



UNIVERSIDAD NACIONAL AUTÓNOMA DE MÉXICO

Escuela Nacional de Estudios Profesionales
" IZTACALA "

Concentración de Carbohidratos Neutros y
Acido Siálico en el Sitio de
Implantación de la Rata

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 :

Joaquín Alejandro Aburto Ramírez



Universidad Nacional
Autónoma de México



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.

DEDICADO A MIS PADRES:

MA. TERESA RAMIREZ Y JESUS ABURTO PARRA

Que me aguantaron más tiempo del debido
para terminar los estudios de Biología.

A MIS HERMANOS:

JESUS Y ANTONIO.

Se agradece: la dirección de esta tesis de el Dr. Hicks y la contribución de la Químico Fármaco Bióloga: Cely Vilar Rojas, la participación de la maestra en Ciencias Cristina Loza y la colaboración en la revisión de la redacción del Biólogo Experimental: Martín Grenfell, del Maestro en Bioquímica: Luis Arturo Baiza Gutman, de la Q.F.B. Cecilia Vilar Rojas y de la secretaria de mecanografía Marlene y a la impresora: "AZTECA".

Este trabajo fue realizado en la Subjefatura de Investigación Científica del Centro Médico Nacional, ubicado en Av. Cuauhtémoc; en la Sección División de Biología de la Reproducción a cargo del Dr. Juan José Hicks.

RESUMEN.

Debido a que los carbohidratos, neutros: glucosa, manosa, galactosa, fucosa así como el ácido siálico con carga negativa pudiesen participar en la adhesión celular, embriogénesis, diferenciación celular, biología del desarrollo era de gran interés determinar la concentración de este tipo de moléculas que están en superficies celulares y se encuentran combinadas con proteínas (glicoproteínas), lípidos (glicolípidos) y con otros carbohidratos.

Se usaron 18 ratas *Longs evans* de dos meses de edad controladas y apareadas por el método Trío (dos hembras y un macho). Al quinto día de embarazo fueron inyectadas por vía intravenosa en la cola con una solución al 3 % de azul Evans para marcar los sitios de implante; se esperó 20 minutos y se sacrificaron por dislocación cervical.

Se extrajo el útero, se puso a una temperatura de 4°C y se cortaron, separando los sitios de implante del resto del útero; en seguida fueron puestos en tubos de ensaye por separado, se pesaron y se homogenizaron a una temperatura de 4°C en solución salina isotónica, se congelaron y se mantuvieron para ser utilizados a temperatura de 4°C. Se usaron alícuotas de 150, 100, 100, 50, 50, 100 microlitros para medir carbohidratos neutros por reacción de Antrona, Fucosa por el método de Dische-Sheltes, Acido Siálico por el método de Warren, Proteínas por el método de microbiuret, Peso seco por oxidación de la materia orgánica, Acido desoxirribonucléico (A.DN.) por el método de Burton.

De los resultados se obtuvo que no existen diferencias significativas entre las concentraciones de los carbohidratos de no sitios y sitios de implantación pero no puede excluirse la posibilidad de que exista diferencia entre ambas zonas a nivel de células epiteliales o de -- sus membranas, ya que las diferencias pudieron enmascarse al haber trabajado con una mezcla de células. Por último, respecto a las relaciones de concentraciones se determina que por un microgramo de ácido siálico hay 4 -- de fucosa.

CONCENTRACION DE CARBOHIDRATOS NEUTROS Y ACIDO SIALICO EN
EL SITIO DE IMPLANTACION DE LA RATA.

INTRODUCCION.

Debido a que los carbohidratos, neutros: glucosa, manosa, galactosa, fucosa así como el ácido siálico con carga negativa pudiesen participar en la adhesión, es de gran interés determinar la concentración de este tipo de carbohidratos que están en superficies celulares y se encuentran combinados con proteínas (glucoproteínas), lípidos (glicolípidos) y otros carbohidratos.

Se ha demostrado en animales de laboratorio (conejos, ratas, hamsters) que no todo el endometrio es capaz de recibir al huevo, y que existen sitios de implantación especializados, requiriendo estas zonas funcionales una maduración metabólica, ya que si son utilizadas antes de obtenerla, se transforman en sitios de implantación refractarios a una nueva implantación.

Recientemente, se han identificado nueve diferentes proteínas en secreciones endometriales, de las cuales siete son glicoproteínas y tienen un peso molecular mayor de 70,000 aumentando su concentración durante la fase de preimplantación, en la coneja, en ciervo y en el humano.

En 1966-67 Beier confirmó la presencia de una proteína en lavados uterinos de coneja entre los días y siete.

días postcoito, denominándola blastocina, la cual constituye del 40 al 60 por ciento de las proteínas totales encontradas en el quinto día, o sea, el día que se señala como el de la implantación, demostrándose posteriormente su presencia tanto en fluidos como en útero y oviducto en conejo, carnero, foca, coneja, humano e incluso en tracto genital masculino, particularmente en cola del epidídimo y en plasma seminal desconociéndose, en este caso, su posible correlación funcional.

Estudios recientes de bioquímica analítica han demostrado la presencia de carbohidratos en fluidos genitales de la hembra formando parte principalmente de las proteínas como son los casos del ácido N-acetilneuramínico (ácido siálico) en la prealbúmina de la glucosa en la postalbúmina y de concentraciones importantes de glucosa en las β -glicoproteínas (uteroespecíficas).

La blastocinina contiene aproximadamente 5.7 por ciento de carbohidratos, entre los que no se encuentra el ácido siálico. Teniendo este carbohidrato la particularidad de ser el responsable en gran parte de la carga de su superficie de las membranas celulares, así como de algunos determinantes antigénicos y sitios receptores a hormonas. En estudios realizados por Rajalakshmi M. y col., se demostró que tanto en la rata como en el ratón la concentración de glucógeno en el tracto genital disminuye inmediatamente después del coito, para iniciar a partir de ese momento un aumento progresivo en su concentración, alcanzando su máximo en el día cuatro, o sea al final de la preimplantación. Las fluctuaciones en las concentraciones de glucógeno y

ácido siálico durante el embarazo temprano corresponden con los cambios en la concentración sistémica de estrógenos durante las etapas de estro, proestro y preimplantación, lo que permite hacer la consideración de que el ácido siálico juega un papel muy importante en la interacción blastocisto-endometrio, mientras que el glucógeno es un polisacárido de reserva indispensable para permitir el metabolismo glicolítico del huevo en los primeros días postimplantación.

En la fase de preimplantación, se ha demostrado que la sialidasa o neuraminidasa, al regular las características de carga de glicoproteínas, mucopolisacáridos y sialolípidos, pudiese ejercer un efecto importante sobre las características de polaridad de la superficie endometrial, y como consecuencia, afectar tanto la interacción de hormonas al modificar las características de los receptores de membranas, como los requerimientos de polaridad necesarios para la implantación.

En la mujer, tanto en tejido endometrial como en fluidos, la actividad de neuraminidasa aumenta progresivamente de fase proliferativa a fase secretora, estando su actividad muy aumentada en el embarazo temprano y en la fase de preimplantación.

En la fracción de β -glicoproteínas de lavados uterinos de conejas, se demostró la presencia de una proteasa específica con una actividad máxima al séptimo día postcoito, la cual es regulada por hormonas ováricas.

El ácido N-acetilneuramínico o siálico de útero de rata es regulado por esteroides detectándose dos picos de máxima concentración, el primero en el día uno postcoito, el cual coincide con el pico de estrógenos en el proestro, y el otro en el día cuarto, o sea unas horas antes de la implantación, que coincide con la descarga de estrógenos que ocurre antes de la implantación.

Una vez efectuada la implantación, la concentración de ácido siálico disminuye considerablemente, aumentando al quinto día postimplantación.

En determinaciones realizadas en ratas tratadas con neuraminidasa del primero al quinto día, o del quinto al séptimo se observó que disminuía el número de interacciones del blastocisto con el endometrio y como consecuencia el número de implantes. (Trabajo realizado en el laboratorio del Dr. Hicks).

Para demostrar el efecto de los esteroides sobre la concentración de ácido siálico uterino, se trataron ratas ovariectomizadas con estrógenos y progesterona, y se observó que ambos actúan sinérgicamente aumentando su concentración, misma que aumenta en ratones vasectomizados; tratados con testosterona y progestágenos. Sin embargo, Shandilya en 1977, determinó ácido siálico en mono langur tratado con estrógenos-progesterona y no encontró diferencias significativas, mientras que en monos normales, la concentración de ácido siálico es mayor en la fase proliferativa que en la fase lútea, con una disminución marcada en el día de la ovulación, estos valores fueron determinados en el humano por Rosado y col., encontrando que

la concentración de ácido siálico en endometrio humano es mayor en la fase secretora que en la proliferativa, y que en presencia de dispositivos intrauterinos aumenta considerablemente.

Levin en 1973, midió el potencial de membrana endometrial durante el tratamiento con estrógenos, como con progesterona, y demostró que la fase intracelular de la membrana es negativa con respecto a la fase luminal y que las cargas de superficie están dadas por un "potencial zeta", el cual disminuye rápidamente dentro del rango de pocos Amstrongs en dirección normal a la carga superficial. Las cargas que provienen de este potencial zeta son las que causan la repulsión o atracción electrostática, lo que invalida las bases en que Clemetson funda su hipótesis, sin embargo, es importante el concepto dado por Clemetson, de que el contacto entre blastocisto y endometrio están gobernados por cargas electrostáticas de superficie las cuales están reguladas hormonalmente.

Estudios de la superficie del blastocisto y el útero han demostrado que los recubrimientos celulares son similares a los de otras células, de tal forma que tanto el blastocisto como el útero de rata presentan una carga de superficie negativa, debido a las glicoproteínas de la membrana. En base a este hallazgo se ha considerado la posible adición progresiva de materiales en la superficie del trofoblasto, mismas que lo hacen más adhesivo, así como menos polar, mientras que simultáneamente el huevo induce la remoción de moléculas superficiales del endometrio, quedando finalmente expuestos en la superficie molé

culas apropiadas en carga, que permitirán una interacción y un rearrreglo lateral con la membrana celular.

De acuerdo a la investigación realizada por Gibbons y Mattener el constituyente mucoso del fluido cervical es una glicoproteína (mucina) con un alto peso molecular del orden $1-4 \times 10^6$ constituida en un 75 a 80 por ciento por azúcares principalmente por n-acetil-aminoazúcares conociéndose que la disminución de la viscosidad del moco cervical en los días cercanos a la ovulación se correlaciona con un aumento del número de moléculas de fucosa unidas a las proteínas concomitante con una disminución en el n-acetil-neuramínico (ácido siálico), así como de la proporción de hidroxiaminoácidos (serina y treonina) en la cadena polipeptídica, conduciendo esto último a una disminución en el número de enlaces o-glicosídicos.

Si se considera que la unión intermacromolecular entre las diferentes mucinas se lleva a cabo por medio de calcio, que establece puentes entre dos ácidos siálicos, es presumible que al disminuir el número de residuos de azúcares dentro de la fase preovulatoria, el número de enlaces intermoleculares debe disminuir también y como consecuencia se presenta baja la viscosidad.

En el fluido uterino destacan las glicosidasas proteínicas con gran actividad enzimática, por su posible participación en el proceso de implantación. En la vaca, se ha descrito la presencia de beta-n-acetilgalactosaminidasa y alfa-fucosidasa siendo su actividad mayor a la del plasma sanguíneo del mismo animal. Estas mismas enzimas

presentan una pobre actividad en las secreciones humanas, no presentando variaciones significativas en relación con el estado endócrino, por lo que se ha considerado que su función debe relacionarse con el tipo de placentación, ya que en el humano es hemocorial y en la vaca es sindesmocorial, aceptándose que las glicosidasas actúan sobre el embrión humano y no sobre el endometrio. Por lo tanto se considera que el papel funcional está aun por discutirse, ya que se demostró que en la rata existe un cambio en la población de azúcares y que si se bloquean algunos de ellos, no se verifica la implantación. Este cambio en los azúcares de superficie del sitio de implante, se puede explicar por la acción de este tipo de enzimas.

En 1979 Hicks y col., informan en un artículo científico que en unos experimentos realizados con ratas de la especie *Longs evans* en fase de preimplantación inhibieron la implantación al administrar por vía intraluminal la proteína de origen vegetal Concanavalina A, que tiene sitios de reconocimiento para moléculas de glucosa y manosa. Concluyen que el huevo debe reconocer en orden ciertas moléculas de la superficie endometrial para implantarse.

Por otra parte en 1980 Salazar y col., escriben que en un estudio hecho con microscopio electrónico y técnicas de tinción Shea para la identificación de glicoproteínas, observaron una capa finamente delgada, granulada y densa al rayo de electrones a lo largo de la membrana plasmática de la célula superficial endometrial en los sitios de preimplantación de la rata especie *Longs evans* y

que en los sitios alejados (resto del útero) se notó una capa de glicoproteínas más gruesa.

En unos experimentos realizados para determinar la concentración de iones en el sitio de implante de la rata especie *Longs evans* se encontró que el ión calcio es uno de los más elevados y está relacionado con la formación de uniones intermoleculares entre ácidos siálicos (20).

Por último, al perderse la zona pelúcida por remoción de glicoproteínas, se origina un cambio en la carga de superficie del blastocisto, la cual es ya en ese momento prácticamente neutra, permitiéndole tener una compatibilidad de carga con el sitio de implante (22).

Concomitante en otras informaciones se reporta que en 1967 Weiss trata a cultivos de células de mamíferos con neuraminidasa y observa que la adhesión celular se reduce.

(26) En 1965 Cook lleva a cabo estudios con células sanguíneas tratadas con neuraminidasa y observa que se reduce la adhesión celular.

Helgeland en 1966 dice que la neuraminidasa destruye receptores de Polyoma virus en células de embrión de rata.

Beneddit en 1967 usa Iron coloidal para formar depósitos en la membrana celular y observa que la neuraminidasa disminuye los depósitos.

En 1967 Rambourg y Leblond demostraron con un estudio en más de 50 células la existencia en todas de la túnica celular. Con el uso de la técnica de Paschiff con M.E. y de la técnica de PA-plata con M.E., indican que la túnica contiene carbohidratos.

En 1967 Rambourg y Leblond utilizan hidróxido de torio en solución ácida y demostraron grupos ácidos en la membrana celular. Con M.E. observan la reacción y observan zonas densas.

Soupart en 1965 observa que la neuraminidasa reduce la penetración del óvulo de coneja por el espermatozoide.

Usando la tinción de Hale que usa hidróxido férrico coloidal, Gasic (1968) demuestra que los grupos ácidos pueden ser removidos con neuraminidasa.

Weiss en 1968 lo hace con cultivos de células de mamíferos.

Métodos histoquímicos asociados con microscopio electrónico han sido utilizados para demostrar la presencia de carbohidratos en las membranas celulares. El más usado es la reacción de ácido peryódico-schiff-base, (oxidación de grupos hidróxido vecinos, para dar aldehidos que puedan ser teñidos con ácido fucsínico).

Ejemplos de glicoproteínas: ribonucleasa, glucosa, oxidasa, gonadotropina coriónica humana, uteroglobulina, colágeno, interferón y ovoalbúmina.

Ejemplos de glicolípidos: Sialoesfingolípidos, glicolípidos, n-acetil neuraminil lactosil ceramida (16).

Otros ejemplos de glicoproteínas son las inmunoglobulinas I y G, IgM, IgA, anticuerpos que se encuentran en el suero humano, las caseínas de vaca, cabra y humano. La alfa glicoproteína ácida aislada de sangre humana, la transferrina, sustancias específicas de los grupos sanguíneos, la tiroglobulina de cerdo, humano, etc. LH, FSH, LTH (prolactina). (18), (23).

Gottschalk reporta que Bergman y Wernier en 1951 determinaron en muestras (18) de moco de estados diferentes del ciclo menstrual y la preñez en humano, la relación de ácido siálico-fucosa encontrando la 1.2/1.6 de concentración molar.

También en 1975 Hicks y otros encuentran que la relación de fucosa-ácido siálico en endometrio humano es de 1 a 5 microgramos por mg. de DNA en fase secretora del endometrio. Igualmente en 1982, Hicks propone que los carbohidratos actúan como mensajeros durante la implantación (21).

La glucosa se encuentra en el azúcar de caña, de remolacha y la miel (27) unida a una molécula de fructuosa formando la sacarosa. La maltosa es un azúcar compuesta por la unión de dos moléculas de glucosa. El almidón que se almacena en forma de gránulos en semillas, frutos, tubérculos, raíces de las plantas, la celulosa que constituye las paredes de las células vegetales, las dextranas que forman parte de las paredes celulares de las bacterias

y levaduras, el glucógeno que se almacena en el hígado son compuestos biológicos formados por la unión de varias moléculas de glucosa.

(25) La fucosa se obtiene a partir de los glucosidos que se encuentran en varias especies de convolvuláceas; se encuentra en algas Fucus nodosus, Fucus vesiculosus y en la goma de tragacanto. Es componente de paredes bacterianas.

(16) De las glicoproteínas actualmente es estudiada su estructura por medio de marcadores radiactivos y en relación a la composición de carbohidratos se han encontrado en orden intracelular primero hexosaminas después carbohidratos neutros manosa, galactosa y por último ácido siálico (observar dibujo después de la pág.14).

Ultimamente se realizan intensos estudios sobre la función de los carbohidratos en la membrana celular que se cree que es la adhesión celular, función de receptores y de reconocimiento celular. Se hacen estudios sobre la adhesión ya que están implicados en la embriogénesis, diferenciación celular y formación de tejidos.

OBJETIVO.

Determinar la concentración de carbohidratos, neutros, glucosa, manosa, galactosa, fucosa y ácido siálico en el sitio de implantación de la rata *Longs evans*.

HIPOTESIS.

Si los carbohidratos de superficie se encuentran en la membrana celular entonces es necesario determinar su concentración por su posible participación en la adheribi lidad celular, embriogénesis, diferenciación celular.

PROCEDIMIENTO.

Ratas *Longs evans* de dos meses de edad fueron controladas y apareadas por el método Trío (dos hembras y un macho) en jaulas que estuvieron dentro de un cuarto a temperatura de 20°C y luz de neón durante doce horas del día, fueron alimentadas con Purina rat chow y agua *ad la libitum* y al quinto día de embarazo fueron utilizadas para detectar los sitios de implantación inyectándoles en la cola por vía intravenosa un mililitro de una solución al tres por ciento de azul de Evans en agua, veinte minutos después fueron sacrificadas por dislocación cervical, la piel la mojó con alcohol por la parte ventral y se levantó con pinzas de disección para cortarla con tijeras hasta hacer una abertura de buen tamaño para mover y hacer a un lado los intestinos, con el fin de localizar, cortar y extraer los cuernos uterinos que fueron puestos en una superficie de caja de petri a 4°C en donde se cortaron y se pararon con navajas las zonas pintadas y el resto de los cuernos uterinos, en seguida fueron puestos por separado en tubos de ensaye pequeños (previamente pesados) a una temperatura de 4°C en solución salina isotónica, se congelaron, se mantuvieron y al ser utilizadas a temperatura de 4°C se descongelaban, de cada homogeneizado se usaron diferentes alícuotas para medir los siguientes parámetros:

- a) Carbohidratos neutros (glucosa, manosa, galactosa) por reacción de Antrona.
- b) Fucosa por el método de Dische-Shelts.

- c) Acido siálico por el método de Warren.
- d) Proteínas por el método de microbiuret.
- e) Peso seco por oxidación de la materia orgánica.

Se calcularon y obtuvieron los valores de:

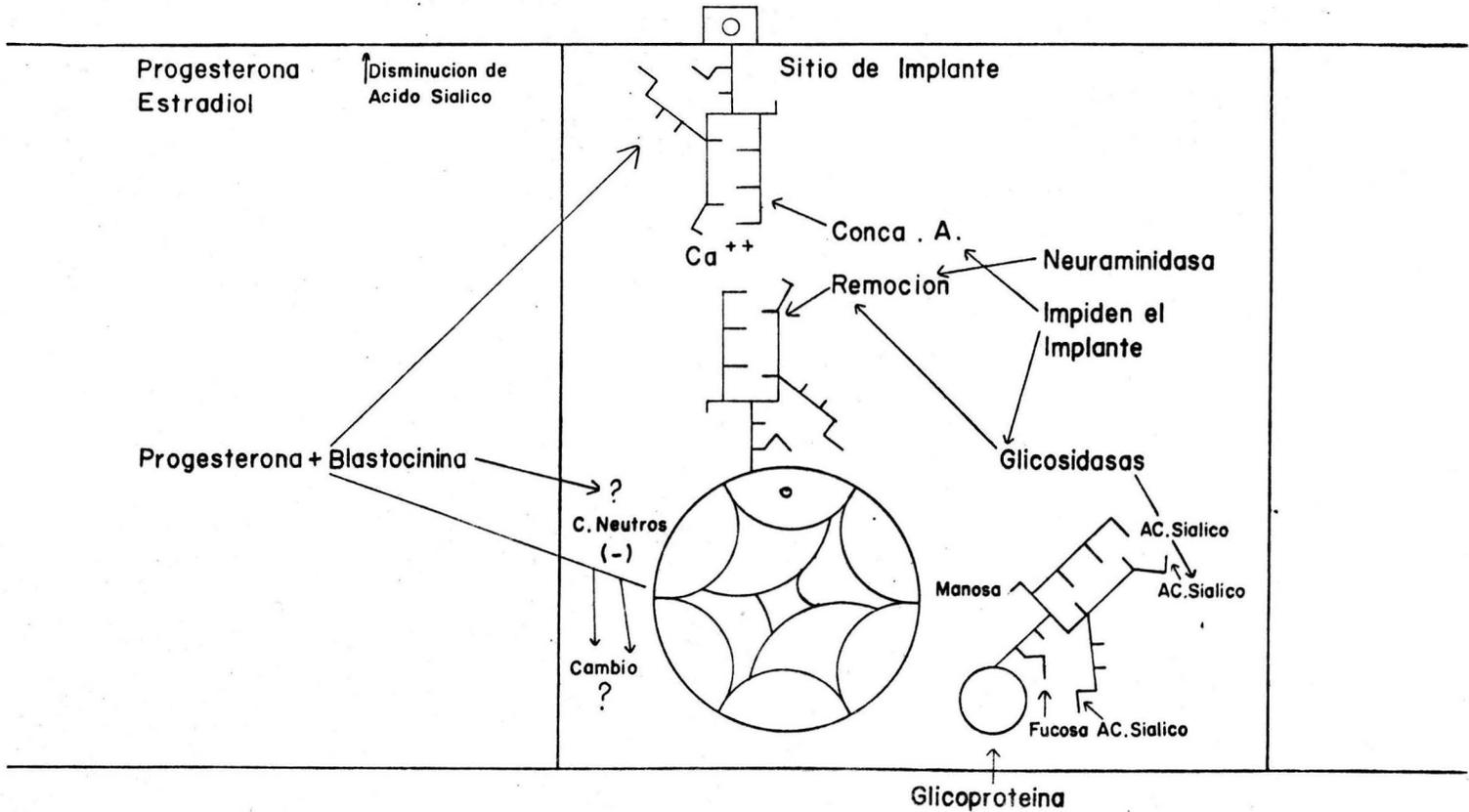
- a) Microgramos de carbohidratos neutros, fucosa y ácido siálico por miligramo de proteína, peso seco y tejido húmedo.
- b) Nanomolas de carbohidratos neutros, fucosa y ácido siálico por miligramo de proteína, peso seco y tejido húmedo.
- c) Microgramos de fucosa entre microgramos de ácido siálico, así como nanomolas de fucosa entre nanomolas de ácido siálico por miligramo de proteína.
- d) Microgramos de carbohidratos neutros entre microgramos de ácido siálico, así como nanomolas de carbohidratos neutros entre nanomolas de ácido siálico por miligramo de proteína.
- e) Microgramos de carbohidratos neutros entre microgramos de fucosa y, por último, nanomolas de carbohidratos neutros entre nanomolas de fucosa por miligramo de proteína.

Se sacaron medidas estadísticas media, varianza, desviación estándar del número total de experimentos de los incisos anteriores a), b), c), d), e) y se hicieron gráficas de los incisos a) y b).

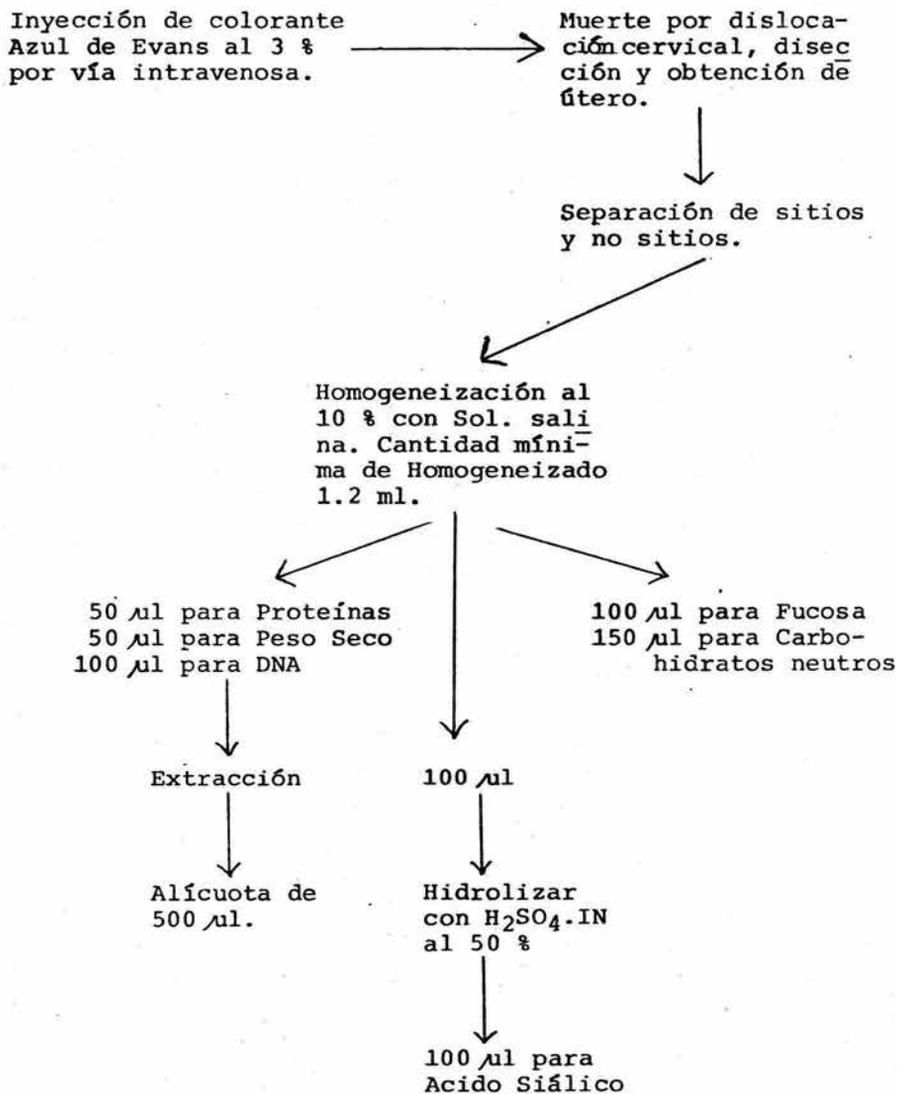
f') Se hizo una prueba de T student.

Se estableció la diferencia y semejanza que se obtuvo de los resultados entre los sitios de implantación y resto de los cuernos uterinos.

DIBUJO QUE PRESENTA: Blastocisto, Sitio de Implantacion y Carbohidratos de la Membrana Celular.



Procedimiento.



HEXOSAS NEUTRAS.

Reactivos:

1. Standard 1 mg de glucosa/ml
2. Solución A: 280 ml de agua
720 ml de H_2SO_4 concentrado
500 mg de antrona
10 gr de tiourea

Tubo	Standard	Agua	Antrona		
0	-µl	.5ml	2.5ml	Agitar	
1	12.5	.487	↓	Ebullición 15'	Leer a 620 nm
2	25	.475			
3	50	.456			
4	75	.425			
5	100	.4			
				Enfriar 10 min en hielo	

FUCOSA

Método de Dische-Shettles.

Reactivos:

1. 40 $\mu\text{g/ml}$
2. Cisteína al 3%
3. H_2SO_4 6:1

Tubo	Fucosa	Agua	H_2SO_4	Cisteína			
B	-ml	1.0ml	4.5ml	100 μl			
1	.2	.8	↓	↓	Incubar a 92°C 3 min.	Reposar 90 min	
2	.4	.6					Leer a 395nm
3	.6	.4					
4	.8	.2					
5	1.0	-					

CUANTIFICACION DE ACIDO SIALICO.

Método de Warren.

Reactivos:

1. Standard .6mg/10 ml de agua.
2. Solución A: 428 mg de Peryodato de sodio.
10 ml de Acido fosfórico 9M
3. Solución B: 16.11 gr. de Sulfato de Sodio.
10.0 gr. de Arsenito de Sodio
100 ml de agua.
4. Solución C: 1.2 gr. de Acido Tiobarbitúrico.
32.2 gr. de Sulfato de Sodio.
200 ml de Agua
5. Solución D: Ciclohexano para extraer.

Tubo	Standar	Agua	Sol.A.	Sol.B.	Sol.C.	Sol.D.	
0	0ul	250ul	100ul	.5ml	1.5ml	2ml	
1	50ul	200	↓ Agitar y repo- sar 20 min.	↓ Agitar y qui- tar co- lor amari- llo	↓ Agitar 15 min a Ebu- llición 5 min. en hie- lo	↓ Agitar	
2	100ul	150					
3	150ul	100					
4	200ul	50					
5	250ul	0					
							↓ Centrifugar a 2500 r.p.m. 5 min.
							↓ Extraer fase supe- rior
							↓ Leer a 550nm

METODO DE BIURET (PROTEINAS)

1. 100 ml de NaOH 38 %
2. 100 ml de CuSO_4 1 %
3. Standard de Albúmina (mg/ml)
4. 100 ml de NaOH 30 %
5. Biuret: 79 ml NaOH al 38 % y 21 ml CuSO_4 1%

Leer a 310 nm color por 2 horas.

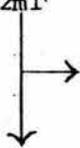
Tubo	Albúmina	Agua	NaOH 30%	Biuret
0	0	2ml	1ml	0
1	200 ul	1.8	↓	↓
2	400 ul	1.6		
3	600 ul	1.4		
4	800 ul	1.2		
5	1000 ul	1		
0	↓	↓	0ml	1ml
1			↓	↓
2				
3				
4				
5				

TECNICA DE DETERMINACION DE PESO SECO.

Sol. A. 1 gr. de Dicromato de Potasio en 50 ml de H_2SO_4
(calentar a $70^{\circ}6$ $80^{\circ}C$)

Estandard

20 mg. Stock de manosa en 10 ml de H_2O

Tubo	Manosa	H_2O	Sol. A.
0	0 ml	1.0	2ml
1	.2	.8	 <p>Antes de agregar colocar los tubos en hielo y resbalar por las paredes.</p>
2	.4	.6	
3	.6	.4	
4	.8	.2	
5	1.0	.0	

Colocar los tubos en baño de agua hirviendo 20 min.

Enfriar.

Leer a 660 nm.

RESULTADOS Y ANALISIS.

Significado de abreviaturas y signos: \bar{X} (media), D.E., (desviación standard), Ac., (ácido), C., (carbohidratos), ref. (referencia).

TABLA I, GRAFICA I.- Concentración de carbohidratos neutros, fucosa y ácido siálico en útero de rata al quinto día de embarazo.

Segmento uterino	Carbohidratos neutros *	Fucosa*	Ac. siálico*
NO SITIOS	27.01+9.0**	15.98+7.25	4.36+1.70
SITIOS DE IMPLANTE	24.9 +6.74	16.00+5.7	4.00+1.71

* μg /mg de proteínas.

** \bar{X} + D.E.

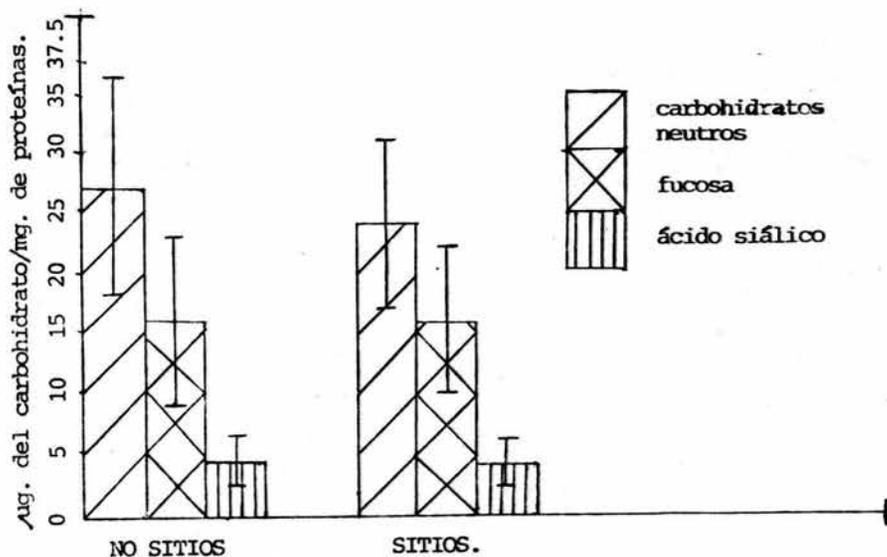
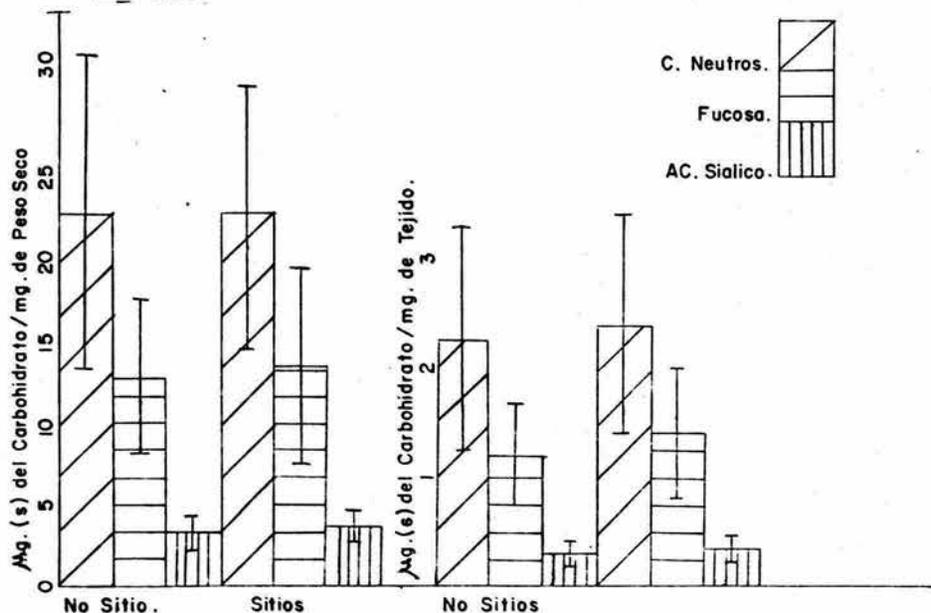


TABLA II, GRAFICAS II y III. Concentración de carbohidra-
tos neutros, fucosa y ácido siálico en útero de
rata al quinto día de embarazo.

Parámetro de referencia	Segmento uterino	Carbohidratos neutros*	Fucosa*	Ac. siálico*
PESO SECO	NO SITIOS	23.21±9.9	12.81±4.5	3.42±1.04
	SITIOS DE IMPLANTE	23.12±7.9**	13.64±6.0	3.64±1.23
TEJIDO	NO SITIOS	2.28±1.5	1.22±0.46	0.32±0.10
	SITIOS DE IMPLANTE	2.42±1.03	1.42±0.58	0.35±0.09

* μg de carbohidratos/mg del parámetro de ref.

** $\bar{X} \pm$ D.E.



En las Tablas I, II y gráficas I, II se puede observar que tanto en no sitios como en sitios de implantación las concentraciones más grandes corresponden a los carbohidratos neutros, en seguida las de fucosa y por último al ácido siálico las más bajas.

Por otra parte, para determinar la concentración molecular de los carbohidratos se hicieron cálculos en nano molas obteniéndose lo siguiente:

TABLA III. Concentración de carbohidratos neutros, fucosa y ácido siálico en útero de rata al quinto día de preñez.

Parámetro de referencia	Segmento uterino.	Carbohidratos neutros*	Fucosa*	Ac. siálico*
PROTEINAS	NO SITIOS	150.05+50.0	97.44+34.7	14.00+5.5
	SITIOS DE IMPLANTE	138.33+37.4**	97.56+44.21	12.93+5.5
PESO SECO	NO SITIOS	128.94+55	78.10+27.4	11.06+3.3
	SITIOS DE IMPLANTE	128.4 +43.8	83.17+36.5	11.76+3.9
TEJIDO	NO SITIOS	12.6 + 5.83	7.43+ 2.8	1.03+0.32
	SITIOS DE IMPLANTE	13.4 + 5.72	8.65+ 3.5	1.13+0.29

* n molas de carbohidrato/mg del parámetro de referencia

** $\bar{X} \pm$ D.E.

TABLA IV. Relaciones de las concentraciones por miligramo de proteína de carbohidratos neutros, fucosa y ácido siálico de útero de rata al quinto día de embarazo.

Segmento uterino	$\frac{\text{ug de fucosa}}{\text{ug de Ac.síalico}}$	$\frac{\text{nmolas, fucosa}}{\text{nmolas Ac.Síalico}}$
NO SITIOS	3.9 \pm 1.52	7.5 \pm 2.3
SITIOS DE IMPLANTE	4.1 \pm 1.19	7.7 \pm 2.2

Segmento uterino	$\frac{\text{ug de C.neutros}}{\text{ug de Ac.Síalico}}$	$\frac{\text{nmolas C.neutros}}{\text{nmolas Ac. Síalico}}$
NO SITIOS	7.1 \pm 3.71	10.7 \pm 11.0
SITIOS DE IMPLANTE	6.9 \pm 3.0	10.7 \pm 6.8

Al principio se hizo de la forma que sigue:

$$\frac{\text{ug de Ac.Síalico}}{\text{ug de C. neutros}}$$

NO SITIOS	0.2 \pm 0
SITIOS	0.2 \pm 0

Los valores anteriores indican que por cada microgramo de ácido siálico hay 4 de fucosa, por una nanomola del ácido siálico hay 7.5 de fucosa, por un microgramo de ácido siálico 7 de carbohidratos neutros y que por una nanomola de ácido siálico no hay carbohidratos neutros (ver +, D.E.) por un microgramo de carbohidratos neutros no hay ácido siálico.

Al principio la siguiente relación no se había pedido y se hizo de la siguiente manera:

Segmento uterino	$\frac{\text{ug de C.neutros}}{\text{ug de fucosa}}$	$\frac{\text{nmolas C.neutros}}{\text{nmolas fucosa}}$
NO SITIOS	1.81 \pm 0.61	1.5 \pm 1.4
SITIOS DE IMPLANTE	1.68 \pm 0.62	1.4 \pm 0.8

(Observar los valores de nanomolas).

Los valores anteriores indican que por un microgramo de fucosa hay 1.5 de carbohidratos neutros, por una nanomola de fucosa hay 1.4 de carbohidratos neutros (ver \pm D.E.). En un cálculo de la relación C. neutros/fucosa hecha solo con 9 experimentos y en microgramos por mg. de proteína se obtuvo:

	$\frac{\text{C. neutros}}{\text{fucosa}}$
NO SITIOS	1.1 \pm 1.3
SITIOS	0.9 \pm 2.0

TABLE V. Concentración de carbohidratos neutros, fucosa y ácido siálico en útero de rata al quinto día de embarazo.

Parámetro de Segmento Carbohidratos.

referencia	uterino	neutros*	fucosa*	Ac.síálico*
PROTEINAS	NO SITIOS	52.61 \pm 15.3	97.44 \pm 34.7	14.00 \pm 5.5
	SITIOS DE IMPLANTE	40.77 \pm 6.81	97.56 \pm 44.21	12.93 \pm 5.5
PESO SECO	NO SITIOS	50.84 \pm 27.6	78.10 \pm 27.4	11.05 \pm 3.3
	SITIOS DE IMPLANTE	45.23 \pm 7.3	83.17 \pm 36.5	11.76 \pm 3.9
TEJIDO	NO SITIOS	5.17 \pm 3.03	7.43 \pm 2.8	1.03 \pm 0.32
	SITIOS DE IMPLANTE	4.75 \pm 2.22	8.65 \pm 3.5	1.13 \pm 0.29

* n molas de carbohidrato/mg del parámetro de referencia

** $\bar{X} \pm$ D.E.

Por último, a todos los resultados se les aplicó una prueba de T student para un ensayo de dos colas con una P de 0.05 obteniéndose que no existen diferencias significativas entre las concentraciones de los carbohidratos de no sitios y sitios de implantación.

DISCUSION.

En los no sitios y sitios de implantación las concentraciones de los carbohidratos se determinaron utilizando todas las células que los integran, por lo que no puede excluirse la posibilidad de que existan diferencias significativas de concentración de carbohidratos entre ambas zonas epiteliales o de sus membranas implicadas en el proceso de adhesión, ya que las diferencias significativas pudieron enmascarse al haber trabajado con una mezcla de células, más sin embargo en los valores se obtuvo una pequeña diferencia, por lo tanto para hacer una determinación de la concentración de carbohidratos más específica sería necesario hacer otro trabajo más sutil aislando las células que componen el epitelio uterino que recubre los intersitios y sitios de implante respectivamente, que son células que sufren cambios estructurales y funcionales debido a que están principalmente relacionadas con la interacción huevo endometrio durante la preñez temprana.

Otra posibilidad es que los cambios propuestos de los carbohidratos no sean de concentración sino de posición realizados por medio de intercambios celulares.

El hecho de haber obtenido mayores concentraciones de los carbohidratos glucosa-manosa-galactosa, tanto en no sitios como en sitios de implantación se relaciona con la degradación de glucógeno almacenado previamente en el cuarto día de la preñez en la rata y con su utilidad, debido a que constituyen los sustratos principales para la obtención de energía celular y son usados por las células para la elaboración de glicoproteínas y glicolípidos

estructurales de las membranas celulares. Por lo que respecta a las concentraciones del carbohidrato neutro fucosa que fueron un poco más bajas respecto a las anteriores seguramente se deben a que su principal función es ser estructural en las membranas celulares ya que es un derivado de la glucosa. Las concentraciones más pequeñas correspondieron al ácido siálico, la causa es semejante a lo que ocurre con la fucosa.

Por otra parte, debido a que se han hecho dos trabajos en útero de rata al quinto día de preñez, uno bloqueando los carbohidratos manosa glucosa con la proteína de origen vegetal concanavalina A y otro rompiendo los enlaces del carbohidrato ácido siálico con la enzima sialidasa obteniéndose en los dos trabajos disminución en el número de implantes (Introducción) por lo que se puede afirmar que hay una participación importante de los carbohidratos en el proceso de implantación.

Respecto a la relación de las concentraciones de carbohidratos obtenidas se puede deducir que se debe también a lo escrito para los carbohidratos neutros, fucosa y ácido siálico anteriormente. Además las relaciones de un microgramo de ácido siálico por 3.9 microgramos de fucosa para no sitios y de un microgramo de ácido siálico por 4.1 de fucosa para sitios corresponden con lo que se reporta en cita 18 y lo encontrado por Hicks y col. en 1975 (léelo en la Introducción).

CONCLUSIONES.

No se encontraron diferencias significativas en la concentración de carbohidratos neutros, fucosa y ácido siálico entre el sitio de implantación y el resto del útero, sin embargo no puede excluirse la posibilidad de diferencias a nivel de células epiteliales ya sea en cantidad, distribución o posición de los carbohidratos neutros, fucosa y ácido siálico.

La concentración de carbohidratos neutros es de: ---
 27.01±9.0, fucosa 15.98±7.25, ácido siálico 4.36±1.70 por miligramo de protefna en no sitios; carbohidratos neutros 24.9±6.74, fucosa 16.00±5.7, ácido siálico 4.00±1.71 también por miligramo de protefna en sitios de implantación - (nótese la pequñsima diferencia con los no sitios).

Por último por 1 microgramo de ácido siálico hay 3.9 de fucosa, por uno de ácido siálico hay 7.1 de carbohidratos neutros, por 1 microgramo de fucosa hay 1.1 de carbohidratos neutros en no sitios y para sitios de implantación por un microgramo de ácido siálico hay 4.1 de fucosa, por un microgramo de ácido siálico hay 6.9 carbohidratos neutros, por un microgramo de fucosa hay 1.6 de carbohidratos neutros en la rata Longs evans. (compare los valores anteriores y nótese las pequeñas diferencias).

BIBLIOGRAFIA

1. Collado H., y col. Nuevos conceptos relacionados con la implantación. I. Período de preimplantación. Ginec Obstet. Méx. Vol. 44 Año XXXII. Núm. 261, julio 1978, págs. 63 a 84.
2. Gil-Recasens E. Ma. y col. Nuevos conceptos relacionados con la implantación. III. Características bioquímicas. Ginec. Obstet. Méx. Vol. 44 Año XXXIII. Núm. 266. diciembre 1978, págs. 492-495.
3. Hicks, J.J. y col. Nuevos conceptos relacionados con la implantación. IV. Función del moco cervical y el fluido endometrial. Ginec. Obstet. Méx. Vol. 46 Año XXXIV. Núm. 273. julio 1979, págs. 55,59.
4. Hicks, J.J. Características morfológico-funcionales del cigoto de mamífero durante la preimplantación.
5. Hicks, J.J. y Guzmán González A.M. Inhibition of implantation by intraluminal administration of Concanavalin A in mice. Contraception 20: 129-136.
6. Salazar-Rubio M. y col. High resolution cytochemical study of uterine epithelial cell surface of the rat at identified sites previous to blastocyst-endometrial contact. Arch. Invest. Méd (Méx) II:117,1980
7. Terán, B.J.C. 1978. Actividad de Tirosina aminotransferasa y triptófano dioxigenasa en el útero de rata. Tesis Profesional. Universidad Iberoamericana. México D.F.

8. Colowich P.S., Kaplan B.W. 1957. Methods in Enzimology. Vol. III. 1era. Edición Ed. Academic Press. págs. 4-5, 14, 16-18.
9. Itzhaki E.R., Gill M.D. 1964. Analytical biochemistry. Vol. 9. A microbiuret method for estimating proteins. págs. 401-410.
10. Bernal, A.M.D. Tesis 1967. U.N.A.M.
11. Gill K.W., Myers A. 1965. An improved diphenylamine method for the estimation of deoxirribonucleic acid. Nature 206: 93.
12. Lenhinger A. Bioquímica (1977). Worth Publishers New York, E.U.A.
13. Staunton West E.D. y otros. 1969. Bioquímica Médica 4a. Edición Ed. Interamericana págs. 155, 167, 168, 188-191, 227-228, 438-39, 114-122.
14. Ham W.A. Tratado de Histología 1965. 7a. Edición. Ed. Interamericana págs. 95-100, 114-122.
15. Colowick P.S. y Kaplan O.N. Methods in Enzymology. Vol. VIII Complex Carbohydratos. 1966. 1era. Edición Ed. Academic Press págs. 3-52.
16. Weissman-Claiborne 1975. Cell Membranes 3a. Ed. Selección de Scientific American. Sugar of the Cell Membrane. Paul Soseman dop the Jonhs Hopkins University.
17. Stecher Paul G. 1968. The Merk Index. 8a. Ed. Editorial Merck. 8Co. Inc. págs. 494, 479, 644, 472 y 945.
18. Gottschalk 1965. Glicoproteínas. Tomo IIA. págs. 124-25.

19. Gottschalk 1960. Acid Sialics. Editorial the SYNDICS of Cambridge University Press. págs. Índice y Prefacio, 42-43.
20. Miranda L. 1980. Proyecto de tesis. Concentración de iones en sitio de implante de rata. Centro Médico Nacional.
21. Hicks, J.J. y otros. 1975. Effect of intrauterine copper and the nucleic acids, polysome pattern and glycoprotein composition of the human endometrium. Am. Journal of Obstetrics and Gynecology.
22. Información de fuentes de 2a. mano. Hicks J.J., Gil. Recasens E. Ma. Características morfológica y funcionales del Cigoto de mamífero durante la preimplantación I.M.S.S. C.M.N. 1980. Págs. 4 y 5.
23. Yungnans N. Wayne y col. 1979. Observations on the Origins of plasma membrane in rat deciduoma. Cell on tissue Research. 200 págs. 35-43.
24. Baiza G.L.A. Tesis 1980. Concentración de grupos SH en útero de rata durante el ciclo estral.
25. Gutiérrez N.F.C. Tesis 1979. Efecto del 17 Estradiol y la Progesterona sobre la actividad enzimática en útero de rata.
26. Barcelo Diccionario Terminológico de Química 1976. Ed. Alhambra. 2a. Edición pág. 358.
27. Winzler J.R. 1972. Carbohidrates in Cell Surfaces. Anual Rev. Cell Biolog. págs. 77-121.
28. Rakoff N.H. y Rose C.N. 1974. Química orgánica fundamental. Ed. Limusa 1era Ed. págs. 751-752.

29. Bhagavan 1978. Biochemistry. Editorial L.B. Lippincott Company. 2a. Edición págs. 170-176, 272, 314 y 315.