



**UNIVERSIDAD NACIONAL AUTONOMA DE MEXICO**

**ESCUELA NACIONAL DE ESTUDIOS PROFESIONALES  
IZTACALA**

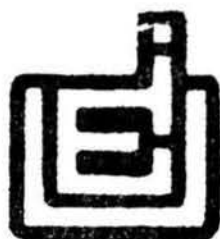
**ESTUDIO DE COMPONENTES CON AFINIDAD  
PARA 17 $\beta$ -ESTRADIOL EN LA SUPERFICIE  
APICAL DEL EPITELIO UTERINO DE RATA**

**T E S I S**

**QUE PARA OBTENER EL GRADO DE  
MAESTRO EN CIENCIAS  
(BIOLOGIA DE LA REPRODUCCION)**

**PRESENTA EL BIOLOGO  
MARTIN PALOMAR MORALES**

**DIRECTOR :  
DR. JUAN JOSE HICKS GOMEZ**



**MEXICO, D. F.**

**1994**



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.

Este trabajo se realizó en la Unidad de Investigación Médica en Bioquímica del Hospital de Especialidades del Centro Médico Nacional Siglo XXI del IMSS, bajo la dirección del Dr. Juan José Hicks. El estudio ultraestructural y el ensayo histoquímico se realizaron en el Departamento de Embriología de la Facultad de Medicina de la UNAM, con la asesoría de la M. en C. María Cristina Márquez Orozco. Durante un año se gozó de beca ENEPI-DGAPA, y durante dos años se gozó de Beca IMSS

¿Conoces el periodo de gestación de las gamuzas,  
sabes cuando las cebras tienen sus crías?

Job, 39 1



**A mi esposa, Gladys**

**A mi hijo, Gibrán de Jesús**

**Por todo el amor que me han  
enseñado a dar y compartir.**

**A mis Padres y hermanos**

## MI AGRADECIMIENTO A:

Los revisores de esta Tesis: Dr. Juan José Hicks, M. en C. María Cristina Márquez Orozco, M. en C. Luis Arturo Baiza Gutman, M. en C. María Cristina Revilla Monsalve y M. en C. Alberto Martín Guzmán Grenfell, por sus valiosos comentarios, el tiempo y la paciencia que invirtieron junto conmigo.

La M. en C. Ma. Cristina Márquez Orozco (Cris), la Quim. Amalia Marquez Orozco (Amita) y la P. de B. Ma. Verónica Gazca Ramírez, del Departamento de Embriología de la Facultad de Medicina de la UNAM, que hicieron posible la realización del estudio ultraestructural y el ensayo histoquímico.

El M. en C. Hector Alfonso Bernal Torres, del Hospital de Ginecología y Obstetricia No. 4. "Luis Castelazo Ayala", por enseñarme con paciencia la determinación radioquímica de receptores estrogénicos.

El M. en C. Martín Pedro Vargas Suárez, de la Facultad de Química de la UNAM, por permitirme el acceso a la liofilizadora.

Mis compañeros de la Unidad de Investigación Médica en Bioquímica.

## ABREVIATURAS

ADN	Acido desoxirribonucleico
AF	Complejo albúmina-isotiocianato de fluoresceína
AEF	Complejo 17-hemisuccinato-17 $\beta$ -estradiol-albúmina-isotiocianato de fluoresceína
AMP	Adenosín-monofosfato
AMP <sub>c</sub>	Adenosín monofosfato 3',5'-cíclico.
ARN	Acido ribonucleico
ARNm	Acido ribonucleico mensajero
BSA	Albúmina sérica de bovino
CAD	Carbón activado:dextrán
DES	Dietilestilbestrol
DTT	Ditiotreitol
E <sub>2</sub> , $\beta$ E <sub>2</sub>	17 $\beta$ -estradiol
$\alpha$ E <sub>2</sub>	17 $\alpha$ -estradiol
E <sub>2</sub> - <sup>3</sup> H	Estradiol tritiado
EDTA	Etilén diamino tetraacetado disódico
FITC	Isotiocianato de fluoresceína
h	horas
K	Constante de disociación del complejo hormona-receptor.
LDH	Lactato deshidrogenas <sup>a</sup>
5'N	5'-nucleotidasa
P <sub>4</sub>	Progesterona

PBS	Salina amortiguada con fosfato
PMSF	Fluoruro de fenil metil sulfonilo
S	Unidades Svedberg de sedimentación en gradiente de densidad
Tam	Tamoxifeno
Tris	Tris(hidroximetil)-amino metano
$U_{\max}$	Unión máxima de la hormona a su receptor

## INDICE

RESUMEN .....	1
INTRODUCCION .....	2
MECANISMO GENOMICO DE LOS ESTROGENOS .....	4
EFFECTOS NO GENOMICOS DE LOS ESTROGENOS Y SU POSIBLE PARTICIPACION EN EL MECANISMO GENOMICO .....	9
IMPLANTACION .....	18
SEÑALES EMBRIONARIAS DURANTE LA IMPLANTACION .....	20
HIPOTESIS .....	22
OBJETIVOS .....	22
METODOLOGIA .....	23
RESULTADOS .....	31
DISCUSION .....	60
CONCLUSIONES .....	68
REFERENCIAS .....	70

## RESUMEN

Las hormonas esteroideas producen al menos, dos tipos de efectos: 1) Unos, de latencia y duración largas, mediados por receptores citosólico/nucleares, denominados genómicos, a causa de que el mecanismo de acción involucra la replicación del genoma y la síntesis de proteínas. 2) Otros, denominados no genómicos, de latencia y duración cortas, en los cuales participan estructuras membranales como las plasmáticas, lisosomales y microsomales. Basados en estos últimos, se ha propuesto la existencia de receptores a estrógenos en la membrana plasmática de las células blanco.

Por otra parte, se ha postulado que durante la implantación, se requiere de la existencia de señales embrionarias que actúan sobre las células epiteliales uterinas, y se ha demostrado que los blastocistos de numerosas especies de mamíferos son capaces de sintetizar estrógenos a partir de andrógenos o progesterona. El propósito del presente trabajo fue demostrar la presencia de receptores en la membrana plasmática apical de epitelio uterino (superficie luminal) de la rata.

Se adaptó una metodología para la obtención de proteínas de superficie luminal uterina, en la rata, basada en la acción de un detergente no iónico sobre proteínas de la membrana plasmática. Por estudios de marcadores bioquímicos y de microscopía electrónica, se determinó que el método, diseñado originalmente para la coneja, en la rata también liberaba proteínas de dicha membrana, las cuales se pudieron recuperar.

En la solución recuperada, se trató de determinar las características del receptor estrogénico, mediante un método radioquímico, encontrándose, o que el receptor no estaba presente en las proteínas obtenidas, o que la estrategia empleada no fue la adecuada. Como control, se identificó y cuantificó el receptor estrogénico citosólico de epitelio uterino de ratas en estro.

Por una estrategia histoquímica, se detectó en células epiteliales uterinas la presencia de sitios de unión a estrógenos durante cada una de las fases del ciclo estrual y en el día cinco de la gestación, dispersos sobre toda la superficie celular. No se pudo inferir acerca de la localización exacta a nivel subcelular a causa de que, en las condiciones empleadas, no es posible detectar las estructuras. Los sitios de unión a estradiol fueron más abundantes durante el estro que en las otras fases del ciclo y que en zonas de implantación o regiones interzona, en día cinco de gestación. Los sitios de unión a estrógenos fueron inhibidos por  $17\beta$ -estradiol, dietilstilbestrol y tamoxifeno, pero no por progesterona ni  $17\alpha$ -estradiol.

## INTRODUCCION

Las hormonas esteroides, al interactuar con sus células blanco regulan el metabolismo celular e influyen sobre su función. Su efecto produce cambios morfofisiológicos en los diferentes órganos hormono-dependientes y su acción es decisiva en el funcionamiento adecuado de ellos. A pesar del conocimiento de diversos eventos involucrados en ello, aún existen muchas interrogantes sobre algunos de los mecanismos moleculares involucrados en la transducción y expresión de los efectos hormonales a nivel celular.

En los vertebrados se han descrito por lo menos cinco tipos de hormonas esteroides: glucocorticoides, mineralocorticoides, progestinas, andrógenos y estrógenos, cada uno con características químicas y biosintéticas particulares y un metabolismo y un mecanismo de acción diferentes.

Las acciones de los estrógenos descritas clásicamente sobre la función reproductiva de la hembra son múltiples, pudiendo destacarse las siguientes: a) participación en el inicio de la vida fértil, a través de su efecto directo sobre el eje hipotálamo-hipófisis y sobre los órganos sexuales, en particular induciendo el desarrollo y diferenciación del útero y oviductos; b) expresión de los caracteres sexuales secundarios, incluyendo patrones conductuales propios de la hembra de roedores como la lordosis y la receptividad; c) regulación del desarrollo de los folículos ováricos o foliculogénesis durante el ciclo reproductivo; d) intervención en la regulación de los cambios uterino, vaginal y mamario durante el ciclo reproductivo y el embarazo (Ross, 1985).

El mecanismo de acción de los estrógenos se relaciona con el tiempo necesario para obtener, en las células blanco cambios metabólicos o morfológicos producidos por estas hormonas. Al considerar el tiempo requerido para observar su efecto, se pueden señalar por lo menos dos tipos de eventos: El primero es la respuesta rápida que se presenta dentro de los primeros minutos posteriores al estímulo, o sea a la unión del esteroide con la célula blanco, y que es el inicio de la regulación del metabolismo al inducir probablemente cambios en la concentración, distribución o producción *de novo* de moléculas mediadoras o segundos mensajeros, cuya activación no involucra la síntesis de proteínas, sino que incluye eventos sobre la membrana celular, es decir, es un proceso no genómico. El segundo es una respuesta tardía, cuyos efectos se presentan minutos e incluso horas después del estímulo y en el que existe síntesis de proteínas, es decir, es un mecanismo genómico (Pérez-Palacios y cols, 1988).



## **MECANISMO DE ACCION GENOMICO DE LOS ESTROGENOS**

Los estrógenos, al igual que las demás hormonas esteroides, son moléculas hidrofóbicas, que son distribuidas por vía sanguínea desde las glándulas de origen hasta los tejidos del organismo, mediante una proteína acarreadora específica, denominada globulina transportadora de esteroides sexuales, o por proteínas que las transportan inespecíficamente como la albúmina, que también puede transportar otros lípidos (Pérez-Palacios y cols, 1988). Otra manera de distribución de estas hormonas es el ir disueltas en el plasma, lo cual es posible gracias a que una proporción de los esteroides se conjuga con sulfato formando el estrógeno-sulfato, o con glucuronato, originando el glucuronato de estrógeno, que en ambos casos son moléculas anfífilas (Loza-Arredondo y cols, 1988; Pérez-Palacios y cols, 1988).

Debido a sus características moleculares los esteroides tienen la capacidad de penetrar a través de casi todas las membranas biológicas, sin embargo sólo pueden ser retenidos por los órganos llamados blanco o diana, que poseen moléculas de naturaleza protéica con la capacidad de unir el esteroide y que son necesarias para producir un efecto. Tales proteínas son llamadas receptores, y deben tener las siguientes características para ser consideradas como tales: 1) Alta especificidad, es decir, que interactúen sólo con un esteroide o un tipo de estos, lo que habilita a las células para responder a una señal hormonal sin interferencias; 2) Elevada afinidad, o sea una gran unión del esteroide a bajas concentraciones intracelulares del mismo; 3) Especificidad de tejidos: deben estar presentes en los órganos blanco; 4) Correlación entre la respuesta biológica y la

unión del esteroide al receptor: esta debe preceder a aquella, y el grado de la respuesta debe relacionarse con la proporción de hormona ligada al receptor.

Se sabe que los receptores estrogénicos interactúan con esteroides naturales como el  $17\beta$ -estradiol ( $E_2$ ), la estrona y el estriol y con diversos fármacos sintéticos de naturaleza esteroideal y no esteroideal, mientras que con otros esteroides naturales como son los andrógenos, las progestinas y los corticoides, no lo hace, o la interacción es en proporción muy baja. La interacción de los estrógenos con sus receptores se puede medir con una constante de disociación,  $K \sim 1$  nM, la cual es la medida de la afinidad del receptor por un ligando, y valores más pequeños de  $K$  corresponden a afinidades elevadas. Diversos estudios han demostrado que el receptor de estrógenos se encuentra en cantidades elevadas en algunos tejidos como el útero, la vagina, las glándulas mamarias, la hipófisis, y no se encuentra o está en bajas proporciones en el resto de los tejidos. Al unirse el estrógeno a su receptor se forma el complejo estrógeno-receptor, denominado  $E-R_E$ , el cual, en su forma activa actúa sobre algunas regiones específicas del genoma, para promover la expresión de genes determinados, y como consecuencia, induce la transcripción de ARNm y la biosíntesis de proteínas específicas, cuya actividad induce cambios en el metabolismo celular, la duplicación del ADN, la proliferación celular, y el incremento en la actividad de algunas enzimas (revisado por Clark y Markaverich, 1988).

Si bien ha sido aceptado este esquema generalizado, al menos existen tres localizaciones probables para el receptor de estrógenos, que son el citosol, el núcleo y la membrana plasmática.

En el primer modelo del mecanismo de acción genómico del  $E_2$ , sugerido por Jensen y cols (1968), llamado de dos etapas, se postula la existencia de un receptor libre, específico para estrógenos, localizado en el citosol de las células blanco, que una vez unido al estradiol forma el complejo  $E_2R_E$ , que se trasloca al núcleo, al mismo tiempo que ocurre un cambio estereoquímico o activación del receptor, que en esta forma es capaz de unirse al ADN (Yamamoto y Alberts, 1972; O'Malley y Means, 1974; Jensen y cols, 1968).

Mediante técnicas de fraccionamiento celular por extracción con soluciones a distintas concentraciones de KCl, y centrifugación en gradiente de densidad, se aisló el receptor citoplásmico de estrógenos, que resultó ser una proteína con coeficiente de sedimentación de 8S, que probablemente es un dímero cuyas subunidades poseen un coeficiente de 4 S, que una vez activado o transformado y translocado al núcleo, se identificó como una proteína con peso molecular cercano a 66 kD, y un coeficiente de sedimentación de 5 S (Jensen y cols, 1968).

El proceso de activación del complejo  $E_2-H^3$  es poco conocido, aunque se ha postulado que se debe a que se incorpora una proteína citosólica, de bajo peso molecular (Jensen y cols, 1968; Yamamoto y Alberts, 1972). (Jensen y cols, 1968). En contraste, Linkie y Siiteri (1973) sugieren que la activación del receptor es un evento intranuclear. Ya en el núcleo, el complejo  $E_2-H^3$  se une al ADN, gracias a que el receptor tiene una región de unión rica en residuos de cisteína, arginina y lisina, y presentan secuencias Cys-(aminoácido X)-Cys, que probablemente forman proyecciones "dactilares" con afinidad por iones metálicos divalentes, que se ajustan a secuencias específicas del ADN, de manera similar a como lo hace el factor de transcripción III, que es una proteína activadora de la expresión del gene de ARNr 5 S (Green y cols, 1986). Las regiones de los

receptores que se unen a las hormonas esteroideas son similares, por lo que se consideran provenientes de un receptor ancestral común (Green y cols, 1986). El complejo E<sub>2</sub>-H<sup>3</sup> acoplado a las regiones específicas de la cromatina ocasiona un incremento en la síntesis de ARN y de proteínas (O'Malley y Means, 1974).

El modelo de dos etapas prevaleció hasta 1984, fecha en la cual se puso en tela de juicio la localización citosólica del receptor, libre u ocupado, y se demostró por dos estrategias diferentes su predominio nuclear. El primer tipo de técnicas fue el desarrollo de anticuerpos monoclonales específicos para el receptor (Greene y Jensen, 1982), lo que permitió su localización inmunocitoquímica en el núcleo y no en el citosol de los órganos blanco (King y Greene, 1984). La segunda fue la enucleación de las células blanco con citocalasina, que facilitó la separación de citosol ó citoplasto del núcleo ó nucleoplasto (Welshons y cols, 1984), y la cuantificación de los receptores en la fracción nuclear (Welshons y cols, 1985). De este modo, se sugiere que el receptor ocupado se encuentra firmemente unido al ADN, mientras que el desocupado, inactivo, se une con baja afinidad a otro componente nuclear (Hansen y Gorsky, 1985, 1986; Gorsky y cols, 1984, 1986).

Tomando en consideración los antecedentes mencionados, el grupo de Gorsky (1984) propuso un "nuevo modelo de acción de los estrógenos", mediado por un receptor nuclear. Sin embargo, la metodología que sustenta este modelo también presenta artificios, tales como el no poder precisar si el receptor está en el interior del núcleo, o en su superficie, cuando se emplea la inmunocitoquímica, o contaminación de la fracción nuclear con residuos de citosol, en la técnica de enucleación (Szego y Pietras, 1985). Por otra parte, en este modelo aún falta explicar la manera en que los estrógenos son transportados al núcleo y los

factores que contribuyen a estabilizar la interacción del complejo  $E_2-H^3$  con el ADN.

## **EFFECTOS NO GENOMICOS DE LOS ESTROGENOS Y SU POSIBLE PARTICIPACION EN EL MECANISMO GENOMICO**

Como se señaló anteriormente, los estrógenos ejercen efectos que no pueden ser explicados mediante el mecanismo clásico o genómico, debido a que se manifiestan con rapidez, no cambian la expresión de los genes ni estimulan la síntesis protéica, por lo que se les ha denominado efectos no genómicos. Entre estos, se pueden señalar la elevación transitoria de la concentración de AMPc (adenosín monofosfato cíclico ó 3'5'-AMP (Szego y Davis, 1967), que solo se había descrito para hormonas polipeptídicas y la epinefrina (Szego y Pietras, 1984, ver tabla I), el incremento del funcionamiento del ciclo de las pentosas en las células uterinas, y el incremento en el consumo de oxígeno en las mismas células y en los espermatozoides (Hicks y Rosado, 1976) y otros, enlistados en la tabla II.

Hasta la fecha, se desconoce la relación que existe entre el mecanismo genómico y los eventos no genómicos. De hecho, el conocimiento de los receptores citosólicos o nucleares, y la postulación del mecanismo genómico, ha causado que se subestime la importancia de los efectos no genómicos de los estrógenos.

El grupo de Szego ha proporcionado evidencias experimentales para postular la participación de un receptor estrogénico membranal como mediador de los efectos de los estrógenos. La existencia de este receptor está basada en el hecho de que hepatocitos y células aisladas de útero de rata pueden retenerse en filtros con estradiol inmovilizado covalentemente a soportes inertes (Pietras y Szego, 1977, 1979a), mientras que en las mismas condiciones, no se retienen las células del epitelio intestinal, que fueron tomadas como control a causa de no ser

**TABLA I. DICOTOMIA POSTULADA EN LOS MODOS DE ACCION DE  
HORMONAS ESTEROIDES Y POLIPEPTIDICAS**

PARAMETRO	H. PEPTIDICAS	H. ESTEROIDES
Localización del receptor	Plasmalema externo	Citosol
Entrada celular	No	Entrada libre a todas las células, retención sólo por células blanco
Activación de ciclasa de nucleótidos.	Si	No
Acción celular	Indirecta	Directa

TOMADO DE SZEGO Y PIETRAS (1984)

TABLA II. REPRESENTACION ESQUEMATICA DE LAS RESPUESTAS DEL UTERO A ESTROGENOS (17 $\beta$ -ESTRADIOL) A LO LARGO DEL TIEMPO EN HORAS

30	DIVISION CELULAR SINTESIS DE HISTONAS Y DNA
10	[ SINTESIS NETA DE PROTEINAS INCREMENTO EN ACTIVIDAD DE MUCHAS ENZIMAS INCREMENTO NETO DE RNA
5	INCREMENTO EN LA ACTIVIDAD DE MOLDE DE DNA MARCADO DE PROTEINAS DESDE AMINOACIDOS ISOTOPICOS [ CAPTURA NETA DE Na <sup>+</sup> Y H <sub>2</sub> O ELEVACION DE cGMP
1	[ MARCADO DE LIPIDOS DESDE PRECURSORES ISOTOPICOS CAPTURA NETA DE ALBUMINA METABOLISMO DE GLUCOSA INCREMENTADO
0.5	[ CAPTURA NETA DE UREA, MONOSACARIDOS Y AMINOACIDOS INCREMENTO EN INCORPORACION RELATIVA DE AMINOACIDOS EN LAS PROTEINAS, CON t <sub>1/2</sub> RAPIDO  [ CAPTURA NETA DE Ca <sup>2+</sup> INCREMENTO DE LA ACTIVIDAD DE RNA POLIMERASA
0.1	[ ADHESION INTERCELULAR AUMENTADA ENTRADA DE CALCIO REDISTRIBUCION DE LOS SITIOS ENLAZADORES DE CONCAVALINA A EN LA SUPERFICIE
0.05	[ MARCADO DE RNA DESDE PRECURSORES ISOTOPICOS  [ UNION DE ESTROGENOS AL NUCLEO TRASLOCACION NUCLEAR DE VESICULAS TIPO LISOSOMAS E HIDROLASAS ACIDAS DISPONIBILIDAD DE CATEPSINA B, FOSFATASA ACIDA, RIBONUCLEASA ACIDA Y OTRAS ENZIMAS LISOSOMALES VESICULACION MICROPINOCITICA DE LA MEMBRANA
0.01	INCREMENTO EN LARGO Y NUMERO DE MICROVELLOSIDADES HIPEREMIA: INCREMENTO EN TRANSPORTE DE AMINOACIDOS, GLUCOSA Y NUCLEOSIDOS
0.005	[ ELEVACION DEL cAMP SALIDA DE CALCIO LIBERACION DE HISTAMINA
0.001	ESTROGENOS UNIDOS A EXTRACTOS CITOSOLICOS  ESTROGENOS UNIDOS EN LA MEMBRANA PLASMATICA



órganos blanco de los estrógenos. La retención de hepatocitos y células uterinas fue inhibida por pretratamiento de las células con proteasas y por competencia con estrógenos libres, lo cual indica la naturaleza proteica del esteroide y su especificidad (Pietras y Szego, 1977, 1979a).

En estudios posteriores, el mismo grupo, al intentar aislar los receptores de hepatocitos y células uterinas aisladas de ratas ovariectomizadas, mediante centrifugación en gradiente de sacarosa de la fracción membranal del extracto total, obtuvieron una proporción muy alta de sitios de unión para estrógenos, con gran afinidad y especificidad para estradiol, en las subfracciones de membrana plasmática, en cambio, en preparaciones de células de epitelio intestinal no se detectó unión del E<sub>2</sub> (Pietras y Szego, 1979b, 1980). La unión del E<sub>2</sub>-<sup>3</sup>H, dado que no se inhibió con 17 $\alpha$ -estradiol, cortisol, testosterona ni progesterona, pero sí con E<sub>2</sub> no marcado, estriol o dietilestilbestrol, fue específica (Pietras y Szego, 1979b, 1980).

El posible receptor membranal a estrógenos se ha puesto en evidencia en tejidos diversos como son los espermatozoides (Hernández-Pérez y cols, 1979; Cheng y cols, 1981), el endometrio humano (Berqvist y cols, 1984), las neuronas (Towle y Sze, 1983), las células de carcinoma mamario humano en cultivo (Nenci y cols, 1981), las células hipofisiarias de la línea GH<sub>3</sub> en cultivo (Zysek y cols, 1981) y las células aisladas de las glándulas prepuciales de ratas ovariectomizadas (Pietras y cols, 1981).

Los receptores membranales de cualquier órgano blanco una vez activados a causa de su unión a la hormona, deben inducir algún efecto. Sin embargo, no se sabe si los efectos rápidos que causa el E<sub>2</sub> en la célula blanco se deben a su

interacción con el sitio de unión membranal, o si existe otro tipo de mecanismos. Se debe señalar que, hasta que se compruebe que el acoplamiento del E<sub>2</sub> con su sitio de unión localizado en la membrana plasmática, evoca un efecto o respuesta celular, no debe considerarse tal proteína como un receptor.

El incremento temprano de la concentración de AMPc inducido por estrógenos (Szego y Davis, 1967; Szego y Pietras, 1984, ver tabla I) resulta ser de gran interés, ya que el metabolito actúa como un transductor de hormonas polipeptídicas y de la epinefrina, y aún cuando se desconoce el mecanismo por el que los estrógenos provocan un incremento en concentración, existen evidencias de que es bloqueado por antagonistas β-adrenérgicos (Szego y Davis, 1967), lo que podría indicar que los estrógenos inducen la liberación de adrenalina, y ésta, a su vez, induce el incremento de cAMP. También se desconoce si este efecto se relaciona con alguna de las acciones de los estrógenos.

Entre otros efectos no genómicos inducidos por los estrógenos en las células blanco, están los relacionados con los lisosomas y los endosomas, que han sido propuestos como elementos participantes en el mecanismo de acción hormonal, ya que se demostró la asociación de los estrógenos con los lisosomas (Szego y cols, 1971), y su redistribución perinuclear bajo la acción de estas hormonas (Szego y cols, 1974).

La administración de estradiol a ratas inmaduras, machos y hembras gonadectomizados provoca la aparición de enzimas lisosomales en los núcleos de las células de las glándulas prepuciales y en células uterinas, dentro de los 15 minutos posteriores a la administración (Szego y cols, 1974), y mediante la utilización de IgG específica para proteínas lisosomales de las mismas glándulas

de rata, se demostró que los estrógenos inducen la traslocación de estos organelos al núcleo 30 minutos después de su administración (Nazareno y cols, 1981).

Utilizando técnicas histoquímicas de alta resolución de microscopía electrónica, y bioquímicas, se detectó, recientemente, la presencia de enzimas lisosomales en fracciones nucleares del epitelio y el estroma uterinos en el útero de la rata durante el ciclo estrual y en las zonas de implantación embrionaria (Durán-Reyes y cols, 1993; Guzmán-Grenfell y Hicks, 1993), y se demostró que agentes estabilizadores de la membrana plasmática como el cortisol, la indometacina, y el propranolol, posibles inhibidores del desplazamiento de los lisosomas evitan los efectos agudos de la activación lisosomal por esteroides (Nemere y Szego, 1981).

La capacidad de movilización vectorial de los lisosomas a través de los sistemas de microtúbulos del citoesqueleto (Rebhun 1972; Szego, 1984), los capacita para translocar moléculas de la superficie celular hacia el núcleo, al igual que sus componentes enzimáticos, lo cual probablemente facilite que algunas de las enzimas lisosomales intervengan en la des-represión genética, la transcripción del genoma y la replicación del ADN (Szego, 1974, 1984). Por otra parte, se demostró *in vivo* que los estrógenos inducen alteraciones en el número y la longitud de los microtúbulos del citoesqueleto, dentro de los primeros 35 segundos de su inyección intravenosa (Szego y cols, 1988). Este parece ser uno de los efectos rápidos de estas hormonas, que podría facilitar el desplazamiento eficiente de los lisosomas.

La captura de estradiol en partículas membranales de tipo endosómico con características enzimáticas diferentes a las de los lisosomas, internalización

celular de éstos y su unión a la matriz nuclear, se demostró en células uterinas de rata ovariectomizada (Pietras y Szego, 1984).

De la fracción microsomal, libre de lisosomas, del endometrio de cerdo se han aislado receptores a estradiol (Szendro y cols, 1983), sin embargo, textualmente, estos autores, señalan que "la existencia preferente del receptor en la membrana plasmática (cf. Pietras y Szego, 1979b) no es probada o rechazada completamente por nuestros resultados".

Otro aspecto a considerar es la posibilidad de relación entre la captación de estrógenos por una proteína membranal y el mecanismo genómico, si se considera la existencia de una continuidad entre las membranas plasmáticas y las lisosomales, y el reciclaje de estas, incluyendo sus proteínas asociadas, mediante mecanismos de endocitosis, exocitosis, coalescencia y desprendimiento de membranas (Szego, 1974, 1984; Szego y Pietras, 1985). De manera que el estradiol podría llegar al núcleo unido a receptores membranales, lo cual contradice la existencia de receptores predominantemente nucleares (Gorski y cols, 1984, 1986).

De hecho, Szego y Pietras (1985) ponen en tela de juicio la localización exclusiva de los receptores estrogénicos en el núcleo, y postulan que los resultados obtenidos por King y Greene, (1984), Welshons y cols, (1984, 1985), Gorski y cols, (1984, 1986) y otros autores, son artificios debidos a la metodología empleada; así, la técnica inmunohistoquímica aplicada por King y Greene (1984) permite detectar tanto los receptores a estrógenos localizados dentro de los núcleos como sobre él; y en la técnica de aislamiento utilizada por Welshons y cols (1984) no se realizó un perfil de identificación de enzimas marcadoras de la

pureza de los nucleoplastos (fracción nuclear). Con este tipo de argumentos, Szego y Pietras (1985) mantienen la postulación de la localización membranal de receptores estrogénicos.

Otro argumento de apoyo a la hipótesis de que el estradiol influye de manera aún no conocida en el transporte vectorial de moléculas del citosol al núcleo, se basa en que después de la exposición de las células blanco uterinas a estrógenos, se ha detectado en el núcleo la presencia de diversas enzimas, que en otras condiciones no se localizan en él, como la fosfatasa ácida y la  $\beta$ -glucuronidasa (Szego y cols, 1974; Durán-Reyes y cols, 1993), la ribonucleasa ácida II (Szego y cols, 1974), la calmodulina y la guanilil-ciclasa (Flandroy y cols, 1983), la  $\alpha$ -manosidasa y la  $\alpha$ -glucosidasa (Guzmán-Grenfell y cols, 1993). Es probable que por el mismo mecanismo se transporte un factor citosólico que contribuye a aumentar la estabilidad de la unión del complejo  $E_2-R_E$  a los componentes nucleares, y al mismo tiempo se puede explicar el porque se postulo que era necesaria la transformación o activación del complejo  $E_2R_E$ , de acuerdo al modelo de dos etapas (O'Malley y Means, 1974; Jensen y cols, 1968).

Con base en los hallazgos experimentales analizados, y debido a que explica muchos de los efectos de los estrógenos, es posible aceptar como válido el mecanismo de acción genómico, que involucra un receptor nuclear, a pesar que sus autores (Gorsky y cols, 1984, 1986) no aclaran cómo se transporta el estradiol al núcleo. Lo que pudiera complementar su teoría sería la existencia de un receptor membranal, ya que la membrana plasmática se continúa con las lisosomales y las microsomales. Esta continuidad, más que asociación física, se refiere a la posibilidad de intercambio de los fosfolípidos y las proteínas entre ellas, y a la transmisión del mensaje mediante movimientos de los receptores

embebidos en membranas, hacia el citosol y el núcleo (Szego, 1974, 1984; Szego y Pietras, 1984).

Por otro lado, el mecanismo no genómico, de corta latencia que involucra respuestas metabólicas rápidas, relacionadas con una interacción esteroide-membrana celular, quizá con producción de segundos mensajeros culminaría con la liberación del contenido de vesículas membranales hacia el espacio extracelular o el núcleo (Szego, 1974, 1984), o con otro tipo de eventos como los descritos en la tabla II.

## IMPLANTACION

Mientras el cigoto se segmenta y es transportado desde el oviducto hasta el útero, el endometrio experimenta cambios progresivos que conducen a una fase de receptividad, en la cual adquiere la capacidad de responder a las señales embrionarias (Psychoyos, 1973, 1976; Hicks, 1981). Esta fase depende de las condiciones hormonales propias del endometrio, en el momento en el que el embrión llega a la cavidad uterina. En la rata de laboratorio, esto sucede al quinto día, cuando se considera día cero la presencia de espermatozoides en el frotis vaginal.

Durante la receptividad endometrial, entre el embrión y la zona del endometrio con la que se pone en contacto se establece una serie de interacciones que favorecen la implantación embrionaria (Psychoyos, 1973). La respuesta del endometrio a los estímulos embrionarios incluye un incremento en la permeabilidad vascular, cambios morfológicos de las células epiteliales y un marcado aumento en la proliferación y diferenciación de las células estromales, conocido como reacción decidual (Psychoyos, 1973; Sengupta y col, 1979).

Los requerimientos hormonales para la preparación de las células uterinas en la implantación y el desencadenamiento de la reacción decidual es característico de cada especie (Lejeune y cols, 1986). En la rata y el ratón, se requiere de la progesterona y el estradiol de origen materno, y este último es esencial para la inducción de la implantación en el útero preparado por la progesterona (Psychoyos, 1973; Yoshinaga y Adams, 1966). La ovariectomía antes de tercer día de la gestación bloquea la receptividad uterina y la implantación. El tratamiento secuencial de ratas ovariectomizadas con progesterona y estradiol



desencadena la presentación de estos procesos (Psychoyos, 1976; Sengupta y col, 1979).

En otras especies como el conejo, el cerdo y el criceto o hámster, no son indispensables los estrógenos maternos para la implantación (Kwun y Emmers, 1974; Orsini y Meyer, 1962). En estas especies, los estrógenos son producidos por el blastocisto antes de la implantación (Hoversland y cols, 1982; George y Wilson, 1978; Wu y Lin, 1982; Sholl y cols, 1983; Perry y cols, 1976; Paria y cols, 1984; Sengupta y cols, 1983; Bhatt y Bullock 1974). En la rata, se sabe que el blastocisto es capaz de convertir andrógenos a estrógenos, pero no se puede afirmar que participe en la implantación.

Algunas respuestas del útero a los estrógenos pueden no ser alteradas por la administración de antiestrógenos, que son moléculas que en presencia de estrógenos antagonizan sus efectos, probablemente por bloqueo o competencia de la unión de las hormonas a sus receptores citosólicos ó nucleares, ni por inhibidores de la síntesis de proteínas, como la liberación rápida de histamina y la síntesis de prostaglandinas (Castracane y Jordan, 1976; Marcus y Shelesnyak, 1967). Estos hallazgos sugieren que algunos efectos importantes de los estrógenos no son mediados por el mecanismo clásico o genómico.



## SEÑALES EMBRIONARIAS DURANTE LA IMPLANTACION

Dos de las respuestas más tempranas del útero a la presencia del blastocisto son los cambios en la permeabilidad vascular y el inicio de la reacción decidual de las células estromales, en la vecindad del blastocisto. Se ha propuesto que esas respuestas pueden ser originadas por medio de un efecto directo del blastocisto sobre las células estromales. Como el epitelio luminal permanece intacto durante estos eventos, el efecto del blastocisto sobre el estroma requiere la transmisión de una señal a través de la capa epitelial. Se han acumulado evidencias de que las células epiteliales juegan un papel activo en la transmisión del mensaje desde el blastocisto hasta el estroma, o incluso, que el epitelio podría participar en el evento, mediante la amplificación de la señal embrionaria, o tal vez mediante la generación de una nueva, que a su vez incidiría sobre el estroma, ya que cuando se elimina experimentalmente el epitelio luminal de los cuernos uterinos sensibilizados con pretratamiento de progesterona y estradiol, el útero se insensibiliza a estímulos deciduogénicos, (Lejeune y cols, 1981).

Se han propuesto como mensajeros del blastocisto a las señales físicas, la histamina, el estradiol, las prostaglandinas y los catecol-estrógenos. En las dos últimas décadas se ha demostrado que la administración de esos compuestos a ratas pseudoembarazadas causa reacción decidual, lo cual es bloqueado por inhibidores o antagonistas de esas moléculas (revisado por Kennedy, 1983).

Dickman y cols (1975, 1976) han propuesto que el blastocisto secreta estrógenos, los cuales difunden hasta el endometrio, en el cual inducen el incremento en la permeabilidad de los capilares. Esta hipótesis implica que, además de unir estrógenos ováricos circulantes, el epitelio debe interactuar con los embrionarios,

los cuales deben entonces saturar la capacidad de unión de los receptores en las zonas de implantación. Ward y cols (1978) encontraron que el endometrio de las zonas de implantación de ratas con implantación retardada, unen menos  $E_2-H^3$ , en comparación con las regiones interzonas, lo cual era de esperarse si los receptores de las zonas de implantación se saturan con el estrógeno embrionario. Logeat y cols (1980) demostraron que los receptores nucleares de los estrógenos y progesterona se hallan en mayor cantidad en zonas de implantación que en las regiones interzona, en ratas el día cinco de preñez, diferencia que persiste aún cuando se practique la ovariectomía un día antes de la implantación, lo cual apoya la hipótesis de la participación de estrógenos embrionarios durante la implantación embrionaria. Sin embargo, Martel y Psychoyos (1983) encuentran menor cantidad de receptores nucleares y citosólicos a estrógenos en zonas de implantación que en regiones interzonas, lo cual indica que el blastocisto no produce estrógenos. Los resultados de Logeat y cols (1980) contrasta con lo encontrado para el mismo sujeto (rata) por parte de Martel y Psychoyos (1983). La diferencia pudiera encontrarse en distinto tipo de diseño.

## **HIPOTESIS**

El epitelio uterino de las zonas de implantación posee un receptor membranal, el cual se une a los estrógenos producidos por el blastocisto. Este receptor puede ser aislado con el uso de detergentes no iónicos, a causa de las propiedades intrínsecas de tales sustancias, y puede ser visualizado mediante una técnica histoquímica específica para sitios de unión a estrógenos no solubles.

## **OBJETIVOS**

1. Aislar las proteínas de la superficie apical del epitelio luminal uterino de ratas en estro y en el día 5 de la gestación (día de la implantación).

1.1. Adaptar la metodología de obtención de proteínas de superficie apical de epitelio luminal uterino, en la rata.

1.2. Encontrar la concentración óptima de un detergente no iónico (Tritón X-100) en la cual se liberen las proteínas de la superficie apical con poca contaminación de proteína citosólica.

2. Caracterizar las constantes cinéticas del receptor membranal a estrógenos, de entre las proteínas aisladas de la superficie apical del epitelio luminal uterino.

2.1. De útero en estro.

2.2. De útero en día cinco de gestación.

3. Estudiar, mediante una técnica histoquímica, la distribución del receptor membranal a estrógenos en el epitelio uterino durante cada una de las fases del ciclo estrual, en las zonas de implantación y las regiones interzonas.

## METODOLOGIA

### MATERIALES

**Reactivos.** Para las técnicas bioquímicas, histológicas e histoquímicas se utilizaron los siguientes reactivos: 2,3,6,7-[<sup>3</sup>H]-estradiol, que fue obtenido de New England Nuclear; estradiol no radioactivo (frío), tris(hidroximetil)-amino metano (Tris), etilén-diamino-tetracétato disódico (EDTA), leupeptina, pepstatina A, fluoruro de fenil metil sulfonilo (PMSF), albúmina sérica bovina, 17-hemisuccinato de 17 $\beta$ -estradiol-albúmina sérica bovina (que tenía de 8 a 10 residuos de esteroide por molécula de albúmina), isotiocianato de fluoresceína (isómero I), ditioneitol (DTT), cacodilato de sodio dimetil-sulfóxido (DMSO) y 5'-monofosfato de adenosina (AMP), que se adquirieron de Sigma Chemical Co; glutaraldehído, cacodilato de sodio, óxido de propileno, resina Polibed 812, acetato de uranilo y citrato de plomo que se compraron en Polysciences, Inc; carbón activado, hematoxilina y eosina que se obtuvieron de Sigma de México. Los demás reactivos fueron de grado analítico y se compraron en Merck de México y en J.T. Baker.

El 17 $\beta$ -estradiol-17-hemisuccinato de albúmina sérica de bovino-isotiocianato de fluoresceína (EAF) y la albúmina sérica de bovino fluoresceinada (AF) se prepararon de acuerdo al método de Gaetjens y Pertschuck (1980): A 15 mg de isotiocianato de fluoresceína disueltos en 1 ml de amortiguador de carbonatos 0.1 M pH 9.2 se les adicionó 1 mg de albúmina sérica de bovino o de 17 $\beta$ -estradiol-17-hemisuccinato de albúmina sérica de bovino, en un volúmen final de 4 ml. La mezcla se agitó a 4 °C durante 7 h en la oscuridad, se dializó durante 72 h en un litro de NH<sub>4</sub>HCO<sub>3</sub> 10 mM, el cual fue cambiado cada 12 h, y se liofilizó. El polvo

recuperado se resuspendió en fosfato de sodio y potasio 100 mM; NaCl 50 mM a pH 7.4 (PBS), con 10 % de etanol, y se determinó la cantidad de isotiocianato de fluoresceína unido por molécula de albúmina o estradiol-albúmina, mediante absorción luminosa a 495 nm en un espectrofotómetro Beckman, modelo DU-46. Para comprobar en ambos compuestos la presencia de proteína fluoresceínada, se pasaron a través de una columna de Biogel P-2, y se obtuvieron 40 fracciones de 1.0 ml, que fueron leídas en un espectrofotómetro Beckman, modelo DU-46 a 280 nm para proteína y 495 nm para fluoresceína. En las figuras 1 y 2 se puede observar que la fluoresceína que no se unió a proteínas aparece en fracciones distintas a las que migra la fluoresceína unida a proteínas.

**Animales.** Se utilizaron 120 ratas hembra, de la cepa Sprague-Dowley, sexualmente maduras, de 250-300 g de peso, que se mantuvieron en condiciones controladas de luz (ciclos 14 h luz por 10 h oscuridad, iniciando a las 7:00 AM), y temperatura (de 22 a 24°C), con agua y alimento Purina chow administrados *ad libitum*. A las ratas se les determinaron, por lo menos dos veces, todas las fases del ciclo estrual, mediante la observación de células epiteliales vaginales, obtenidas por lavados con solución salina (NaCl 0.9 %). Las ratas se distribuyeron en grupos, de acuerdo a la fase del proyecto.

En la fase I, de implementación y adaptación de la técnica para la obtención de proteínas de la superficie luminal del epitelio se utilizaron 20 ratas en estro.

En la fase II, la de caracterización del receptor a estrógenos por ensayo radioquímico se utilizaron tres grupos de animales: Grupo A. Estro, seis ratas en esta fase del ciclo estrual, y en las que el útero se homogeneizó y el extracto obtenido se trató por centrifugación diferencial para obtener la fracción soluble,

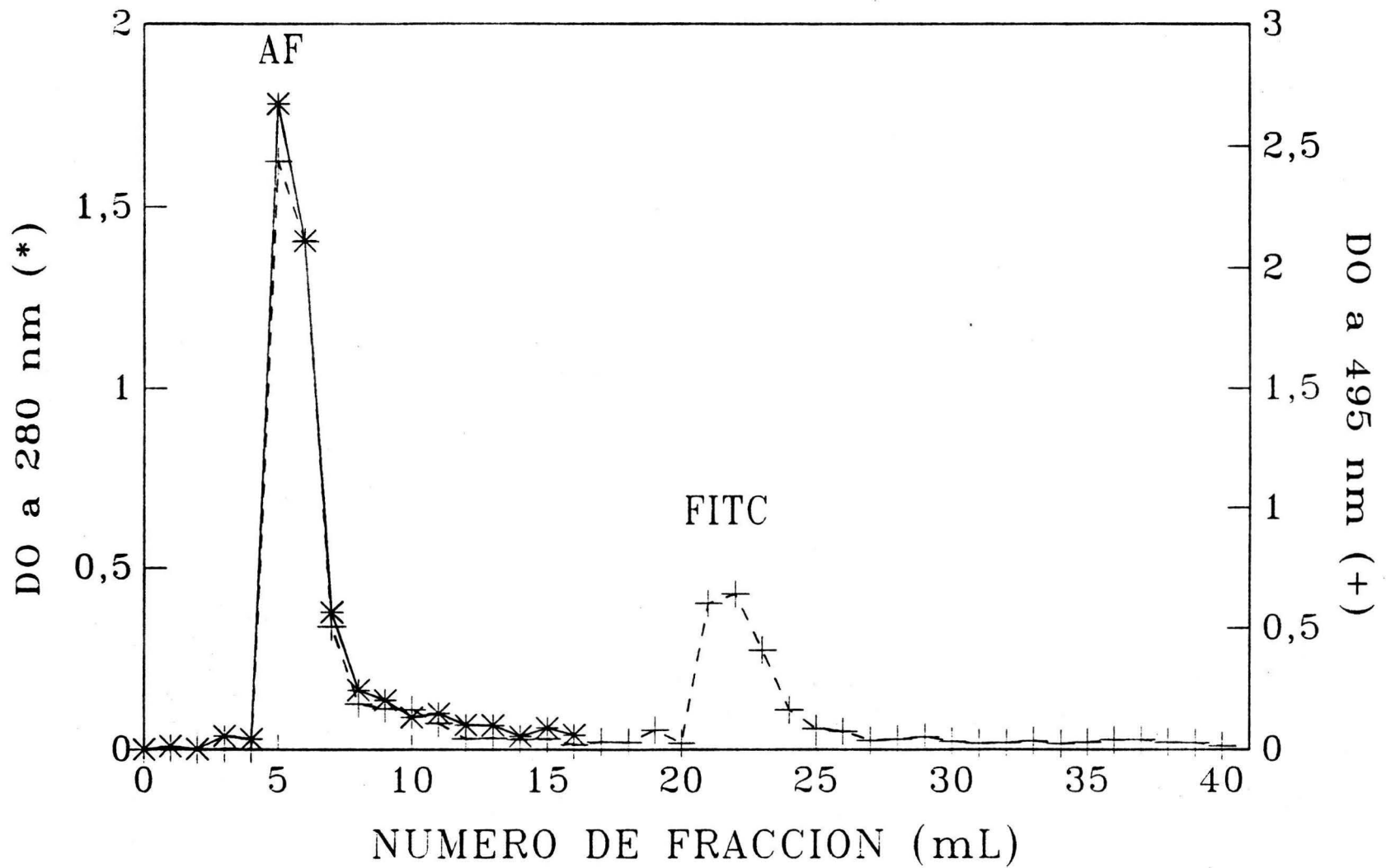


FIGURA 1. Representación gráfica del resultado de la cromatografía en Biol-gel P-2 del complejo albúmina fluoresceína (AF).

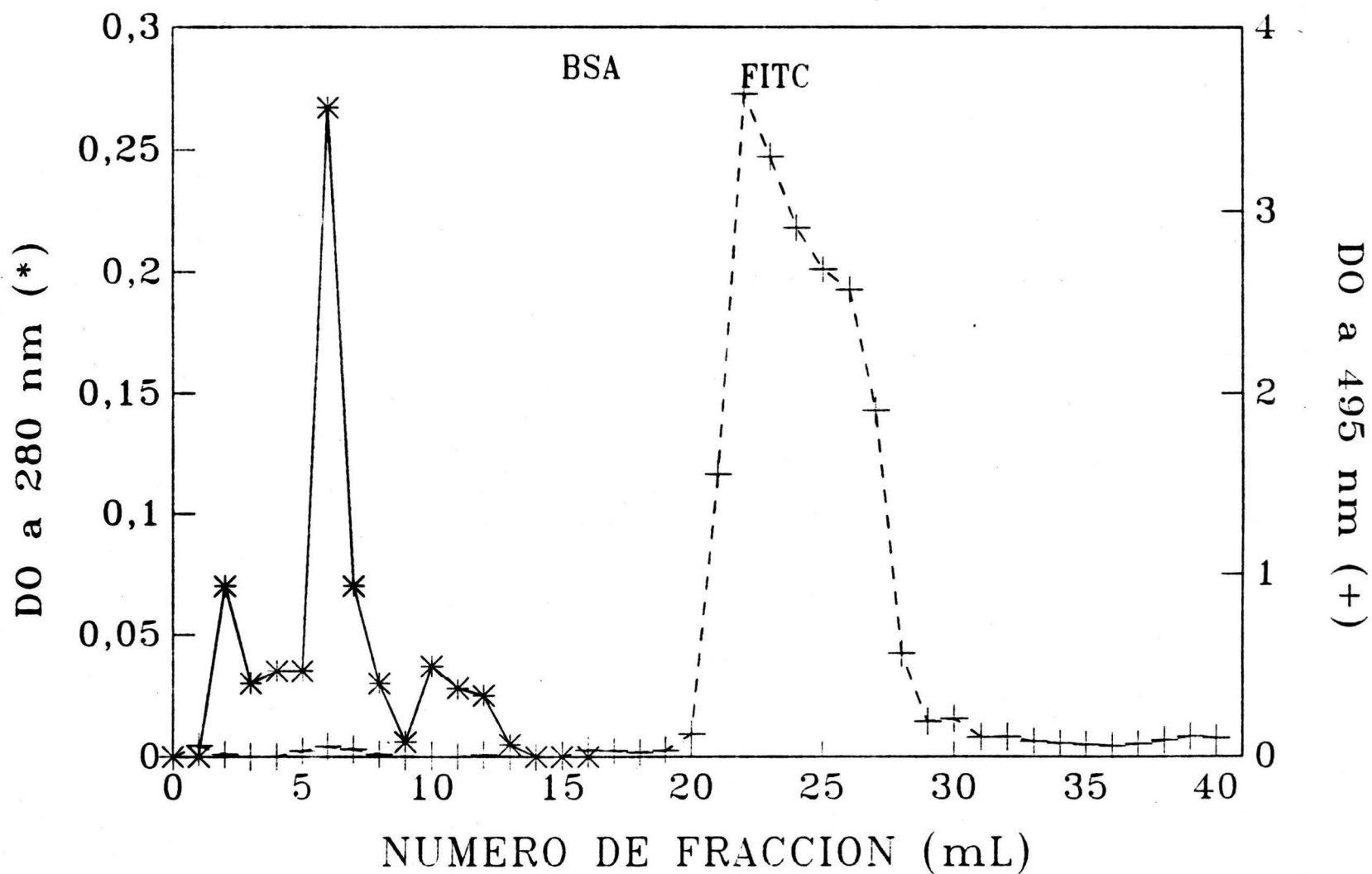


FIGURA 2. Representación gráfica del resultado de la cromatografía en Bio-gel P-2 de Isotiocianato de fluoresceína y albúmina sérica bovina.

como control; Grupo B. Estro, 40 ratas en las cuales los cuernos uterinos, una vez obtenidas, se sometieron a lavado/incubación con el medio Tx, como se indica más adelante; Grupo C. Ratas gestantes. 40 Ratas que presentaban el patrón normal del ciclo estrual fueron apareadas en una proporción de 2:1, con machos de fertilidad comprobada durante una noche. En la mañana, se tomaron muestras de fluido vaginal, que se observaron al microscopio óptico. La presencia de espermatozoides en el frotis se tomó como indicador del apareamiento, y se denominó a ese día como cero. Las ratas apareadas se mantuvieron en condiciones normales hasta el día 5 de gestación, y los cuernos uterinos se sometieron a lavado/incubación como se describe más adelante.

En la fase III, de detección de sitios de unión a estrógenos por ensayo histoquímico se utilizaron dos grupos de ratas: Grupo D. Ciclo estrual. Entre tres y cinco ratas en cada fase del ciclo estrual normal; Grupo E. Ratas en el día 5 de la gestación, fecha en la cual se lleva a cabo la implantación. Se emplearon cuatro sujetos.

## **FASE I. IMPLEMENTACION DE LA TECNICA DE LAVADO/INCUBACION DE LOS CUERNOS UTERINOS CON EL MEDIO TX.**

**Obtención de fluido uterino y de proteínas de membrana.** Las ratas en estro se sacrificaron por dislocación cervical. Se obtuvo el útero, el cual se colocó en una caja de Petri con solución salina al 0.9 % en frío, se cortaron los cuernos uterinos y se sometieron a un lavado intraluminal (figura 3) con amortiguador (NaCl 140 mM; Tris-HCl 25 mM, a pH 7.5), para obtener el fluido uterino y posteriormente, se lavaron de la misma manera durante 10 min, con 100 µl de medio Tx, que contenía NaCl 140 mM; Tris-HCl 25 mM; PMSF 0.5 mM; leupeptina



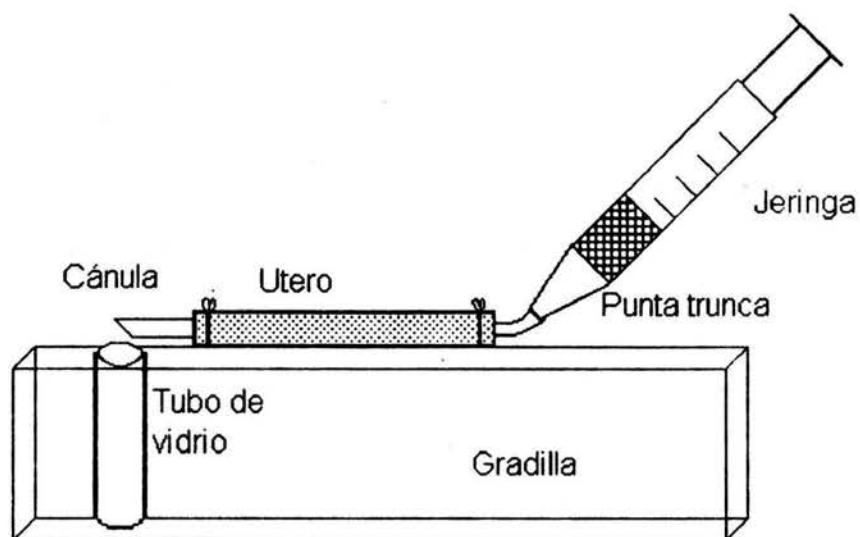


FIGURA 3. Diseño utilizado para la obtención de proteínas de membrana plasmática luminal de células epiteliales uterinas.

20  $\mu\text{g/ml}$ ; pepstatina A 20  $\mu\text{g/ml}$ , y Tritón X-100 a de 0.0, 0.025, 0.05, 0.1 y 0.2 %, a pH 7.5, con objeto de seleccionar la concentración óptima del detergente para la obtención de las proteínas membranales de epitelio uterino con poca o ninguna contaminación de las citosólicas. Al término de los 10 min, se recuperó, con otros 400  $\mu\text{l}$  el material liberado, que se denominó extracto Tx, el cual, al igual que el fluido uterino, fue centrifugado durante 10 min a 2500 rpm en una centrifuga refrigerada Beckman modelo J2-HS en un rotor JA 18.1, para eliminar residuos celulares.

**Obtención de extractos de células epiteliales.** Las ratas en estro fueron sacrificadas y perfundidas por la aorta abdominal con solución salina suplementada con versenato 0.1 % para eliminar proteínas sanguíneas que se unen al estradiol. Se obtuvieron los uteros, se fragmentaron en sentido longitudinal y transversal, y las fracciones se sometieron a agitación vigorosa en un vórtex con perlas de vidrio, en el medio I, constituido por Tris 5 mM; Sacarosa 0.25 M; KCl 2.5 mM y MgCl 0.5 mM a pH 7.5 durante 2 min (Fagg y cols, 1979), con el fin de obtener el extracto crudo de las células epiteliales endometriales, el cual se sometió a centrifugación diferencial para obtener una fracción libre de núcleos, membranas, mitocondrias y lisosomas.

**Control bioquímico.** En el fluido uterino, en el extracto de células epiteliales y en los extractos Tx se determinó, por medio del fosfato inorgánico liberado a partir de AMP, la actividad de la 5'-nucleotidasa (5'N), que es una de las enzimas marcadoras de la presencia de las proteínas de la membrana plasmática (Touster y col, 1970). Para comprobar que la extracción de las proteínas lumbinales no afectó la integridad del epitelio uterino, se cuantificó la actividad de lactato deshidrogenasa (LDH) que es una enzima marcadora de la presencia de

proteínas citosólicas (Bucher y col, 1963). La relación entre ambas actividades enzimáticas permitió determinar el grado de pureza de los extractos obtenidos. Las proteínas totales de los extractos y el fluido uterino se cuantificaron por el método de Bradford (1976). Se determinó la concentración de ADN en los extractos por el método de Ciles y Myers (1965).

**Microscopía electrónica.** Para el análisis ultraestructural con el microscopio electrónico de transmisión, después de la obtención de las proteínas de la superficie apical de las células del epitelio endometrial, fragmentos de la parte central de cada cuerno uterino de 1 a 2 mm de longitud se fijaron por 2 h en glutaraldehído al 2.5% amortiguado en cacodilato de sodio 0.15 M a pH 7.4, se postfijaron en OsO<sub>4</sub> al 2 %, y se lavaron dos veces durante 15 minutos en amortiguador de cacodilato, se deshidrataron por inmersión en una serie de alcoholes graduales, desde 60 % hasta absoluto, durante 10 min cada uno, y se lavaron con óxido de propileno durante 20 minutos, se preincluyeron 72 h en una mezcla de óxido de propileno y Polibed 812 (1:1), y se incluyeron en Polibed 812. La polimerización de la resina epóxica se llevó a cabo en una estufa Reichert-Jung modelo KT10 a 35° C durante 12 h, 45° C otras 12 h y finalmente a 60° C otras 12 h. Se obtuvieron cortes de 60 a 90 nm en un ultramicrotomo Reichert-Jung modelo Ultracut, se contrastaron con acetato de uranilo al 4 % durante 20 min y con citrato de plomo al 0.3 %, 10 min, y se observaron en un microscopio electrónico de transmisión ME-10, con el fin de detectar probables daños tisulares causados por el tratamiento con el Tritón X-100.

## RESULTADOS

**Reactivos fluorescentes.** Los reactivos EAF y AF fueron bien preparados. En el método original (Gaetjens y Pertschuck, 1980) se obtienen de 4 a 5 residuos de FITC por mol de esteroide-albúmina ó albúmina. Otros estudios (Nenci y cols, 1981, Berqvist, 1984) utilizan EAF o AF preparados de manera similar y con un rendimiento equivalente. Para los reactivos preparados en este trabajo, se determinó que la proteína unida a hormona poseía de 5 a 6 residuos del marcador fluorescente, mientras que la proteína no marcada tenía entre 6 y 7 residuos por molécula proteica. Por otra parte, la cromatografía de los complejos AF (figura 1) y EAF (no mostrado) indican que la absorbancia a 495 nm (la presencia de FITC) migra al parejo que la absorbancia a 280 nm (proteína), en contraste con una mezcla de FITC y BSA que no se hicieron reaccionar, y que cada una migra por separado (figura 2), lo cual prueba que los compuestos preparados eran efectivamente AF y EAF.

**Concentración óptima de Tritón X-100 en el medio TX.** Mediante la técnica de lavado/incubación con Tritón X-100 se encontró que la cantidad de proteína liberada se incrementa en relación directa a la concentración del detergente en el medio, mientras que la cantidad de proteína encontrada en extracto total de epitelio es similar a la del extracto Tx, lo cual se observa en la figura 4. La LDH, en cuanto a volumen total de los extractos, aumentó en forma proporcional de acuerdo a la concentración del detergente, y fue muy baja en el fluido uterino y la del extracto de epitelio, similar a la obtenida con 0.05 % de Tritón X-100 (figura 5), mientras que relacionada a la cantidad de proteína, tuvo un incremento casi lineal desde 0.0 hasta 0.05 % de detergente, mientras que a partir de 0.05 y hasta 0.2 %, la actividad fue muy parecida, en cambio, la del fluido uterino fue ligeramente

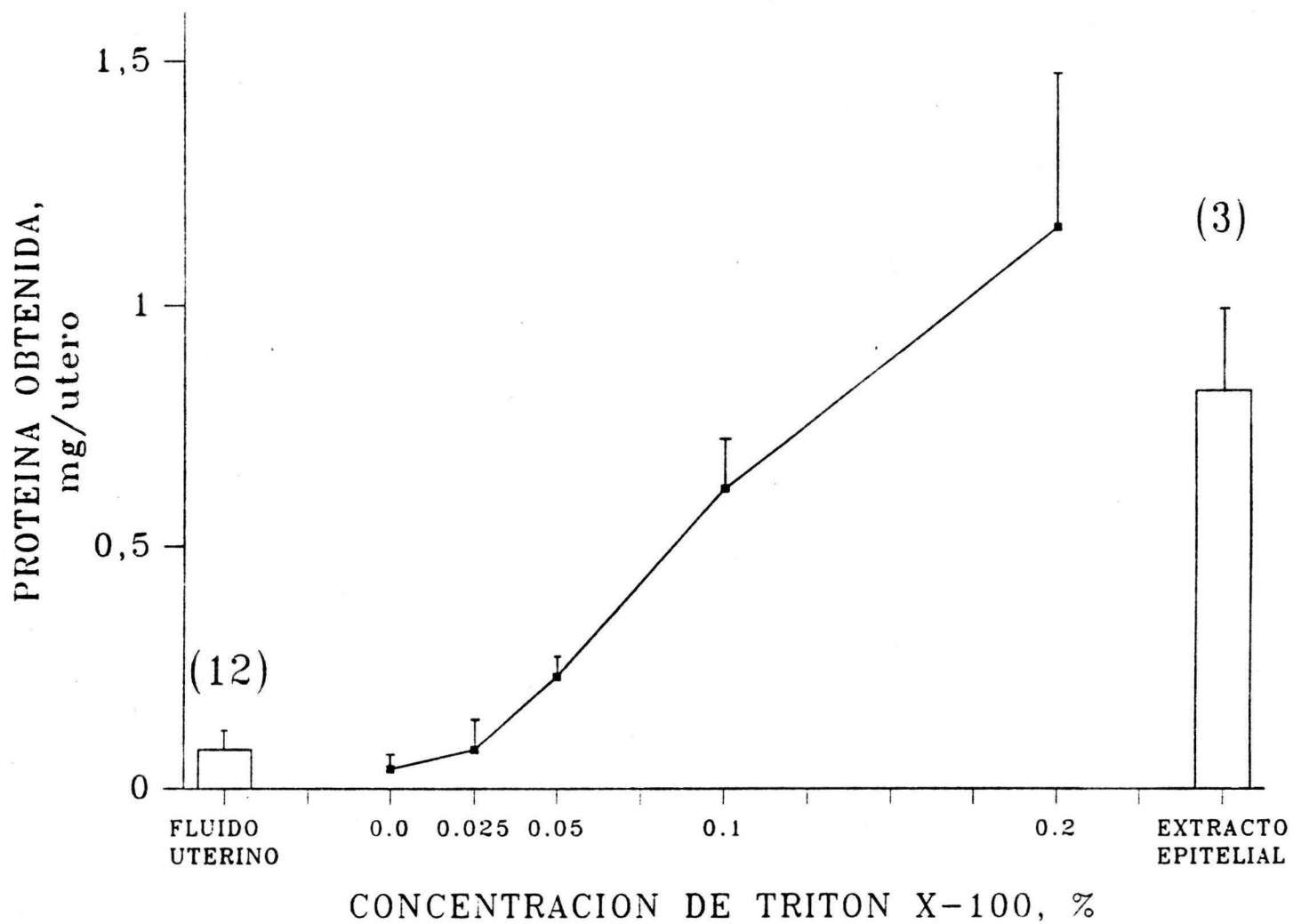


FIGURA 4. Representación gráfica del resultado de la cuantificación de proteínas en el fluido uterino, los extractos Tx y el extracto epitelial. Aparentemente, el Tritón X-100 al 0,2 % libera mas proteína que la encontrada en extracto epitelial ( $\bar{X} \pm DE$ , n=4, excepto donde se indica).

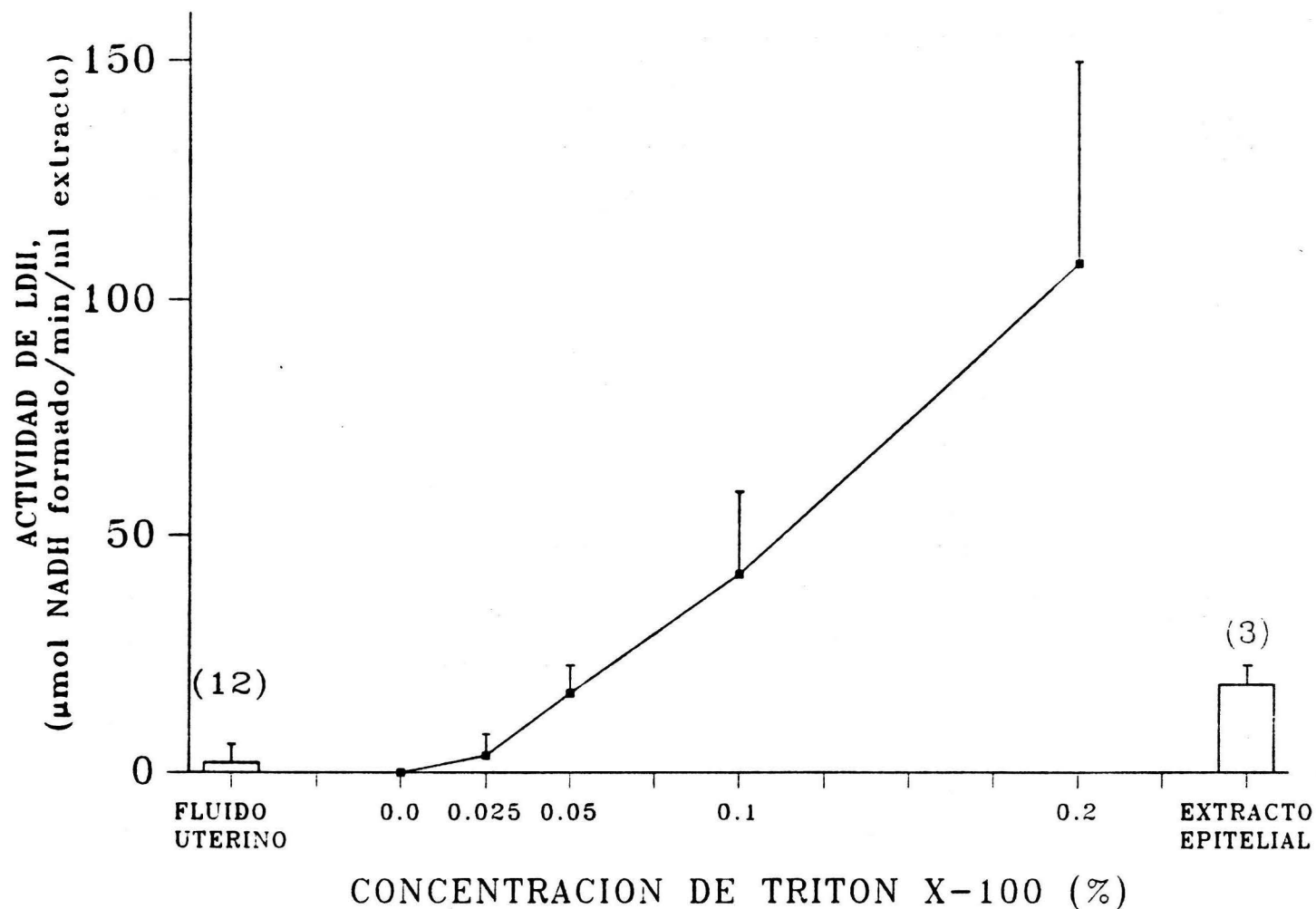


FIGURA 5. Representación gráfica de la actividad de LDH determinada en fluido uterino, extractos Tx y extracto epitelial, por volumen ( $\bar{X} \pm$  D.E. de 4 experimentos, excepto donde se indica).

menor a la medida con las concentraciones de Tritón X-100 de 0.05, 0.1 y 0.2 %, y la del extracto epitelial solo fue casi la mitad de la registrada con 0.025 % de Tritón X-100 (figura 6). Por otra parte, la 5'N, en cuanto a volumen de muestra,, exhibe una tendencia a aumentar de manera lineal (figura 7), y relacionada con la cantidad de proteínas, se encontró un efecto inverso de la concentración de detergente: a menor concentración de éste en el medio (0.0 y 0.25 %) la actividad es muy alta, mientras que a concentraciones elevadas del detergente (0.05, 0.1 y 0.2 %), la actividad es muy baja (figura 8).

Del análisis de los resultados se pudo inferir que las concentraciones de 0.025 % y 0.05 % de Tritón X-100 en el medio fueron eficientes para la obtención de extracto Tx.

Debido a que la concentración de proteínas obtenidas con medio Tx a una concentración de 0.2 % era mayor que en el extracto epitelial total, se pensó en un posible daño celular generalizado, que incluyera daño nuclear. Para comprobar esta hipótesis, se utilizó la técnica de Giles y Myers (1965) para cuantificar la concentración de ADN en los extractos Tx. Sin embargo, la cantidad de esa macromolécula en los extractos estuvo por abajo del límite inferior de la sensibilidad de la prueba, puesto que fue menor a 1 µg en el volumen total de los extractos Tx en los que se utilizó la concentración de Tritón X-100 de 0.2 % (datos no mostrados), con lo que se hizo evidente que a esta concentración de detergente sólo se disgregó la membrana plasmática y no la nuclear.

**Microscopía electrónica.** En el tejido sometido a lavado/incubación con el medio TX sin detergente, se observó que en las microvellosidades de la región apical del epitelio uterino de ratas en estro, y en la superficie carente de éstas, la membrana

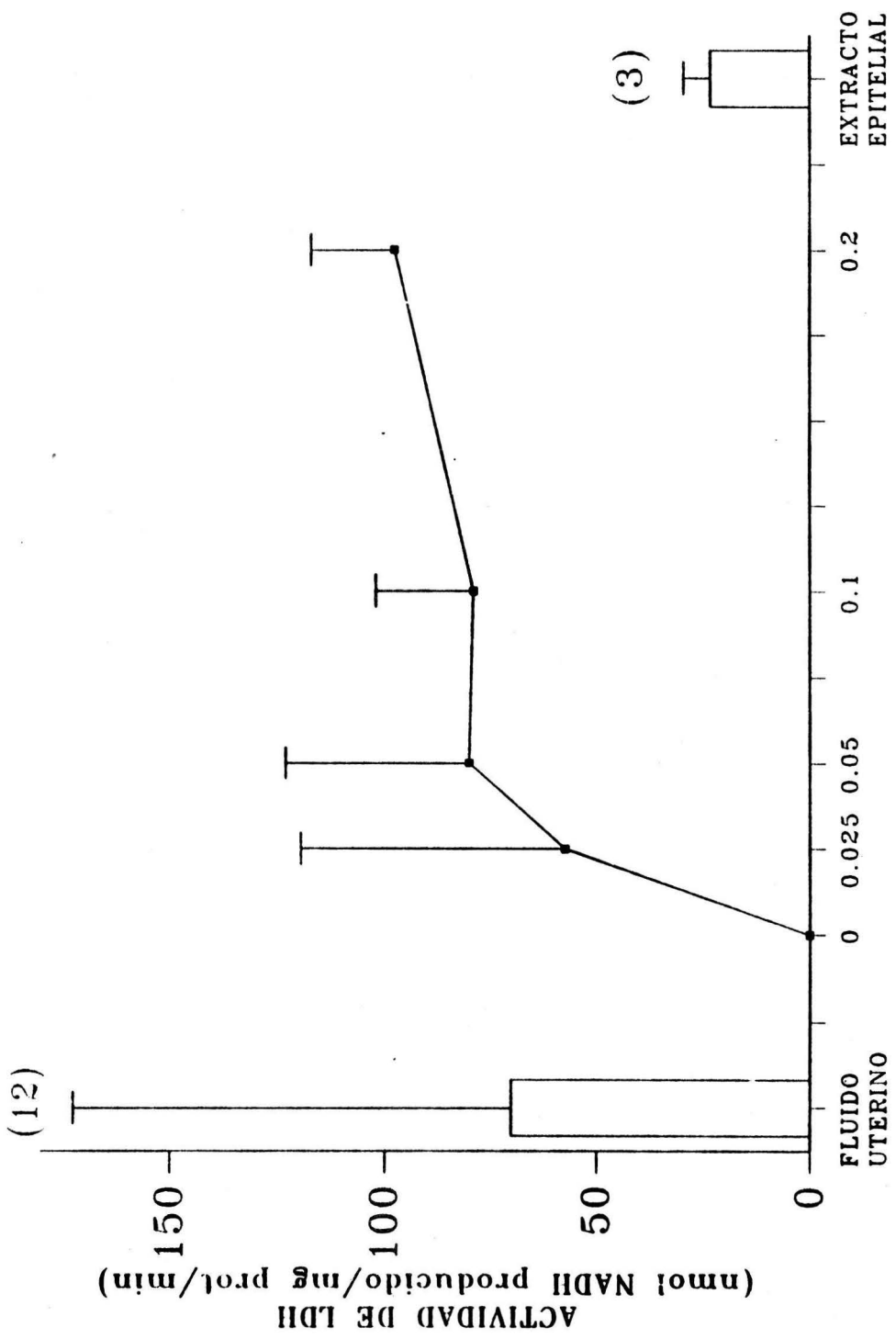


FIGURA 6. Representación gráfica de la actividad específica de LDH en fluido uterino, extractos Tx y extracto epitelial ( $\bar{X} \pm DE$ , n = 4, excepto donde se indica).



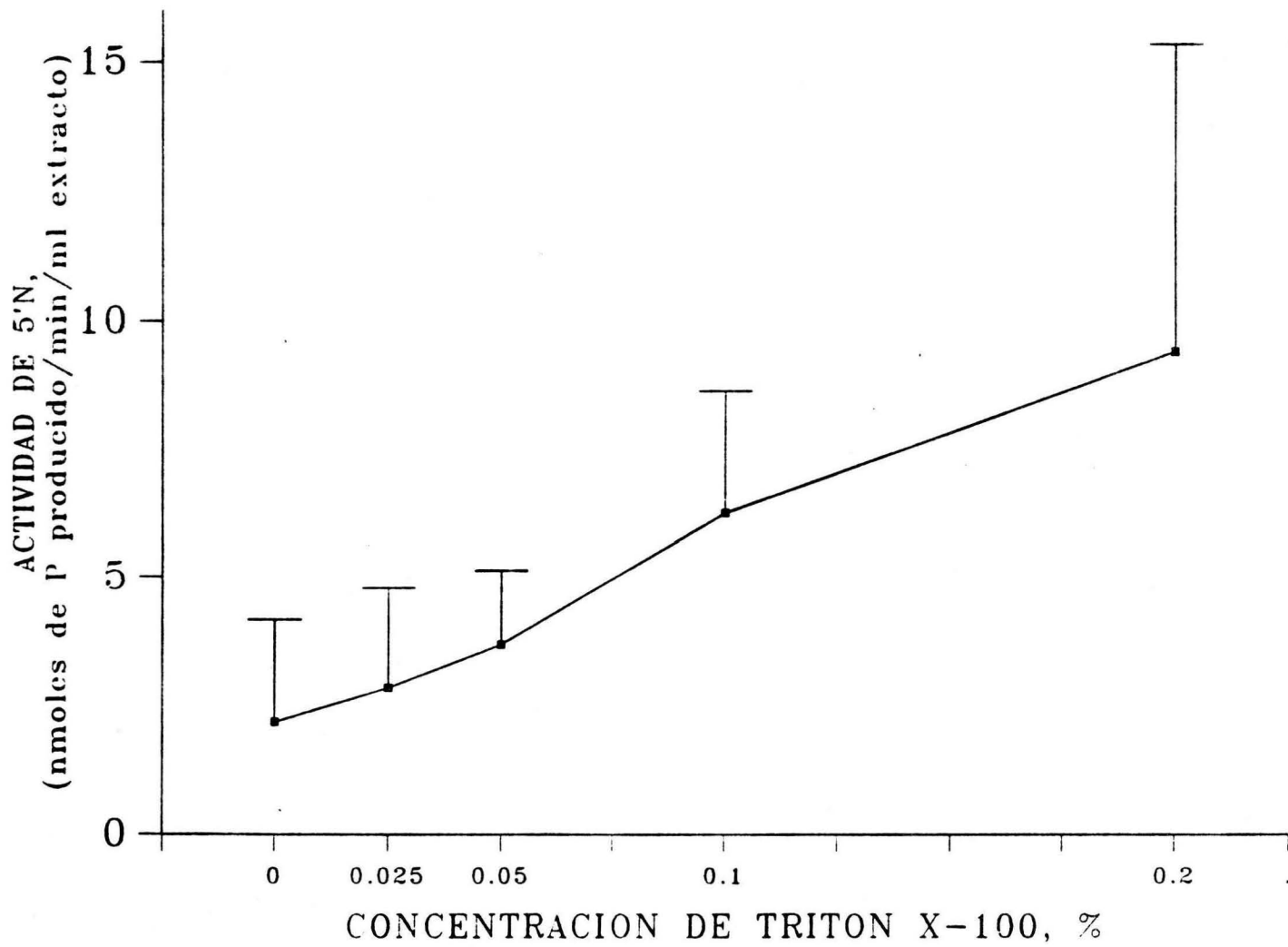


FIGURA 7. Muestra la actividad de 5'N en extractos Tx por volumen obtenido ( $\bar{X} \pm D.E.$  de 4 experimentos).

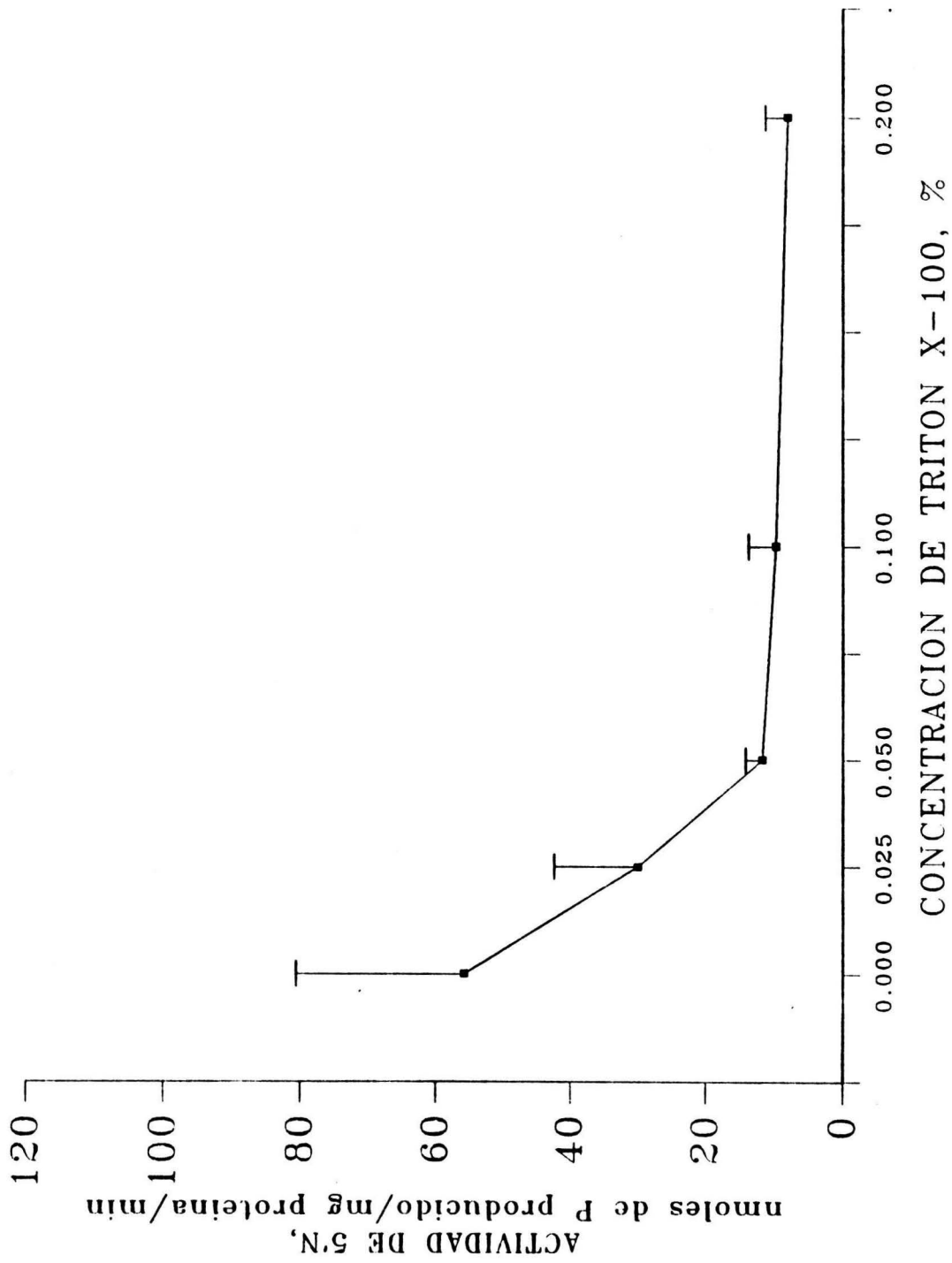


FIGURA 8. Muestra la actividad de 5'N en extractos Tx, en relación a la cantidad de proteínas ( $\bar{X} \pm D.E.$  de 4 experimentos).

tuvo una estructura normal de la bicapa, mientras las proteínas apicales fueron abundantes y formaron puentes ramificados que se disponían en el espacio existente entre las microvellosidades y sobre la punta de éstas (figura 9). Una estructura similar se observó en el epitelio uterino de las ratas en estro que se sometieron al lavado/incubación con el medio TX a una concentración de 0.025 % de detergente, de donde se deduce que la remoción de las proteínas apicales fue mínima, y no se causó daño celular, ya que la estructura fina de la membrana de las microvellosidades y las regiones lisas se conserva, si bien la cantidad de proteínas de glicocálix es menor (figura 10). Las muestras de útero de rata en estro, tratado con el detergente a la concentración de 0.05 % presentan, tanto en las microvellosidades como en las regiones carentes de ellas, una menor cantidad de proteínas unidas a la membrana plasmática y de puentes que las ponen en contacto, y se ven algunos acúmulos dispersos entre estas, lo cual permite suponer que se eliminaron las proteínas (figura 11). Las muestras obtenidas de útero de rata en estro incubado con el detergente a concentración de 0.1 % presentan un aparente adelgazamiento de la membrana plasmática de las microvellosidades y de las áreas lisas, las proteínas apicales fueron muy escasas y quedaron acúmulos pequeños entre las microvellosidades. En el citoplasma se observaron vacuolas, un aumento notable de polirribosomas, retículo endoplásmico rugoso con cisternas distendidas, todo lo cual, en conjunto, es indicador de daño celular generalizado, que podría explicar el aumento de la actividad de LDH observada en los extractos Tx obtenidos según este tratamiento, debido a una extracción de las proteínas citosólica además de las membranales y del glicocálix (figura 12).

**Ensayo radiométrico de receptor a estrógenos.** Por literatura, se sabe que durante el proestro tardío o el estro, los receptores citosólicos o nucleares de



Figura 9. Micrografía electrónica de la superficie apical de epitelio uterino de una rata en estro después del lavado con el medio Tx, sin tritón X-100 (Control). En las microvellosidades (1) y en la superficie lisa (2) se observa la membrana plasmática (3) normal, y a su alrededor abundantes proteínas (4) que forman puentes entre las microvellosidades. 88 000 X.

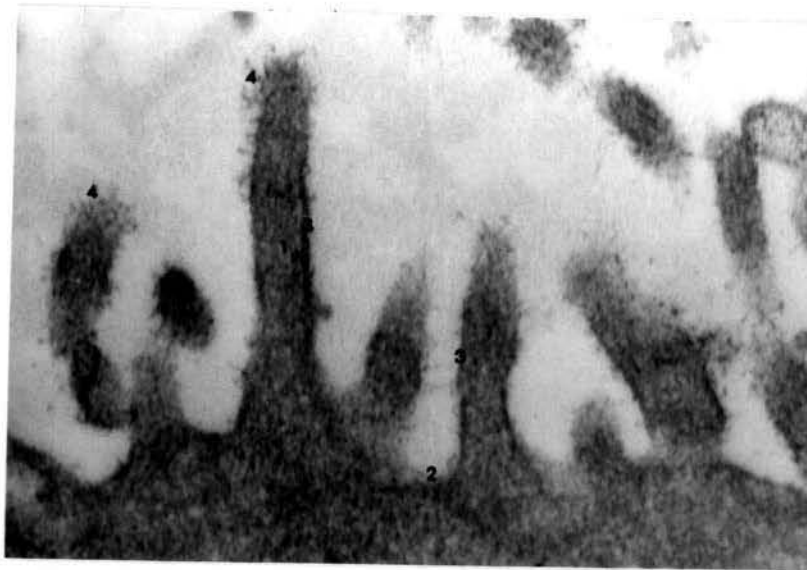


Figura 10. Micrografía electrónica de la superficie apical de epitelio uterino de una rata en estro, expuesto al medio Tx con 0.025 % de Tritón X-100, en la que se observan la membrana plasmática (3) de las microvellosidades (1) y de la superficie lisa (2) normal, y una menor cantidad de proteínas (4) unidas a las microvellosidades, que en menor proporción las ponen en contacto, y algunas están libres. 88 000 X.



Figura 11. Micrografía electrónica de la superficie apical de epitelio uterino de una rata en estro, sometida a tratamiento con el medio Tx con 0.05 % de Tritón X-100, en la cual la membrana plasmática (3) conserva un aspecto normal en las microvellosidades (1) y en la superficie lisa (2), sin embargo las proteínas (4) se han desprendido de la membrana en una proporción mayor. 88 000 X.



Figura 12. Micrografía electrónica de la superficie apical de epitelio uterino de una rata en estro, expuesto al medio Tx con 0.1 % de Tritón X-100, en la que se observa que las microvellosidades (1) son más delgadas, la membrana plasmática (3) de éstas y de la superficie lisa (2) es más delgada, las proteínas (4) son muy escasas y en el citoplasma hay ribosomas dispersos (5). 88 000 X.

estradiol se hallan incrementados. Como un control, se obtuvieron extractos citosólicos del epitelio uterino de ratas en estro, mediante la técnica de Fagg (1979), y se analizaron para determinar el receptor de estrógenos, Los resultados obtenidos fueron analizados utilizando la Hoja de cálculo Microsoft Excel for Windows<sup>®</sup>, obteniendo una  $K$  de 3.13 nM y una  $U_{max}$  de 14.7 fmoles unidos/mg de proteína, y se observan en la figura 13.

Una vez que se determinaron las constantes cinéticas del receptor citosólico de estrógenos, se realizaron ensayos para tratar de identificar al receptor en los extractos Tx. Como la concentración de proteínas en los extractos Tx de ratas en estro era muy baja (cerca de 200  $\mu$ g/ml), fue necesario unirlos y liofilizarlos, y después, redissolverlos en el medio A, a la concentración de 1.0 mg/ml, para realizar los experimentos como se describió en la metodología, encontrando que en estas condiciones, no se logró identificar al receptor en los extractos (figura 14), por lo cual se practicó en los extractos Tx, antes de la liofilización, una diálisis durante 72 h, para evitar la probable interferencia de los componentes del medio Tx. Con el material obtenido se realizaron ensayos, y al término de la incubación se adicionó una solución acuosa de Tritón X-100 para llevarlo a una concentración final de 0.05 %, para solubilizar las proteínas, a causa de que no pudieron disolverse sino hasta la adición del detergente. Se continuó el procedimiento para cuantificar la actividad del receptor de estrógenos, ensayos que también dieron resultados negativos, ya que tampoco se logró encontrar la actividad del receptor (figura 15).

De acuerdo a la hipótesis, se pensó que probablemente en estro no estaba presente el receptor, y que en el día cinco de la gestación sí se encontraba presente, por lo que se intentó determinar su presencia en los extractos Tx del



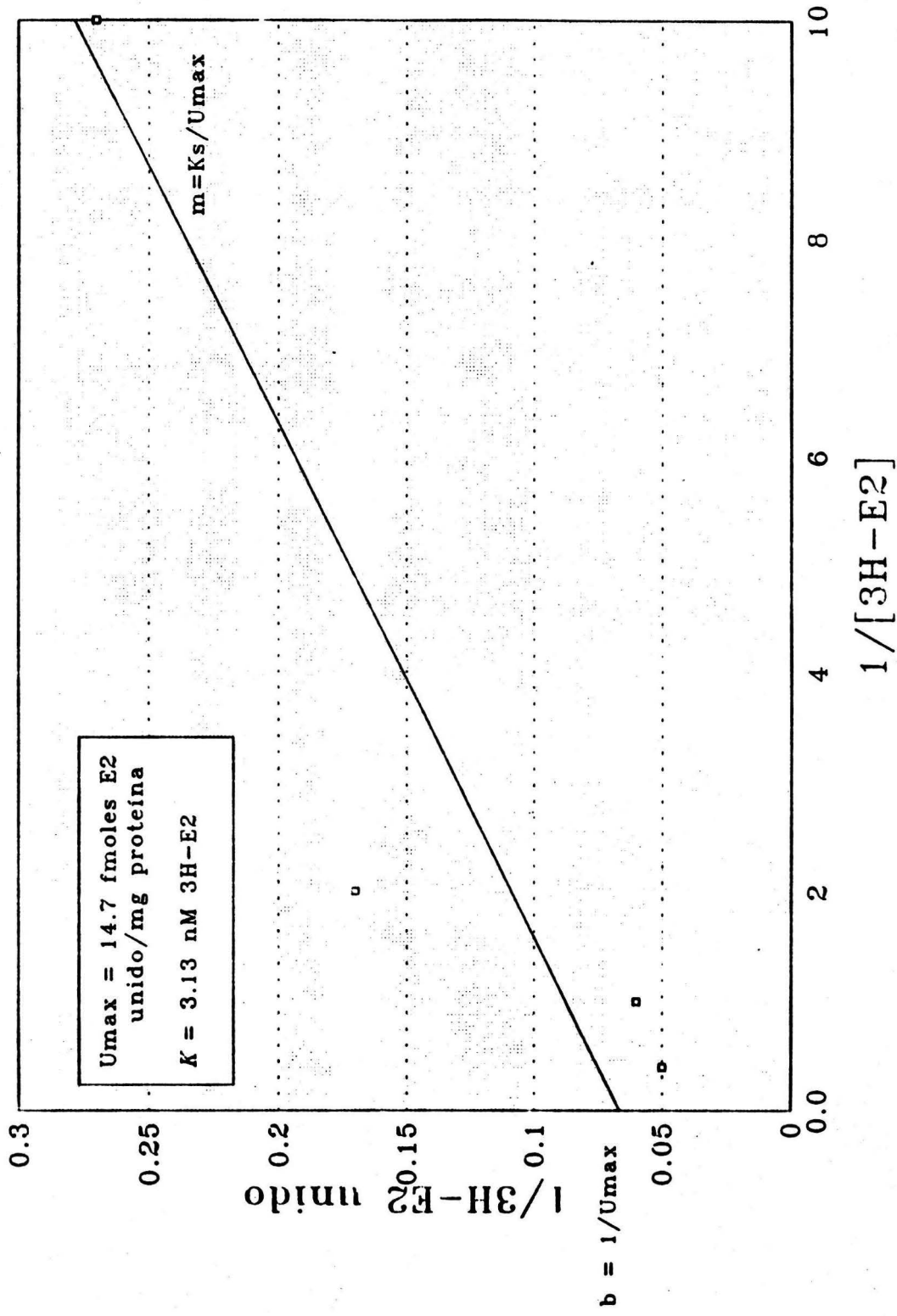


FIGURA 13. Características del receptor citoplásmico de estrógenos. Promedio de tres experimentos por duplicado.

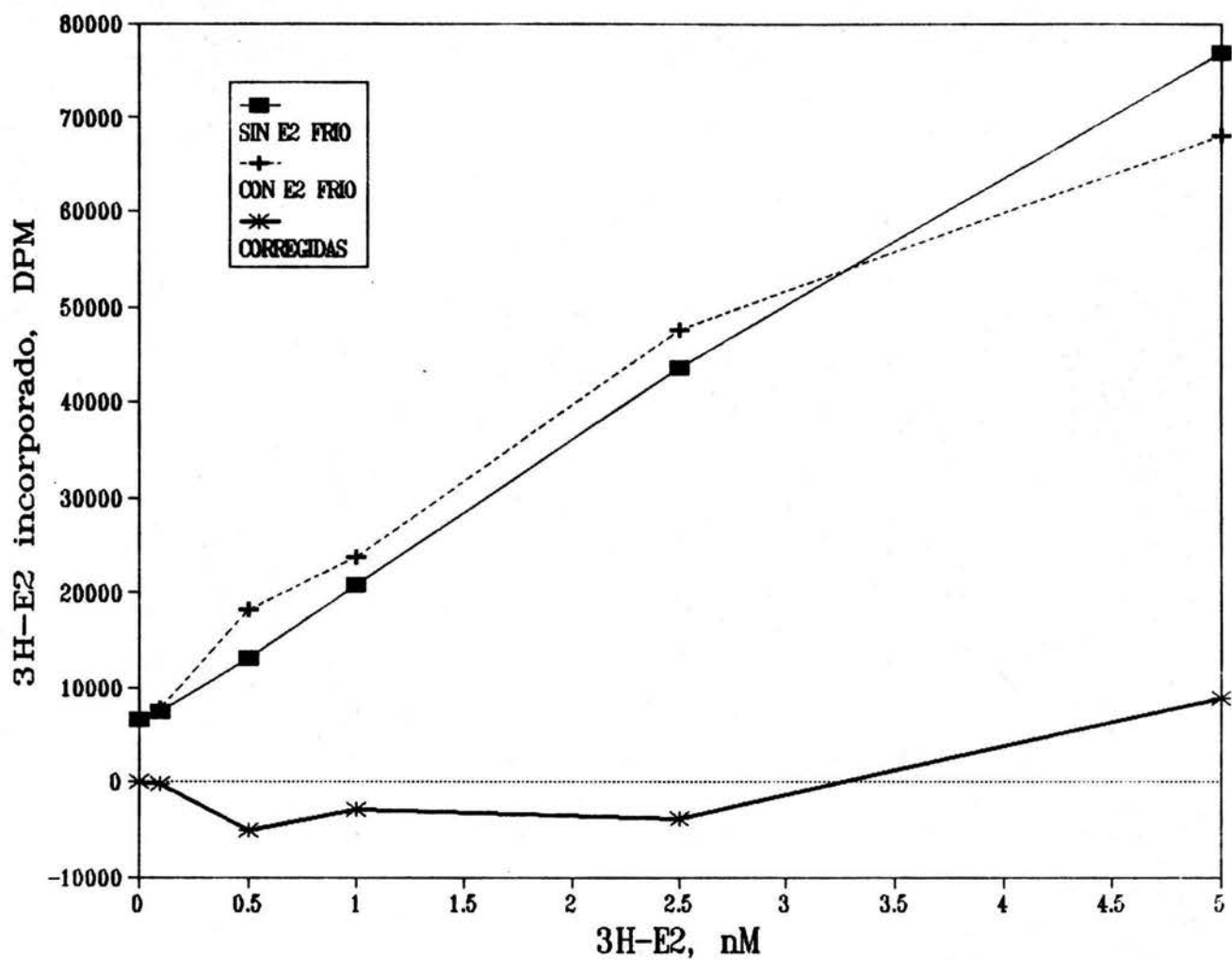


FIGURA 14. Representación gráfica de un ensayo del receptor a estógenos en el extracto Tx de epitelio uterino de ratas en estro, en presencia de Tritón X-100. La unión específica de  $E_2$ - $^3H$  fue muy baja e incluso negativa en algunos puntos de la curva.

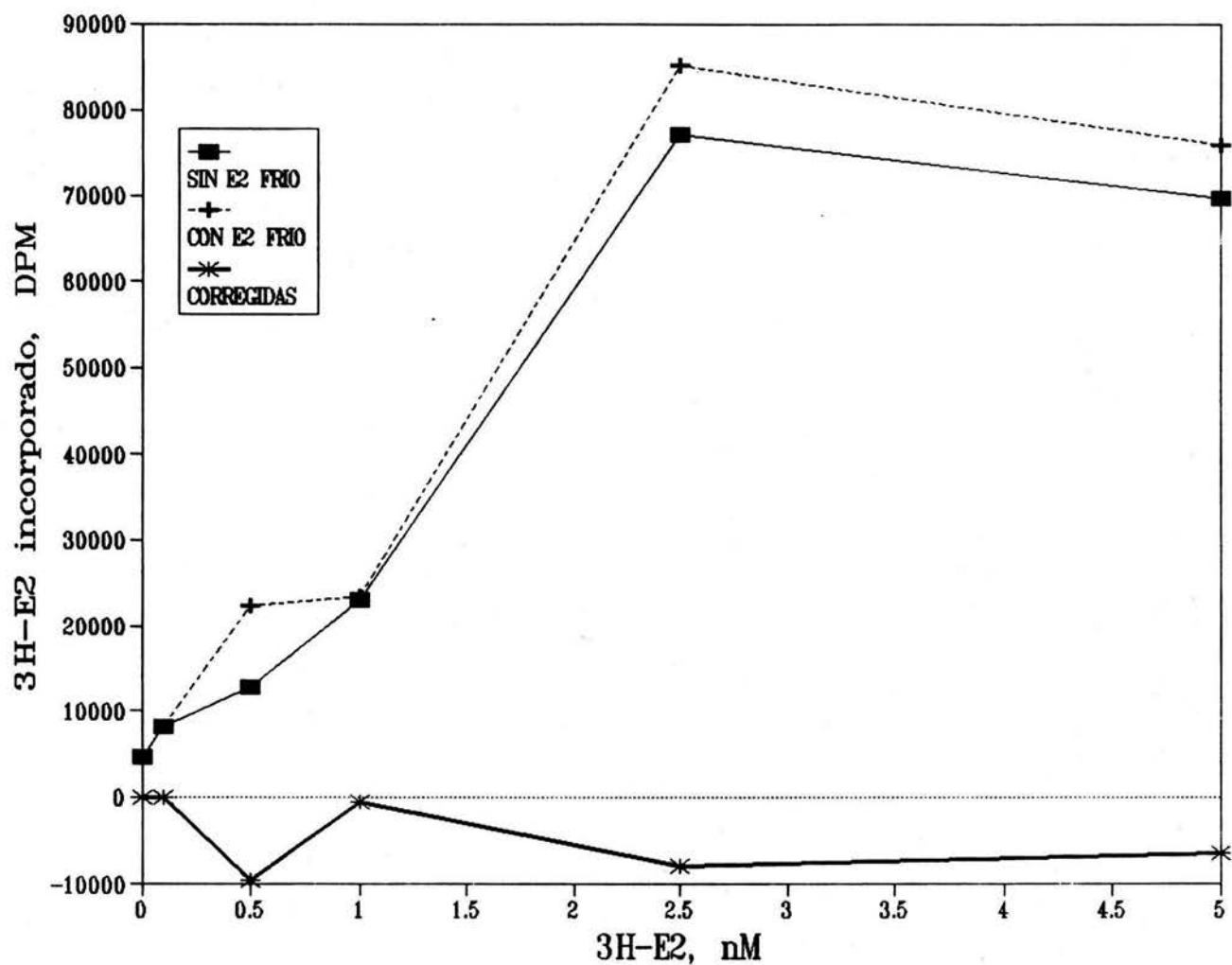


FIGURA 15. Representación gráfica de un ensayo del receptor a estrógenos en el extracto Tx de epitelio uterino de ratas en estro en ausencia de Tritón X-100. La unión específica de E<sub>2</sub>-<sup>3</sup>H fue muy baja e incluso negativa en algunos puntos de la curva.

útero de ratas en ese día, de la siguiente manera: se incubaron las proteínas del extracto Tx después de la diálisis y la liofilización, de la manera descrita, y se centrifugó a 10,000 rpm durante 10 min, para precipitar la proteína insoluble, que se lavó mediante una centrifugación y se resuspendió con una solución acuosa de Tritón X-100, a una concentración final del detergente de 0.05 %. Se obtuvieron mediante este esquema tres fracciones: un primer sobrenadante, un segundo sobrenadante y un precipitado, el cual se resuspendió, y en las tres se determinaron las emisiones radioactivas, observándose que no se encontró al receptor en ninguna de las tres fracciones (figuras 16, 17 y 18). A los sobrantes de las tres fracciones se les adicionaron 100  $\mu$ l del reactivo de Bradford, para detectar la presencia de proteínas, las cuales se detectaron en el primer sobrenadante y en el precipitado.

**Distribución histoquímica de los sitios de unión a estrógenos.** En los cortes histológicos del útero de rata incubados con EAF, se observó que durante el proestro (la fase anterior al estro), el estroma era mucho más rico en sitios de unión a estrógenos que el epitelio (figura 19); en el estro (fase del ciclo sexual de la rata en el cual es mucho más probable que ocurra la ovulación) el patrón fluorescente, que indica la distribución de los sitios de unión a estrógenos, fué notablemente mayor en el epitelio que en el estroma, si bien en este se observan "puntos" de mayor intensidad fluorescente que el resto del tejido (figura 20); en el metaestro (posterior al estro) se observa que el epitelio es menos afín que el estroma por el EAF, mientras que la afinidad de ésta capa celular es menor que en proestro y estro (figura 21); en el diestro (después de metaestro y antes de proestro), se observó una escasa interacción del EAF con las células epiteliales y estromales (figura 22), lo que indujo a pensar en la existencia de una cantidad mínima, o incluso ausencia, de los sitios de unión a estrógenos.

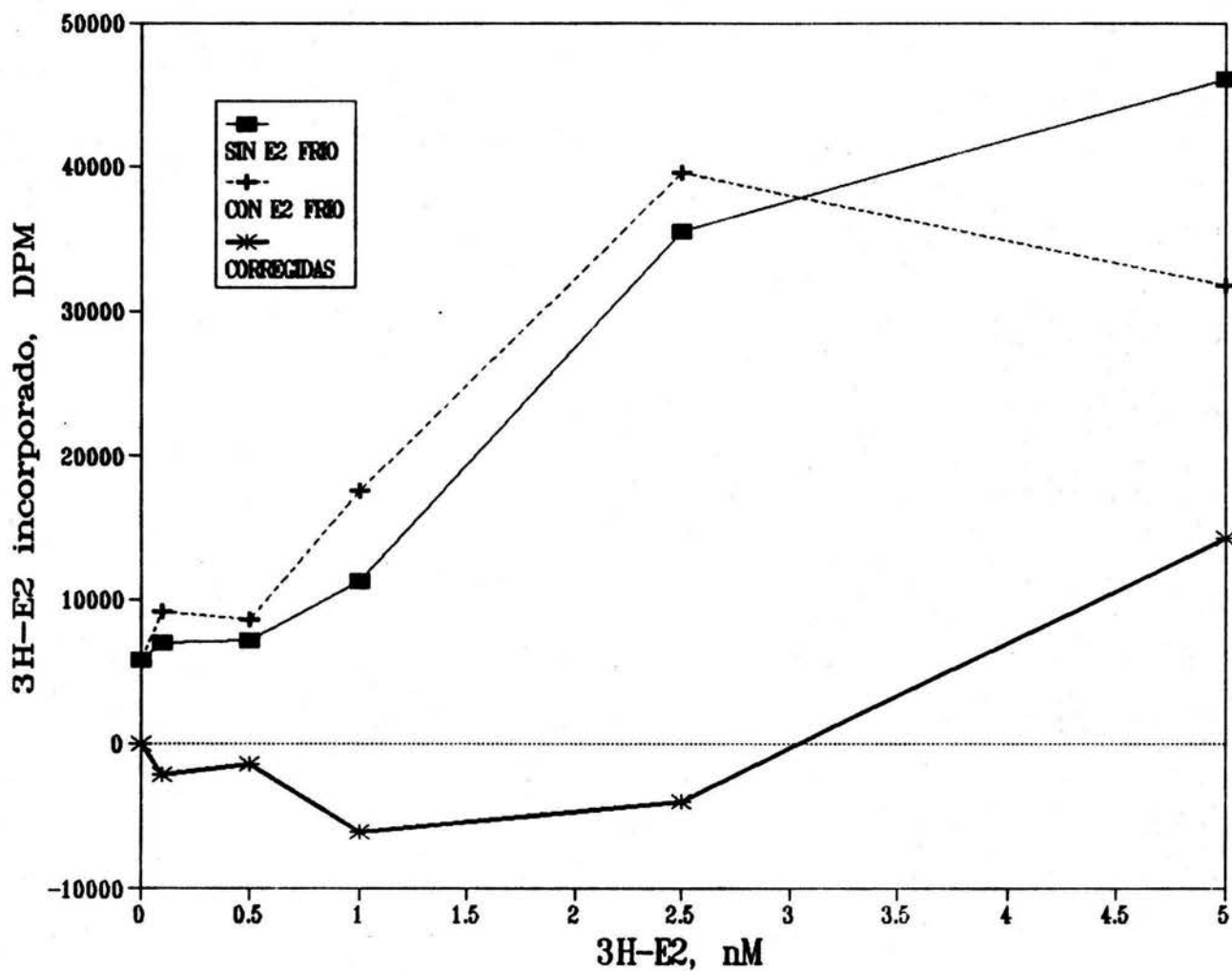


FIGURA 16. Representación gráfica de los resultados obtenidos de un ensayo del receptor a estrógenos en el extracto Tx de epitelio uterino de ratas en día cinco de gestación, en el primer sobrenadante. La unión específica de  $E_2$ - $^3H$  fue muy baja e incluso negativa en algunos puntos de la curva.

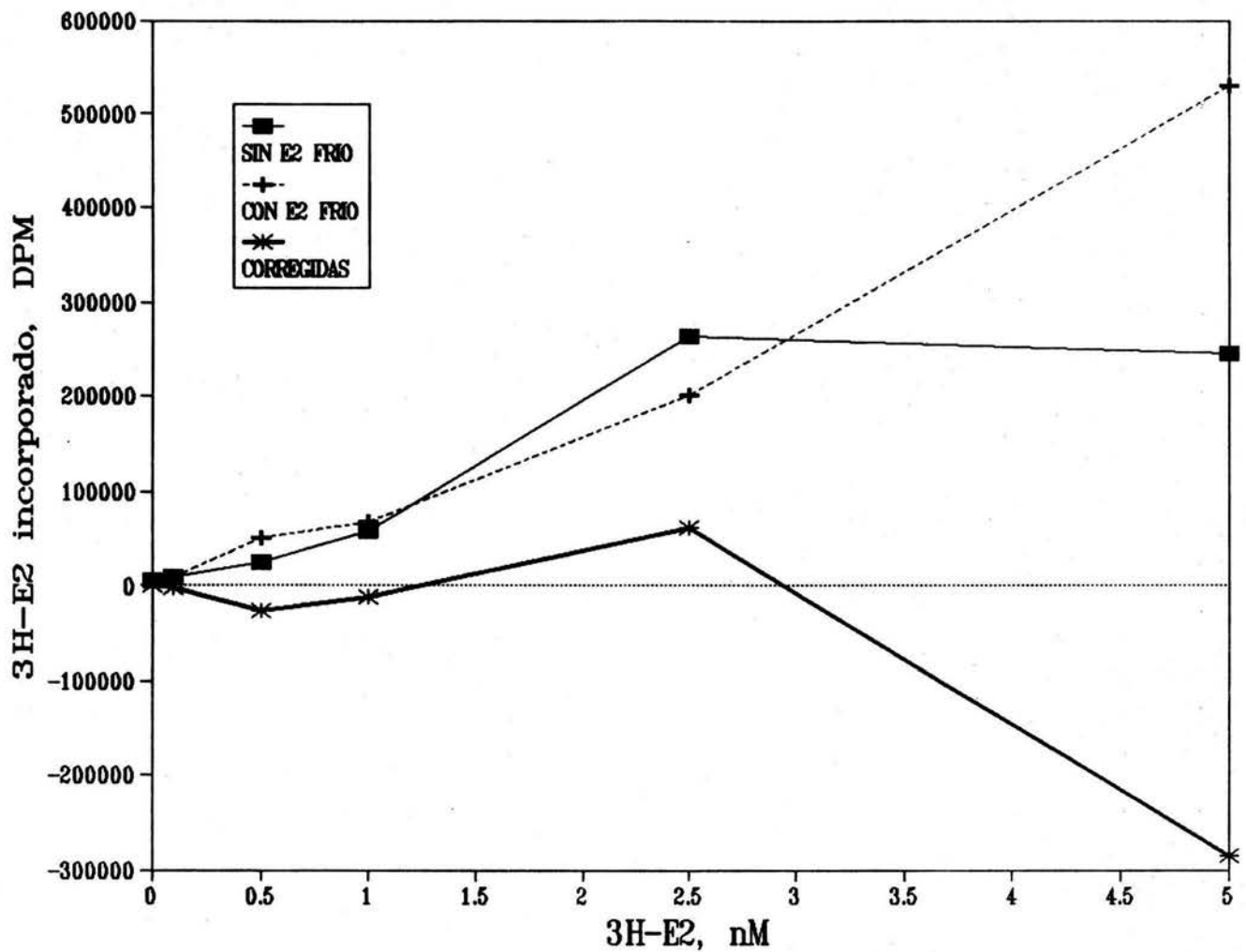


FIGURA 17. Representación gráfica de los resultados obtenidos en un ensayo del receptor a estrógenos en el extracto Tx de ratas en día cinco de gestación, en el segundo sobrenadante. La unión específica de E<sub>2</sub>-<sup>3</sup>H fue muy baja e incluso negativa en algunos puntos de la curva.

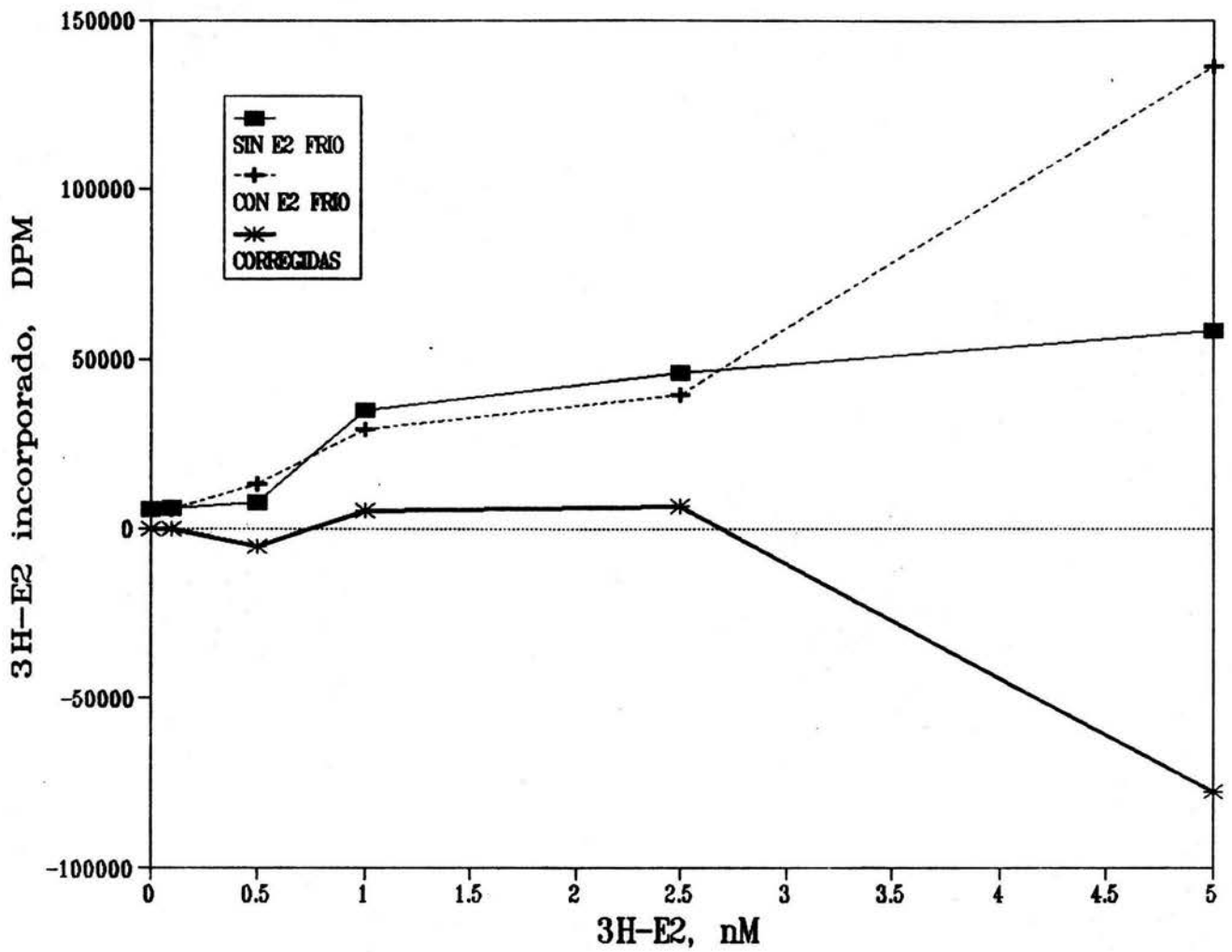


FIGURA 18. Representación gráfica de los resultados obtenidos en un ensayo del receptor a estrógenos en el extracto Tx de ratas en día cinco de preñez, en el precipitado. La unión específica de E<sub>2</sub>-<sup>3</sup>H fue muy baja e incluso negativa en algunos puntos de la curva.



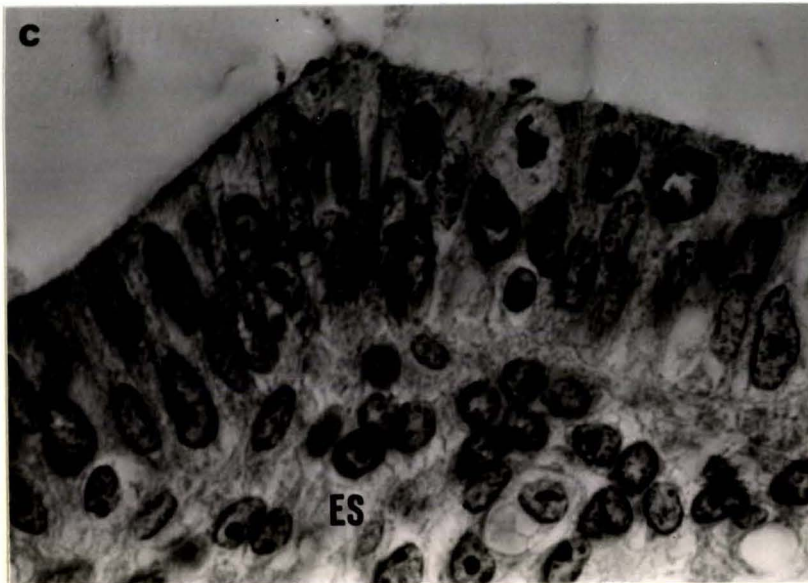
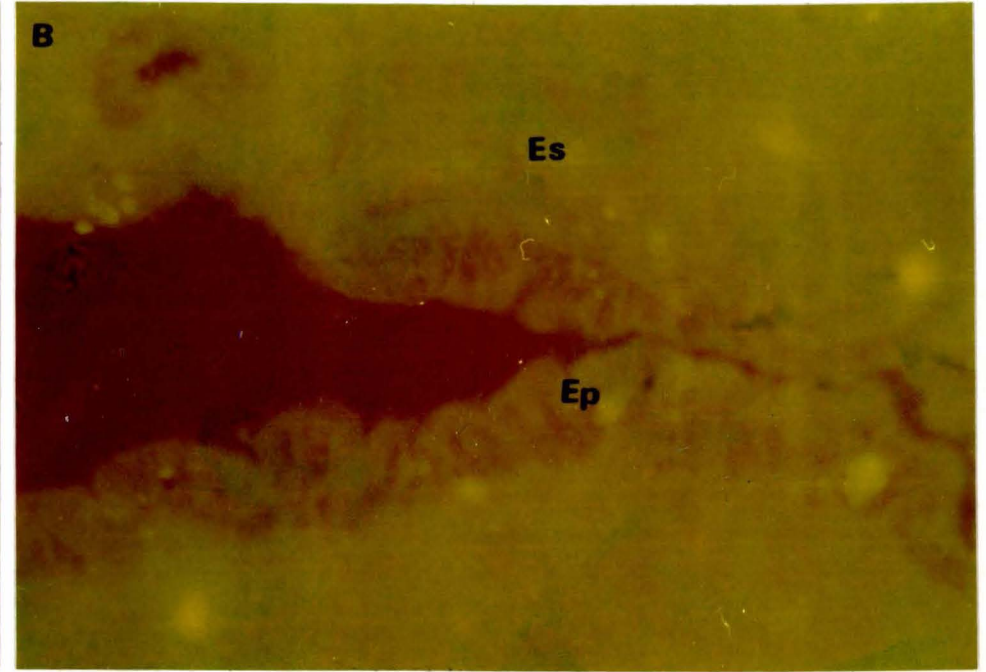
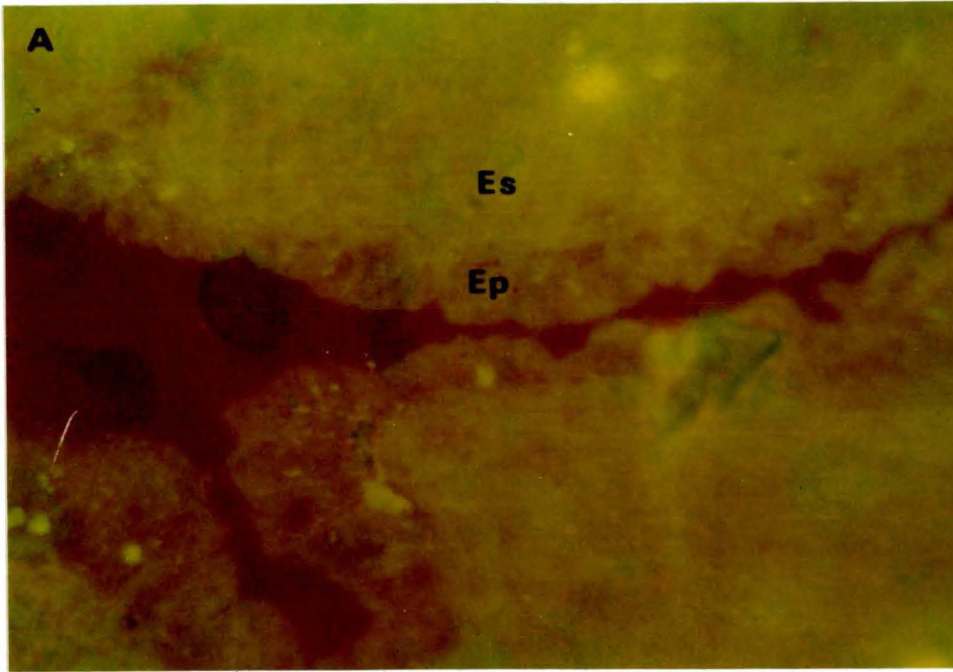


FIGURA 19. Visualización epifluorescente de los sitios de unión a estrógenos en cortes histológicos del estroma y el epitelio uterinos de ratas en proestro. A, corte incubado con AF; B, corte incubado con EAF; C, corte teñido con H-E. Ep, epitelio; Es, estroma. A y B 500 X; C, 1435 X.



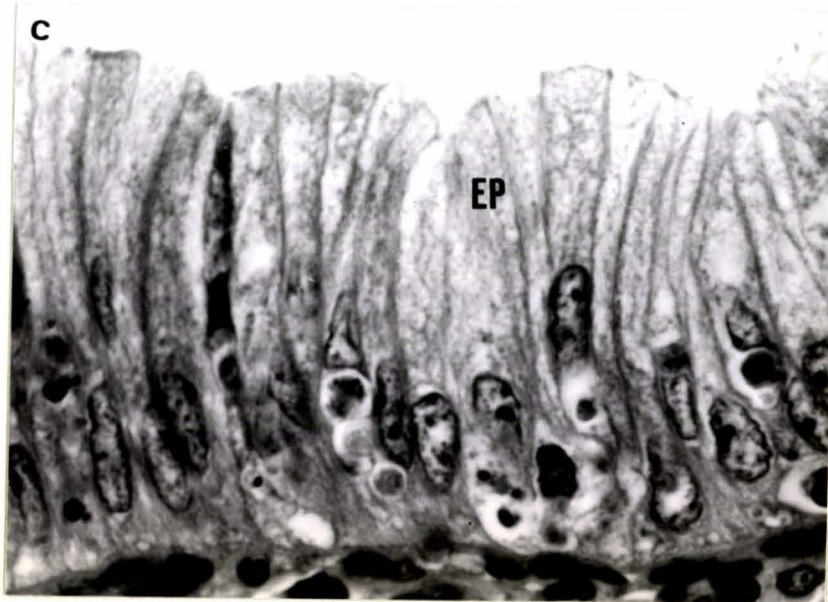
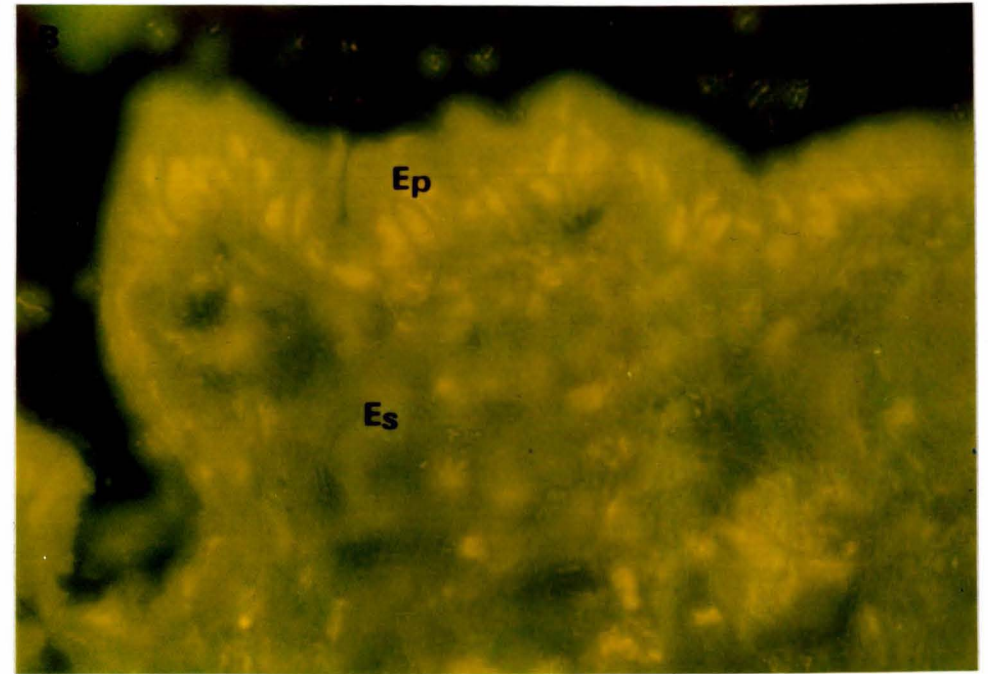
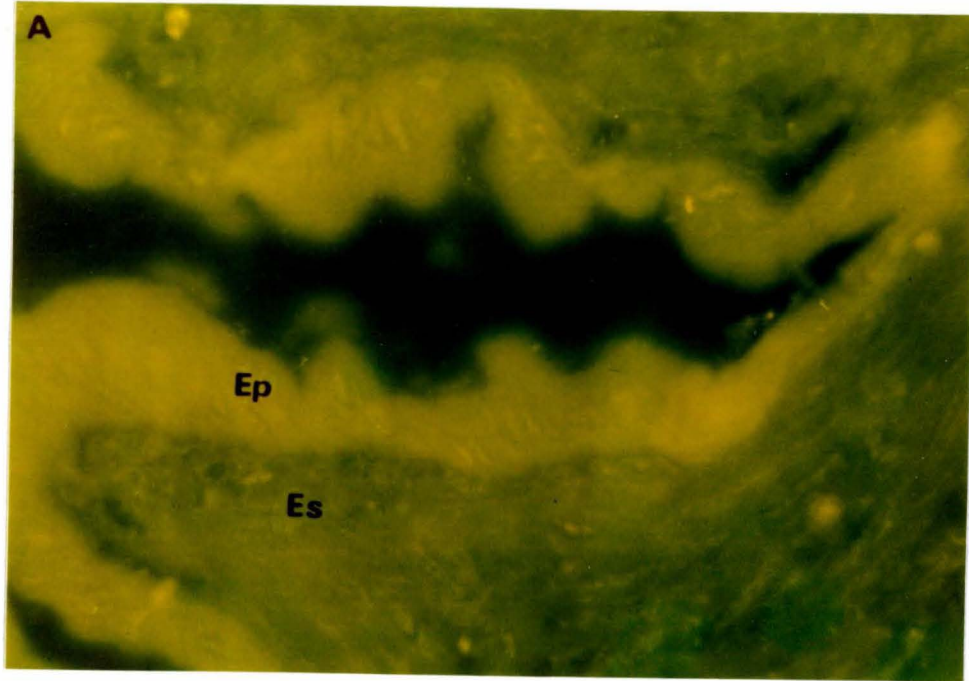


FIGURA 20. Visualización epifluorescente de los sitios de unión a estrógenos en cortes histológicos del estroma y el epitelio uterinos de rata en estro. A, corte incubado con AF; B, corte incubado con EAF; C, corte teñido con H-E. Ep, epitelio; Es, estroma. A y B 500 X; C, 1435 X.

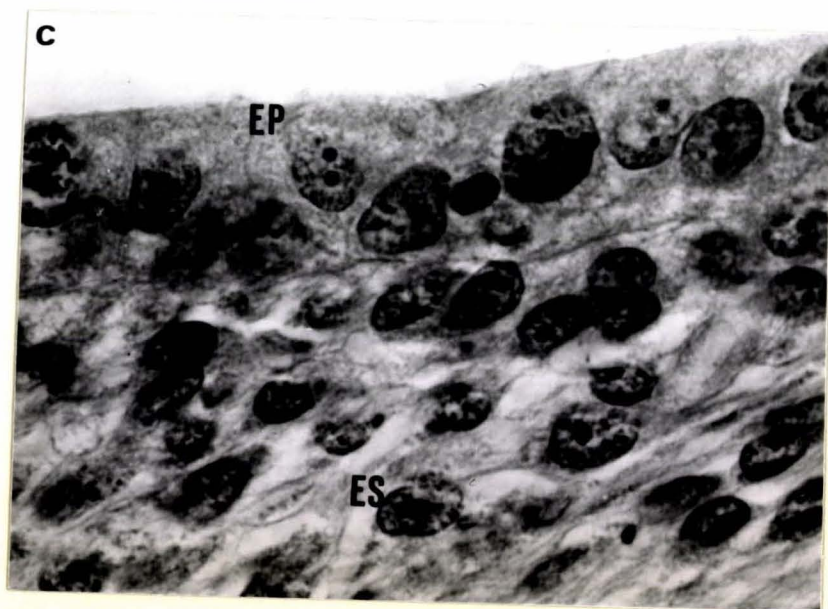
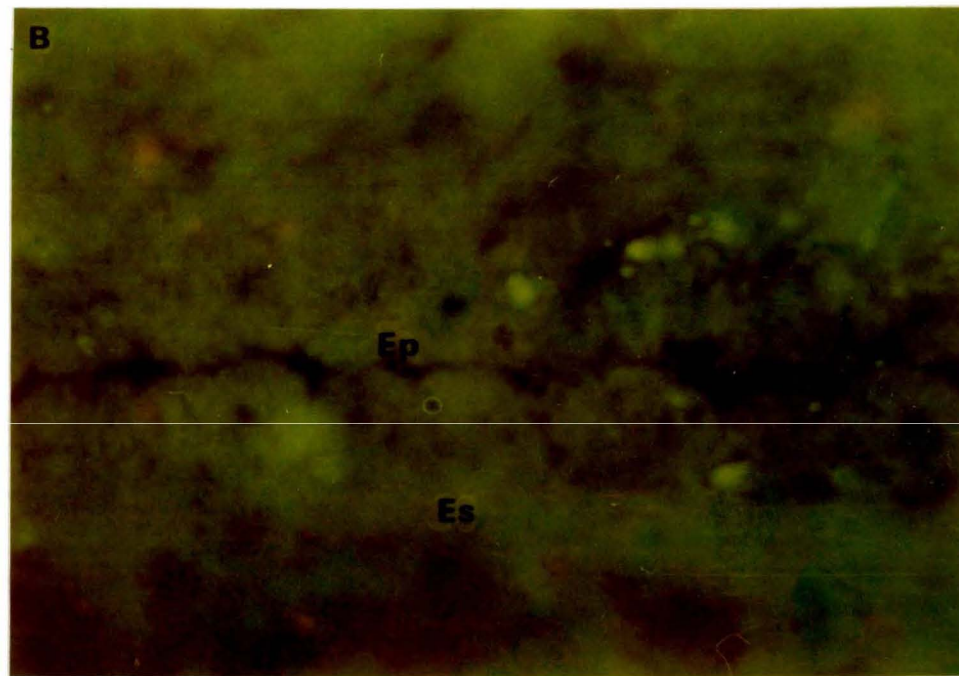
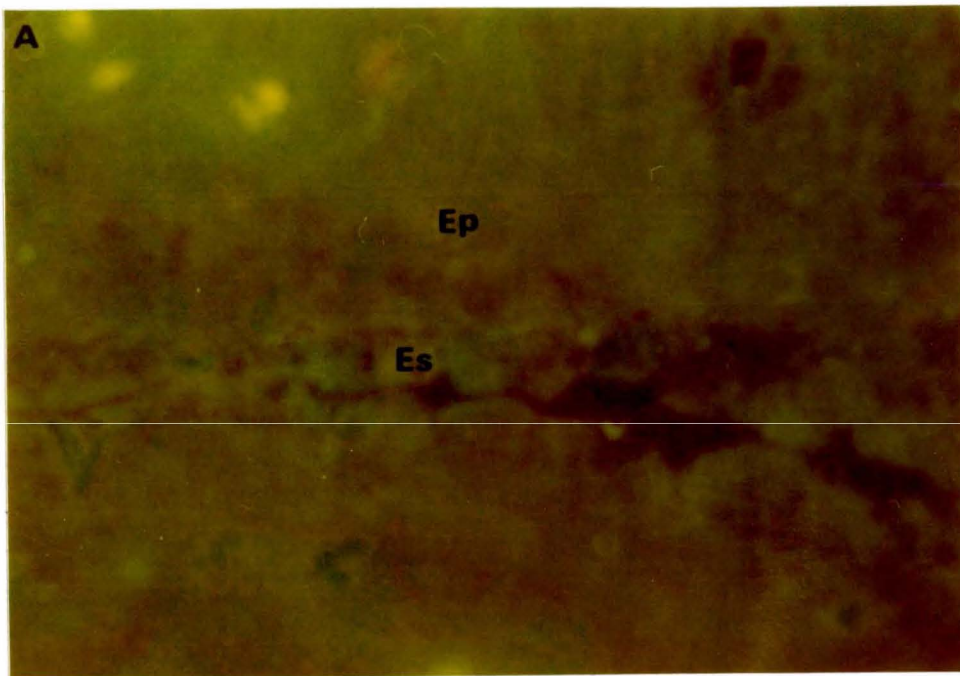


FIGURA 21. Visualización epifluorescente de los sitios de unión a estrógenos en cortes histológicos del estroma y el epitelio uterinos de rata en metaestro. A, corte incubado con AF; B, corte incubado con EAF; C, corte teñido con H-E. Ep, epitelio; Es, estroma. A y B 500 X; C, 1435 X.



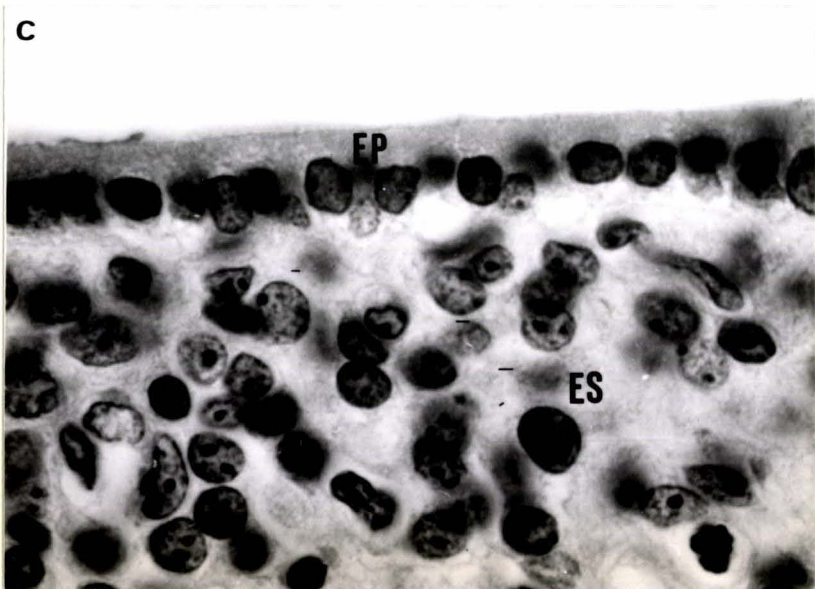
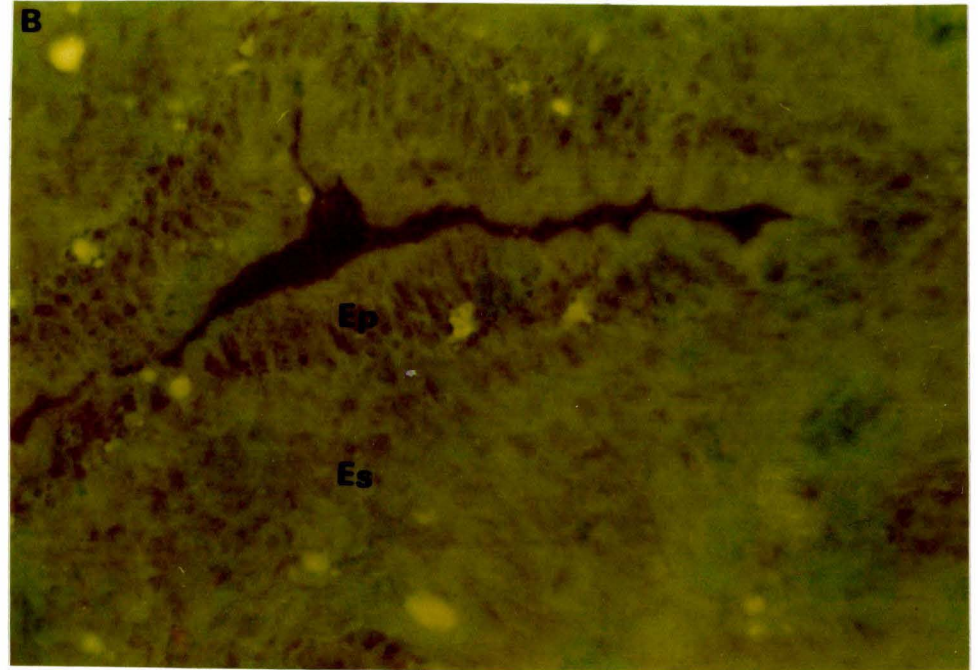
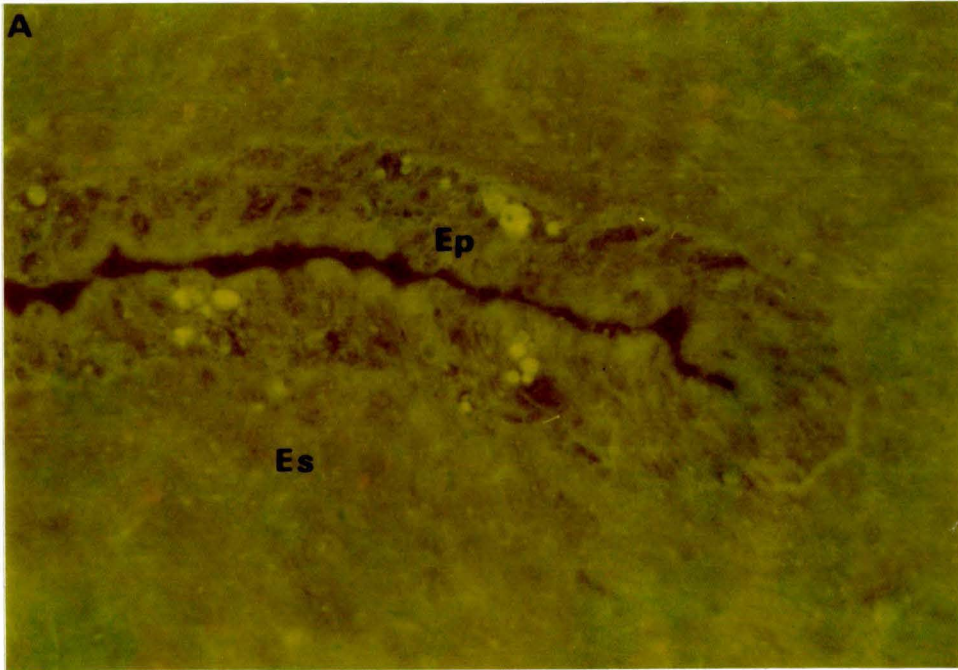


FIGURA 22. Visualización epifluorescente de los sitios de unión a estrógenos en estroma y epitelio uterinos de rata en diestro. A, corte incubado con AF; B, corte incubado con EAF; C, corte teñido con H-E. Ep, epitelio; Es, estroma. A y B 500 X; C, 1435 X.

De las muestras provenientes de ratas con cinco días de gestación, en los cortes, tanto de las zonas de implantación como de regiones interzonas, que se incubaron con el EAF, la reacción fue negativa en el epitelio y en el estroma (figuras 23 y 24).

De la coincubación de los cortes histológicos del útero de ratas en estro con EAF y los análogos esteroidales y no esteroidales, se observó que con el Tam, el DES y el  $\beta E_2$  hubo una disminución en la intensidad de la fluorescencia, en orden decreciente (figura 25 e,f,g); en contraste, en las preparaciones incubadas con el  $\alpha E_2$  y la  $P_4$ , que no compiten con el reactivo fluorescente por los sitios de unión, la intensidad luminosa de la reacción fué alta (figura 25 c,d) y similar a la observada en los cortes de útero de ratas en estro, incubados sólo con el EAF (figura 25 a).



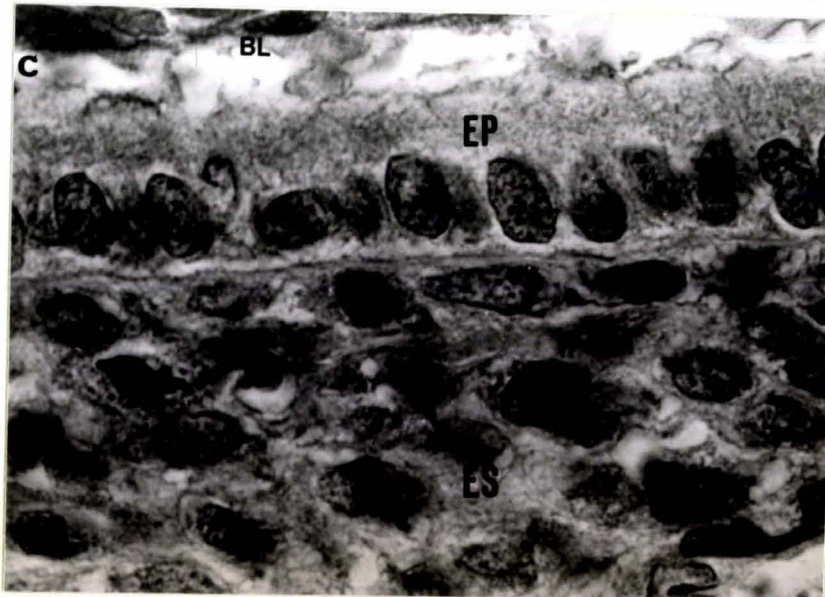
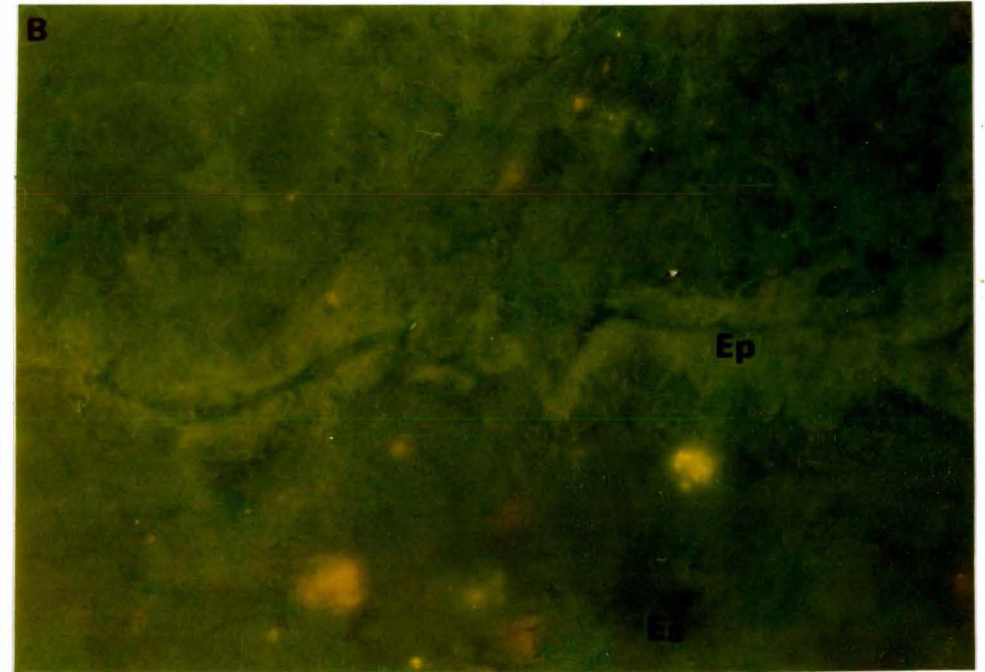
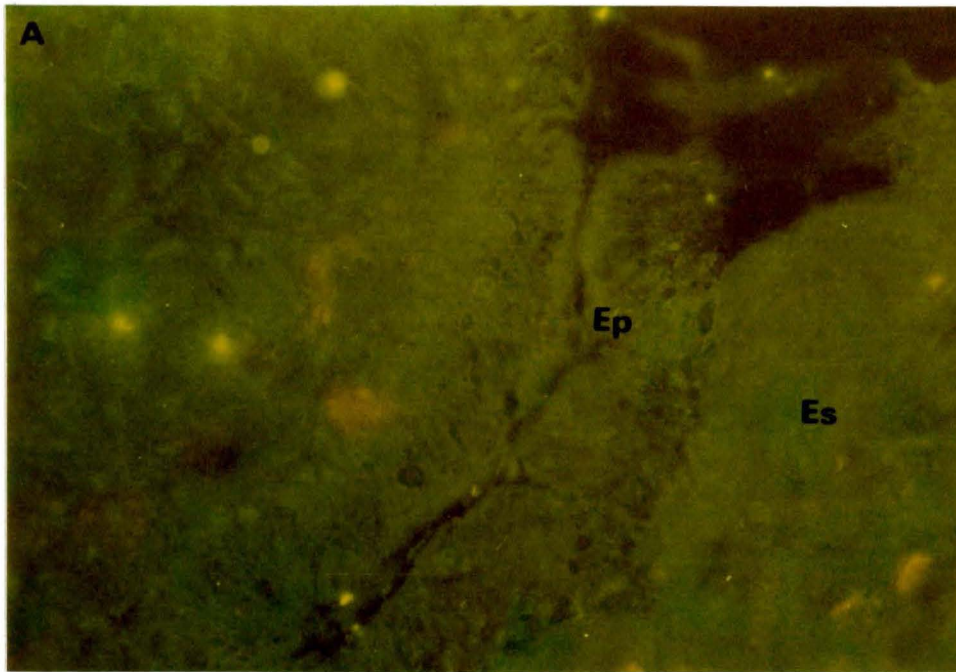


FIGURA 23. Visualización epifluorescente de los sitios de unión a estrógenos en cortes histológicos del estroma y el epitelio uterinos de la zona de implantación. A, corte incubado con AF; B, corte incubado con EAF; C, corte teñido con H-E. Ep, epitelio; Es, estroma. BL, blastocisto. A y B 500 X; C, 1435 X.

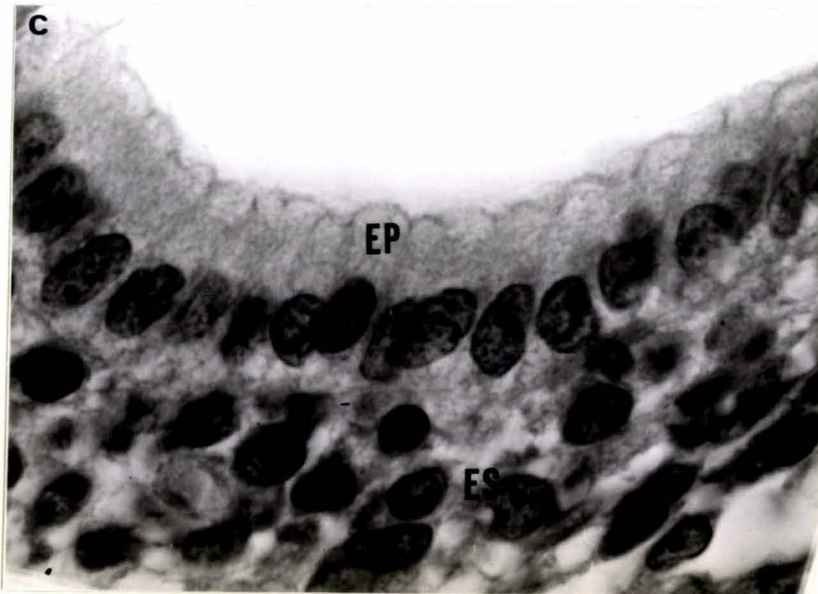
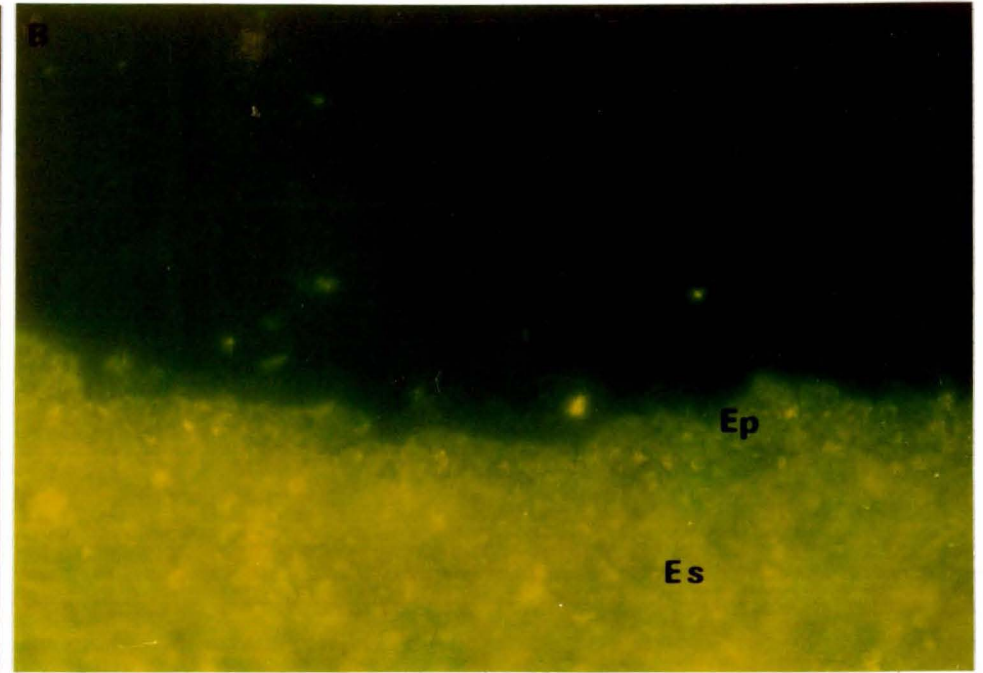
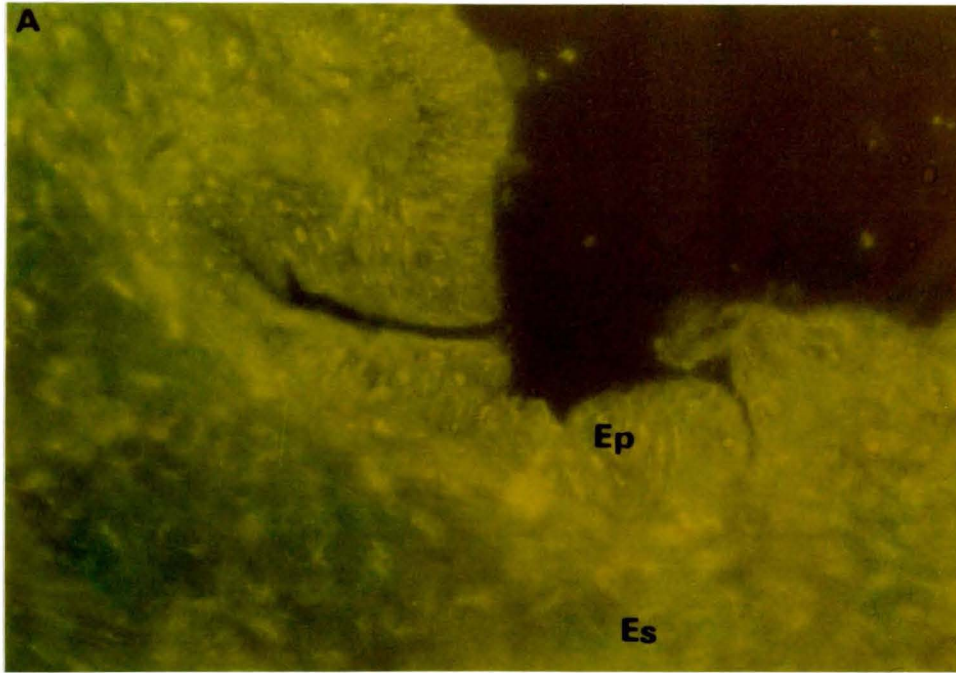
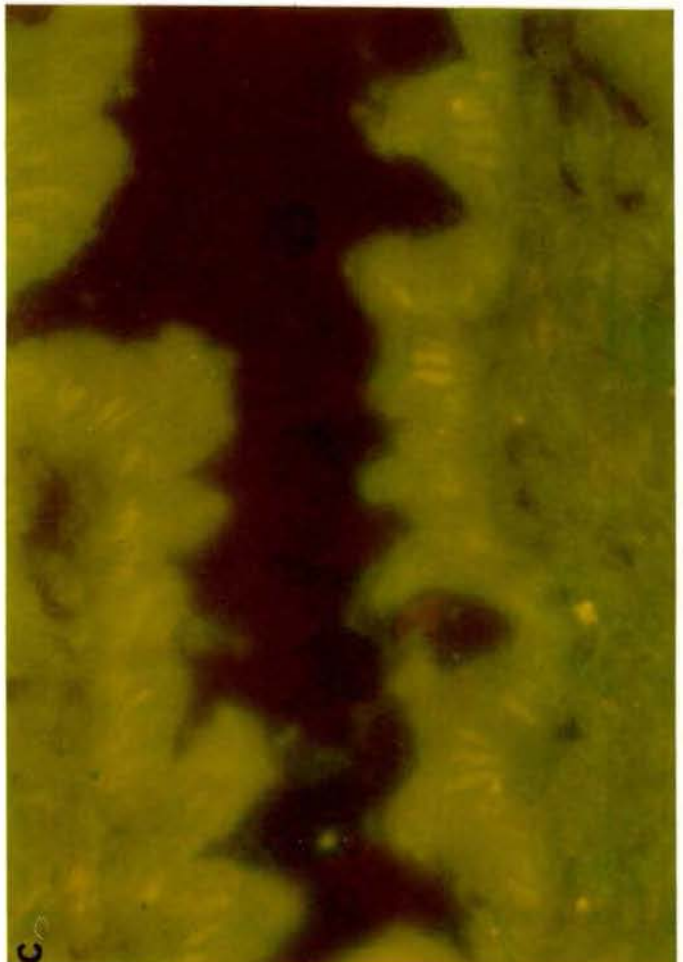
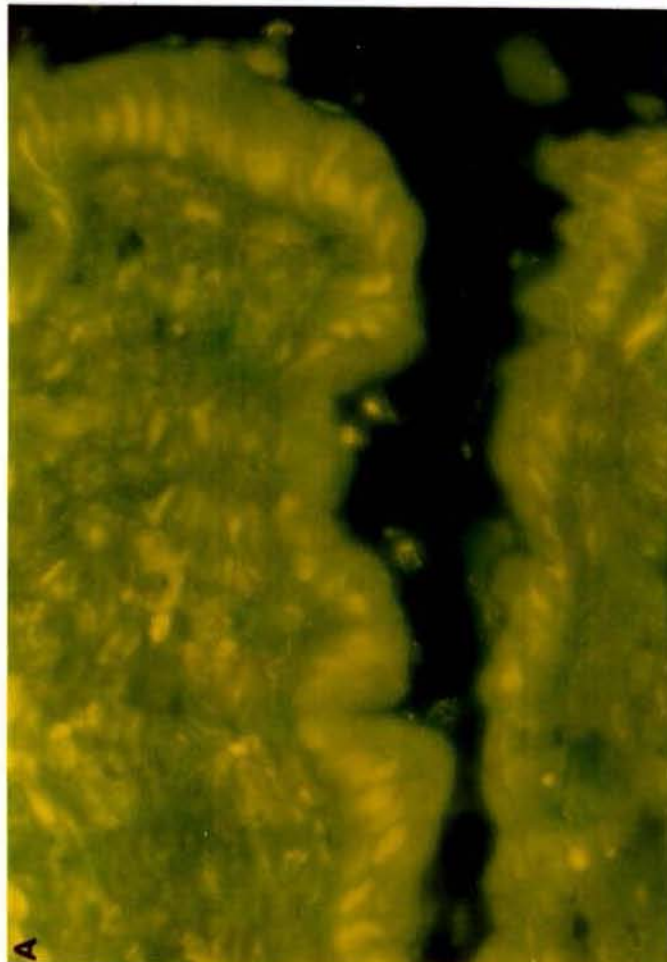
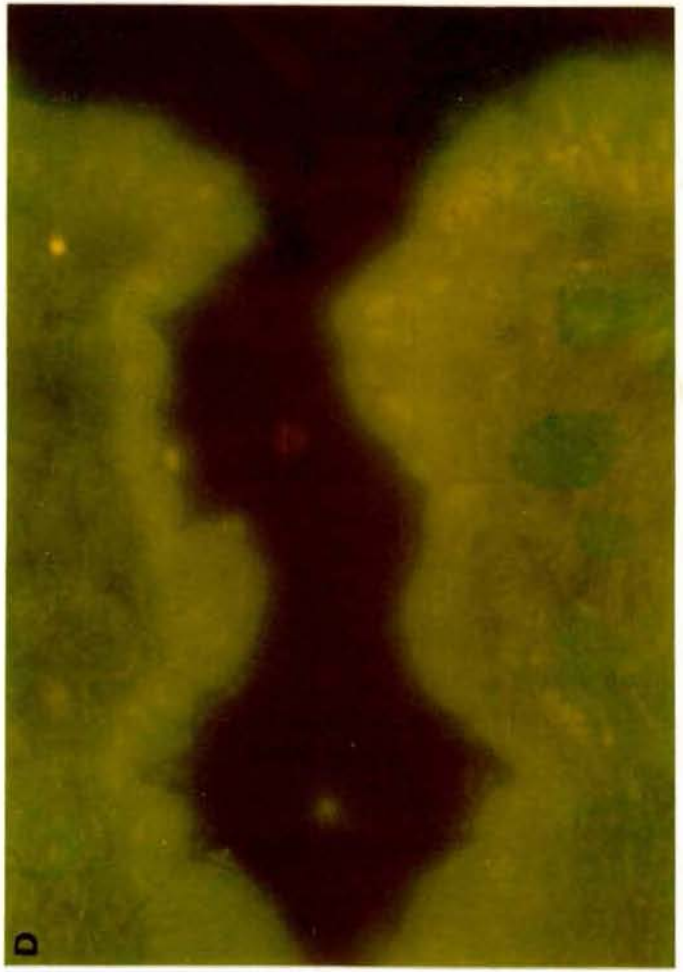
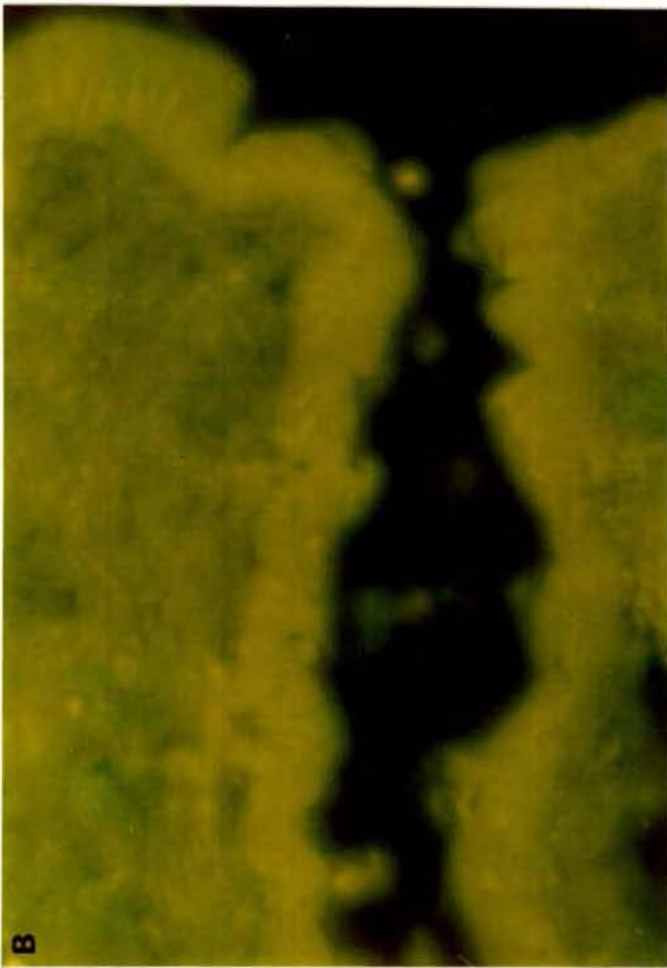
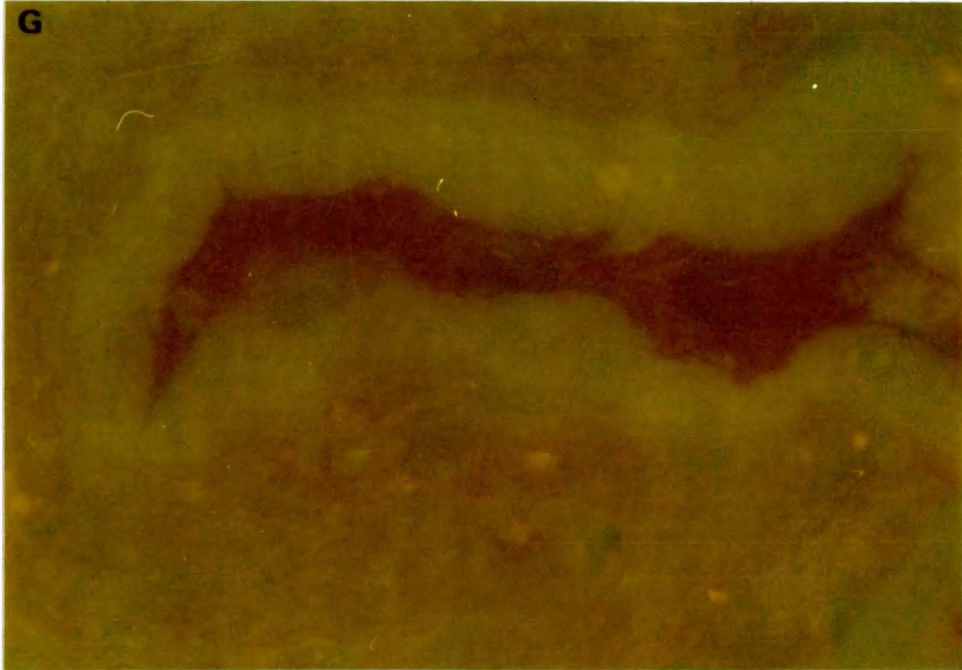
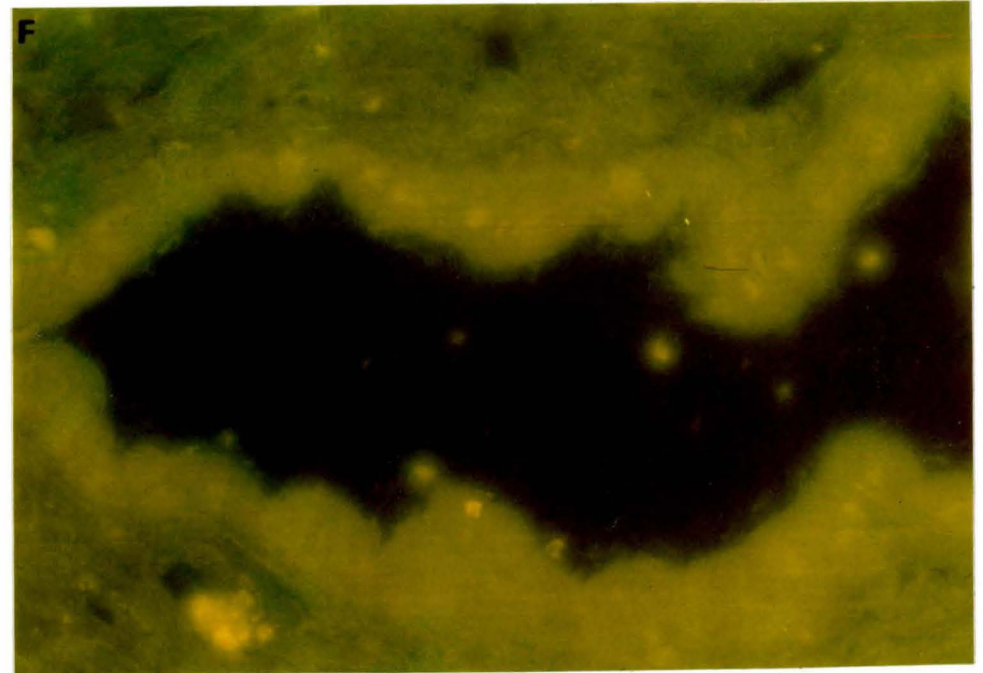
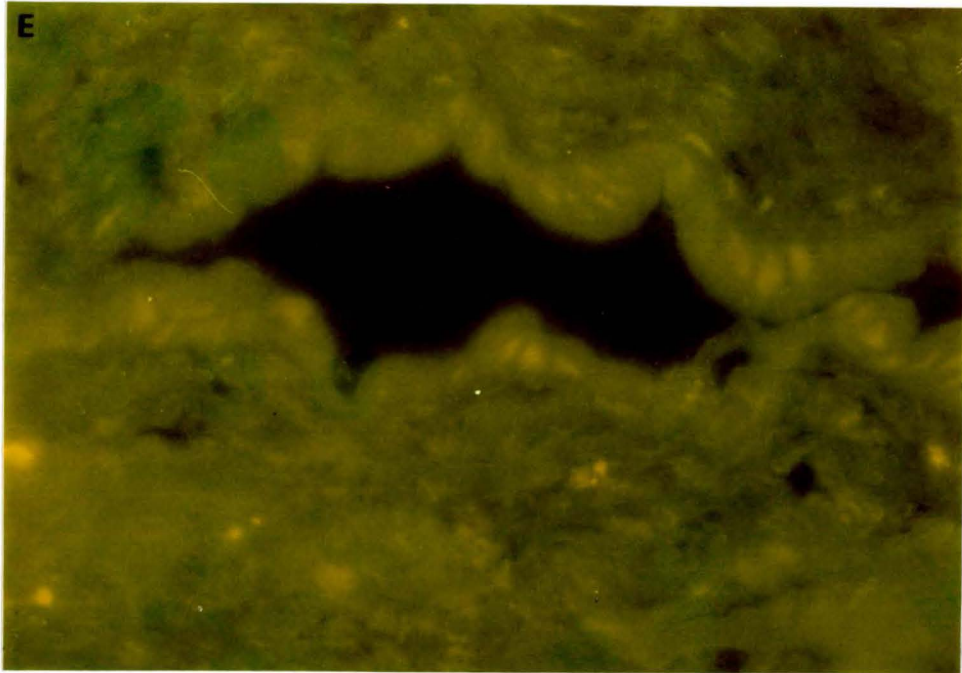


FIGURA 24. Visualización epifluorescente de los sitios de unión a estrógenos en cortes histológicos del estroma y el epitelio uterinos de la región interzona. A, corte incubado con AF; B, corte incubado con EAF; C, corte teñido con H-E. Ep, epitelio; Es, estroma.







**FIGURA 25.** Resultado del ensayo histoquímico realizado en presencia de análogos esteroidales y no esteroidales los sitios de unión a estrógenos en el estroma y el epitelio uterinos de rata en estro. 500 X. A-D, página anterior; E-G, esta página.

- A: Incubación con EAF.
- B: Incubación con AF.
- C: Incubación con EAF +  $\alpha$ -E<sub>2</sub>;
- D: Incubación con EAF + P<sub>4</sub>;
- E: Incubación con EAF +  $\beta$ -E<sub>2</sub>;
- F: Incubación con EAF + DES;
- G: Incubación con EAF + Tam.



## DISCUSION

El primer objetivo del presente trabajo fue implementar un método para obtener proteínas de membrana apical del epitelio uterino de la rata. Para este fin, se empleó la técnica de Anderson y cols (1986), modificada por Hoffman y cols, (1990), que consiste en la incubación intraluminal con medio TX, el cual lleva al detergente no iónico Tritón X-100, a una concentración de 0.1 % durante 10 minutos.

La incubación en este estudio se redujo a 10 minutos, y el detergente se utilizó a cuatro distintas concentraciones: 0.025, 0.5, 0.1 y 0.2 %, además del medio sin detergente como control. El grado de liberación de proteínas se determinó por dos estrategias. En la primera de ellas, la bioquímica, se determinaron la cantidad de proteínas totales, la actividad de LDH como marcadora de la presencia de proteínas citosólicas (Bucher y cols, 1963) y la actividad de 5'N, como marcadora de la presencia de proteínas membranales (Aronson y Touster, 1973, Touster y cols, 1970). Por la segunda, ultraestructural, por microscopía electrónica de transmisión se detectó la cantidad de material electrodensito liberado, puesto que Anderson y cols (1986) comunicaron que, al desprenderse las proteínas de la membrana, disminuyó la afinidad del plasmalema por el citrato de plomo y el acetato de uranilo, por lo que se observó un contraste muy tenue.

Se demostró, tanto por las pruebas bioquímicas como por la ultraestructural, que la concentración óptima de detergente en el medio TX para la liberación de proteínas membranales del epitelio uterino de la rata fue la de 0.05 %, con la cual se obtuvo una actividad de 5'N relativamente alta, lo que significa que efectivamente se extrajeron proteínas membranales, y en cambio, la actividad de

LDH fue relativamente baja; mientras que a concentraciones mayores de detergente, la cantidad de proteínas membranales fue muy baja y las proteínas citosólicas fueron altas, similares a la de los extractos epiteliales. A concentraciones menores o en ausencia del detergente, la relación entre las proteínas membranales y citosólicas fue mas alta, sin embargo, la cantidad total de proteínas fue muy baja. Con respecto al estudio ultraestructural, la concentración de 0.025 % de detergente solo causó liberación de las proteínas del glicocálix, que se encontraron desprendidas de las membranas, la de 0.05 % tuvo una liberación mayor de las proteínas, que se localizaron entre las microvellosidades, y con la de 0.1 % además del desprendimiento de las proteínas membranales, también se observó una reducción del espesor de la bicapa de las microvellosidades y de las áreas lisas de la superficie apical del epitelio.

Estos resultados aparentemente son debidos a las propiedades intrínsecas del Tritón X-100, un detergente no iónico típico. Estos detergentes se unen a las proteínas integrales de membrana, formando arreglos micelares alrededor de los dominios hidrofóbicos de las proteínas (Tanner, 1979). A bajas concentraciones, estos detergentes se incorporan dentro a la bicapa fosfolipídica, y conforme se incrementa su concentración, la bicapa se satura y se forman micelas mixtas de detergente y fosfolípidos, que incluyen proteínas de membrana (Helenius y Simons, 1975). En el caso del epitelio uterino de la rata, es probable que las concentraciones de detergente de 0.1 y 0.2 % hayan provocado la ruptura de las membranas, lo que explicaría el que la cantidad de proteína total y la actividad relativa de la LDH sean similares a las cuantificadas en extractos epiteliales, y el que a la concentración de 0.1 % se produzca un adelgazamiento de la bicapa del epitelio, como el que se observa al microscopio electrónico de transmisión.

La concentración óptima de 0.05 % para la liberación de las proteínas membranales del útero de la rata es la mitad de la utilizada por Hoffman y cols, (1990), en la coneja (0.1 %). este resultado podría deberse a que se trata de dos especies distintas, ya que la rata es un roedor y la coneja un lagomorfo, lo que parece ser la principal razón para que existan diferencias entre la estructura, la cantidad, la composición o la distribución de las proteínas del epitelio uterino de ambas especies, siendo probable que también produzcan cambios debidos al tamaño y grosor de los cuernos y del epitelio uterinos. En apoyo a las diferencias específicas, se puede mencionar que, por ejemplo, en el ratón, especie más pequeña que la rata, pero filogenicamente muy cercana a ella, el lavado intrauterino con soluciones aparentemente inocuas como el PBS, la solución salina, o el Tris-glicina causa remoción del endometrio en su totalidad (Martin, 1984).

Una vez adaptado el método de obtención de proteínas del epitelio luminal uterino de rata, se procedió a cumplir el segundo objetivo, determinar las características del receptor membranal a estrógenos. Para esto, con el extracto Tx obtenido con una concentración de 0.05 % de detergente a partir de ratas en estro y en el día cinco de la gestación, se realizaron ensayos en varias condiciones para buscar al receptor. Como control, se tomó el citosol del epitelio uterino de ratas en estro, en el que el receptor tuvo una  $K$  de 3.13 nM y una  $U_{max}$  de 14.7 fmoles/mg de proteína, valores que son similares a los reportados en la literatura internacional (ver para revisión Clark y Markaverich, 1988). Desafortunadamente, no fue posible identificar en ninguna de las condiciones experimentales el receptor membranal a esteroides, que, de acuerdo a los antecedentes mencionados por el grupo de Szego (Pietras y Szego 1977, 1979a,b, 1984; Szego, 1974, 1984; Szego

y Davis, 1967; Szego y Pietras, 1984, 1985) debería encontrarse en el epitelio uterino, y, conforme a la hipótesis de este trabajo, especialmente en ratas en el día de la implantación, en las zonas en que ésta se lleva a cabo.

De los resultados obtenidos se puede deducir, en primer lugar, que la estrategia para obtenerlo mediante extracción con un detergente no iónico probablemente no sea la adecuada, dadas las características del receptor: En los procedimientos experimentales utilizados para aislar y solubilizar las proteínas de las biomembranas con detergentes no iónicos, estos no influyen sobre la actividad biológica de las proteínas, ya que no modifican su estructura terciaria (Tanner, 1979), por lo cual los detergentes no iónicos como el Tritón X-100 son elegidos cuando es necesario conservar tal actividad biológica (Tanford y Reynolds, 1976). La que se altera en algunas ocasiones, cuando el sitio en el cual une a su ligando es hidrofóbico (Tanner, 1979; Tanford y Reynolds, 1976), como sería de esperar en el receptor a estrógenos, lo cual podría explicar los resultados negativos cuando se realizaron ensayos en presencia del detergente. Sin embargo, en los ensayos realizados en ausencia de detergente, tampoco se encontró la actividad del receptor, lo que permite suponer entonces, que no hubo interferencia de parte del detergente, sino que el receptor no pudo ser aislado.

Müller y cols (1979), buscando también receptor membranal, encontraron que el estradiol se une a membranas aisladas de útero de rata de una manera inespecífica, que parece no ser mediada por receptores. Sus estudios los llevaron a cabo en membranas obtenidas por centrifugación en gradiente de densidad en sacarosa, provenientes de úteros de ratas inmaduras (21-23 días de edad), las cuales tiene como inconveniente que presentan una cantidad muy baja de receptores a estrógenos (Clark y cols, 1978, 1980), por lo cual sus resultados,

aún cuando pueden ser un apoyo a los presentados en este trabajo, no son del todo confiables.

Pietras y Szego (1977; 1979a,b; 1980) utilizó ratas de nueve semanas de edad que fueron ovariectomizadas tres semanas antes del experimento, condición en la que los receptores a estrógenos se hallan en los órganos blanco en número elevado, y sin interaccionar con su ligando, lo que eleva la eficiencia de las determinaciones (Cidlowski y Muldoon, 1974), y teóricamente aislaron parcialmente un receptor membranal a estrógenos. Sin embargo, su esquema experimental consiste en la preparación de membranas por centrifugación en gradiente de densidad en sacarosa, a partir de la fracción nuclear de un extracto total de útero o hígado, por el método de Touster y cols (1970) modificado, en el cual se obtienen fragmentos de membrana plasmática, que llevan proteínas integrales, con alto rendimiento, aunque contaminados con proteína citosólica (Aronson y Touster, 1973, Touster y cols, 1970). esto hace suponer que lo que dichos autores consideran como un receptor membranal a estrógenos en realidad sea el receptor citosólico.

Los resultados obtenidos por la técnica histoquímica apoyan la existencia del receptor membranal a estrógenos, por lo que se puede inferir que tal vez en los extractos Tx se halle presente, aunque en cantidad baja para ser detectada por las técnicas bioquímicas aquí empleadas, o quizá que debido a sus propiedades no haya podido separarse de las membranas a pesar de que otras proteínas sí (p. ej 5'N ó la  $\gamma$ -glutamil transpeptidasa, que se comportó de manera similar a la 5'N, resultados no mostrados). Por lo anterior, se considera posible que, aplicando estrategias histoquímicas de alta resolución con ayuda de la microscopía electrónica, se pudieran detectar. Con esta finalidad, en estudios posteriores, se

propone el empleo de ferritina acoplada al esteroide. La ferritina es una proteína electrodensa, que no es penetrada por los electrones emitidos por la fuente energética del microscopio electrónico. También se pudiera utilizar oro coloidal, que presenta las mismas características de electrodensidad de la ferritina, pero recubierto por 17 $\beta$ -estradiol-17-hemisuccinato de albúmina sérica de bovino, que interactúa con sitios de unión a esteroides (Gaefkens y Pertschuck, 1980; Lee, 1981, 1982; Berqvist y cols, 1984; Nenci y cols, 1981).

Por otra parte, Frairia y cols, (1991) han caracterizado y cuantificado receptores membranales a proteína transportadora de hormonas sexuales en las células de órganos blanco a estrógenos como el endometrio humano y próstatas hiperplásicas. Pudiera ser que los mecanismos no genómicos de los estrógenos sólo se lleven a cabo a través de la interacción del estradiol y su proteína transportadora íntimamente ligados, con el receptor membranal a tal proteína.

El último objetivo fué detectar sitios de unión a estrógenos en la membrana plasmática del epitelio uterino de ratas utilizando una metodología capaz de localizar los sitios de unión a ligandos que no son solubles en el citosol, y por lo tanto se encuentran unidos a la membrana plasmática o el citoesqueleto (Lee, 1981). Con este método se pudo detectar un receptor membranal a estrógenos en otros órganos blanco de estas hormonas, como son el endometrio humano (Berqvist y cols, 1984) y células de cancer mamario (Nenci y cols, 1981).

Por otra parte, empleando la misma técnica, en útero de rata se localizaron en el proestro ocupando el extremo basal de las células epiteliales, y en el diestro, distribuidos en la totalidad de la superficie celular de las mismas células, pero no se halló en estro o metaestro (Lee, 1982). Los resultados obtenidos por ese autor



difieren de los aquí presentados, ya que en diestro no se encontraron sitios de unión a estrógenos, en proestro y metaestro se localizaron distribuidos en el citoesqueleto de las células estromales, y sólo durante el estro se localizaron sitios de unión a estrógenos, de manera abundante en toda la célula. Las discrepancias entre ambos estudios no tienen una explicación científica o técnica aceptable, ya que se utilizaron sujetos de la misma cepa, de aproximadamente la misma edad, y con ciclo luz:oscuridad similar, pero se puede asegurar la veracidad de los presentados aquí a causa de que se repitieron al menos, tres veces para cada estadio del ciclo estrual.

Aún cuando la resolución del sistema óptico no permite hacer inferencias muy precisas sobre la localización subcelular de los receptores, en las células epiteliales del útero de rata en estro se observa claramente una mayor afinidad del material nuclear por el EAF, así como una definición precisa del plasmalema que se encuentra en contacto con el lumen uterino. Esto corrobora el predominio de receptores nucleares a estrógenos en este sistema sobre los citosólicos, pero permite seguir suponiendo que una gran proporción de receptores pueda ser membranal.

De acuerdo a los resultados de Logeat y cols (1980), que hallaron que los receptores son más elevados en la zona de implantación que en las regiones interzona, y a Bernal, (1989), quien reportó que los sitios de unión I y II a estrógenos (receptores y sitios secundarios, respectivamente) se encuentran en mayor cantidad en las zonas de implantación cuando se comparan con las regiones interzonas, en este estudio se debió hallar mayor afinidad por el EAF en las zonas de implantación que en las regiones interzona. En el presente estudio, no se corroboraron sus hallazgos, ya que la afinidad por el EAF fue similar en

ambas áreas, lo cual pudiera deberse a que, a pesar de que ambos sitios ligadores de estrógenos (I y II) estuvieran presente en las zonas de implantación en mayor cantidad que en las regiones interzona, la fluorescencia sea enmascarada por el azul de tripano, que se inyecta a las ratas entre 45 a 60 minutos antes de ser sacrificadas, ya que el colorante, por su unión a proteínas sanguíneas que se extravasan al espacio intersticial de las zonas de implantación (Psychoyos, 1976) se acumula en ellos, y puede afectar la intensidad fluorescente, ya sea por inhibición de la reacción entre los sitios I y II con el EAF, lo cual es improbable, puesto que al parecer el colorante es afín por estradiol (Martell y Psychoyos, 1983) o quizá por interferir en la emisión fluorescente del EAF.

Para comprobar si el azul de tripano interfiere en la detección de los sitios de unión a estrógenos, sería necesario realizar otro tipo de experimentos, como inducir, en ratas ovariectomizadas, con tratamiento hormonal o mecánico, la pseudopreñez y falsa decidualización en uno de los dos cuernos uterinos, conservando el otro sólo bajo efecto de la ovariectomía, con el fin de analizar en ellos la presencia del receptor. En tales condiciones el cuerno uterino así tratado se comportaría como una gigantesca zona de implantación y el no tratado como una región interzona.



## CONCLUSIONES

1. El Tritón X-100 al 0.025 y 0.05 % libera las proteínas de la membrana apical del epitelio uterino sin dañar la estructura celular.
2. Las concentraciones de 0.1 y 0.2 % del detergente causan ruptura de las células, quizá por crear micelas mixtas a partir de la bicapa membranal.
3. La concentración de 0.2 %, de Tritón X-100 no daña los núcleos celulares, puesto que no se detectó DNA en los extractos Tx.
4. El receptor de estrógenos no pudo ser detectado por métodos bioquímicos, entre las proteínas de la membrana plasmática del epitelio uterino de las ratas en estro o en el día cinco de preñez, cuando fueron extraídas con Tritón X-100 al 0.05 %.
5. Mediante estudios histoquímicos, se encontró que los sitios de unión a los estrógenos, localizados en el epitelio uterino de ratas, se hallan en gran cantidad durante el estro, con predominio nuclear, aunque también distribuidos en citosol y membrana plasmática.

6. Con la técnica histoquímica aplicada, no se lograron detectar los sitio de unión a estrógenos en el epitelio uterino de ratas en el día cinco de la gestación, ni en las zonas de implantación ni en las interzonas.

7. En el epitelio uterino de ratas en estro, la unión del EAF a los sitios de unión a estrógenos fue inhibida por el  $\beta$ -estradiol, el dietilestilbestrol y el tamoxifeno y no fue afectada por el  $\alpha$ -estradiol ni por la progesterona.

## REFERENCIAS

- ANDERSON, T.L.; OLSON, G.E. y HOFFMAN, L.H. 1988. Stage-specific alterations in the apical membrane glycoproteins of endometrial epithelial cells related to implantation in rabbits. Biol. Reprod. 34: 701-720.
- ARONSON, N.N. y TOUSTER, O. 1973. Isolation of rat liver plasma membrane fragments in isotonic sucrose. Methods Enzymol. 32: 90-102.
- BERNAL, A. 1989. Analisis de los sitios de unión de tipo I y II para estradiol en endometrio de rata en relación a la implantación del blastocisto. Tesis para obtener el Grado de Maestría en Biología de la Reproducción. ENEP Iztacala, UNAM. 36 pp.
- BERGQVIST, A.; EKMAN, R. y LJUNGBERG, O. 1984. Binding of estrogen and progesterone to human endometrium in the different phases of the menstrual cycle. Am. J. Clin. Pathol. 83: 444-449.
- BHATT, B.M. y BULLOCK, 1974. Binding of oestradiol to rabbit blastocysts and its possible role in implantation. J. Reprod. Fertil. 39: 65-70.
- BUCHER, Th.; CZOK, R.; LAMPRECHT, W. y LATZKO, E. 1963. Pyruvate. En: Bergmeyer, H.U. (editor). Methods of enzymatic analysis. Verlag Chemie/Academic Press. New York & London. p. 253-259.
- BRADFORD, M.M. 1976. A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of dye binding. Analyt. Biochem. 72: 248-254.
- CASTRACANE, V.D. y JORDAN, V.C. 1976. Considerations into the mechanism of estrogen-stimulated uterine prostaglandin synthesis. Prostaglandins 12 (2): 243-251.
- CHENG, C.Y.; BOETTCHER, B.; ROSE, R.J.; KAY, D.J. y TINNEBERG, H.R. 1981. The binding of sex steroids to human spermatozoa. An autoradiographic study. Int. J. Androl. 4: 1-17.
- CIDLOWSKI, J.A. y MULDOON, T.G. 1974. Estrogenic regulation of cytoplasmic receptor populations in estrogen-responsive tissues of the rat. Endocrinology 95: 1621-1629.
- CLARK, J.H.; HARDIN, J.W. UPCHURCH, S y ERIKSSON, H. 1978. Heterogeneity of estrogen binding sites in the cytosol of rat uterus. J. Biol. Chem. 253: 7630-7634.

CLARK, J.H.; MARKAVERICH, B.; UPCHURCH, S.; ERICKSSON, H.; HARDIN, J.W. y PECK, E.J. 1980. Heterogeneity of estrogen binding site. Relationship to estrogen receptors and estrogen responses. Recent Progr. Horm. Res. 36: 89-134.

CLARK, J.H. y MARKAVERICH, B. 1988. Actions of ovarian steroid hormones. En: Knobil, E. y Neil, J.D. (eds.) *Physiology of Reproduction*. Raven Press. New York. Vol. I, pp. 675-724.

DANNHORN, D.R. y KIRCHNER, C. 1990. Uptake of tritiated uteroglobin by the endometrium of the rabbit during peri-implantation, Cell Tissue Res. 259: 519-528.

DICKMANN, Z., DEY, S.K. y SEN GUPTA, J. 1975. Steroidogenesis in rabbit preimplantation embryos. Proc. Natl. Acad. Sci. 72: 298-300.

DICKMANN, Z., DEY, S.K. y SEN GUPTA, J. 1976. A new concept: control of early pregnancy by steroid hormones originating in the preimplantation embryo. Vit. Horm. 34: 215-242.

DURAN-REYES, G.; DIAZ-FLORES, M.; CASTILLO, S. y HICKS, J.J. 1992. Nuclear presence of two lysosomal enzymes in rat implantation sites. (Enviado a publicación).

ENDERS, A.C. y NELSON, D.M. 1973. Pinocytotic activity of the uterus of the rat. Am. J. Anat. 138: 277-300.

FAGG B.; MARTIN, L.; ROGERS L.; CLARK, B; y QUARMBY, V. 1979. A simple method for removing the luminal epithelium of the mouse uterus for biochemical studies. J. Reprod. Fert. 57: 335.

FLANDROY, L, CHEUNG, W.Y. y STEINER, A.L. 1983. Immunofluorescent localization of cGMP, cGMP-dependent protein kinase, calmodulin and cAMP in the rat uterus. Cell Tissue Res. 233: 639-646.

FRAIRIA, R., FORTUNAT, N., BERTA, L., FAZZARI, A., FISSORE, F. y GAIDANO, G. 1991. Sex steroid binding protein (SBP) receptors in estrogen sensitive tissues. J. Steroid. Biochem. Mol. Biol. 40 (4-6): 605-612.

GAETJENS E. y PERTSCHUCK, L.P. 1980. Synthesis of fluorescein labelled hormone-albumin conjugates for the fluorescent histochemical detection of hormone receptors. J. Steroid. Biochem. 13: 1001-1003.

GEORGE, F.W. y WILSON, J.D. 1978. Estrogen formation in the early embryo. Science 199: 200-201.

GORSKI, J., TOFT, D., SHYAMALA, G., SMITH, D. y NOTIDES, A. 1968. Hormone studies on the interaction of estrogen with the uterus. Recent Progr. Horm. Res. 24: 45-80.

GORSKI, J., WELSHONS, W. y SAKAI, D. 1984. Remodeling the estrogen receptor model. Mol. Cell. Endocrinol. 36: 11-15.

GORSKY, J., WELSHONS, W.V., SAKAI, D., HANSEN, J., WALENT, J. KASSIS, J., SHULL, J., STACK, G. y CAMPEN, C. 1986. Evolution of a model of estrogen action. Rec. Prog. Horm. Res. 42: 297-327.

GREEN, S.; WALTER, P.; KUMAR, V.; KRUST, A.; BORNERT, J. ARGOS, P. y CHAMBON, P. 1986. Human estrogen receptor cDNA; secuencia, expresión y homología a v-erb-A. Nature 320: 134- 139.

GREENE, G.L. y JENSEN, E.V. 1982. Monoclonal antibodies as probes for estrogen receptor detection and characterization. J. Steroid Biochem. 16: 353-359.

GRODY, W.W, SCHRADER, W.T. y O'MALLEY, B.W. 1982. Activation, transformation, and subunit structure of steroid hormone receptors. Endocrine. Rev. 3: 141-163.

GUZMAN-GRENFELL, A.M. y HICKS, J.J. 1993. Nuclear presence of two lysosomal glycosidases in endometrium during the rat estrous cycle. (Enviado a publicación)

HAMABATA A. 1988. Estructura y propiedades de aminoácidos, péptidos y proteínas. en Bioquímica e Inmunología (Díaz-Zagoya, J.C. y Hicks, J.J., eds.). Facultad de Medicina, UNAM. 59-88.

HANSEN J.C. y GORSKY, J. 1985. Conformational and electrostatic properties of unoccupied and liganded estrogen receptors determined by aqueous two-phase partitioning. Biochemistry 24: 6078-6085.

HANSEN, J.C. y GORSKY, J. 1986. Conformational transitions of the estrogen receptor monomer. J. Biol. Chem. 261: 13990-13996.

HELENIUS, A. Y SIMONS, K. 1975. Solubilization of membranes by detergents. Biochim. Biophys. Acta. 415: 29'79.

HERNANDEZ-PEREZ, O.; BALLESTEROS, L.M. y ROSADO, A. 1979. Binding of 17 $\beta$ -estradiol to the outer surface and nucleus of human spermatozoa. Arch. Androl. 3: 23-29.

HICKS, J.J. 1981. Regulación endócrina de la implantación del cigoto de mamífero. Gac. Med. Méx. 117: 510-520.

HICKS, J.J. y ROSADO, A. 1976. Steroid hormones and sperm metabolism. En: Briggs, H.H. (ed.). *Advances in Steroid Biochemistry and Pharmacology*. Vol 5. Academic Press, New York.

HILDEN, S.; RHEE, H.M. y HOKIN, L.E. 1974. Sodium transport by phospholipid vesicles containing purified Na<sup>+</sup> and K<sup>+</sup> ion activated ATPase. J. Biol. Chem. 249: 7432-7440.

HOFFMAN, L.H.; WINFREY, V.P.; ANDERSON, T.L. y OLSON, G.E. 1990. Uterine receptivity to implantation in the rabbit: evidence for a 42 kDa glycoprotein as a marker of receptivity. En: Denker, H.W. y Aplin, J. (eds). *Trophoblast research*, Vol. 4. Plenum Publishing. 243-258.

HOOVERSLAND, R.C.; DEY, S.K. y JOHNSON, D.C. 1982. Aromatase activity in the rabbit blastocyst. J. Reprod. Fert. 66: 259-263.

JENSEN, E.V.; SUZUKI, T.; KAWASHIMA, T.; STUMPF, W.E.; JUNGBLUT, P.W. y DESOMBRE, E. 1968. A two step mechanism for the interaction of estradiol with rat uterus. Proc. Natl. Acad. Sci. USA. 59: 632-638.

KENNEDY, T.G. 1983. Embryonic signals and the initiation of blastocyst implantation. Aust. J. Biol. Sci. 36: 531-543.

KING, W.J. y GREENE, G.L. 1984. Monoclonal antibodies localize oestrogen receptor in the nuclei of target cells. Nature 307: 745-747.

KWUN, J.K. y EMMENS, C.W. 1974. Hormonal requirements for implantation and pregnancy in the ovariectomized rabbit. Aust. J. Biol. Sci. 27: 275-283.

LEE, S.H. 1981. The histochemistry of estrogen receptors. Histochemistry 71: 491-500

LEE, S.H. 1982 Uterine epithelial and eosinophil estrogen receptors in rats during the estrous cycle. Histochemistry 74: 443-452.

LEJEUNE, B.; DEHOU, M.F. y LEROY, F. 1986. Tentative extrapolation of animal data to human implantation. Ann NY Acad. Sci. 476: 63-74.

LEJEUNE, B., VAN HOECK, J. y LEROY, F. 1981. Transmitter role of the luminal uterine epithelium in the induction of decidualization in rats. J. Reprod. Fert. 61: 235-240.



LEROY, F., VAN HOECK, J. y BOGAERT, C. 1976. Hormonal control of pinocytosis in the uterine epithelium of the rat. J. Reprod. Fert. 47: 59-62.

LINKIE, D.M. y SIITERI, P.K. 1978. A re-examination of the interaction of estradiol with target cell receptors. J. Steroid Biochem. 9:1071-1078.

LOGEAT, F., SARTOR, P., VU HAI, M.T. y MILGROM, E. 1980. Local effect of the blastocyst on estrogen and progesterone receptors in the rat endometrium. Science 207: 1083-1085.

LOZA-ARREDONDO, M.C.; LEMUS, A.E. y PEREZ-PALACIOS, G. 1988. Metabolismo de hormonas esteroides. En Hicks, J.J. y Díaz-Zagoya, J.C. (editores) Bioquímica e Inmunología. Facultad de Medicina, Universidad Nacional Autónoma de México, México, D.F. Vol. II. pp. 53-92.

MARCUS, G.J. y SHELESNYAK, M.C. 1967. Studies on the mechanism of nidation. XX. Relation of histamine release to estrogen action in the progestational rat. Endocrinology 80: 1028-1031.

MARTIN, L. 1984. On the source of uterine 'luminal fluid' proteins in the mouse. J. Reprod. Fert. 71: 73-80.

MULLER, R.E.; JOHNSTON, T.C. y WOTIZ, H.H. 1979. Binding of estradiol to purified uterine plasma membrane. J. Biol. Chem. 254(16): 7895-8000.

NAZARENO, M.B.; HORTON, M.J.; SZEGO, C.M. y SEELER, B.J. 1981. Antibodies against estradiol-binding lysosomal lipoproteins gain access to the nuclear compartment of preputial gland cells under estrogen influence. Endocrinology 108: 1156-1163.

NEMERE, I. y SZEGO, C.M. 1981. Early actions of parathyroid hormone and 1,25-dihydroxycholecalciferol on isolated epithelial cells from rat intestine. II. Analysis of additivity, contribution of calcium, and modulatory influence of indomethacin. Endocrinology 109: 2180-2187.

NENCI, I.; MARCHETTI, E.; MARZOLO, A. y FABRIS, G. 1981. Affinity cytochemistry visualizes specific estrogen binding sites on the plasma membrane of breast cancer cells. J. Steroid. Biochem. 14: 1139-1146.

O'MALLEY, B.W. y MEANS, A.R. 1974. Female steroid hormones and target cell nuclei. Science 183: 610-620.

ORSINI, M.W. y MEYER, R.K. 1962. Effect of varying doses of progesterone on implantation in the ovariectomized hamster. Proc. Soc. Exp. Biol. Med. 110: 713-715.

PARIA, B.C., SENGUPTA, J. y MANCHANDA, S.K. 1984. Role of embryonic oestrogen in rabbit blastocyst development and metabolism. J. Reprod. Fert. 70: 429-436.

PEREZ-PALACIOS, G.; LARREA, F.; CERBON, M.A. y VILCHIS, F. 1988. Mecanismo de acción de hormonas esteroides. En Hicks, J.J. y Díaz-Zagoya, J.C. (editores) *Bioquímica e Inmunología*. Facultad de Medicina, Universidad Nacional Autónoma de México, México, D.F. Vol 2. pp. 93-125.

PERRY, J.S.; HEAP, R.B.; BURTON, R.D. y GADSBY, J.E. 1976. Endocrinology of the blastocyst and its role in the establishment of pregnancy. J. Reprod. Fert. 25: (Suppl.) 85-104.

PIETRAS, R.J. y SZEGO, C.M. 1975. Surface modifications evoked by estradiol and diethylstilbestrol in isolated endometrial cells: evidence from lectin probes and extracellular release of lysosomal protease. Endocrinology 97: 1445-1454.

PIETRAS, R.J. y SZEGO, C.M. 1977. Specific binding sites for oestrogen at the outer surfaces of isolated endometrial cells. Nature 265: 69-72.

PIETRAS, R.J. y SZEGO, C.M. 1979a. Metabolic and proliferative responses to estrogen by hepatocytes selected for plasma membrane binding-sites specific for estradiol-17 $\beta$ . J. Cell. Physiol. 98: 145-160

PIETRAS, R.J. y SZEGO, C.M. 1979b. Estrogen receptors in uterine plasma membrane. J. Steroid. Biochem. 11: 1471-1483.

PIETRAS, R.J., SZEGO, C.M., ROBERTS, J.A. y SEELER, B.J. 1981. Lysosomal cathepsin B-like activity: mobilization in prereplicative and neoplastic epithelial cells. J. Histochem. Cytochem. 29 (3A): 440-450.

PIETRAS, R.J. y SZEGO, C.M. 1984. Specific internalization of estrogen and binding to nuclear matrix in isolated uterine cells. Biochem. Biophys. Res. Commun. 123 (1): 84-91.

PIETRAS, R.J., SZEGO, C.M. y SEELER, B. 1981. Immunologic inhibition of estrogen binding and action in preputial-gland cells and their subcellular fractions. J. Steroid. Biochem. 14: 679-691.

PSYCHOYOS, A. 1973. Hormonal control of ovum implantation. Vitamins. Hormons. 34: 215-242.

PSYCHOYOS, A. 1976. Hormonal control of uterine receptivity for nidation. J. Reprod. Fert. (Suppl) 25: 17.



RAMBO, C.O. y SZEGO, C.M. 1983. Estrogen action at endometrial membranes: Alterations in luminal surface detectable within seconds. J. Cell. Biol. 97: 679-683.

REBHUN, L.T. 1972. Polarized intracellular particle transport: saltatory movements and cytoplasmic streaming. Int. Rev. Citol. 32: 93-137.

ROSS, G.T. 1985. Trastornos del ovario y del aparato reproductor femenino. En Wilson, J.D. y Foster, D.W. (editores). Endocrinología. 7. Panamericana. Buenos Aires, Argentina. Vol. 2. pp. 315-388.

SEELER, B.J., HORTON, M.J, SZEGO, C.M. y DELANGE, R.J. 1988. Monoclonal antibodies toward lysosomal cathepsin B cross-reacts preferentially with distinct histone classes. Int. J. Biochem. 20 (10): 1089-1106.

SENGUPTA, J.; ROY, S.K. y MANCHADA, S.K. 1979. Hormonal control of implantation: A possible role of lysosomal function in the embryo-uterus interaction. J. Steroid. Biochem. 11: 729-744.

SENGUPTA, J.; PARIA, B.C. y MANCHANDA, S.K. 1983. Effect of an estrogen antagonist on development of blastocyst and implantation in the hamster. J. Exp. Zool. 225: 119-122.

SHELESNYAK, M.C. 1957. Some experimental studies on the mechanism of ova-implantation in the rat. Rec. Prog. Horm. Res. 13: 269-322.

SHOLL, S.A.; ORSINI, M.W. y HITCHINS, D.J. 1983. Estrogen synthesis and metabolism in the hamster blastocyst, uterus and liver near the time of implantation. J. Steroid Biochem. 19: 1153-1161.

SPAZIANI, E. y SZEGO, C.M. 1958. The influence of estradiol and cortisol on the uterine histamine of the ovariectomized rat. Endocrinology 63: 669-678.

SPAZIANI, E y SZEGO, C.M. 1959. Further evidence for mediation by histamine of estrogenic stimulation of the rat uterus. Endocrinology 64: 713-723.

SZEGO, C.M. 1974. The lysosome as a mediator of hormone action. Progr. Horm. Res. 30: 171-232.

SZEGO, C.M. 1984. Mechanisms of hormone action: parallels in receptor-mediated signal propagation for steroid and peptide effectors. Life Sci. 35: 2383-2396.

SZEGO, C.M. y DAVIS, J.S. 1967. Inhibition of estrogen-induced elevations of cyclic 3',5'-adenosine monophosphate in rat uterus. I. By  $\beta$ -adrenergic receptor blocking drugs. Molec. Pharmacol. 5: 470-480.

SZEGO, C. M. y PIETRAS, R.J. 1984. Function in cellular activation: propagation of the action of hormones and other effectors. Int. Rev. Cytol. 88: 1-302.

SZEGO C.M. y PIETRAS, R.J. 1985. Subcellular distribution of oestrogen receptors. Nature 317 (6032): 88-89.

SZEGO, C.M.; SEELER, B.J.; STEADMAN, R.A.; HILL, D.F.; KIMURA, A.K. y ROBERTS, J.A. 1971. The lysosomal membrane complex: focal point of primary steroid hormone action. Biochem. J. 123: 523-528.

SZEGO, C.M., STEADMAN, R.A. y SEELER, B.J. 1974. Intranuclear concentration of lysosomal hydrolases in steroid target cells. Acute response to administration of gonadal steroids. Eur. J. Biochem. 46: 377-386.

SZEGO, C.M.; SJÖSTRAND, B.M.; SEELER, B.J.; BAUMER, J.W. y SJÖSTRAND. 1988. Microtubule and plasmalemmal reorganization: acute response to estrogen. Am. J. Physiol. 254 (Endocrinol. Metab. 17): E775-E785).

SZENDRO, P.I., SIERRALTA. W.D. y JUNGBLUT, P.W. 1983. Structural assignment and extractability of microsomal estradiol receptors. Hoppe-Seyler's Z. Physiol. Chem. Bd 364: S. 1337-1344.

TANFORD, C. y REYNOLDS, J.A. 1976. Characterization of membrane proteins in detergent solutions. Biochem. Biophys. Acta. 457: 133-170.

TANNER, M.J.A. 1979. Isolation of integral membrane proteins and criteria for identifying carrier proteins. En: Current Topics in Membranes and Transport, V. 12: Carriers and membrane transport proteins. Bronner, F. y Kleinzeller, A. (Eds.). 1-51.

TOUSTER, O.; ARONSON, N.; DULANEY, J. y HENDRICKSON, H. 1970. Isolation of rat liver plasma membranes. J. Cell. Biol. 47: 604-618.

VOET, D. y VOET, J.G. 1991. Biochemistry. Wiley. New York. 1223 pp.

TOWLE, A.C. y SZE, P. 1983. Steroid binding to synaptic plasma membrane: Differential binding of glucocorticoids and gonadal steroids. J. Steroid Biochem. 18: 135-143.

WARD, W.F., FROST, A.G. y WARD ORSINI, M. 1978. Estrogen binding by embryonic and interembryonic segments of the rat uterus prior to implantation. Biol. Reprod. 18: 598-601.

WELSHONS, W.V.; LIEBERMAN, M.E. y GORSKY, J. 1984. Nuclear localization of unoccupied oestrogen receptors. Nature 307: 747-749.

WELSHONS, W.V.; KRUMMEL, B.M. y GORSKY, J. 1985. Nuclear localization of unoccupied receptors for glucocorticoids, estrogens and progesterone in GH3 cells. Endocrinology 117: 2140-2147.

WU, J.T. y LIN, G.-M. 1982. Effect of aromatase inhibitor on oestrogen production in rabbit blastocysts. J. Reprod. Fert. 66: 655-662.

YAMAMOTO, K.R. y ALBERTS, B.M. 1972. In vitro conversion of estradiol receptor protein to its nuclear form. Dependence on hormone and DNA. Proc. Natl.Acad. Sci. USA. 69: 2105-2109.

YOSHINAGA, K. y ADAMS, C.E. 1966. Delayed implantation in the spayed, progesterone-treated adult mouse. J. Reprod. Fertil. 12: 593-595.

ZYZEK, E.; DUFY-BARBE, L.; DUFY, B. y VINCENT, J.D. 1981. Short-term effect of estrogen on release of prolactin by pituitary cells in culture. Biochem Biophys. Res. Commun. 102: 1151-1157.