

003414
24



UNIVERSIDAD NACIONAL AUTONOMA
DE MEXICO

FACULTAD DE CIENCIAS

DIVISION DE ESTUDIOS DE POSGRADO

**EFFECTOS DE LA OVARIECTOMÍA E INYECCIÓN
DE ESTRADIOL EN LA DISTRIBUCIÓN DE RNA
NUCLEAR ANALIZADO POR MICROSCOPIA
ELECTRÓNICA MEDIANTE hibridación in situ**

T E S I N A

**QUE PARA OBTENER EL DIPLOMA DE
ESPECIALISTA EN MICROSCOPIA
ELECTRONICA APLICADA A
LAS CIENCIAS BIOLÓGICAS**

PRESENTA

AIDA GABRIELA / GUZMAN LOPEZ

DIRECTOR DE TESIS: DR. LUIS FELIPE JIMÉNEZ GARCÍA

26 6211

**TESIS CON
FALLA DE ORIGEN**

SEPTIEMBRE DE 1998



Universidad Nacional
Autónoma de México

Dirección General de Bibliotecas de la UNAM

Biblioteca Central



UNAM – Dirección General de Bibliotecas
Tesis Digitales
Restricciones de uso

DERECHOS RESERVADOS ©
PROHIBIDA SU REPRODUCCIÓN TOTAL O PARCIAL

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

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

UNIVERSIDAD NACIONAL AUTÓNOMA DE MÉXICO

FACULTAD DE CIENCIAS

ESPECIALIDAD EN MICROSCOPIA ELECTRÓNICA

EFFECTOS DE LA OVARIECTOMÍA E INYECCIÓN DE ESTRADIOL EN LA
DISTRIBUCIÓN DE RNA NUCLEAR ANALIZADO POR MICROSCOPIA
ELECTRÓNICA MEDIANTE *hibridación in situ*

AIDA GABRIELA GUZMÁN LÓPEZ

SEPTIEMBRE DE 1998

ÍNDICE

	Pág.
RESUMEN.....	1
INTRODUCCIÓN.....	2
El Núcleo Celular en Interfase.....	2
Funciones del Núcleo.....	13
Hormonas Esteroides.....	14
Estructura del Útero.....	16
OBJETIVO.....	18
MATERIAL Y MÉTODO.....	19
Animales y Experimentos.....	19
Microscopía Electrónica.....	19
<i>Hibridación in situ</i> Ultraestructural.....	20
Análisis Cuantitativo.....	21
RESULTADOS.....	24
Descripción Morfológica.....	24
Morfometría.....	25
DISCUSIÓN.....	31
CONCLUSIÓN.....	33
BIBLIOGRAFÍA CONSULTADA.....	34

RESUMEN

En adición al conocimiento sobre los efectos transcripcionales de las hormonas esteroideas, se ha descrito un efecto postranscripcional. En el análisis ultraestructural de partículas ribonucleoproteicas nucleares (RNP), se observó que el número de gránulos pericromatinianos (GPC) aumentaba en las células epiteliales endometriales del útero de rata después de la ovariectomía. Sin embargo, el número de PCG disminuyó después de la inyección con estradiol. En estudios *in vitro* se observaron resultados similares. Estas observaciones sugieren que los PCG son estructuras RNP nucleares involucradas en el almacenamiento y/o transporte de algunos mRNA procesados. Nosotros hemos utilizado un protocolo de *hibridación in situ* empleando microscopía electrónica, ocupando ADN genómico como una sonda de detección de RNA intranuclear en células epiteliales endometriales del útero de rata, después de la ovariectomía e inyección con estradiol. Se utilizaron ratas hembras adultas. Se seleccionaron un grupo control y tres grupos experimentales. Los animales experimentales fueron ovariectomizados y separados en tres subgrupos. Después de 21 días, 2 de los grupos fueron inyectados con 20 mg/ml de 17- β estradiol y se sacrificaron 30 y 120 minutos después de la inyección. Muestras de los úteros de los animales control y experimentales fueron fijadas con paraformaldehído al 4% y embebido en resina Lowicryl. Se utilizó ADN genómico biotinado de rata como sonda y estreptavidina acoplada a partículas de oro coloidal de 10 nm de diámetro como sistema de detección. La densidad numérica de los granos de oro fue medida y analizada estadísticamente. Un marcado específico fue observado en el núcleo de todos los animales. Los granos de oro en el nucleoplasma se asocian con fibras pericromatinianas (FPC) y GPC. La densidad media de los granos de oro en el nucleoplasma de las ratas control fue de 471/ μm^2 . En las ratas ovariectomizadas la media observada fue de 488. 30 y 120 minutos después de la inyección con estradiol, la densidad fue de 283 y de 233, respectivamente. Los valores presentan diferencias significativas entre los grupos de ratas ovariectomizadas y el control y entre las ovariectomizadas y las ratas inyectadas. Observamos que la cantidad de RNA intranuclear se incrementa en las ratas ovariectomizadas en relación al grupo control. Con la inyección de estradiol, el RNA disminuye después de 30 minutos y se incrementa de nuevo después de 120 minutos. La marca fue observada asociada a FPC y GPC. Nuestros resultados apoyan estudios previos indicando que un compartimiento intranuclear está involucrado en el almacenamiento y/o transporte de RNA. Este compartimiento es sensible a las hormonas esteroideas y puede estar representado por los FPC y los GPC. Estos resultados también apoyan que los PCG pueden estar involucrados en el metabolismo de una fracción de mRNA ya procesado.

INTRODUCCIÓN

El Núcleo Celular en Interfase

Por definición y a diferencia de las células procarióticas, las células eucarióticas poseen una estructura especializada llamada núcleo. El núcleo es el principal depósito de la información genética en la célula eucarionte y es comúnmente referido como el centro del control celular, que contiene a la mayoría del ADN y está rodeado por la envoltura nuclear. La envoltura nuclear aísla los procesos genéticos centrales de replicación y de la transcripción del ADN, respecto a los ribosomas citoplásmicos en los que el mensaje genético se traduce a proteínas. Por consiguiente el ADN se mantiene en un compartimiento separado del citoplasma, que es en donde se producen la mayoría de las reacciones metabólicas de la célula (en Alberts y col., 1994).

La separación de los compartimientos nuclear y citoplásmico ofrece al parecer ciertas ventajas, ya que permite separar la síntesis de ARN (transcripción), tanto en el tiempo como en el espacio de la síntesis proteica (traducción). Los ARN que se han transcrito pueden ser alterados en el núcleo antes de ser traducidos a proteínas. Esta alteración, denominada

procesamiento del ARN, representa un paso intermedio importante en la transferencia de la información genética de los eucariontes (en Alberts y col., 1994).

El lapso de tiempo que transcurre entre una división celular (mitosis) y otra es conocido como interfase. Este tiempo es ocupado para la preparación de la célula para que se lleve a cabo su proliferación. La interfase se caracteriza por una gran actividad metabólica, crecimiento celular y duplicación del ADN. Por otro lado, es la parte más prolongada del ciclo celular (en Alberts y col., 1994). En este período no suceden cambios celulares visibles al microscopio óptico (en Vázquez-Nin y Echeverría, 1995).

El núcleo de todas las células en interfase, poseen los mismos componentes básicos. Sin embargo, no tienen el mismo aspecto en todas ellas (en Cormarck, 1988). Es el más grande de los organelos intracelulares. Mide entre 5 y 10 μm de diámetro, por lo que se puede observar fácilmente al microscopio óptico a bajos aumentos. Excepcionalmente puede ser más grande, como en el caso de los núcleos politénicos o los de los ovocitos de algunos invertebrados, que incluso se pueden ver a simple vista. Las células con núcleo realizan todas las funciones propias de los seres vivos: se nutren, respiran, crecen, se reproducen, etc., (en Vázquez-Nin y Echeverría, 1995).

El núcleo puede ser dividido en dos componentes principales: la envoltura nuclear y el interior, llamado nucleoplasma. Dentro del nucleoplasma, el nucléolo es algunas veces considerado como una entidad independiente (en Raska y col., 1990).

La envoltura nuclear separa espacialmente al nucleoplasma del citoplasma, debido a que es una estructura formada por una doble membrana que juega un papel en la regulación de los intercambios núcleo-citoplasma de moléculas y de complejos macromoleculares. Asimismo, es el posible sitio de anclaje para la cromatina en la interfase. La membrana nuclear está formada por una membrana externa, que se continua con el retículo endoplásmico rugoso y una membrana interna, que es adyacente a la lámina nuclear y a la cromatina. Las membranas externa e interna se fusionan en varios lugares, formando los poros nucleares. Estos poros están constituidos por complejos macromoleculares llamados complejos del poro, los que controlan el paso de moléculas en el núcleo (ver Spector, 1993).

La lámina nuclear está compuesta de tres grandes polipéptidos denominados Láminas y que en algunos mamíferos mide alrededor de 10 nm de grosor (ver Spector, 1993).

El término nucleoplasma, se refiere a la parte interna del núcleo celular, en donde el nucleolo está cercano a las áreas de cromatina condensada y otras dos regiones morfológicamente diferenciables: el área pericromatiniana que consiste en regiones que bordean la cromatina condensada y el espacio intercromatiniano (en Raska y col., 1990). Además, el interior nuclear está compuesto de una matriz nuclear, que es un complejo de varias proteínas características, aún no del todo definida (Berezney 1984, citado por Jiménez-Carola y Segura Valdez, 1993).

El nucleolo es una región altamente especializada del núcleo, en donde se realizan la transcripción de los genes ribosomales, la formación de partículas prerribosomales y el procesamiento del RNA ribosomal. El nucleolo no está rodeado por una membrana, pero en este sitio se encuentran localizadas discretas regiones funcionales. Ultraestructuralmente está compuesto por cinco áreas, la región fibrilar densa, los centros fibrilares, la región granular, los intersticios nucleolares y la región de cromatina nucleolar (en Raska y col., 1990; Spector, 1993; Vázquez-Nin y Echeverría, 1995).

La región fibrilar densa consiste de un fino entramado de fibras de 5 nm de ribonucleoproteínas y usualmente forman un borde concéntrico, o cubierta alrededor de los centros fibrilares. Mediante autoradiografía se ha demostrado que la transcripción de los genes de rDNA ocurren en este sitio y/o en la periferia de los centros fibrilares (en Raska y col., 1991). Estudios recientes de

hibridación in situ ultraestructural indican que el componente fibrilar denso contiene los genes ribosomales (Jiménez-García y col., 1993). Estos resultados son congruentes con los datos autorradiográficos, aunque otros autores han encontrado diferencias (ver Spector, 1993).

Los centros fibrilares son transparentes a los electrones y están caracterizados por una fina textura fibrilar, están compuestos por proteínas, DNA y por pequeñas cantidades de RNA. Por medio de técnicas citoquímicas se pueden identificar los organizadores nucleolares. La cantidad de centros fibrilares puede reflejar la síntesis nucleolar (en Raska y col., 1990).

La región granular está formada por partículas de 15-20 nm de diámetro. Estas partículas representan prerrbosomas en diferentes estadios de maduración de las subunidades pequeñas y grandes (ver Spector, 1993).

El nucleolo está usualmente rodeado por la cromatina perinucleolar, que está conectada con las regiones de la cromatina intranucleolar y está en continuidad con los centros fibrilares (ver Spector, 1993).

Con ayuda del microscopio electrónico de transmisión y usando la técnica de contraste de Bernhard para estructuras ribonucleoproteicas, han sido definidas las siguientes estructuras en el interior del núcleo: los gránulos intercromatinianos (GI), las fibras pericromatinianas (FP), dos tipos de cuerpos nucleares: un cuerpo nuclear simple (CNS) y los cuerpos espiralados y los gránulos pericromatinianos (GP) en diversos tipos celulares de mamíferos (Monneron y Bernhard, 1969). Estas estructuras de naturaleza ribonucleoproteica describen un patrón constante de distribución dentro del núcleo y son vistas con un denso contraste, en comparación con la cromatina que se observa con un bajo contraste (Monneron y Bernhard, 1969) (ver Fig. 1).

Los gránulos intercromatinianos (GIC) son de 10 a 20 nm de diámetro aproximadamente. Están presentes en grupos en la región intercromatiniana. Parecen ser estructuras relacionadas con el almacén y/o ensamblado de proteínas y ARNs, involucrados en el procesamiento postranscripcional de pre-mRNA. Además, los GIC incorporaron uridina tritiada lentamente, lo que indica que contienen ARN más bien estable y de poco recambio (en Spector, 1993, Jiménez-García y Segura-Valdez, 1993). Estas estructuras contienen factores de splicing que aparentemente responden a la transcripción por algún mecanismo de reclutamiento, que los dirige a las FPC (Jiménez-García y Spector, 1993).

Las fibras pericromatinianas (FPC) están compuestas por filamentos enrollados de 3 a 5 nm de diámetro. La descripción de estos componentes fue lograda por la utilización del contraste de Bernhard, que representa estructuras que contienen pre-RNA preferencialmente. Las FPC pueden aparecer como una mezcla heterogénea de estructuras teñidas en la región pericromatiniana del núcleo celular. Sin embargo, acorde con la definición morfológica, las FPC están situadas en la pericromatina y en el espacio intercromatiniano. Por medio de estudios citoquímicos se ha establecido que las FPC son elementos estructurales que contienen pre-RNA transcrito fuera del nucleolo (ver Vázquez-Nin y Echeverría, 1995). Estas fibras son el sustrato morfológico de la transcripción, pues incorporan uridina tritiada rápidamente; su presencia es inducida por hormonas que activan la transcripción y contienen, además, proteínas relacionadas con la maduración del pre-mRNA.

Los cuerpos espiralados son cuerpos, de agregados de fibrillas y gránulos de con un diámetro de 30 a 60 nm aproximadamente. El tamaño más grande es de menos de un micrómetro, se encuentran altamente contrastados después de la utilización de la técnica de Bernhard, lo que demuestra que están formados por partículas ribonucleoproteicas (en Raska y col., 1990). Contienen material relacionado con el metabolismo tanto del pre-rRNA, como del pre-mRNA (Brasch y Ochs, 1992, citado por Jiménez-García, 1993), como el U3SnRNA (Jiménez-García y col., 1994).

Los gránulos pericromatinianos (GPC) se encuentran en las regiones pericromatinianas, su tamaño puede ser entre 35 y 50 nm y están rodeados por un halo claro. De acuerdo a varias extracciones enzimáticas y químicas, los GPC están compuestos por ribonucleoproteínas (RNP) y están formados de filamentos enrollados. Pueden ser encontrados como gránulos solos o en grupos, en este último caso ocurre frecuentemente después de la alteración del metabolismo de los ácidos nucleicos. Estos gránulos pueden tener un origen pericromatiniano o nucleoplásmico. Algunos estudios citoquímicos indican que estos gránulos pueden servir como partículas de transporte y/o almacenamiento de RNA mensajero maduro que es transcrito a partir de algunos genes específicos (ver Vázquez-Nin y Echeverría, 1996).

Estudios de las partículas ribonucleoproteicas nucleares en el útero de rata usando microscopía electrónica, métodos morfométricos y estereológicos mostraron que el número de gránulos pericromatinianos cambia inversamente proporcional con la concentración del estradiol. Esto indica un efecto postranscripcional del estradiol en el transporte de RNAm del núcleo al citoplasma (Vázquez-Nin et al., 1979 y Vázquez-Nin y Echeverría, 1996).

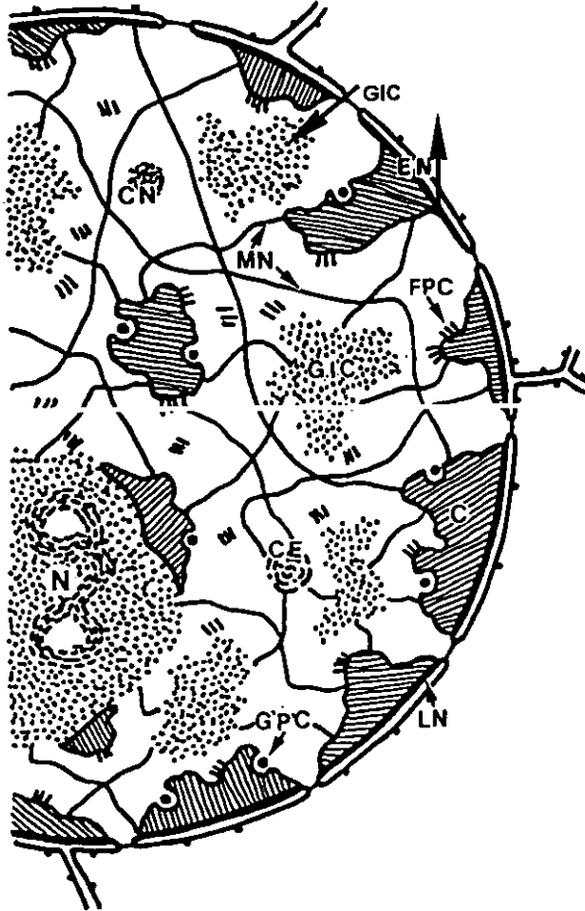


Fig. 1. Esquema representativo de la organización ultraestructural del núcleo en interfase. Se pueden observar los principales componentes. Envoltura nuclear, EN; lámina nuclear, LN; matriz nuclear, MN; cromatina, C; cuerpos espiralados, CE; gránulos pericromatinianos, GPC, gránulos intercromatinianos GIC, fibras pericromatinianas, FPC y el nucleolo N. (Tomado de Jiménez-García y Segura-Valdez, 1993, modificado de Monneron y Bernhard 1969).

En 1978 Vázquez-Nin y col., estudiaron los efectos de la ovariectomía y administración de estradiol en los componentes nucleares de las células endometriales de rata, en donde la variación de la concentración de la hormona causa cambios en la frecuencia de los GPC y en el volumen nucleolar. La ovariectomía induce un incremento en el número de los GPC y una reducción en el volumen nucleolar y la administración de estradiol produce un rápido decremento en el número de GPC y un incremento en el volumen nucleolar. Esto indica que el estradiol, además de su conocido efecto transcripcional, tiene un efecto post-transcripcional en el transporte de RNA del núcleo al citoplasma. La variación de los GPC es producida por la combinación de los efectos en la síntesis de RNA extranucleolares y/o transporte de este al citoplasma. Ambos efectos son independientes y a diferentes tiempos.

También se ha descrito la unión del estradiol a partículas ribonucleoproteicas en el útero de rata y esta unión estimula la salida de estas partículas del núcleo (Thampan, 1985), lo que confirmó los estudios de Vázquez-Nin y col. (ver Vázquez-Nin y Echeverría, 1996).

Echeverría y col., en 1985, estudiaron los efectos de la progesterona sobre los constituyentes ribonucleoproteicos nucleares en células endometriales de rata, donde se observó que la progesterona induce pequeños cambios en la velocidad de transcripción. Mencionan que la progesterona no afecta la velocidad de transcripción y transporte de RNA a citoplasma, esto se vió

reflejado en el número constante de GPC en comparación con la utilización de estradiol, en individuos que fueron ovariectomizados, inyectados y controles.

En 1991 Echeverría y col., mencionan los efectos de la testosterona en los componentes ribonucleoproteicos de las células epiteliales de la próstata en ratas macho castradas. Los efectos son semejantes a los causados por la ovariectomía e inyección de estradiol en las estructuras nucleares de las células endometriales. Estos resultados representan una confirmación de la consideración de que los GPC tienen un papel citofisiológico como partículas almacenadoras de mRNA de unos pocos genes, y que están almacenados en el núcleo por la restricción de su transporte hacia el citoplasma.

Vázquez-Nin y col., describen en 1991 que los receptores a estradiol están localizados principalmente en el núcleo, pero también están presentes en el citoplasma. Este receptor se une a partículas nucleares que contienen RNA recién sintetizado y que su unión a partículas ribonucleoproteicas no bloquean la unión del ADN con el dominio de el receptor a estradiol (ver Vázquez-Nin y Echeverría, 1996).

Funciones del Núcleo

Una de las principales funciones del núcleo es la transcripción de secuencias de ADN o genes, que son de dos tipos, los nucleolares y extranucleolares. La transcripción es un proceso complejo en donde se polimeriza una molécula de ARN a partir de nucleótidos que contienen azúcar ribosa en lugar de desoxiribosa del ADN. Las secuencias de estos nucleótidos está fijada por su complementaridad con los de una de las hebras del ADN. En este proceso intervienen polimerasas de ARN, así como otras enzimas llamadas topoisomerasas y diversas proteínas que controlan y regulan estas reacciones. Las moléculas de ARN que se obtienen de este proceso se unen inmediatamente a proteínas, constituyendo en esta forma partículas ribonucleoproteicas (RNP), (ver Vázquez-Nin y Echeverría , 1995).

Otra de las funciones del núcleo es el procesamiento intranuclear de los ácidos ribonucleicos (ARN) hasta su total maduración. Los genes extranucleolares que contienen la información para la síntesis de proteínas tienen secuencias en las que no están codificados aminoácidos. Estas secuencias, que se denominan intrones, se encuentran intercaladas entre las que contienen dicha información que se llaman exones. Por lo tanto los intrones deben ser retirados del ARN pre-mensajero que es copia fiel del ADN. El proceso por el cual se lleva a cabo esta supresión consiste en el corte de los

extremos de los intrones y en el pegado de los exones y se denomina con la palabra inglesa "splicing". La maduración del ARN pre-mensajero implica otras reacciones como el agregado de un nucleótido especial en el extremo 5' libre, la 7-metilguanósina y una serie de adeninas en el extremo 3', (ver Vázquez-Nin y Echeverría , 1995).

Todos los procesos de transcripción como los de maduración del ARN residen en la estructuras visibles con el microscopio electrónico de transmisión con ayuda de técnicas de contraste adecuadas para este fin. Se han definido las siguientes estructuras ribonucleoproteicas en el interior del núcleo: el nucleolo, las fibras pericromatinianas (FPC), los gránulos intercromatinianos (GIC), los cuerpos espiralados y los gránulos pericromatinianos (GPC), (ver Raska y col., 1990; Spector, 1993; Echeverría y Vázquez-Nin, 1995).

Hormonas Esteroideas

Las hormonas son sustancias secretadas por un órgano o tejido especializado, las cuales se vierten a la sangre, que las transporta hacia un órgano o tejido blanco, sobre el cual ejercen un efecto específico. Las hormonas de acuerdo a su naturaleza y su estructura química se clasifican en dos grupos: las hormonas con un núcleo esteroideo como los corticosteroides, progestinas, andrógenos, estrógenos y sus metabolitos; y los péptidos o derivados de los

derivados de los aminoácidos como la hormonas foliculo estimulante, luteinizante, insulina, tiroxina, etc. (ver Herrera, 1983).

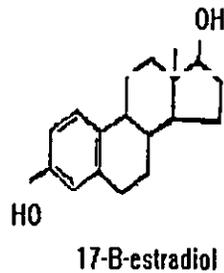
Las hormonas esteroideas son derivados del colesterol, de pequeño peso molecular, liposolubles y difunden libremente a través de la membrana celular, (ver Pasqualin, 1973).

Para la expresión de su mensaje biológico las hormonas esteroideas requieren de receptores intracitoplásmicos. Estos receptores son reconocidos, los cuales permanecían inactivos hasta ese momento (estos receptores funcionan como segundos mensajeros). Así, se forma un complejo denominado hormona-receptor, el cual se dirige al núcleo, en donde se une a una proteína receptora llamada aceptor; ésto le confiere una gran afinidad para interaccionar con sitios aceptores en la cromatina. Estos sitios aceptores nucleares están localizados muy cercanos a las secuencias de DNA y su transcripción es hormono-regulada (ver Calandra, 1985).

El grupo principal de hormonas esteroideas, es el de las hormonas sexuales: los andrógenos y estrógenos. Los estrógenos son sintetizados en los ovarios y en las glándulas suprarrenales, inducen a estro y los principales son la estrona, el estriol y el estradiol (ver Calandra, 1985).

El estradiol es el estrógeno ovárico más potente, cuyas funciones principales son la de preparar al útero para la anidación del huevo, producir y mantener las características sexuales secundarias femeninas. El estradiol se presenta en dos formas isómeras: el isómero más activo es el 17- β estradiol y el menos activo es el 17- α estradiol (ver Dorland, 1992) (ver Fig. 2).

Fig. 2 Representación gráfica de la molécula del 17- β estradiol (Tomado de Herrera E. Elementos de Bioquímica, 1993).



Estructura del Útero

El útero es parte del aparato reproductor de las hembras de los mamíferos, que recibe al huevo fecundado procedente de las trompas uterinas, provee su anidación y establece las necesarias relaciones vasculares para el sostenimiento del embrión a lo largo de su desarrollo. El útero está formado

principalmente por una pared gruesa de músculo liso llamada miometrio y su interior esta revestido por una mucosa glandular llamada endometrio (ver Fawcett, 1991; Stevens y Stevens, 1991) .

El endometrio es de unos cuantos milímetros de espesor en el máximo de su desarrollo durante el ciclo estral normal. Está constituido por un epitelio superficial que se invagina para formar numerosas glándulas uterinas tubulares, las cuales se extienden por una gruesa lámina propia, ordinariamente llamada estroma endometrial (ver Cormack, 1988; Fawcett, 1991).

El epitelio superficial es cilíndrico simple y está constituido por células cilíndricas con microvellosidades, el epitelio de las glándulas es semejante (ver Cormack, 1988; Fawcett, 1991).

Las funciones primarias del endometrio son la preparación y la participación para la implantación del huevo fecundado, y la formación de la parte materna de la placenta. Los cambios estructurales y funcionales del endometrio dependen de las hormonas segregadas por los ovarios. Al extirpar los ovarios, el endometrio se atrofia. Al administrar estrógenos, hay un rápido aumento del flujo sanguíneo al útero, el endometrio se vuelve edematoso, sus células comienzan a proliferar y a hipertrofiarse; además, hay un marcado aumento de su actividad metabólica (ver Fawcett, 1991; Stevens y Stevens, 1991).

OBJETIVO

Evaluar las variaciones de la cantidad de RNA totales, por medio de la técnica de *hibridación in situ* ultraestructural en núcleos de las células del endometrio de ratas normales, ovariectomizadas y tratadas con estradiol a diferentes tiempos.

MATERIAL Y MÉTODO

- Animales y Experimentos

Se utilizaron 12 ratas hembras de la raza Wistar de alrededor de 250 g de peso, las cuales se dividieron en cuatro lotes experimentales con tres individuos cada uno. Un lote control al cual no se le aplicó ningún tratamiento, sacrificándolo 21 días después de iniciado el experimento, un lote experimental 1, en donde los individuos se ovariectomizaron bilateralmente (castración) y a los 21 días después se les sacrificó, un lote experimental 2, en donde a los individuos se les realizó una ovariectomía bilateral y 21 días después se les aplicó una dosis de 20 μg de 17- β estradiol intraperitonealmente, esperándose 30 minutos para su sacrificio. Un lote experimental 3, en donde a los individuos se les realizó una ovariectomía bilateral, 21 días después se les aplicó una dosis de 20 μg de 17- β estradiol intraperitonealmente esperándose 120 minutos para su sacrificio.

- Microscopía Electrónica

Para el sacrificio se utilizó éter etílico como anestésico, realizando una incisión ventral para tomar muestras de útero y fijarlas inmediatamente en

paraformaldehído al 4% durante 90 minutos, lavándose las muestras con buffer de fosfatos a pH 7.2 y posteriormente deshidratando con alcohol metílico a diferentes concentraciones (30%, 50%, 70%, 90%) a -20 °C y finalmente infiltrando e incluyendo las muestras en la resina Lowicryl K4M con ayuda de una lámpara de luz ultravioleta a 4°C durante 48 hrs.

Los bloques obtenidos se tallaron y cortaron con ayuda del Ultramicrotomo LKB, los cortes semirinos se montaron en portaobjetos y se tñieron con azul de toluidina para seleccionar el área a observar. De la zona seleccionada se obtuvieron cortes ultrafinos de alrededor de 80 nm de grosor, los cuales se montaron en rejillas de oro cubiertas con una membrana plástica (formvar).

-Hibridación in situ Ultraestructural

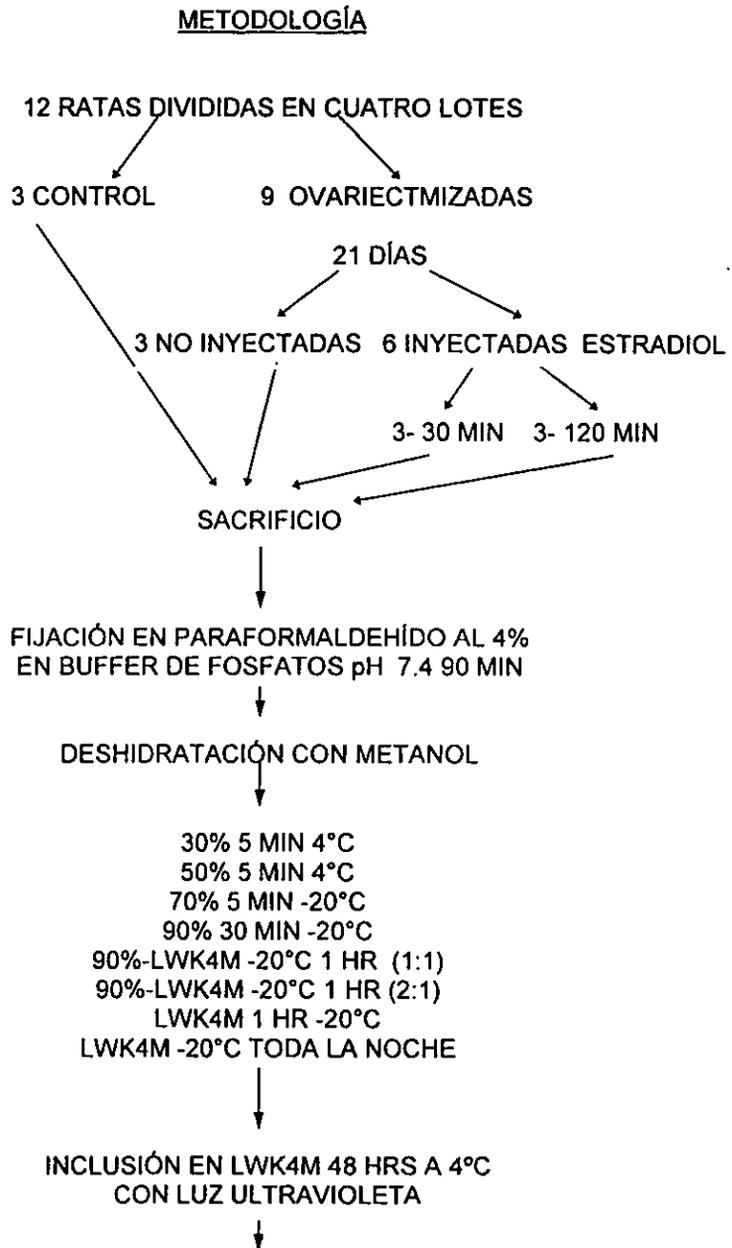
La *hibridación in situ* se llevó a cabo como se describe recientemente López-Velázquez y col., 1998. Se aisló DNA de rata (bazo) a una concentración de 1.7 μ M, con el cual se preparó una sonda tomando 3 μ l de ADN, 5 μ l de enzimas y 5 μ l de nucleótidos (adenina) acoplados con biotina, dejándose reaccionar la mezcla en un baño de flotación a una temperatura de 16°C, durante dos horas y media. Terminado este proceso se obtuvo la sonda. Se añadieron 10 μ l de sonda, 2 μ l de tRNA (100mg/ml) y 10 μ l de formamida. Esta

mezcla se colocó en una baño maría en ebullición durante 4 minutos y transcurrido este lapso de tiempo se colocó la sonda en hielo, se le agregó una mezcla de 4 μ l de BSA al 5%, 4 μ l de sulfato de dextran al 50% y 2 μ l de 20x solución salina concentrada (SSC). Realizada la combinación entre la sonda y la mezcla, se colocaron las gotas necesarias para flotar las rejillas sobre ella y todo dentro de una cámara húmeda. La cámara se colocó en una estufa a 42°C durante toda la noche. Terminado este lapso de tiempo se lavaron en 4x SSC y después se colocaron en una solución de 4x SSC y estreptavidina acoplada a oro coloidal a una concentración de 1:10, durante toda la noche a 4°C. Después se lavaron con 4x SSC y con agua bidestilada, dejándose secar, se realizó contraste de uranilo-plomo y se observó al microscopio electrónico EM-10 Carl Zeiss y se fotografió.

-Análisis cuantitativo

Se tomaron tres series de fotografías, obteniéndose un total de 50. Por cada una se contó el número de granos de oro por micra cuadrada, con los resultados obtenidos se realizó una comparación estadística con la prueba de análisis de varianza.

Diagrama de Flujo (Fig. 3)



CORTE



HIBRIDACIÓN IN SITU
MARCADO 2 ½ HRS (NICK-TRANSLATION)
ELECTROFORESIS
COLOCAR EN SONDA
COLOCAR EN ESTREPTAVIDINA-ORO
LAVADO



CONTRASTE



OBSERVACIÓN



REGISTRO FOTOGRÁFICO

RESULTADOS

Descripción morfológica

Los núcleos de las células endometriales presentan variaciones morfológicas dependiendo del tratamiento al que fueron sometidas. Los núcleos de las células sin tratamiento (controles) son de forma ovalada con poca cromatina condensada, presentándose en mayor proporción la cromatina laxa entre ella se puede observar el material granular disperso como los GPC, GIC, por todo el núcleo. Se puede encontrar frecuentemente un nucléolo; además, se puede observar el marcado con los granos de oro distribuidos por todo el núcleo y asociados a los GPC (ver Fig.4).

Los núcleos de las células endometriales de los individuos castrados presentan una forma irregular con disminución en el volumen nuclear. La distribución de la cromatina es similar a la de los núcleos de las células sin tratamiento. Se puede detectar un aumento en el número de granos de oro, los cuales se distribuyen por todo el núcleo (ver Fig. 5). Además, algunos gránulos pericromatinianos se marcan específicamente.

Los núcleos de las células endometriales de los individuos inyectados (1/2 y 2 horas) con la hormona, son de forma ovalada, con la distribución de la cromatina similar a la de las células sin tratamiento. Dependiendo del tiempo de

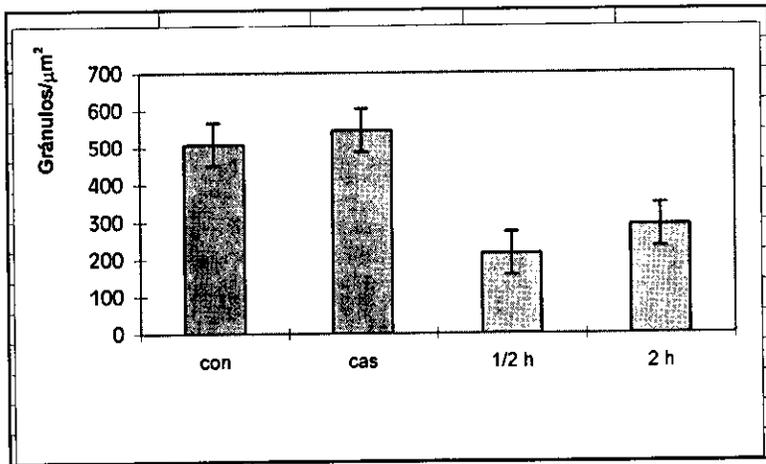
inyección, se puede observar variación en el número de granos de oro. En los núcleos de los individuos de inyección de ½ hora con la hormona presentan una disminución en el número de granos de oro (ver Fig. 6) y los individuos de inyección de 2 horas en comparación con el anterior alcanzan una distribución muy parecida a los de las células sin tratamiento (ver Fig. 7).

Morfometría

Después de contar los granos de oro y calcular su densidad (en μm^2), se observó que el número de granos es mayor en los individuos castrados con respecto a los normales. En los individuos inyectados media hora se presenta una disminución en el número de granos y los individuos inyectados 2 horas presenta un pequeño aumento en el número de granos con respecto al anterior (ver tabla 1 y gráfica 1). Las muestras se compararon estadísticamente con la prueba de análisis de varianza, con un 0.5% de error. Las diferencias encontradas son significativas.

Tabla 1. Número de granos de oro por micra cuadrada de los diferentes tratamientos, grupos control y experimentales.

GRUPO	CONTROL	CASTRADO	INY. ½ HORA	INY. 2 HORAS
Granos de Oro promedio por micra cuadrada	509.25	546.22	215	291.67
SD+/-	115.53	172.55	123.24	104.48



Gráfica 1. Frecuencia de los gránulos de oro por micra cuadrada en los núcleos de las células endometriales con los diferentes tratamientos. Control (con), castrado (cas) e inyección de media hora (1/2) y de 2 horas (2h).

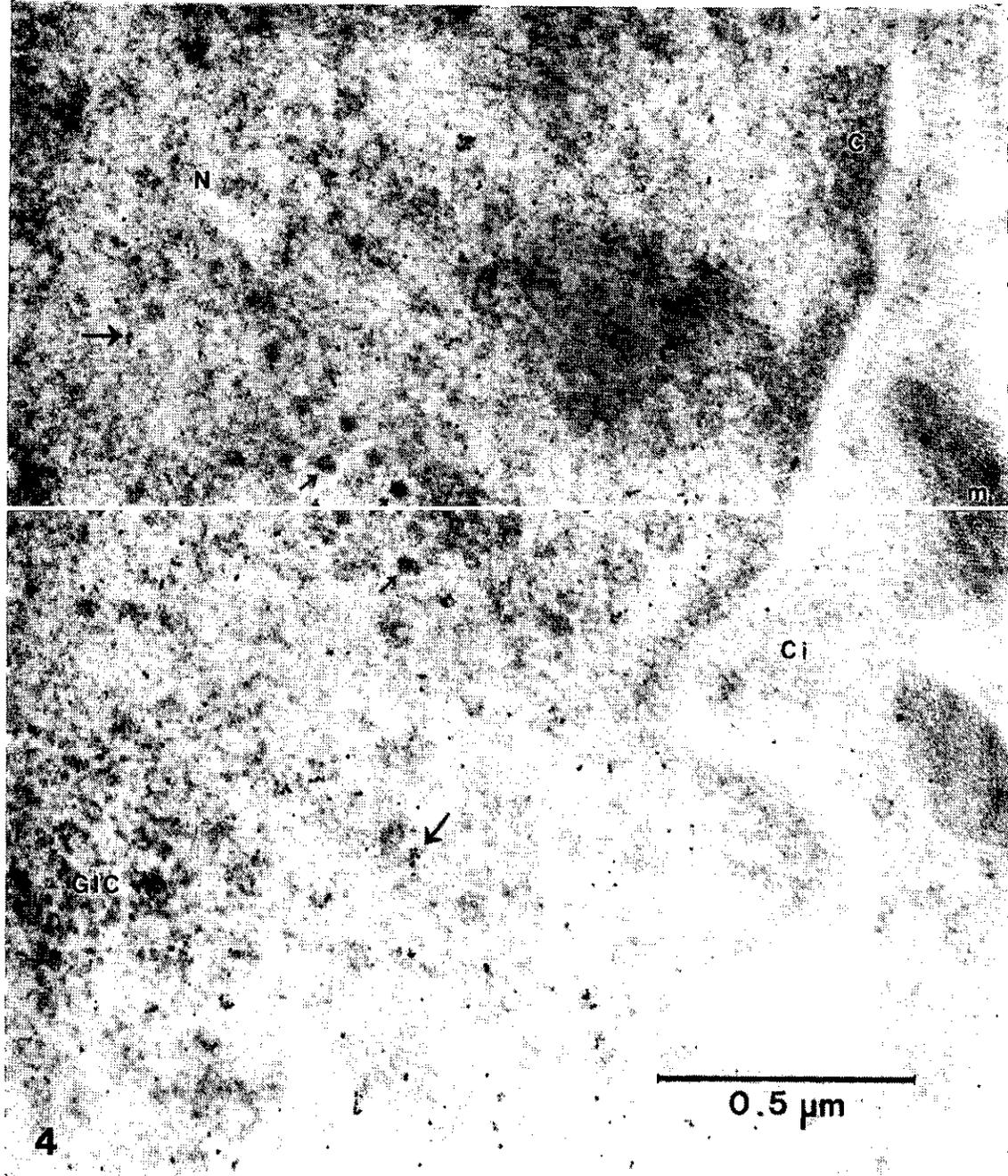


Fig. 4 Localización de RNA total por *hibridación in situ* ultraestructural en el núcleo de una célula epitelial endometrial de rata normal. La marca (flechas grandes) es apreciado en el núcleo (N), asociada en ocasiones a gránulos pericromatinianos (flechas pequeñas). C, cromatina; Ci, citoplasma; m, mitocondrias; GIC, gránulos intecromatinianos. x 84, 000.

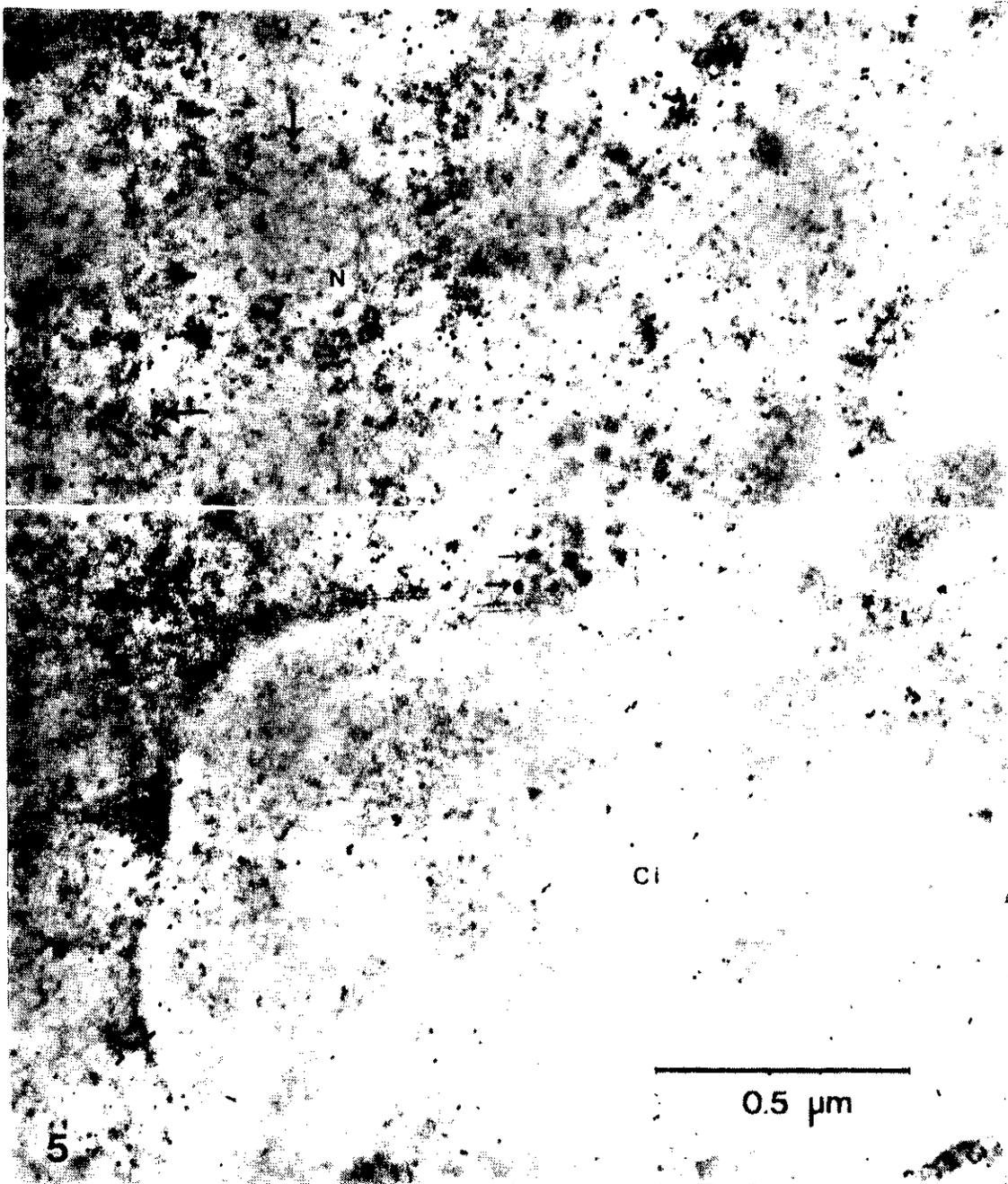


Fig. 5 Localización de RNA total por *hibridación in situ* ultraestructural en el núcleo de una célula epitelial endometrial de rata ovariectomizada. La marca (flechas grandes), en el núcleo (N) muy intensa y se asocia a veces con gránulos pericromatinianos (flechas pequeñas). La marca en el citoplasma (Ci) es menor. x 84, 000.

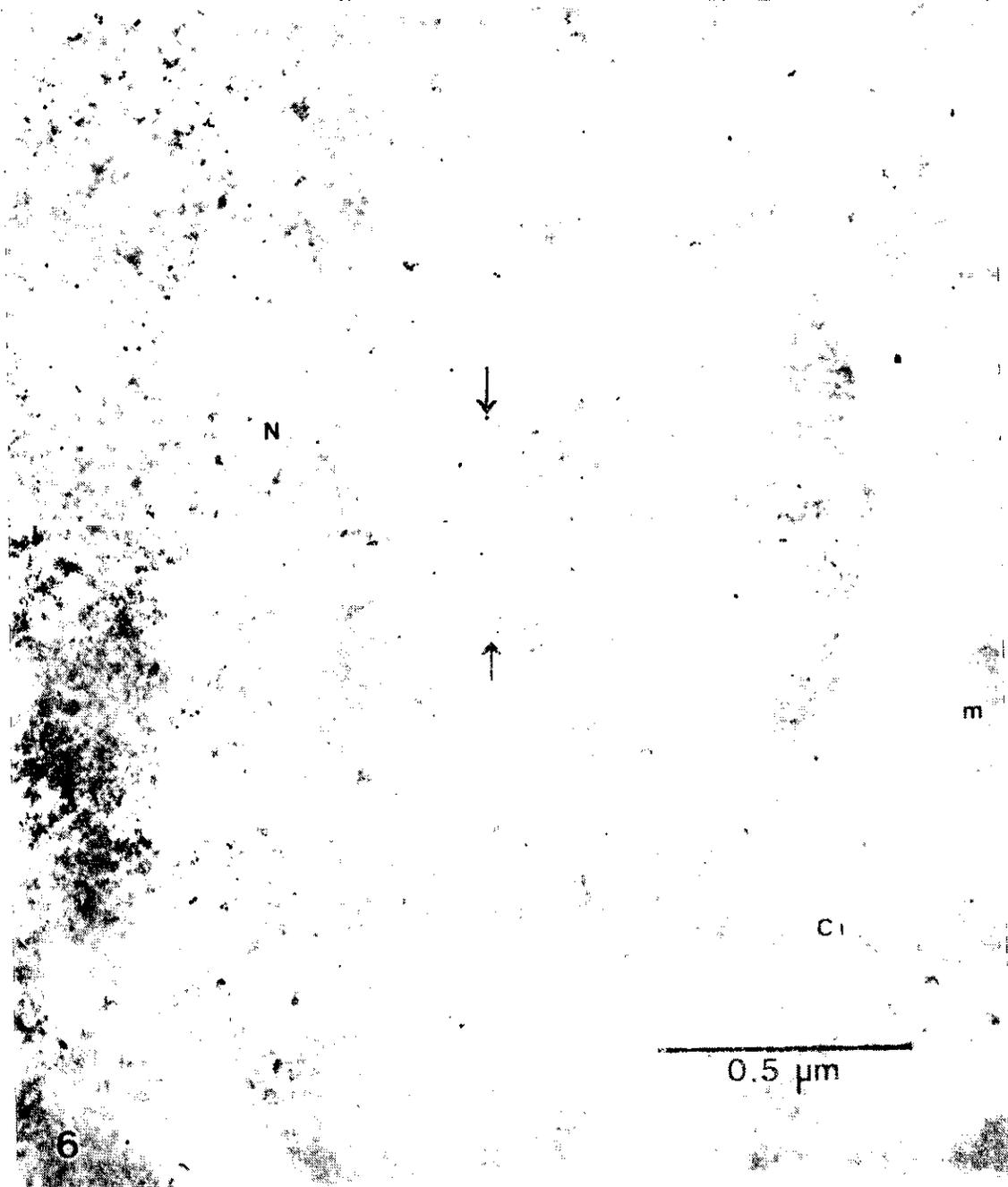


Fig. 6 Localización de RNA total por *hibridación in situ* ultraestructural en el núcleo de una célula epitelial endometrial de rata ovariectomizada y sacrificada después de ½ hora de la administración de estradiol. La marca (flechas grandes) en el núcleo (N), es apreciable, pero menos intensa que en las ratas ovariectomizadas. Ci, citoplasma; m, mitocondrias. x 84, 000.

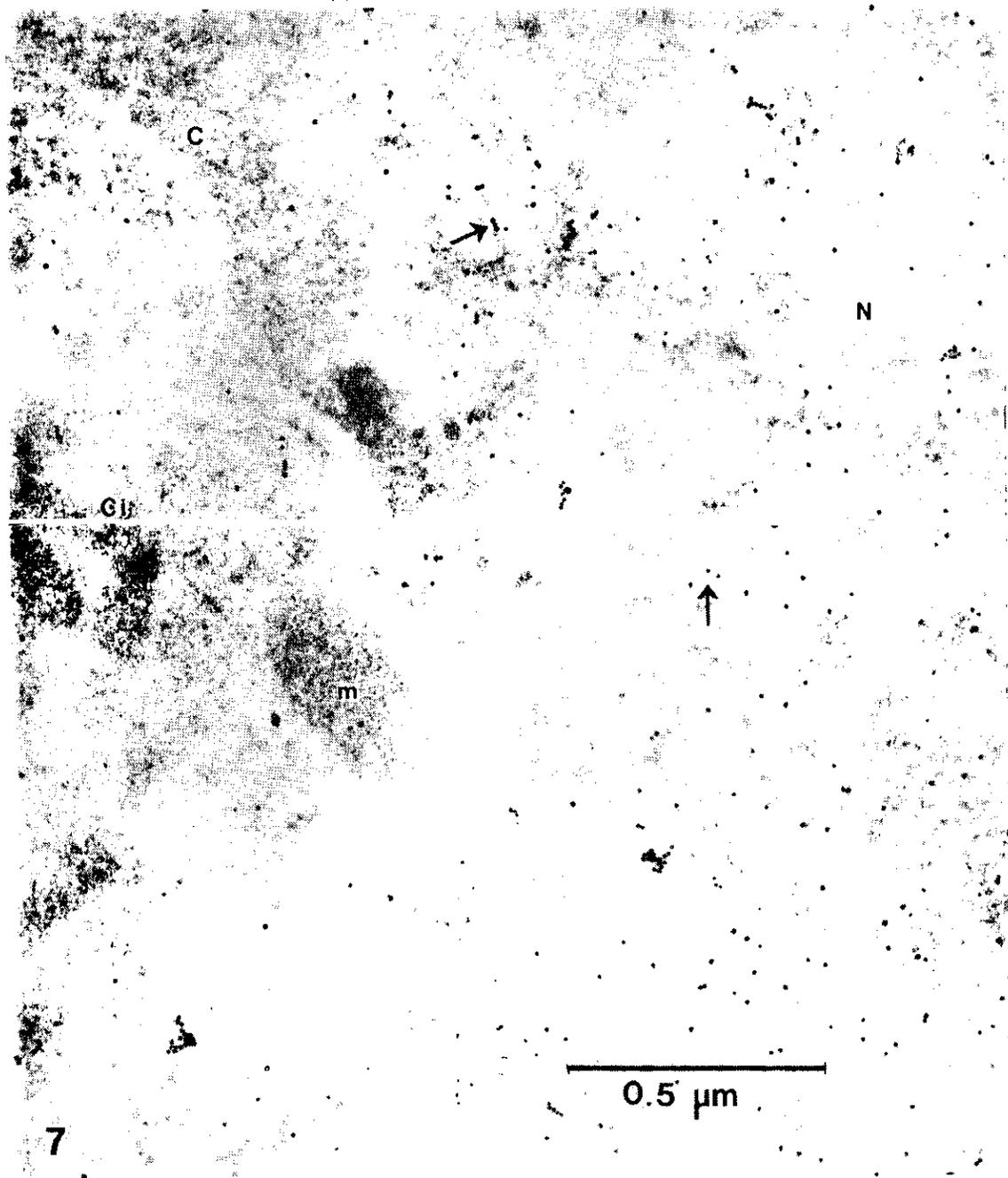


Fig. 7 Localización de RNA total por *hibridación in situ* ultraestructural en el núcleo de una célula epitelial endometrial de rata ovariectomizada y sacrificada después de 2 horas de la administración de estradiol. La marca (flechas grandes) en el núcleo (N), es mayor que después de ½ hora de administración de la hormona. Ci, citoplasma; C, cromatina; m, mitocondrias. x 84, 000.

DISCUSIÓN

Previamente se ha reportado un efecto postranscripcional del estradiol sobre células epiteliales del útero de rata. El efecto consiste en que el número de gránulos pericromatinianos varían inversamente proporcional con la concentración de estradiol (Vázquez-Nin y Col., 1978; Vázquez-Nin y Echeverría, 1996). Estos mismos resultados se obtuvieron *in vitro*, lo que indica un efecto postranscripcional del estradiol en el transporte de RNAm del núcleo al citoplasma (Vázquez-Nin y Col., 1979; ver Vázquez-Nin y Echeverría, 1996).

En el presente trabajo se estudiaron las variaciones de RNAs intranucleares por medio de *hibridación in situ* ultraestructural por medio de sondas de DNA genómico de rata (López-Velázquez y col., 1998). Los resultados indican una mayor cantidad de RNA en el estado castrado en comparación con los animales normales e inyectados

Estos resultados sugieren que una gran cantidad de RNA se almacena en el núcleo durante la castración. La evaluación del marcado permite notar que una parte de ese marcado ocurre en los GPCs.

Estos resultados se correlacionan con estudios previos en donde en los mismos estadios hay mayor cantidad de GPCs, por lo que podemos coincidir que una fracción importante está presente en sus partículas. Los cambios más críticos inducidos por el estradiol, además de los transcripcionales, ocurren en el transporte del RNA previamente sintetizado. En ratas castradas e inyectadas, estos cambios ocurren durante la primera hora después de su administración (Vázquez-Nin y Col., 1978 y 1979).

Este trabajo además de corroborar lo antes mencionado, muestra que existe una cantidad de RNA en diferentes partes del núcleo que varía de acuerdo a los GPC y que no se había medido antes con otras metodologías morfológicas hasta este trabajo.

CONCLUSIÓN

Por medio de la *hibridación in situ* ultraestructural, se observó que después de la ovariectomía, el RNA se acumula en el interior del núcleo. Después de la inyección de estradiol, el RNA pasa al citoplasma. Además, parte del RNA intranuclear se asocia con gránulos pericromatinianos, lo que refuerza la hipótesis de que esas partículas contienen mRNA ya maduro, producto de algunos genes específicos, además; de que el RNA total presente en otras partículas y disperso por todo el núcleo varía en cantidad de acuerdo con lo observado para el caso de los GPC.

BIBLIOGRAFÍA CONSULTADA

Alberts B., Bray D., Lewis J., Raff M., Roberts K. and Watson J. Molecular Biology of The Cell. 3a rd. Garland Publishing, Inc. New York & London. 1994.

Calandra R., N. A. Endocrinología Molecular. Edit. El ateneo. Argentina. 1985.

Cormark D. Histología de Ham. 9a ed. Harla. México. 1988.

Dorland L. Diccionario de Especialidades Médicas. Ed Médicos. 1992.

Echeverría O. M., Vázquez-Nin G., Pedrón J. A rapid method for the isolation and culture of endometrial epithelial cells responsive to estradiol. Acta Anat. 106: 45-56. 1980.

Echeverría O. M., Díaz J., Hernández Y., Sánchez C., Parra R., Hernández R., Vázquez-Nin . Effects of Progesterone on nuclear robonucleoprotein constituents of endometrial cells of the rat. Acta Anat. 122: 205-211. 1985.

Echeverría O. M., Pagán R., Vázquez-Nin. Effects of the testosterone on nuclear ribonucleoprotein components of prostate epithelial cells. *Biol. Cell* 72, 223-229. 1991.

Fawcett D. W. *Tratado de Histología*. Edit. Mc Graw Hill. España, 1991.

Herrera E. *Elementos de Bioquímica*. Edit. Interamericana, Mc Graw Hill, México. 1993.

Jiménez-García L., Segura-Valdez M. L. El Origen y la Evolución del Núcleo Celular. Un enfoque ultraestructural del procesamiento postranscripcional del ARN premensajero. Cap. 8 de *Tópicos de Biología Evolutiva*, Juan Núñez-Farfan y Carlos Cordero. Centro de Ecología, UNAM. México D.F. 1993.

Jiménez-García L. F., Spector D.L. In vivo evidence that transcription and pre-mRNA processing are coordinated by a recruiting mechanism. *Cell*. 73: 47-59. 1993.

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

Jiménez-García L.F., Segura-Valdez M.L., Ochs, R.L., Rothblum, L.I., Hannan R., Spector, D.L. Nucleologenesis: U3SnRNA-containing prenucleolar bodies move to sites of active pre-rRNA transcription after mitosis. *Mol. Biol. Cell* 5: 955-966.1994.

Laguna J. Bioquímica. Edit. Salvat, México, D. F. 1990.

López-Valázquez, G., Segura Valdez, M. L., Alcántara Ortigoza, M. A., Jiménez García, L. F. Localization of intranuclear RNA by electron microscopy in *situ* hybridization using a genomic DNA probe. *Arch. Med. Res.* 29(2): 185-190. 1998.

Monneron A., Bernhard W. Fine structure of the interphase nucleus in some mammalian cells. *J. Ultrastruct. Res.* 27: 266. 1969.

Pasqualini R. Q. Endocrinología Vol. II. Edit. Científico-Médica, Barcelona España. 1973.

Raska I., Ochs R., Salamin-Michel L. Immunocytochemistry of the cell nucleus. *Elec. Micros.* 3: 301-353. 1990

Selye Hs. Endocrinología Edit. Salvat. España, 1952.

Spector D. Macromolecular Domains Within the Cell Nucleus. *Annu. Rev. Cell Biol.* 9:265-315. 1993.

Stevens A., Stevens L. J. *Texto y Atlas de Histología*. Mosby/ Doyma Libros. México. D.F. 1991.

Thampan R. V., The nuclear binding of estradiol stimulates ribonucleoprotein transport in the rat uterus. *J. Biol. Chem.* 260: 5420-5426. 1985.

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

Vázquez-Nin G. H., Echeverría O. M., Pedrón J. Effects of estradiol on the ribonucleoprotein constituents of the nucleus of cultures endometrial epithelial cells. *Biol. Cellulaire.* 35: 221-228. 1979.

Vázquez-Nin G. H., Echeverría O. M. *El núcleo celular interfásico*. Edit. Las prensas de ciencias. México, 1995.

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