

Universidad Nacional Autónoma de México

FACULTAD DE MEDICINA VETERINARIA Y ZOOTECNIA



EFFECTO DE LA PROGESTERONA SOBRE LOS
GRANULOS PERICROMATINIANOS DE LAS
CELULAS DEL EPITELIO LUMINAL DEL
ENDOMETRIO DE RATA

T E S I S

QUE PARA OBTENER EL TITULO DE:
MEDICO VETERINARIO ZOOTECNISTA
P R E S E N T A:

RAFAEL HERNANDEZ GONZALEZ

Asesores: M.V.Z. M. en C. Jorge Tolosa S.
M. en C. Concepción Sánchez
Dr. en C. Gerardo H. Vázquez Nin



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.

I N D I C E

RESUMEN.....	PAG.	1
INTRODUCCION.....	"	2
MATERIAL Y METODOS.....	"	6
RESULTADOS	"	8
FIGURA 1	"	9
GRAFICA 1.....	"	10
GRAFICA 2.....	"	11
GRAFICA 3.....	"	12
DISCUSION.....	"	13
CONCLUSIONES	"	16
LITERATURA CITADA	"	17

RESUMEN

Con el propósito de conocer los efectos de la progesterona sobre la expresión génica, se ovariectomizaron 36 ratas Wistar adultas a las cuales se les administró estradiol durante tres semanas, al término de éstas, se obtuvieron muestras del cuerno uterino derecho de cada animal, las cuales se procesaron para microscopía electrónica mediante la técnica de Bernhard, al mismo tiempo se administraron 5 mg. de progesterona por rata, tomándose muestras del cuerno contra lateral a tiempos variables después de la administración, procesándose de la misma forma que las muestras del cuerno derecho. A partir de las fotografías obtenidas por microscopía electrónica se realizaron cálculos estereológicos los cuales muestran que la progesterona administrada después de un tratamiento con estradiol es capaz de producir cambios en el volumen nucleolar ($P < 0.05$). Sin embargo aparentemente este tratamiento no produce cambios significativos en la cantidad de gránulos pericromatinianos por unidad de superficie nuclear ($P > 0.05$), así como en el total de estructuras ribonucleoproteicas no nucleolares ($P > 0.05$). Estos resultados sugieren que la progesterona induce cambios a nivel génico sólo en un reducido número de estructuras específicas involucradas en la transcripción; o bien que la progesterona es capaz de inducir cambios masivos de estructuras ribonucleoproteicas involucradas en la transcripción génica en un período mayor de tiempo que el requerido por los estrógenos.

INTRODUCCION

El núcleo es el responsable del control de numerosas actividades en la célula. La información necesaria para el control de estas actividades se encuentra codificada en moléculas de Acido desoxirribonucleico (DNA). A pesar de que todos los núcleos de las células de un organismo contienen la misma información genética, existe una gran diversidad de formas, funciones y tipos celulares. Esto se debe a una forma diferente de utilizar el DNA y el mecanismo por el cual sucede se basa en la existencia de una acción represora o activadora de un gen específico. La duplicación del DNA es un fenómeno indispensable para la conservación de la continuidad genética y sólo ocurre durante una determinada etapa del ciclo celular conocida como interfase. También en esta etapa ocurren la síntesis de RNA y la mayor parte de la síntesis proteica (2). La mayoría de los núcleos de un individuo adulto se encuentran en interfase (18). Entre los componentes del núcleo interfásico además de la envoltura nuclear, matriz nuclear y cromatina se encuentra el nucleolo y diversas partículas o estructuras ribonucleoproteicas (RNP) no nucleolares (14, 16, 20) algunas de las cuales tienen probada significancia citofisiológica (20,21).

El nucleolo se ha descrito como la estructura intranuclear de mayor tamaño relacionada con el metabolismo del ácido ribonucleico (RNA). Su morfología es la de una estructura esférica cuyo diámetro es de 1-3 μ m. Gracias al empleo de técnicas histoquímicas es posible distinguir dos componentes principales dentro del nucleolo: uno denominado cuerpo nucleolar constituido por ribonucleoproteínas (RNP) y el otro de cromatina condensada denominado cromatina nucleolar. El cuerpo nucleolar contiene tres tipos de componentes: fibrillas de 50-10 μ de grosor, gránulos de 150 a 200 μ de diámetro y un material difuso, amorfo, denominado matriz la cual contiene a los otros

dos componentes (20). Diversos estudios citoquímicos muestran que principalmente el RNA nucleolar se concentra en las fibrillas y gránulos los cuales componen la mayor parte del cuerpo nucleolar. Estudios autorradiográficos sugieren que la porción fibrilar es precursora de la porción granular y que ambas dan origen al RNA ribosómico (RNA) que una vez formado emigra al citoplasma (12). La cromatina asociada al nucleolo aparece generalmente en alguno de los extremos de éste y en ocasiones es posible apreciar además cromatina intranucleolar. La cromatina asociada al nucleolo es la responsable de la mayor parte de RNA_r sintetizado (12). Se ha observado que en muchos organismos, los nucleolos se fijan a regiones especiales de cromosomas específicos; estas regiones reciben el nombre de organizador del nucleolo. Los estudios de hibridación molecular, permiten afirmar que las regiones organizadoras del nucleolo contienen la información genética correspondiente al RNA ribosómico. El tamaño de los nucleolos guarda relación con la intensidad de síntesis protéica que se desarrolla en la célula (12, 10) por lo que el volumen nucleolar es un indicador morfométrico del estado de la transcripción de los genes del organizador nucleolar (24). Existen cinco tipos de estructuras ribonucleoprotéicas no nucleolares, éstas son: fibrillas pericromatínicas, gránulos intercromatínicos, fibras intercromatinianas, fibras espiraladas y gránulos pericromatinianos. Los gránulos pericromatinianos han sido descritos como partículas esféricas que miden de 300 a 500 Å de diámetro y frecuentemente se les localiza en la periferia de la heterocromatina aunque también en la zona interheterocromática; una característica de esta estructura ribonucleoprotéica es la de estar rodeada de un halo claro de aproximadamente 250 Å de espesor. Los datos citoquímicos y morfométricos sugieren que tanto en artrópodos como en vertebrados dichos gránulos contienen ácido ribonucleico producto de la transcripción del gen a) cual son adyacentes (20, 21). Los trabajos comparativos (20, 23) entre gránulos pericromatinianos de hepatocitos de rata y gránulos de los anillos de Balbiani de cromosomas politénicos de Chironomus sugieren que estos grá-

nulos realizan una función de almacén y/o transporte intranuclear de ácido ribonucleico mensajero o premensajero.

Por otra parte tenemos que las hormonas ováricas -- producen importantes cambios morfofuncionales en los diversos tejidos del aparato reproductor (1,7,9,11), cambios que incluyen modificaciones en la transcripción genética del epitelio endometrial. Existen trabajos en los que se estudia el efecto de la administración de las hormonas ováricas sobre las diferentes estructuras del aparato reproductor (4,5,6,10,13,17,19 - 22,24,25), trabajos incluso en los cuales se estudian los --- efectos del estradiol sobre los gránulos pericromatinianos de las células epiteliales del endometrio de rata. Uno de estos trabajos estudia "in vitro", el efecto del estradiol sobre la cantidad de gránulos pericromatinianos del epitelio endome--- trial de rata, y señala que dicha hormona produce una disminu--- ción significativa de la cantidad de estos gránulos en la pri--- mera hora posterior a la administración de la hormona (25). Estos autores también registran que al mismo tiempo que dismi--- nuye la cantidad de gránulos en el núcleo hay un aumento de - RNA citoplásmico. Por ello postulan que el estradiol es el -- responsable de un incremento en transporte de RNA al citoplas--- ma. Estos resultados apoyan también la hipótesis de que los - gránulos pericromatinianos son la expresión morfológica de un estado metabólico del RNA.

Por otra parte estudios sobre la variación de los - gránulos pericromatinianos durante el ciclo estral de la ra--- ta (7) muestran que existe un incremento en el número de es--- tos gránulos durante la etapa de diestro la cual es una fase asociada a altos niveles plasmáticos de progesterona. Sin em--- bargo para asegurar que esta hormona es la responsable de es--- te efecto es necesario realizar experimentos en animales ova--- rictomizados y tratados con progesterona. Así pues el propó--- sito del presente trabajo es el de estudiar el efecto de la - progesterona sobre la variación en número de los gránulos --- pericromatinianos y volumen nucleolar de las células del epi--- telio luminal del endometrio de rata.

MATERIAL Y METODOS

Se ovariectomizaron 36 ratas Wistar de tres meses de edad, bajo anestesia con éter, a las cuales se les aplicaron inmediatamente 0.133 mgrs/rata de fosfato de poliestradiol una vez por semana durante 3 semanas. Al cabo de las cuales se procedió a realizar el experimento. Este consistió en:

- 1) Resección del cuerno uterino derecho de todas las ratas del cual se tomaron muestras, las cuales se fijaron para microscopía electrónica.
- 2) Inyección intraperitoneal de 5 mg/rata de progesterona.
- 3) Resección del cuerno uterino izquierdo 1/2 hora, 1, 2, 4, 8 horas después de la inyección, tomando muestras para fijación en las mismas condiciones que para el cuerno contralateral.

La fijación se llevó a cabo con glutaraldehído al 2.5% en amortiguador de cacodilatos al 0.16 M a pH 7.3.

La deshidratación e inclusión se realizaron de acuerdo a los métodos habituales en microscopía electrónica. Se realizaron cortes ultrafinos de 90 nm de espesor, los cuales se contrastaron con la técnica de EDTA de Bernhard (3) para ribonucleoproteínas (RNP). Se utilizó un microscopio electrónico EM9S para observar y fotografiar los preparados siempre a un mismo aumento. El aumento final de la fotografía es de 30,000 X.

El análisis cuantitativo de gránulos pericromatiniano consistió en el conteo de los gránulos pericromatinianos contenidos en cada uno de los núcleos fotografiados en un corte ultrafino. El análisis cuantitativo de otras partículas ribonucleoproteicas como: fibras pericromatinianas e intercromatinianas así como de gránulos intercromatinianos se basó en el conteo estadístico de dichas estructuras en cada uno de los núcleos contenidos en los cortes ultrafinos. El cálculo de la densidad por área se basó en los métodos usuales de análisis estereológicos (21).

Las mediciones del volumen nucleolar se realizaron en un microscopio óptico axiomat (Carl Zeiss) provisto de vernier en la lente intermedia. Estas mediciones se efectuaron a un aumento final de 3200 X. Debido al elevado número de muestras se utilizó una microcomputadora HP 9825 (Hewlett-Packard) para realizar los cálculos esteriológicos, archivo de la información, cálculos estadísticos y expresión gráfica de los resultados. La prueba estadística a la que se sometieron los resultados es la T de Student para muestras -- apareadas y no apareadas.

RESULTADOS

El núcleo en los diferentes tipos de tratamiento presentó invariablemente gránulos pericromatinianos e intercromatinianos, fibras pericromatinianas e intercromatinianas y nucleolo (Fig. 1).

El efecto de la progesterona sobre las estructuras nucleares repercutió principalmente en el nucleolo - donde se observó una disminución en el volumen nucleolar durante la primera media hora de tratamiento ($P < 0.05$), seguida de un aumento gradual hasta alcanzar un valor -- significativo a las 2 hrs. post-tratamiento (Gráfica 1). Los gránulos pericromatinianos visualizados después de la técnica de EDTA para ribonucleoproteínas se presentaron en mayor número en los tratados que en los grupos -- control, pero esta diferencia no fue significativa ----- ($P > 0.05$) (Gráfica 2). Tampoco se presentaron variaciones en la cantidad total de partículas ribonucleoproteícas no nucleolares a lo largo del experimento ($P > 0.05$), (Gráfica 3), ni se apreciaron cambios notables en la morfología nuclear.

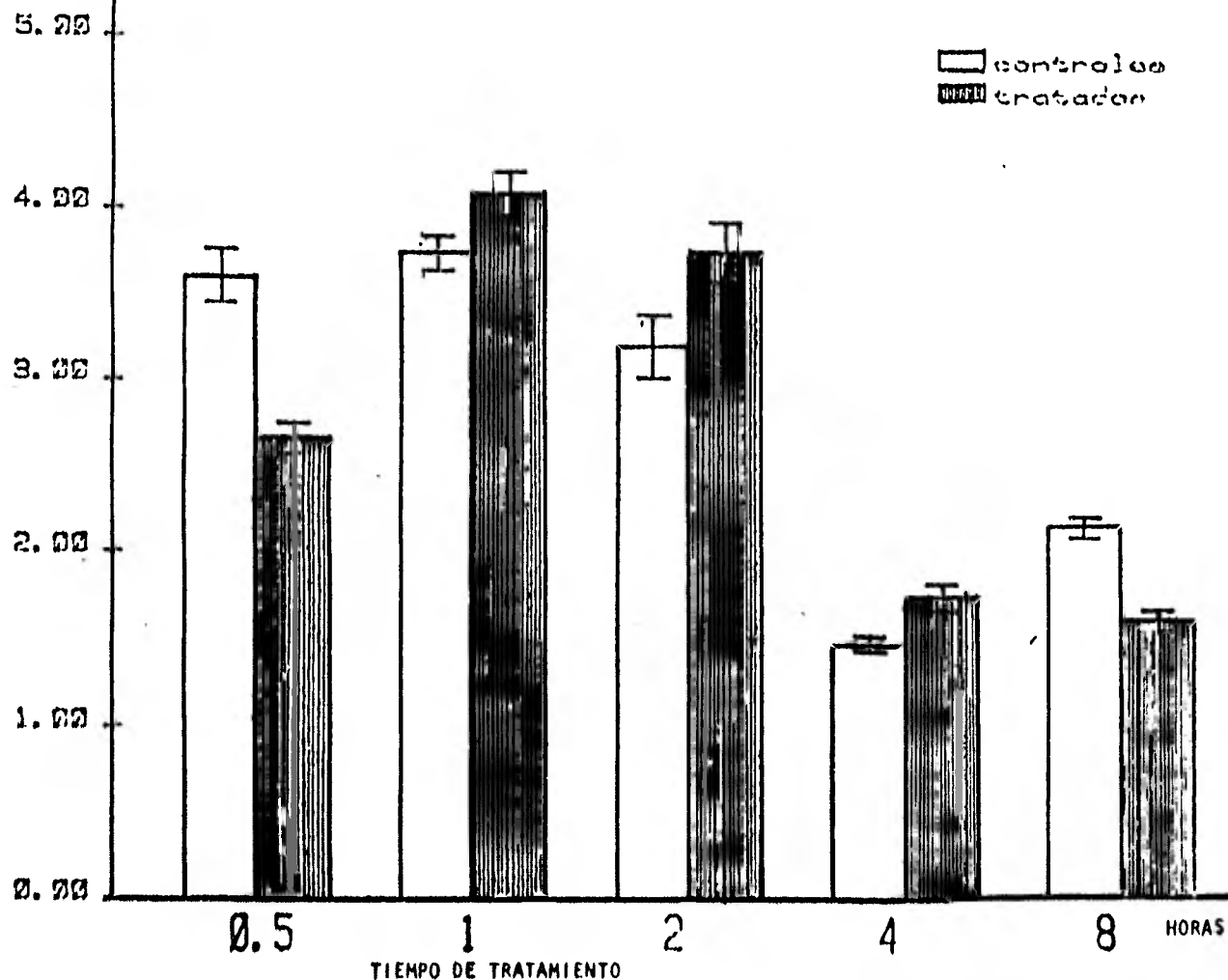


FIGURA 1 Microfotografía electrónica que muestra la presencia de gránulos pericromatinianos (flechas grandes), gránulos intercromatinianos (flechas pequeñas) así como del nucleolo (Nu) y grumos de cromatina condensada (C) en el núcleo de una célula del epitelio luminal del endometrio de rata tratado con progesterona - 30,000 X

micras

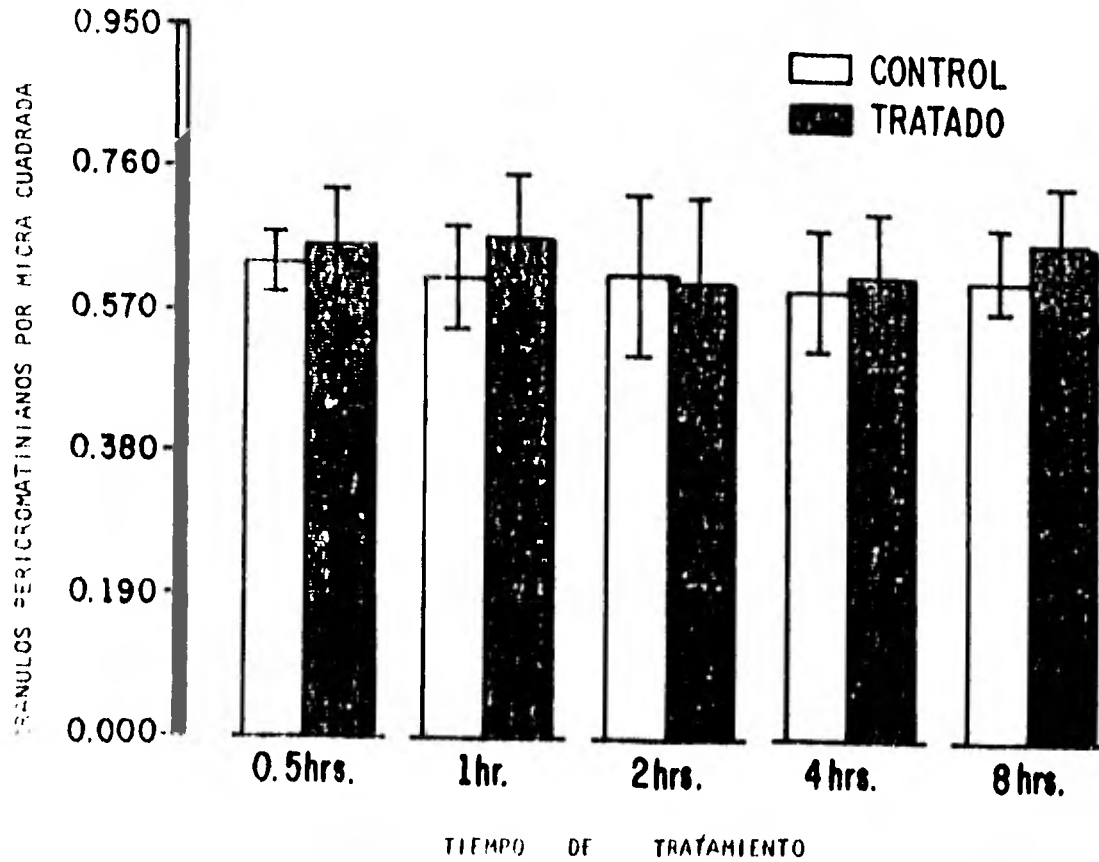
cúbicas

GRAFICA 1 EFECTO DE LA PROGESTERONA SOBRE EL VOLUMEN NUCLEOLAR



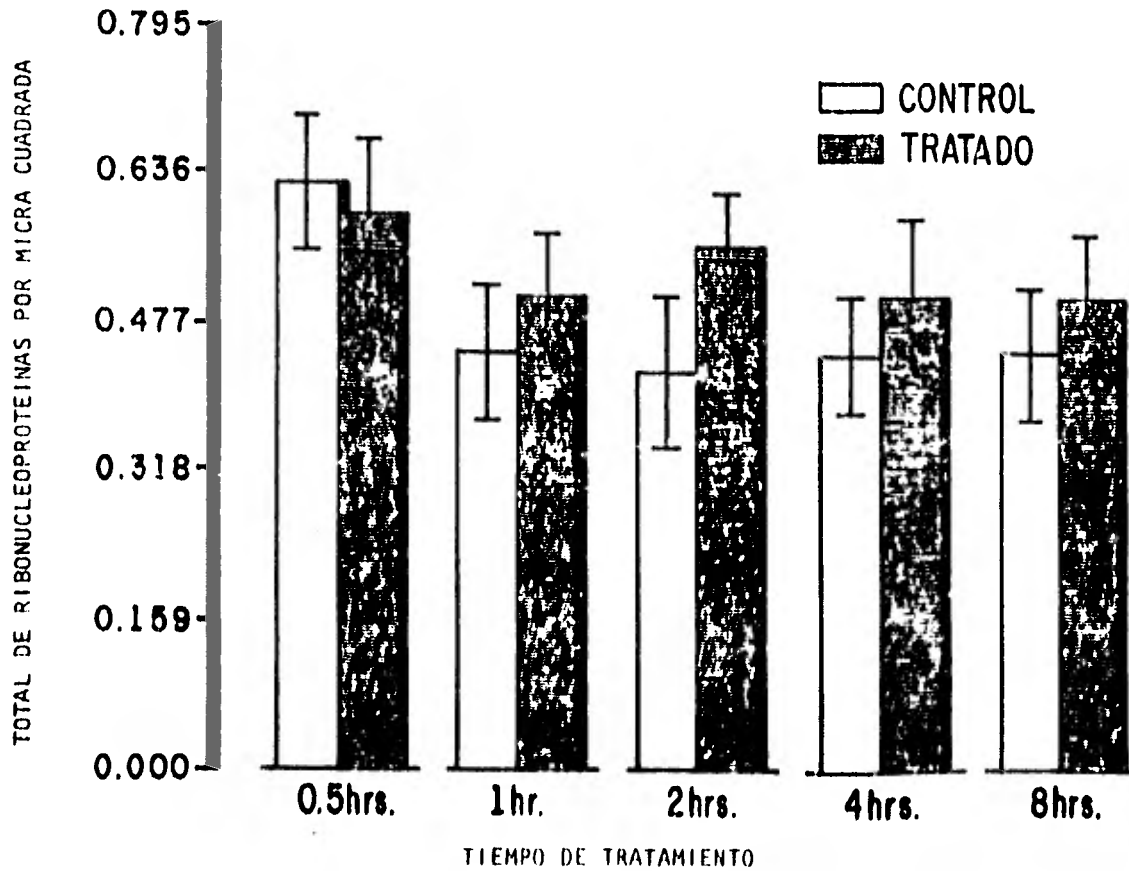
GRAFICA 2

EFFECTO DE LA PROGESTERONA SOBRE LOS GPC



GRAFICA 3

EFFECTO DE LA PROGESTERONA SOBRE LAS RNP



DISCUSION

Los resultados muestran que la progesterona es capaz de producir cambios morfológicos en el nucleolo el cual es una estructura involucrada en los procesos de transcripción génica. Sin embargo en los tiempos que incluye el diseño -- experimental del presente trabajo se observa que la progesterona no es capaz de producir cambios cuantitativos del -- número de gránulos pericromatinianos, así como del total de las otras partículas ribonucleoproteicas.

Estos resultados difieren de los obtenidos por otros investigadores que utilizan modelos experimentales similares en la búsqueda de los efectos transcripcionales de la -- progesterona (13) Kurl y Borthwick (13) encuentran un aumento de la actividad de la RNA polimerasa B (proteína relacionada con el metabolismo del RNA mensajero) 30 minutos después de tratamiento con progesterona, dicha actividad declina a la 1 hora post-tratamiento a los valores normales par volver a tener un ligero incremento a las 4 horas y retornar a los valores normales a las 18 hrs postratamiento. Estos datos muestran que la progesterona afecta la actividad de las RNA polimerasa B y por ende el metabolismo de RNA -- mensajero. Sin embargo estos estudios bioquímicos se basan en la medición de la actividad de las RNA polimerasas extraída de núcleos de fragmentos de tejido uterino el cual contiene diferentes tipos celulares como son: células musculares, conjuntivas y epiteliales. Estos tipos celulares -- responden cada uno en forma diferente a la influencia hormonal (15). Es así que la progesterona después de un tratamiento con estrógenos detiene la actividad mitótica de las células epiteliales a la vez que estimula esta actividad en las células del estroma. Sin embargo aún dentro del tejido epitelial existe variación en cuanto a la respuesta al estímulo hormonal, ya que este mismo tratamiento suprime la -- actividad mitótica en las células del epitelio luminal, sin embargo este efecto no acontece en las células del epitelio glandular (15). En cambio el presente trabajo está enfocado

a la apreciación de cambios morfológicos en núcleo que pudieran delatar efectos tempranos de la progesterona sobre la -- transcripción génica en el epitelio luminal de rata.

En estudios morfológicos similares se ha utilizado únicamente estradiol (24, 25) y sólo existe un trabajo que analiza indirectamente la actividad de la progesterona (7). En este último se hace un análisis del comportamiento de los -- gránulos pericromatinianos durante las fases del ciclo estral de lá rata y en él se muestra que durante las etapas de díastro 1 y 2, existe un incremento en el número de gránulos pericromatinianos. Esto, y los resultados del presente estudio sugieren tres posibilidades: que los cambios que induce la - progesterona a nivel génico afectan a un reducido número de estructuras específicas involucradas en la transcripción como es el caso del presente experimento el cual muestra que -- la progesterona es capaz de inducir cambios en el volumen -- nucleolar; o bien que la progesterona es capaz de inducir -- cambios masivos de estructuras ribonucleoprotéicas involu--- cradas en la transcripción génica en un período mayor de --- tiempo que el requerido por los estrógenos (25) y por último la propuesta por T. Williams y A.W. Rogers (26) quienes discutiendo los efectos de la progesterona sobre las células -- del epitelio luminal del útero sugieren que la progesterona actúa sobre estas células por un mecanismo diferente al del estradiol el cual no involucraría la síntesis de RNA media-- da por DNA.

En favor de la primera posibilidad tenemos los resultados obtenidos en el presente experimento en el cual únicamente se encontraron cambios significativos en la variación --- del volumen nucleolar y no se encontró ninguna diferencia -- significativa en la variación de gránulos pericromatinianos así como en el total de partículas ribonucleoprotéicas lo -- que sugiere que la progesterona activa selectivamente al gen del organizador nucleolar.

Con respecto a la segunda posibilidad es necesario considerar que en el ciclo estral de la rata con duración de 4 días la etapa de proestro tiene una duración de 12 horas, --

la etapa de estro una duración de 12 horas, la de metaestro 21 horas y la de diestro de 57 horas (4, 8), por lo que el útero de un animal sacrificado a mitad de diestro ha estado expuesto por lo menos a más de 24 horas de influencia de -- progesterona y en el presente trabajo únicamente comprende hasta 8 horas de tratamiento.

En relación a la tercera posibilidad sería necesario - realizar un estudio en el cual se compare con la misma metodología el epitelio glandular con el luminal.

V. CONCLUSIONES

La progesterona administrada después de un tratamiento con estradiol es capaz de producir cambios tempranos en la transcripción génica a nivel nucleolar, sin embargo este mismo tratamiento no produce cambios en la transcripción génica extranucleolar.

LITERATURA CITADA

- 1.- Austin, C.R. and Short, R.V.: Mechanisms of hormone Action, Cambridge University Press, Cambridge, 1979.
- 2.- Banks, W.J.: Histology and comparative organology: a --- text-atlas. Williams and Wilkins Company, Baltimore, --- 1974.
- 3.- Bernhard, W.: A new staining procedure for electron mi-- croscopical cytology. J. Ultrastruct. Res., 27: 250-265
- 4.- Bertalanffy, F.D. and Lau, Ch.: Mitotic rates, renewal times, and cytodynamics of the female genital tract epithelia in the rat. Acta anat. 54: 39-81 (1963).
- 5.- Billing, R.J., Barbiroli, B. and Smellie, R.M.S.: Chan-- ges in the patterns of synthesis of ribonucleic acid spe-- cies in immature rat uterus in response to estradiol --- 17-B Biochem. J., 112: 563-659 (1969).
- 6.- Catelli, M.G. and Beauliev, E.E.: Estrogen induced chan-- ges of ribonucleic acid in the rat uterus. Mol. Cell. -- Endocrinol., 6: 129-1591 (1976).
- 7.- Echeverría, O.M., Zavala, G., Benítez, A. and Vázquez -- Nin, G.H.: Changes during estral cycle in the nucleus of endometrial cells of the rat. Biol. Cell., 39: 139-142 (1980).
- 8.- Hafez, E.S.E.: Production and breeding techniques for -- laboratory animals. Lea & Febiger. Philadelphia, 1970.
- 9.- Hafez, E.S.E.: Reproduction in farm animals. 4ed. Lea -- and Febinger. Philadelphia 1980.
- 10.- Hamilton, T.H.: Control by estrogen of genetic transcrip-- ción and translation. Science, 161: 649-660 (1968).
- 11.- Heins, B. and Beato, M.: Hormonal control of uteroglobin secretion and preuteroglobin mRNA content in rabbit en-- dometrium. Mol. Cell. Endocrinol. 21: 139-150 (1981).
- 12.- Junqueira, L.C., Carneiro, J. y López-Sáez, J.F.: Biolo-- gía celular. La Prensa Médica Mexicana. México, 1976.
- 13.- Kurl, R.N. and Borthwick, N.M.: The effect of progesterone on RNA polymerases in the rat uterus. Steroids. 2839: 511-521 (1981).

- 14.- Maillert, M.: Fundamentos de citología animal. Editorial Alhambra, S.A., Madrid, 1975.
- 15.- Martin, L. and Finn, C.A.: Hormonal regulation of cell - división in epithelial and connective tissues of the mouse uterus. J. Endocr. 41: 363-371 (1968).
- 16.- Moneron, A. and Bernhard, W.: Fine structural organiza--- tion of the interphase nucleus in some mammalian cells. - J. Ultrastruct. Res., 27: 266-278 (1969).
- 17.- Muller H. and Beato, M.: RNA synthesis in rabbit endome-- trial nuclei. Hormonal regulation of transcription of the uteroglobinc gene. Eur. J. Biochem. 112: 235-241 (1980).
- 18.- Novikoff, A.B. and Holtzman, E.: Estructura y dinámica -- celular, Ed. Interamericana, México 1972.
- 19.- O'Malley, B.W. and Means, A.R.: Female steroid hormone -- and target cell nuclei. Science, 183: 610 (1974).
- 20.- Puvion, E. and Moyne G.: In situ localization of RNA struc-- tures. In: The cell nucleus, Vol. VIII. Academic Press, - Inc. New York, 1981.
- 21.- Steer, M.W.: Understanding cell structure. Cambridge Uni-- versity Press. Cambridge, 1981.
- 22.- Tachi, C., Tachi, S. and Lindner, H.R.: Modification by -- progesterone of estradiol induced cell proliferation, RNA synthesis and estradiol distribution in the rat uterus. - J. Reprod.Fert., 31: 59-76 (1972).
- 23.- Vázquez-Nin, G. and Bernhard, W.: Comparative ultrastruc-- tural study of perichromatin and Balbiani ring granules. J. ultrastruct. Res., 36: 842-860 (1971).
- 24.- Vázquez-Nin, G., Fcheverría, O., Molina, F. and Fragoso, J.: Effects of ovariectomy and estradiol injection on the nuclear structures of endometrial epithelial cells. Acta Anat., 102: 308-318 (1978).
- 25.- Vázquez-Nin, G.H., Fcheverría, O.M. and Pedron, J.: Effec-- tos of estradiol on the ribonucleoprotein constituents -- of the nucleus of cultured endometrial epithelial cells. Biol. Cellulaire, 35: 221-228 (1979).

- 26.- Williams, T. and Rogers, A.W.: Morphometric studies of --
the response of the luminal epithelium in the rat uterus
to exogenous hormones. J. Anat. 130: 867-881 (1980)