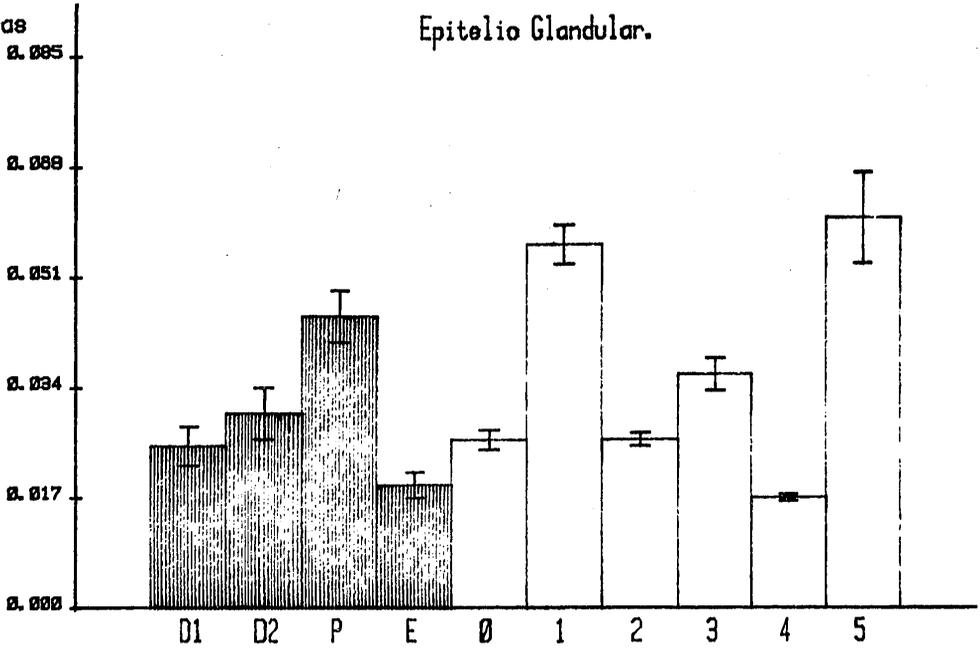
Volumen nucleolar en el Epitelio Glandular.



Grafica No. 6

Relacion vol. nucleolar/vol. nuclear en el Epitelio Glandular.

micras
cubicas



Clave para las figuras 1-6:

ep = epitelio luminal del endometrio

est = estroma

gl = glándula o epitelio glandular.

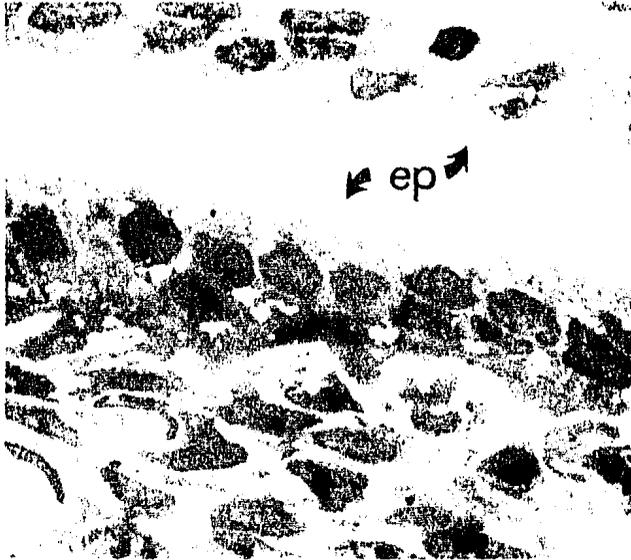


Figura No. 1
Células epiteliales lumbales.
(día 0 post-coitum).

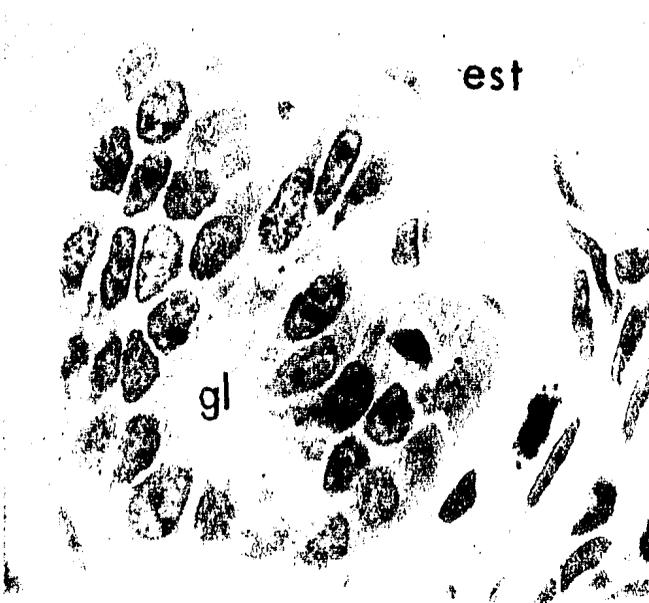


Figura No. 2
Células epiteliales glandulares.
(día 0 post-coitum).

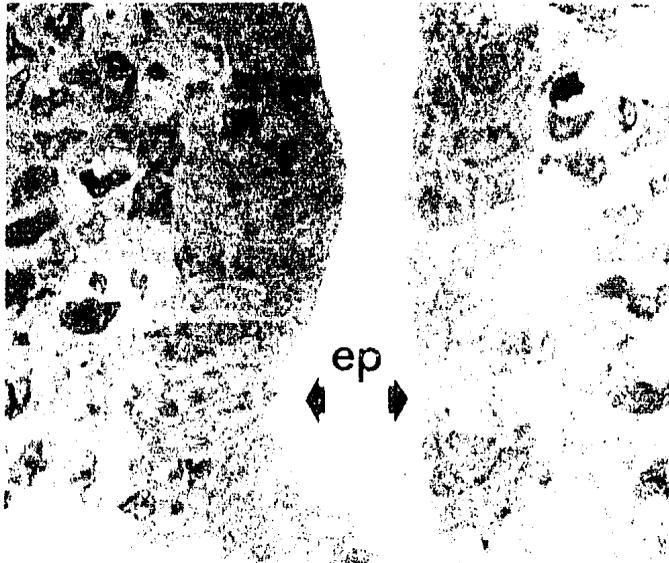


Figura No. 3
Células epiteliales luminales.
(día 1 post-coitum).

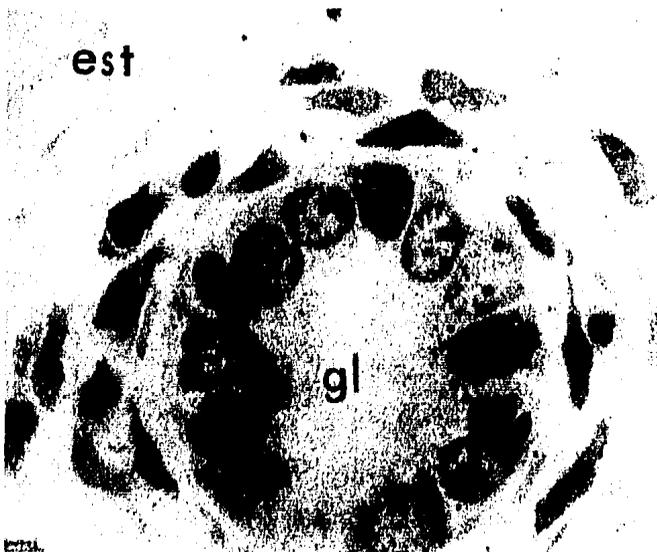


Figura No. 4
Células epiteliales glandulares.
(día 1 post-coitum).

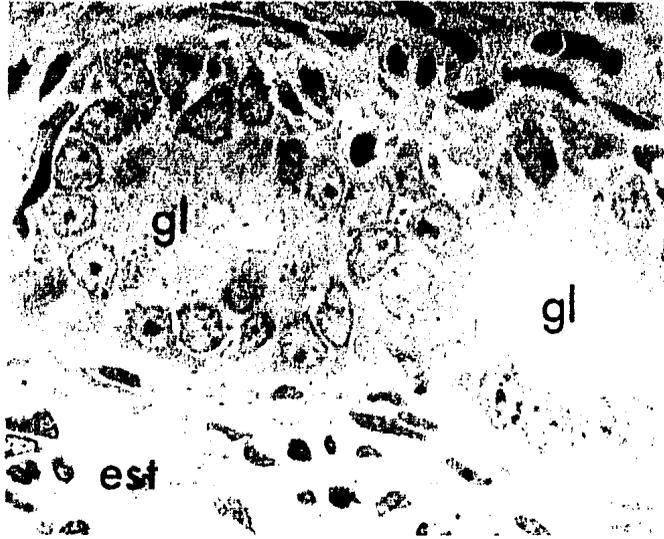


Figura No. 5
Células epiteliales glandulares.
(día 2 post-coitum).

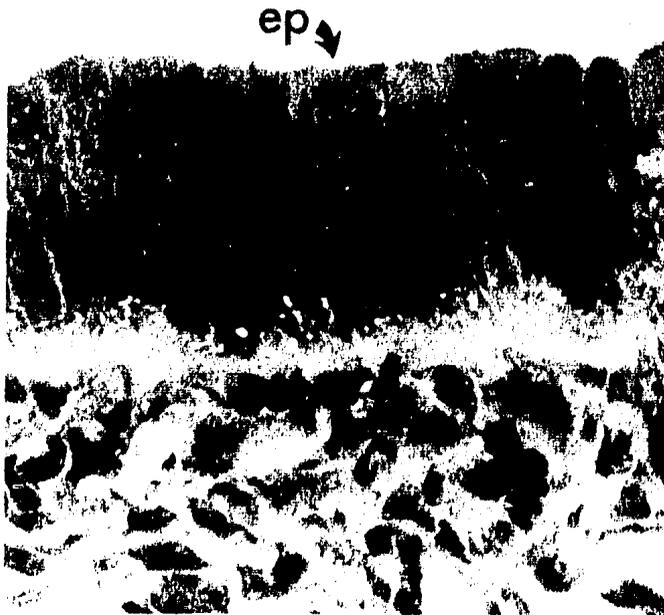


Figura No. 6
Células epiteliales luminales.
(día 3 post-coitum).

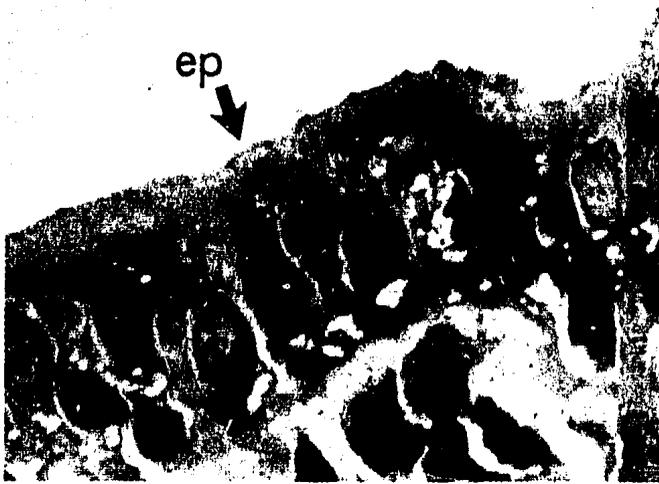


Figura No. 7
Células epiteliales luminales.
(día 5 post-coitum).



Figura No. 8
Células epiteliales glandulares.
(día 5 post-coitum).

VIII. DISCUSION.

Como se sabe, tanto el nivel de estrógenos en el plasma sanguíneo (45,50 y 16) como la concentración de receptores químicos para el estradiol (16) durante la fase de proestro del ciclo estral de la rata son altos.

Por otra parte, la concentración de progesterona y de pregnenolona en el plasma ovárico sigue un patrón semejante al del estradiol (18). Lo mismo acontece con el número de receptores citosólicos y nucleares de la progesterona durante el ciclo estral (48).

Al correlacionar el nivel de estas dos hormonas con los valores medios del volumen nuclear y nucleolar se ha encontrado una estrecha dependencia entre ambos parámetros (51,13), es decir, al aumentar la concentración de estradiol y de progesterona en la sangre, aumenta el volumen nucleolar, tanto de células del epitelio luminal como glandular. Podríamos decir que el volumen nucleolar varía dependiendo de la concentración de estrógenos y de progestinas en el microambiente celular (Gráfica No. 7).

Ahora bien, si tomamos como punto de referencia de la síntesis nucleolar el número de gránulos pericromatinianos, se observa también en los trabajos anteriormente citados (51,13) que se corresponden valores altos de hormonas esteroideas con valores altos en el número de gránulos pericromatinianos localizados en el interior del núcleo.

¿Qué significa esto?

Se han publicado algunos trabajos en los que se registra el efecto de los estrógenos en el volumen nuclear, en el volumen nucleolar, en la síntesis de ribonucleoproteínas, etc. y de ellos se desprende que debido al aumento de la síntesis nucleolar provocado por el estradiol, el volumen nucleolar es mayor y el número de gránulos pericromatinianos también es mayor

no así para el volumen nuclear el cual permanece más o menos constante (47,13).

Sin embargo, también la progesterona estimula la síntesis nucleolar, fundamentalmente de la ARN polimerasa II y sobretodo parece provocar un aumento en el volumen nucleolar en células epiteliales de ratas ovariectomizadas, en particular en tiempos cortos -una o dos horas- después de haberseles aplicado una inyección de progesterona (37).

De igual forma, la progesterona estimula un aumento del volumen nucleolar de células endometriales del estroma de la rata; provoca un aumento del retículo endoplásmico rugoso y la acumulación del componente granular del nucleolo (46).

El estradiol, por su parte, no restablece la función nucleolar completa de las células del estroma uterino de ratas previamente ovariectomizadas e inyectadas con dosis de estradiol (46). Podría pensarse entonces que durante el ciclo estral los estrógenos y las progestinas actúan sinérgicamente estimulando alteraciones y cambios cíclicos dependientes del nivel de tales esteroides en la sangre.

¿Pero, qué sucede durante el período de pre-implantación, cuando los niveles de estradiol y progesterona siguen un curso diferente?

Sería útil mencionar algunos fenómenos que se producen en el endometrio durante la preimplantación. El endometrio crece debido a un aumento en el número y la velocidad de las divisiones celulares así como por la imbibición de líquidos en regiones intercelulares. Cuando los blastocistos se ponen en contacto con el endometrio, la zona pelúcida que rodea al embrión es disuelta al parecer por una enzima secretada por las células del epitelio. Cuando el embrión se pone en contacto con las células epiteliales, éstas son destruidas y el trofoblasto penetra en el estroma. En estos momentos, las células del estroma presentan la reacción decidual que consiste en aumento en número y tamaño de sus células y la formación del citotrofoblasta

to y del sinciciotrofoblasto. Este sincicio intervendrá en la nutrición del embrión y posteriormente formará la parte fetal de la placenta (27).

En este período de pre-implantación y posteriormente durante la implantación (en la especie estudiada, 5 y 16 días aproximadamente) la progesterona es sintetizada en mayor cantidad y aumenta el número de receptores celulares de la progesterona (18). La tendencia es ascendente durante toda la preñez.

El estradiol, por otra parte, presenta una concentración que tiende a bajar a un nivel mínimo durante la pre-implantación (16). Existen algunos trabajos que han registrado un pico de elevación en el día 3 de la preñez, algo a lo que se ha llamado en la literatura como oleada de estradiol. Sin embargo, otros autores consideran que los cambios en la concentración son relativamente pequeños por lo que afirman que hablar de una oleada de estradiol resulta excesivo (16).

También se ha tratado de medir el número de receptores celulares para el estradiol y compararlo con el nivel de estradiol. De este modo se ha visto que las curvas graficadas de ambos parámetros coinciden tanto en el ciclo estral como en los primeros días de la preñez. El registro de los valores para los receptores celulares del estradiol no presentan un pico máximo en el día 3 lo que parece favorecer la idea de que no hay una oleada de estradiol ese día (16).

El nivel elevado de progesterona aunado al nivel decreciente de los estrógenos durante el período de pre-implantación, hace pensar que la progesterona juega un papel de primera línea en la sensibilización del útero y en la puesta en marcha de la reacción decidual. La progesterona estimularía la síntesis de ARN's específicos los cuales se traducen en el citoplasma en proteínas específicas que pudieran actuar, entre otras cosas, en la disminución de los receptores celulares para el estradiol; esto explicaría en parte la caída en el número de dichos receptores durante la preimplantación.

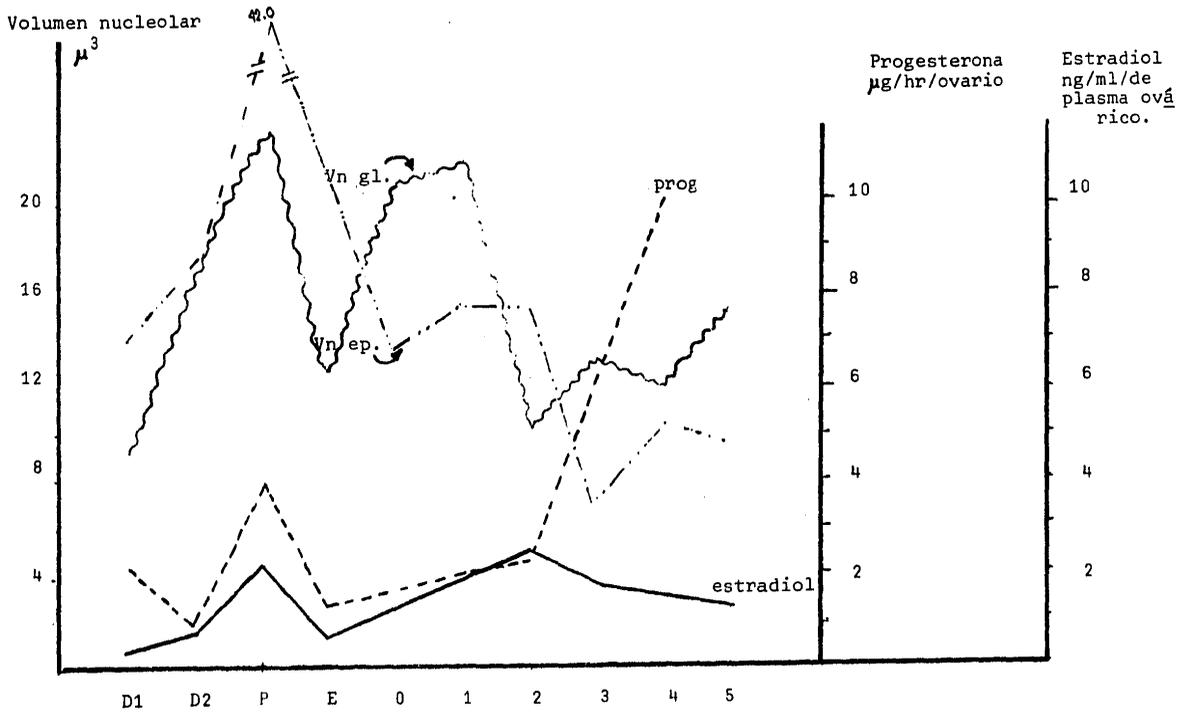
Este mecanismo inhibitorio de la progesterona hacia los receptores de estradiol es importante para el establecimiento de un microambiente celular propicio en el endometrio durante la preñez.

Si este microambiente debe mantenerse a lo largo de toda la preñez, es de esperar que los valores en las concentraciones de progesterona y de estradiol se mantengan en un nivel acorde a lo que se observa en el día 5 que es cuando ocurre la implantación del blastocisto.

Así las cosas, el estradiol fungiría más bien como un regulador o modificador del nivel de síntesis nucleolar originado por el súbito aumento en la concentración de progesterona. Sería interesante observar, desde el punto de vista morfológico y ultraestructural, el restablecimiento del ciclo estral después del alumbramiento en la hembra. Bioquímicamente ya se conoce que el nivel de receptores al estradiol aumenta durante los primeros cinco días subsecuentes al parto y que, por el contrario, el nivel del número de receptores a la progesterona disminuye en el mismo período de lactancia (30).

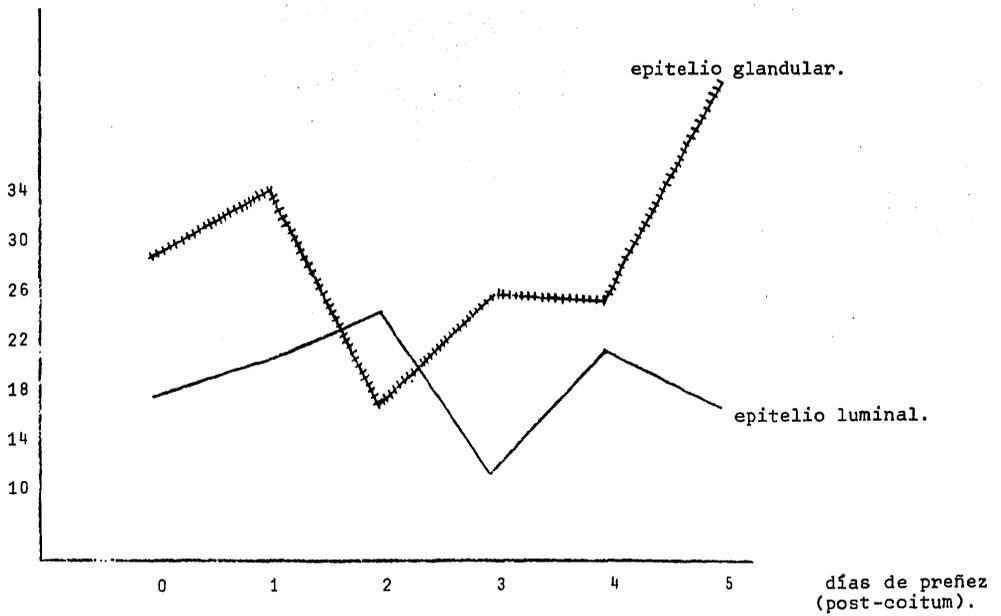
GRAFICA No. 7

Co-relación entre el volumen nucleolar de células del endometrio uterino y el nivel de hormonas esteroides en la sangre.



GRAFICA No. 8

No. de nucleolos
por célula por
volumen nucleolar



IX CONCLUSIONES.

La fisiología uterina de la rata durante el ciclo estral difiere marcadamente a partir del momento en que es fecundado uno o más óvulos. Por alguna razón aún no determinada el cuerpo lúteo secreta progesterona en cantidades tales que su concentración aumenta enormemente en el torrente circulatorio mientras que el estradiol disminuye su concentración. Estos cambios fisiológicos necesariamente tienden a producir cambios morfológicos en las células y tejidos del organismo que actúan como células y tejidos "blanco" a tales hormonas.

En este trabajo se registran los cambios observados en las células endometriales, específicamente en el volumen nucleolar y en el número de nucleolos por célula. Se confirman hechos que se conocían por trabajos anteriores y que poseen otro enfoque, a saber, que la progesterona inhibe la expresión de ciertos genes estimulados por el estradiol y que a su vez estimula la síntesis de proteínas y la transcripción de algunos genes sensibles a la progesterona. Es posible que a nivel macromolecular y molecular se observen cambios importantes como por ejemplo: en los valores cuantitativos de las ribonucleoproteínas, en la estructura fina del nucleolo, en la condensación y descondensación de ciertos segmentos de la cromatina, en la posición del núcleo dentro de la células o de los nucleolos dentro del núcleo, etc., etc.

Por otro lado, y no por esto menos importante, un conocimiento mejor de la dinámica hormonal que se establece durante el ciclo estral, la preñez y el período de lactancia, de la rata o algún otro mamífero ofrecería datos que permitirían tener un panorama más amplio y elucubrar con más y mejores elementos de juicio sobre el papel que juegan las hormonas esteroides en el funcionamiento biosintético, genético y evolutivo de las células y los organismos.

Espero que trabajos ulteriores permitan compaginar los aspectos morfológicos con los aspectos fisiológicos.

Por otro lado y no por esto menos importante, un conocimiento mejor de la dinámica hormonal que se establece durante el ciclo estral y durante el período de la preñez, tanto en la preimplantación como en la implantación, de la rata o de algún otro mamífero susceptible de ser investigado, ofrecerá datos que permitan tener una panorámica más amplia y elucubrar con mejores elementos de juicio sobre el papel que juegan las hormonas esteroides en el funcionamiento biosintético, genético y evolutivo de las células y de los organismos.

X. BIBLIOGRAFIA.

- 1.- Asimov, I. A short history of Biology.
THE NATURAL HISTORY PRESS, New York, 1964.
- 2.- Asimov, I. Introducción a la ciencia.
PLAZA & JANES, Barcelona, 1978.
- 3.- Baird, D.T. Reproductive hormones. En: Reproduction in mammals, Vol 3. C.R. Austin y R.V. Short (ed).
CAMBRIDGE UNIVERSITY PRESS, 1975.
- 4.- Barraclough, Ch.A.; Collu, R; Massa, R y Martini, L. Temporal interrelationships between plasma LH, ovarian secretion rates and peripheral plasma progesterin concentrations in the rat: effects of nembutal and exogenous gonadotropins. *J. of Endocrinology* 88:1437-1447 (1977).
- 5.- Biggers, J.D.; Whitten, W.K. y Whittingham, D.G. The culture of the mouse embryos IN VITRO. En: Methods in mammalian embryology, Cap. 6. J.C. Daniel (ed). W.H. FREEMAN Co. 1971.
- 6.- Bloom, W. y Fawcett, D.W. A textbook of histology.
W.B. SAUNDERS Co. 1975.
- 7.- Bouteille, M.; Laval, M. y Dupoy-Coin, M. Localization of nuclear functions as revealed by ultrastructural autoradiography and cytochemistry. En: The cell Nucleus, Vol. I. Harris Busch (ed). ACADEMIC PRESS, New York, 1974.
- 8.- Britten, R.J. y Davidson, E.H. Gene regulation for higher cells: a theory. *Science* 165:349-357. Julio 1969.
- 9.- Busch, H. The eukaryotic nucleus. En: Receptors and hormone action, Vol. I. B.W. O'Malley y L. Birnbauer (ed). ACADEMIC PRESS, New York, 1977.
- 10.- Clark, J.H. y Peck, E.J. Steroid hormone receptors: basic principles and measurements. En: Receptors and hormone action. B.W. O'Malley y L. Birnbauer (ed). ACADEMIC PRESS, New York, 1977.

- 11.- Csapó,A. Progesterone.
Scientific American,198 (4).Abril,1958.
- 12.- DeRobertis,E.D.P.;Saez,F.A. y DeRobertis,E.M.F. Cell
Biology.W.B.SAUNDERS Co.1975.
- 13.- Echeverría,OM.;Zavala,G.;Benitez,A. y Vázquez-Nín,G.H.
Changes during estral cycle in the nucleus of
endometrial cells of the rat.Biol. Cellulaire
39:139-142 (1980).
- 14.- Finn,C.A. y Martin,L. Patterns in cell division in the
mouse uterus during early pregnancy.J. of En-
docrinology 39:593-597 (1967).
- 15.- Frelster,J.H. Ultrastructure and function of heterochro-
matin and euchromatin.En: The cell nucleus.H.
Busch (ed).ACADEMIC PRESS.New York,1974.
- 16.- Glasser,S.R. y Clark,J.H. A determinant role for proges-
terone in the development of uterine sensitivi-
ty to decidualization and ovoidimplantation.En:
The developmental biology of reproduction.C.L.
Market y J. Papaconstantinou (ed).ACADEMIC
PRESS,New York.1975.
- 17.- Gurdon,J.B. Núcleos transplantados y diferenciación ce-
lular.En: La célula viva.EDITORIAL BLUME.
Madrid,1970.
- 18.- Hashimoto,I.;Henricks,D.M.;Anderson,L.L. y Melampy,R.M.
Progesterone and pregn-4-en-20 α -ol-3-one in
ovarian venous blood during various reproduc-
tive states in the rat.J. of endocrinology 82:
333-341 (1968).
- 19.- Hayat,M.A. Principles and techniques of electron micros-
copy.VAN NOSTRAND REINHOLD Co.1970.
- 20.- Heap,R.B. Role of hormones in pregnancy.En: Reproduction
in mammals,Vol. 3.C.R. Austin y R.V. Short (ed)
CAMBRIDGE UNIVERSITY PRESS,1975.
- 21.- Junqueira,L.C.;Carneiro,J. Y López Sáez,J.F. Biología ce-
lular.PRENSA MEDICA.México,1976.

- 22.- Karnowsky, M.J. A formaldehyde-glutaraldehyde fixative of high osmolality for use in electron microscopy. *J" of Cell Biology*, 27:137A-138A (1965).
- 23.- Knowler, J.T.; Borthwick, N.M. y Smellis, R.M.S. Early effects of estrogen on the transcription of the uterine RNA. En: *Steroids hormones and pregnancy*. J. Jeffrey (organizer). 1975.
- 24.- Laguens, R. Effect of estrogen upon the fine structure of the uterine smooth muscle cells of the rat. *J. of Ultra-structure Research*, 10:578-584 (1964).
- 25.- Leavit, W.W. et. al. Biology of progesterone receptors. En: *Receptors and hormone action*. B.W. O'Malley and L. Birnbauer (ed). ACADEMIC PRESS. 1978.
- 26.- Lehninger, A. Biochemistry. WORTH PUBLISHERS INC. U.S.A. 1975.
- 27.- McLaren, A. The embryo. En: *Reproduction in mammals*, VOL. II. C.R. Austin y R.V. Short (ed). CAMBRIDGE UNIVERSITY PRESS. 1975.
- 28.- Mieli, A. Breve historis de la biología. ESPASA CALPE S.A. Buenos Aires, 1951.
- 29.- Milgrom, E. Progesterone-binding proteins in the plasma and reproductive tract. En: *Receptors and hormone action*. B.W. O'Malley y L. Birnbauer (ed) ACADEMIC PRESS. 1978.
- 30.- Mohla, s.; Clem-Jackson, N. y Hunter, J.B. Estrogen receptors and progesterone-induced gene expression in the rat mammary gland and uteri during pregnancy and lactation: changes in progesterone receptors and RNA polymerase activity. *Journal of Steroid Biochemistry*, 14:501-508 (1981).
- 31.- Monneron, A. y Bernhard, W. Fine structural organization of the interphase nucleus in some mammalian cells. *J. Ultrastructure Research*, 27:266-288 (1969).

- 32.- Morton-Bradbury,E. La chromatine,La Recherche,9 (91).
Julliet-aodt,1978.
- 33.- Nason,A. Biología.
LIMUSA-WILEY S.A.México,1972.
- 34.- O'Malley,B.W. y Means,A.R. Effects of the female steroid
hormones on target cell nuclei.En: The cell nu-
cleus,VOL. III.Harris Busch (ed).ACADEMIC PRESS
New York,1974.
- 35.- O'Malley,B.W. y Schrader,W.T. The receptors of steroid
hormones.Scientific American 234(2).Febrero 1976.
- 36.- Padykula,H.A. y Clark,J.A. Nuclear bodies as functional
indicators in the target cell of sex steroid hor-
mones.En: The cell nucleus,VOL. IX: Nuclear par-
ticles,part B.Harris Busch (ed).ACADEMIC PRESS,
New York,1981.
- 37.- Parra,R. Tesis Profesional.
Facultad de Biología.UNIVERSIDAD VERACRUZANA.
1983.
- 38.- Peachey,L.D. J. Biophys, Biochem, Cytol.
4:233 (1958).
- 39.- Puvion,E. y Moyne,G. In situ localization of RNA structur-
res.En: The cell nucleus,VOL. VIII,nuclear
particles,part A.Harris Busch (ed),ACADEMIC
PRESS.New York,1981.
- 40.- Rakoff,H. y Rose,N.C. Química orgánica fundamental.
ED. LIMUSA-WILEY S.A.México,1973.
- 41.- Schawrtz,D. Méthodes statistiques á l'usage des médecins
et des biologistes.FLAMMARION MEDECINE SCIEN-
CES,Paris.1977.
- 42.- Short,R.V. Role of hormones in cell cycles.En: Reproduc-
tion in mammals,VOL. III.C.R. Austin y R.V.
Short (ed).CAMBRIDGE UNIVERSITY PRESS.1975.
- 43.- Smetana,K. y Busch,H. The nucleolus and the nucleolar
DNA.En: The cell nucleus,VOL. I.Harris Busch
(ed).ACADEMIC PRESS,New York,1974.

- 44.- Spelsberg,T.C. y Cox,R.F. Effects of estrogen and progesterone on transcription,chromatin and ovalbumin gene expression in the chick oviduct.Biochimica et Biophysica Acta,
435:376-390 (1976).
- 45.- Steinetz,B.G. Secretion and function of ovarian estrogen. En: Handbook of Physiology,VOL. II. Cap. 19. CIBA PHARMACEUTICAL FOUNDATION,1973.
- 46.- Tachi,C.;Tachi,S. y Linder,H.R. Effects of ovarian hormones upon nucleolar ultrastructure in endometrial cells of the rat.Biology of Reproduction,10:404-413 (1974).
- 47.- Vázquez Nín,G.H.;Echeverría,O.M. y Pedron,J. Effects of estradiol on the RNP constituents of the nucleus of cultured endometrial cells.Biol. Cellulaire,35:3,221-228 (1979).
- 48.- Vu Hai,M.T.;Logeat,F. y Milgrom,E. Progesterone receptors in the rat uterus; variations in cytosol and nuclei during the oestrus cycle and pregnancy.J. Endocr. (1978).76:43-48.
- 49.- Warner,C.M. y Tollefson,C.M. The effect of progesterone, estradiol and serum on RNA synthesis in preimplantation mouse embryos cultured IN VITRO.Biol of Reprod.,19:332-337 (1978).
- 50.- Watson,J.;Anderson,F.B.;Alan,M.;O'Grady,J.E. y Heald,P.J. Plasma hormones and pituitary luteinizing hormones in the rat during the early stages of pregnancy and after post-coital treatment with tamoxifen,(ICI 46,474).Journal of Endocrinology (1975),65:7-17.
- 51.- Zavala,G. Tesis Profesional. Facultad de Ciencias,UNAM.1980.
- 52.- GENERAL STATISTICS,VOL. I. Hewlett-Packard Company. U.SA.1980.