



UNIVERSIDAD NACIONAL AUTONOMA DE MEXICO

ESCUELA NACIONAL DE ESTUDIOS PROFESIONALES

IZTACALA

400282



61060

**REGULACION DE LA PROLIFERACION DEL EPITELIO
UTERINO. EVALUACION DEL EFECTO DEL IONOFORO
DE CALCIO A - 23187**

T E S I S

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

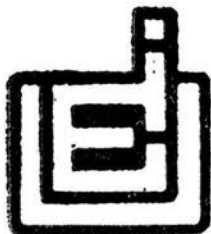
P R E S E N T A :

M.C.P. JESUS RAMIRO QUIJANO VARGAS

DIRECTOR DE TESIS :

DR. LUIS ARTURO BAIZA GUTMAN

LOS REYES IZTACALA, MEXICO 1995





Universidad Nacional
Autónoma de México

Dirección General de Bibliotecas de la UNAM

Biblioteca Central



UNAM – Dirección General de Bibliotecas
Tesis Digitales
Restricciones de uso

DERECHOS RESERVADOS ©
PROHIBIDA SU REPRODUCCIÓN TOTAL O PARCIAL

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

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

Este trabajo se realizó en el Laboratorio de Biología del Desarrollo de la Unidad de Morfología y Función de la Escuela Nacional de Estudios Profesionales - Iztacala de la Universidad Nacional Autónoma de México, bajo la dirección del Dr. Luis Arturo Baiza Gutman.

El autor fue becario del Programa Universitario de Investigación Clínica (PUIC) de la UNAM, por 3 años, durante el desarrollo de la Maestría y Becado por el Instituto Mexicano del Seguro Social, por un año, para la realización del trabajo experimental.

Con amor para:

Susana

Jesús Ramiro y Rodrigo

Por el tiempo no dedicado a ellos...

A mis padres:

Por darme la oportunidad y la
libertad de elegir mi propio
camino.

DEDICATORIA.

Al Dr. Luis Arturo Baiza Gutman a quien debo mi formación académica desde los inicios en la Maestría en Biología de la Reproducción.

Por su decidido apoyo en la elaboración del presente trabajo en todas sus etapas. Sobre todo por su amistad, porque siempre estuvo conmigo, fundamentalmente en los momentos más difíciles.

A mi amigo Luis Arturo... gracias.

AGRADECIMIENTOS:

A la Bióloga Carmen Alvarez Rodríguez quien fue mi compañera de trabajo, en la realización de la parte experimental y vivimos momentos difíciles que superamos siempre unidos.

A los revisores de esta Tesis por sus valiosas y enriquecedoras observaciones.

Al Biólogo Alberto Arriaga Frías por su apoyo en el procesamiento estadístico de los datos y su disposición siempre amable.

A mis compañeros de laboratorio durante la realización de esta Tesis.

A los integrantes del Laboratorio de Genética por las facilidades brindadas en la elaboración del escrito.

A mis condicípulos de la Maestría, sobre todo a Margarita por sus palabras de aliento, porque siempre conte con su apoyo y su compañía.

A todos aquellos que contribuyeron haciendo más ligera la carga y que me impulsaron para conseguir esta meta.

CONTENIDO.

PAGINA

Lista de figuras.....	iii
Lista de tablas.....	iv
Abreviaturas.....	v
RESUMEN.....	1
INTRODUCCION.....	3
-Endometrio.....	4
-Ciclo estrual.....	5
-Estrógenos.....	6
-Mecanismo de acción de los estrógenos.....	8
-Acción genómica de los estrógenos.....	9
-Acción no genómica.....	10
-Proliferación celular.....	11
-El calcio en la proliferación celular.....	13
-Ionoforo de calcio A 23187.....	15
-Justificación.....	15
-Hipótesis.....	16
OBJETIVOS.....	17
-Objetivo general.....	17
-Objetivos específicos.....	17
MATERIAL Y METODOS.....	18
1.-Animales.....	18
2.-Ovariectomía.....	18
3.-Tratamiento con ionóforo y 17β -estradiol...	18
4.-Aplicación de colchicina para evaluar el índice mitótico.....	21
5.-Estirpación y procesamiento del útero.....	21
6.-Estimación del índice mitótico.....	21

7.-Estimación de proteínas, DNA y RNA.....	22
8.-Análisis estadístico.....	22
RESULTADOS.....	23
-Efecto del 17 β -estradiol sobre el útero.....	23
-Efecto del ionóforo A-23187 sobre el útero...24	24
-Efecto del ionóforo A-23187 sobre el útero bajo acción estrogénica.....	25
-Efecto de la administración intraluminal del vehículo sobre el útero con y sin estimulación estrogénica.....	25
DISCUSION.....	39
-Efecto del 17 β -estradiol en el útero.....	39
-Efecto del ionóforo A-23187 sobre el útero...41	41
-Efecto del ionóforo A-23187 sobre el útero bajo acción estrogénica.....	42
-Efecto de la administración intraluminal del vehículo sobre el útero en ratas con y sin estimulación estrogénica.....	43
CONCLUSIONES.....	45
APENDICE I.-Cuantificación de proteínas, DNA y RNA en el útero.....	47
-Procesamiento del tejido.....	47
-Determinación de proteínas por el método de Lowry.....	47
-Determinación del DNA por el método de Giles y Myres.....	48
-Determinación del RNA.....	50
BIBLIOGRAFIA.....	51

LISTA DE FIGURAS.

- Figura 1.-Representación esquemática del núcleo central básico de los esteroides sexuales.....8
- Figura 2.-Cambios histológicos en el epitelio luminal inducidos por el ionóforo A-23187 y el 17β -estradiol.....26
- Figura 3.-Correlación entre la dosis del ionóforo y el índice mitótico.....32

LISTA DE TABLAS.

Tabla 1.-Efecto del estradiol y del vehículo sobre el peso uterino y el índice mitótico del epitelio luminal.....	28
Tabla 2.-Efecto de la administración de estradiol y del vehículo sobre las concentraciones de proteínas, DNA y RNA.....	29
Tabla 3.-Efecto del estradiol y del vehículo sobre las relaciones entre los distintos parámetros bioquímicos.....	30
Tabla 4.-Efecto del ionóforo sobre el peso uterino y el índice mitótico del epitelio luminal.....	31
Tabla 5.-Efecto del ionóforo sobre las concentraciones de proteínas, RNA y DNA.....	34
Tabla 6.-Efecto del ionóforo sobre las relaciones entre los distintos parámetros bioquímicos.....	35
Tabla 7.-Efecto del ionóforo sobre el peso uterino y el índice mitótico del epitelio luminal en ratas tratadas con estrógenos.....	36
Tabla 8.-Efecto del ionóforo sobre las concentraciones de proteínas, RNA y DNA en ratas tratadas con estrógenos.....	37
Tabla 9.-Efecto del ionóforo sobre las relaciones entre los distintos parámetros bioquímicos en ratas tratadas con estrógenos.....	38

ABREVIATURAS.

Acido desoxirribonucleico.....	DNA
Acido ribonucleico.....	RNA
Adenisín monofosfato cíclico.....	AMP _c
Análisis de varianza.....	ANOVA
Hidrogeniones.....	H ⁺
Hormona luteinizante.....	LH
Indice mitótico.....	IM
Factor de crecimiento epidermal.....	EGF
Factor de crecimiento insulinoide 1.....	IGF-1
Factor de crecimiento derivado de las plaquetas.....	PGDF
Kilogramo.....	Kg
Microlitros.....	μl
Microgramos.....	μg
Micrómetros.....	μm
Miligramos.....	mg
Mililitros.....	ml
Molar.....	M
Peso corporal.....	pc
Peso uterino.....	pu
peso/volumen.....	p/v
Porcentaje.....	%
Solución salina amortiguada con fosfatos.....	PBS

RESUMEN:

Los estrógenos promueven en el útero eventos genómicos y no genómicos que se manifiestan en minutos u horas, como son la inducción de cambios en la liberación de histamina, imbibición de agua, permeabilidad vascular y en el transporte de metabolitos a través de la membrana celular.

Se ha observado que la estimulación con 17β -estradiol provoca un aumento en la captación de calcio en el citosol de las células de endometrio.

La elevación intracelular de calcio se ha relacionado con la proliferación de diversas poblaciones celulares y es posible que el incremento dependiente de estrógenos, induzca o facilite esta respuesta.

Con base en lo anterior, se investigó el efecto del ionóforo de calcio A-23187 sobre la respuesta proliferativa del epitelio uterino de rata; ya que éste permite la difusión del calcio a través de la membrana e induce el aumento de su concentración intracelular.

Ratas Wistar vírgenes fueron ovariectomizadas, 15 días después, veinte microlitros de soluciones de ionóforo a concentraciones de 0.5, 2 y 4 $\mu\text{g}/\text{ml}$ (0.097, 0.387 Y 0.775 μM respectivamente) se introdujeron en la luz uterina, a un grupo de ellas se les administró 10 $\mu\text{g}/\text{Kg}$ de 17β -estradiol por vía subcutánea. 27 h después los animales se sacrificaron por dislocación cervical, previamente se les administró colchicina (0.1 mg / 100 g de peso). Se obtuvieron los úteros se pesaron y el tercio medio se fijó en Bouin, se incluyó en parafina, se cortaron transversalmente a 3 μm . Los cortes se tiñeron con hematoxilina-eosina y se contaron los núcleos en mitosis de 3000 células del epitelio luminal del útero. El índice mitótico (IM) se expresó como el número de células en metafase por cada 1000 células. Las otras partes del útero se homogenizaron en PBS en una proporción de 1:15 peso/volumen y se midió la cantidad de proteínas, RNA y DNA.

La administración subcutánea de estrógenos indujo la proliferación del epitelio luminal y un aumento en la concentración de proteínas y RNA uterinos.

La aplicación de ionóforo a dosis de 0.08 μg /cuerno uterino causó en el epitelio luminal una proliferación estadísticamente significativa. La respuesta no se acompañó de cambios significativos en las concentraciones uterinas de proteínas, DNA y RNA.

Cuando se aplicó el ionóforo en organismos tratados con estradiol no se observó un efecto proliferativo adicional.

La inyección intraluminal del vehículo causó por si misma un aumento en la multiplicación celular, lo que puede deberse a la distensión uterina y/o a la inducción de la liberación de factores mitogénicos al líquido uterino.

El efecto proliferativo del ionóforo en el epitelio uterino sugiere que el aumento intracelular de calcio, participa en el mecanismo de inducción de la proliferación por estrógenos.

REGULACION DE LA PROLIFERACION DEL EPITELIO UTERINO.
EVALUACION DEL EFECTO DEL IONOFORO DE CALCIO A-23187.

INTRODUCCION.

El epitelio uterino que forma parte del endometrio experimenta cambios cíclicos característicos del tracto genital.

Estos fenómenos son el reflejo de una variedad de acontecimientos que se presentan como resultado de la acción hormonal, en particular de los esteroides producidos en el ovario.

Existe una gran cantidad de información en relación al mecanismo de acción de las hormonas esteroides y cada vez hay más evidencias de su acción sobre estructuras subcelulares que no tienen relación directa con la interacción de la hormona con los receptores nucleares (1-4).

Con base en ello sus efectos han sido divididos en genómicos y no genómicos. En los primeros la hormona afecta directamente al genoma celular y en los segundos tienen una acción no mediada por receptores nucleares o bien por receptores diferentes a estos, por ejemplo, los de membrana celular u otras proteínas, sin modificar la expresión de los genes (5-7).

Entre los últimos, se han señalado los cambios de permeabilidad membranal y variaciones en el flujo e intercambio iónico, en especial de cationes divalentes como el calcio (8).

Se ha documentado ampliamente que los estrógenos inducen fenómenos de proliferación celular en tejidos como el endometrio (9-11). También se sabe que hay cambios en la concentración intracelular de calcio, en células que han sido inducidas a reproducirse con factores mitogénicos (12-14).

No obstante, la correlación que pudiera existir entre los eventos de división celular y los cambios en la concentración de calcio, ambos inducidos por estrógenos, no ha sido

estudiada.

En este trabajo se emplea al ionóforo A-23187, que permite la incorporación de calcio a la célula, para estudiar si esta ión participa en fenómenos de proliferación celular del epitelio uterino, evaluando indicadores como son: el índice mitótico, el peso húmedo, y el contenido de proteínas, DNA y RNA.

ENDOMETRIO:

El endometrio, adherido firmemente al miometrio subyacente, está sometido a cambios cíclicos en respuesta a la actividad endocrina de los ovarios. Estos cambios culminan con la proliferación de los tejidos que lo integran.

El cuerpo uterino está revestido por un epitelio cilíndrico simple con grupos diseminados de células ciliadas. El epitelio se continúa con glándulas uterinas tubulares simples que se extienden en la mucosa, en ocasiones las glándulas se ramifican en el extremo basal. Entre el epitelio y el miometrio se encuentra el estroma de tejido conectivo, cuyas células más abundantes son los fibroblastos fusiformes o estrellados con núcleos ovoides. Los cuales depositan una trama de fibras reticulares que se condensan por debajo del epitelio y forman una membrana basal. En el estroma también se encuentran células linfoides y leucocitos granulosos errantes.

Los cambios que ocurren en el endometrio durante el ciclo estrual, preparan al útero para recibir al blastocisto y por tanto desempeñan una función importante en el proceso reproductivo (15,16).

Las variaciones en grosor y vascularidad del endometrio se deben a los cambios en la producción de esteroides sexuales ováricos (15,16).

Las células epiteliales columnares que recubren la luz uterina, tienen una participación importante en la interacción entre el blastocisto y el endometrio, en las primeras etapas de

la gestación.

Para facilitar la implantación, las células del epitelio luminal experimentan cambios estructurales que son regulados por la acción de estrógenos y progesterona (16-19).

Este proceso debe evolucionar hasta una etapa crítica cuando el útero está preparado para aceptar selectivamente al blastocisto. Si no ocurre la diferenciación, el proceso de implantación no se lleva al cabo (18,19).

CICLO ESTRUAL:

La rata ovula espontáneamente, presenta ciclos estruales cortos de 4 a 6 días de duración; esto se debe a que los cuerpos lúteos que se forman después de la ovulación, funcionan sólo por unas horas, pero si hay copula durante el estro, se estimula el desarrollo de cuerpos lúteos funcionales y en consecuencia la rata tiene un periodo de preñez o pseudopreñez, dependiendo de que la cópula haya sido fértil o no. La cronología del ciclo estrual es determinada por el ritmo circadiano; por ejemplo, la ovulación siempre se presenta poco después de la media noche (20,21).

Un día antes de que la rata entra en estro, en la mañana del proestro, la secreción de 17β -estradiol que proviene de los folículos en desarrollo, alcanza sus concentraciones máximas, lo que desencadena un aumento preovulatorio de la hormona luteinizante (LH) en la tarde del proestro y la ovulación se presenta en las primeras horas de la mañana siguiente.

Una característica del ciclo estrual es un gran incremento preovulatorio de la secreción de progesterona y 20α -hidroxiprogesterona, cuya elevación coincide con los niveles máximos de LH y son mayores que los observados durante la corta fase luteínica o diestro. La progesterona preovulatoria tiene una función primordial, ya que el comportamiento de apareo de la rata requiere de la influencia de un nivel alto de

estrógenos, que es seguido por un aumento en la concentración de progesterona (17,20,21).

Los niveles sanguíneos de LH y prolactina también se elevan al final del proestro y es probable que la cópula estimule la liberación de la gonadotropinas para producir un cuerpo lúteo que funcione durante la gestación.

En el diestro se secreta poca cantidad de progesterona y 20α -hidroxiprogesterona, pero se desconoce el mecanismo que induce tal fenómeno, así como la causa de su disminución después de dos días y si acaso tiene alguna función. En la rata la fase lútea es insignificante y es modificada por las condiciones ambientales, el ritmo circadiano y la actividad sexual.

Por su parte los estrógenos desempeñan una función esencial en la inducción de los cambios endometriales y son analizados a continuación.

ESTROGENOS:

Una de las funciones primordiales del ovario es la producción de los esteroides sexuales. Estas hormonas tienen como estructura básica el ciclopentanoperhidrofenantreno, que está formado por tres anillos constituidos cada uno por seis átomos de carbono y un anillo de ciclopentano.

Los anillos de seis átomos de carbono se denominan con las letras A,B,C y el ciclopentano con la letra D.

Existe la tendencia a utilizar en la nomenclatura de los esteroides al núcleo central básico del cual proceden. Esto es, estrano, pregnano y androstano; para estrógenos, progesterona y andrógenos respectivamente.

Los átomos de hidrógeno pueden ser sustituidos por cadenas laterales, particularmente por grupos hidroxilos y cetónicos. Para indicar estas sustituciones, se expresa el número del átomo de carbono en el que tienen lugar la sustitución y si esta es α o β . Si es un grupo hidroxilo puede emplearse el

sufijo -ol, situado detrás del número de carbono en que se encuentra, o puede también emplearse el prefijo hidroxilo. Si son varios los grupos hidroxilo, se pueden emplear los sufijos -diol, -triol, etc., o los prefijos dioxi, trioxi, etc.

Si es un grupo cetona puede utilizarse el prefijo oxo o ceto o el sufijo -ona; por ejemplo, delta 4 pregnen-3,20-diona-17 β -ol, indica que hay dos grupos cetona en los carbonos 3 y 20, respectivamente y un grupo hidroxilo en el carbono 17 en posición β .

La existencia de dobles enlaces se expresa por el prefijo delta, seguido del número que indica el átomo de carbono donde se inicia el doble enlace. Si el doble enlace une dos átomos no consecutivos en la escala numérica, se escriben a continuación los números de los átomos. Cuando hay un solo doble enlace se usa el sufijo -en; el sufijo -dien, si hay dos; el sufijo -trien, si hay tres, etc. Por ejemplo, delta 4-pregnen-3,20 diona (progesterona); delta 1-3-5 (10)-estratrien- β , 17 β -diol (estradiol) (22).

Las principales fuentes de producción de estrógenos son los ovarios, las glándulas suprarrenales y la placenta, aunque se producen en menor cantidad en la piel, el tejido adiposo y otros tejidos periféricos.

El ovario sintetiza fundamentalmente estradiol, en menor cantidad estrona y muy poco estriol. Estas tres hormonas tienen el núcleo de ciclopentanoperhidrofenantreno, cuyo anillo A es aromático (fenólico): delta 1-3-5 (10); tienen 18 átomos de carbono con un grupo metilo unido al carbono 13 y un grupo hidroxilo en el carbono 3 (22,23).

El estradiol tiene dos grupos hidroxilo: uno, común a las tres hormonas en el carbono 3 y otro en el carbono 17.

La estrona tiene un grupo cetona en el carbono 17 y el hidroxilo común en el carbono 3.

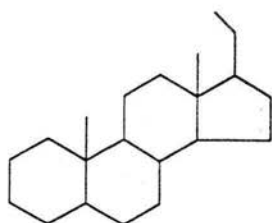
El estriol tiene tres grupos hidroxilo: el común en el carbono 3 y dos más en los carbonos 16 y 17.

De los tres estrógenos sintetizados en el ovario, el

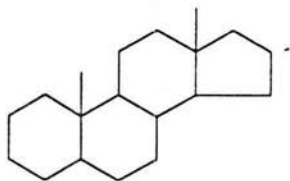
estradiol es el de mayor significado fisiológico tanto por su cantidad como por su potencia biológica en los eventos reproductivos.

MECANISMO DE ACCION DE LOS ESTROGENOS.

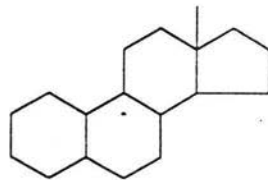
Las hormonas esteroides presentan una gran variedad de efectos en sus órganos efectores. Algunos están relacionados con: 1).-la proliferación celular del tracto reproductivo de la hembra, 2).-los cambios de conducta durante el estro, 3).-el inicio de la pubertad, 4).-la aparición de los caracteres sexuales secundarios y 5).-el desarrollo de los folículos ováricos y de la glándula mamaria.



Pregnano (C21)



Androstano (C19)



Estrano (C18)

FIGURA 1.-REPRESENTACION ESQUEMATICA DEL NUCLEO CENTRAL BASICO DE LOS ESTEROIDES SEXUALES.

En el útero inducen: 1).-la migración de eosinófilos, 2).-la liberación de mediadores químicos como la histamina, 3).-el aumento en la permeabilidad vascular, 4).-la retención de agua y 5).-la proliferación del epitelio (2, 24, 25).

A nivel celular sus efectos se manifiestan pocos minutos después del estímulo hormonal y su respuesta consiste en cambios de permeabilidad de membrana y alteraciones del metabolismo. Sin embargo, hay otros efectos que se presentan minutos u horas después de su interacción con las células y corresponden a un aumento en la síntesis de proteínas, RNA, DNA y finalmente en la proliferación celular (9, 23).

Como fue mencionado con anterioridad, sus efectos se han divididos en genómicos y no genómicos. Los primeros se presentan más tardíamente e implican la interacción del esteroide con el núcleo y la modificación de la expresión génica. Los segundos son más tempranos e involucra su acción sobre estructuras como la membrana celular (2, 23, 26).

Acción genómica de los estrógenos:

Los estudios iniciales sobre la acción de los esteroides sugieren que este grupo de hormonas actúan prácticamente de la misma manera. Desde la fuente de origen son transportados a sus órganos blanco unidos a proteínas específicas como la globulina transportadora de esteroides sexuales o a proteínas inespecíficas como la albúmina. En la vecindad de la célula efectora se separa de su transportador y dada su naturaleza lipofílica, difunden a través de la membrana citoplásmica. En el interior de la célula se une a un receptor citosólico de naturaleza proteica en su estado no activado, formando un complejo hormona-receptor, el que debe experimentar cambios en su conformación molecular que dependen de la temperatura, el pH y la fuerza iónica, para ser activado y translocado al núcleo (23).

En el núcleo de las células se une a sitios aceptores de la cromatina, en los cuales radica la especificidad de su acción

La interacción de los estrógenos con el genoma condiciona la apertura de la cadena de DNA con lo cual la información codificada queda expuesta para ser transcrita y para dirigir la síntesis proteica (23).

A este proceso se le conoce como el esquema de dos pasos, es decir, la unión inicial de la hormona a un receptor citosólico y su translocación al núcleo e interacción con la cromatina (1, 23).

En la actualidad este esquema se ha puesto en duda, ya que hay evidencias que cuestionan la existencia del receptor citosólico y presupone una localización de los receptores principalmente a nivel nuclear (3).

Los efectos de la acción genómica son tardíos y la respuesta está relacionada con la síntesis de proteínas, DNA, RNA, crecimiento y división celular (9, 23).

Acción no-genómica:

No todas las acciones de los estrógenos pueden ser explicadas con base a sus efectos genómicos. En algunas células se han demostrado otros tipos de interacción hormonal con diversos componentes celulares.

Estos cambios se presentan a corto plazo y no requieren de la expresión génica, ni de la síntesis de proteínas. Se ha propuesto la existencia de un posible receptor de membrana plasmática como mediador de los estrógenos en células del endometrio humano, neuronas, espermatozoides, células de carcinoma mamario y células aisladas de la glándula prepucial de ratas, sin embargo, aún no se ha establecido el significado funcional del mismo.

Entre estos efectos se encuentran el incremento transitorio de AMPc, el aumento de rutas metabólicas como el

ciclo de las pentosas y un mayor consumo de oxígeno en células uterinas y espermatozoides (5-7).

También se ha demostrado que los estrógenos inducen en el endometrio cambios en la permeabilidad vascular, la liberación de histamina, la imbibición de agua y modificaciones en la permeabilidad iónica de la membrana celular (2, 26).

Por otro lado, se ha observado que la estimulación de las células endometriales con 17 β -estradiol induce una mayor captación de calcio e incrementa su concentración en el citosol (8). Hecho que reviste gran importancia, ya que se ha demostrado que este catión participa en funciones de proliferación y otros procesos celulares (11-14, 27, 28).

Dado lo interesante de la participación del calcio en la proliferación celular, a continuación se analiza este proceso y su posible relación con el 17 β -estradiol.

PROLIFERACION CELULAR:

Las células tienen diferentes cambios en el transcurso del ciclo celular. En la fase inicial, la G₁, aumentan de tamaño. Posteriormente sigue el período de replicación del material genético o fase S, durante el cual se sintetiza el DNA. La segunda fase de crecimiento (G₂), se caracteriza por la síntesis de varios tipos de RNA y la célula se prepara para la división (29).

Finalmente, la célula entra en el período M, en el cual se presenta la división celular o mitosis. En esta etapa la célula entra en las subfases conocidas como profase, metafase, anafase y telofase (29).

Las células producto de la división puede entrar nuevamente al ciclo y continuar dividiéndose o entrar a la fase G₀ durante la cual adquiere la capacidad de desempeñar una actividad específica, según el tejido de que se trate. En algunos tipos celulares como las neuronas y los eritrocitos, la diferenciación pone fin a la división; en otros como algunos

epitelios, las células pueden entrar nuevamente al ciclo y continuar dividiéndose. En el último caso, el regreso al ciclo celular está determinado por la acción de diversos estímulos, como las hormonas o los factores de crecimiento (péptidos ó proteínas sintetizadas por tejidos específicos que estimulan la proliferación de otros tejidos). En gran medida se desconoce con detalle el mecanismo de acción de estos factores. Sin embargo, se acepta que se unen a receptores membranales y a partir de esta interacción generan una señal interna que es propagada por mediadores intracelulares conocidos como segundos mensajeros.

La señal despertada en la superficie celular se propaga hasta el núcleo, dando como resultado la replicación del DNA.

Existen dos posibles rutas a través de las cuales puede ocurrir este fenómeno. La primera no bien conocida, es empleada por factores de crecimiento del tipo de la insulina o del factor de crecimiento epidermal y parece contar con receptores que activan a la enzima tirosina cinasa. Es posible que en esencia esta ruta sea una cascada apoyada en la fosforilación de una serie de proteínas (30).

La otra ruta de transmisión de la señal, es empleada por factores como el derivado de las plaquetas (PDGF) y parece ser idéntica a la generada por algunas hormonas y neurotransmisores (30).

El PDGF se une a la superficie celular, estimula la hidrólisis del fosfatidilinositol difosfato en los segundos mensajeros inositol trifosfato y diacilglicerol. Estos participan en los procesos que ocurren en la fase de crecimiento G1 y preparan a la célula para la síntesis de DNA.

El inositol trifosfato parece actuar movilizando calcio intracelular; el diacilglicerol activa a la proteína cinasa C, la que fosforila diversas proteínas y favorece el intercambio de iones unidos a la membrana, con esto último se extraen protones (hidrogeniones) y aumenta el pH intracelular (31-33).

La movilización del calcio y el aumento del pH, en

conjunto, contribuyen a la síntesis de RNA y de proteínas que preparan a la célula para la síntesis de DNA y su división subsecuente.

Hay otros estímulos que inducen la división de células postmitóticas, en fase Go, entre estos, la remoción quirúrgica del hígado que induce la proliferación de hepatocitos debida a la disminución de inhibidores de la división como las chalonas producidas por las mismas células (34).

La división de células Go también puede ser inducida por hormonas como los estrógenos, que actúan cíclicamente sobre el endometrio, induciendo la proliferación del epitelio y cuando hay una exposición previa a progesterona estimulan la división de células del estroma.

En general se acepta que los estrógenos inducen la proliferación celular por una acción directa sobre estas, mediada por su interacción con los receptores citosólicos y nucleares (hipótesis directa positiva), (19, 10, 26, 35).

Sin embargo, algunos investigadores suponen que podría haber otras posibilidades como la acción de la hormona sobre otro órgano o tejido y la liberación de un inductor de proliferación (hipótesis indirecta positiva) o la supresión de un inhibidor de la misma (hipótesis indirecta negativa), (36, 37).

EL CALCIO EN LA PROLIFERACION CELULAR.

Los iones de calcio actúan como reguladores en un gran número de funciones celulares; como la conducción nerviosa, la coagulación sanguínea, la contracción muscular y la proliferación celular.

Es de gran interés señalar su acción como propagador de señales externas hacia el interior de la célula (31).

Su concentración intracelular es del orden de 10^{-6} M y puede incrementarse como resultado de estímulos extracelulares al abrirse canales inmersos en la membrana. Estos canales se

encuentran acoplados a receptores o son sensibles a cambios de voltaje (33).

La concentración del ión también puede aumentar a consecuencia de su liberación a partir de sitios de depósito en organelos intracelulares como las mitocondrias o el retículo endoplásmico liso. Por el contrario, puede disminuir como consecuencia de su expulsión hacia el medio extracelular o hacia los depósitos intracelulares, fenómenos que consumen energía suministrada por el ATP y regulados por sistemas bombecedores de calcio (ATPasa dependiente de calcio y magnesio) (31).

Para controlar el movimiento intracelular de calcio, la célula cuenta con proteínas unidas a la membrana que lo captan e introducen al citosol o al interior de los organelos donde es liberado. También dispone de proteínas localizadas en el citosol que lo unen específicamente, como la calmodulina (38).

De la unión de calcio con la calmodulina, resultan cambios de conformación que activan este complejo y a su vez, actúan en sistemas enzimáticos que modifican la actividad celular.

Se ha visto que el inicio de la anafase está relacionado con un incremento intracelular de calcio, que junto con la calmodulina puede inducir la despolimerización de los microtúbulos unidos al cinetocoro y facilitar el movimiento de los cromosomas (39).

Hay estudios que comprueban que las alteraciones específicas en el perfil iónico del citoplasma de diversas células precede y posiblemente desencadena la división y la proliferación celular. Otras evidencias indican que la actividad mitótica puede estar funcionalmente acoplada a cambios de potencial de membrana y el contenido intracelular de cationes inorgánicos (12-14, 27-28).

Se ha demostrado un aumento de calcio intracelular promovido por algunos factores de crecimiento como el PDGF, previo a su efecto mitogénico (40). También se ha implicado al calcio en la proliferación de diversos tipos celulares como

los condrocitos, los linfocitos T, los timocitos, los fibroblastos 3T3, las células epidérmicas, las células epiteliales de los conductos mamarios de humano, (11-13, 27, 28, 41, 42). Esto hace suponer que el incremento intracelular de calcio en el epitelio endometrial pudiera relacionarse con los fenómenos proliferativos que cíclicamente presenta este tejido, como consecuencia de la acción estrogénica.

IONÓFORO DE CALCIO A-23187.

Experimentalmente, la concentración de calcio puede elevarse con sustancias químicas que lo acarrearán al interior de la célula, como el ionóforo A-23187 (43, 44, 46).

Este ionóforo es un ácido carboxílico aislado de *Streptomyces chartreusensis* y tiene un peso molecular de 523 daltones. esta molécula presenta una parte hidrofílica en el centro, que se une selectivamente a los iones de calcio y magnesio (45, 46).

Actúa como acarreador móvil para el transporte específico, a pH fisiológico cataliza el intercambio electroneutro de Ca^{+2} por 2H^{+} a través de la membrana plasmática y/o moviliza calcio de los depósitos internos (43, 44).

Esta capacidad de transporte se puede realizar a través de la membrana plasmática o de los organelos intracelulares movilizando calcio a partir de estos depósitos.

El ionóforo de calcio A-23187 aumenta la concentración citosólica de calcio iónico y provoca efectos proliferativos en algunas poblaciones celulares, como se mencionó previamente (11-13, 27, 28, 41, 42).

JUSTIFICACION:

Uno de los principales efectos de los estrógenos es la proliferación celular en diferentes tejidos y el epitelio uterino representa un tejido efector por excelencia. Sin

embargo, hay algunos aspectos en relación a su mecanismo de acción que no han sido suficientemente estudiados.

Se ha observado que la concentración intracelular de calcio aumenta en las células endometriales en cultivo, cuando son estimuladas con 17β -estradiol (8).

Lo anterior también se ha observado en otros tipos de células cuando son inducidas a dividirse con factores mitogénicos (11-13, 27, 28, 41, 42).

Dado que la concentración intracelular de calcio aumenta cuando las células se estimulan con estrógenos o con factores mitogénicos, es posible que este incremento se relacione con los fenómenos de proliferación celular en el epitelio uterino.

HIPOTESIS:

En algunos tipos celulares se ha visto que la concentración intracelular de calcio, aumenta cuando dichas células son inducidas a dividirse y se ha considerado que esta ión participa en los mecanismos que desencadenan la proliferación celular.

El estradiol es una hormona que estimula la división celular en el epitelio del endometrio.

Entre otros efectos el estradiol provoca cambios de permeabilidad de membrana e intercambio iónico. Se ha encontrado que el calcio intracelular aumenta como consecuencia de la acción de esta hormona.

Con base en lo anterior, es posible que el incremento intracelular de calcio, sea uno de los eventos que medien la acción proliferativa de los estrógenos, si esto es así, entonces el ionóforo de calcio A23187 puede inducir la proliferación del epitelio luminal uterino, ya que provoca un aumento en la concentración del calcio intracelular.

OBJETIVOS.

OBJETIVO GENERAL

Evaluar si el aumento intracelular de calcio inducido por el ionóforo A-23187 favorece la proliferación celular del epitelio uterino.

OBJETIVOS ESPECIFICOS

1.- Evaluar si el ionóforo A-23187 tiene un efecto mitogénico en el epitelio uterino cuando es aplicado en la luz del útero.

2.- Evaluar si la respuesta proliferativa del epitelio uterino, estimulada por 17β -estradiol, se modifica cuando se aplica el ionóforo simultáneamente.

3.-Evaluar la respuesta del útero a la aplicación intraluminal del ionóforo A-23187, en relación a la concentración de DNA, RNA y proteínas.

4.- Evaluar la respuesta del útero a la aplicación de ionóforo en ratas tratadas con 17β -estradiol, en relación al contenido de DNA, RNA y proteínas.

MATERIAL Y METODOS

1.- Animales:

Se emplearon ratas Wistar vírgenes con un peso de 191 ± 24 g. Se mantuvieron bajo un fotoperiodo de 14-10 h luz-oscuridad, alimentadas con purina y agua *ad libitum* y temperatura ambiente de 22 ± 1 °C (Bioterio ENEP Iztacala).

2.- Ovariectomía:

Las ratas fueron anestesiadas con pentobarbital sódico (Anestesal, Smith Kline, Norden de México) a una dosis de 5 mg/100 g de peso. Se les practicó la ovariectomía bilateral mediante una incisión dorsolateral a cada lado. Después de una semana del acto quirúrgico se realizaron lavados vaginales diariamente durante una semana para corroborar que no entraran en estro, lo que indica la remoción completa de las gónadas.

3.- Tratamientos con ionóforo y 17β -estradiol

Posteriormente se dividieron en dos grupos (control y experimental) y fueron sometidas a diferentes tratamientos como se especifica más adelante, hasta completar nueve lotes de cinco a nueve ratas cada uno.

A.- Grupo experimental

a).- Administración de ionóforo A-23187 en la luz uterina:

El ionóforo A-23187 (Sigma Chemical) fue diluido con etanol al 2% en solución salina amortiguada con fosfatos (PBS) estéril y preparada a las concentraciones de 0.5, 2 y 4 $\mu\text{g/ml}$ (0.097, 0.387 y 0.775 μM respectivamente). Cada una de las concentraciones correspondió a un tratamiento diferente. A cada cuerno uterino se le aplicaron 20 μl de la solución

correspondiente.

Para la aplicación de la solución se realizó una incisión ventromedial hasta localizar los cuernos uterinos. Se ligó a cada uno de ellos por el extremo proximal al cérvix con catgut crómico 000 (Catgut-American). Por el extremo opuesto a la ligadura se aplicaron a cada cuerno 20 μ l de la solución de ionóforo a las concentraciones antes mencionadas, por lo que cada tratamiento correspondió a 0.01, 0.04 y 0.08 μ g de ionóforo/cuerno (0.0193, 0.0775 y 0.155 μ moles respectivamente).

La aplicación de las soluciones se realizó con una microjeringa Hamilton de 25 μ l y siempre se inició en el cuerno del lado derecho.

b).- Administración intraluminal de ionóforo A-23187 a ratas previamente estrogenizadas:

Se aplicó subcutáneamente 17 β -estradiol a una dosis de 10 μ g/kg de peso . El estradiol se diluyó en etanol al 1% en PBS. Cinco minutos después se inyectó el ionóforo como se describió previamente.

B.- Grupo control.

Las ratas correspondientes a este grupo fueron sometidas a diferentes tratamientos: a) administración de 20 μ l del vehículo del ionóforo en la luz uterina (etanol al 2% en PBS) y b) aplicación de 20 μ l del vehículo en la luz de cada cuerno a ratas previamente tratadas con estradiol (10 μ g/kg de 17 β -estradiol por vía subcutánea), como se describió en el grupo experimental.

Puesto que ha sido informado que la administración de líquidos en la luz uterina induce proliferación del epitelio por acción de la distensión, se consideró conveniente emplear dos grupos en los cuales no se aplicó vehículo en la luz. Un grupo correspondió a ratas ovariectomizadas solamente y otro a

ratas con ovariectomía y estradiol subcutáneo, para compararlos con los controles a los que se administro el vehículo.

De esta forma, los grupos quedaron distribuidos como sigue:

GRUPO EXPERIMENTAL

Lote 1.- Ionóforo A-23187 en la luz uterina, a una dosis de 0.01 μg /cuerno.

Lote 2.- Ionóforo A-23187 en la luz uterina, a una dosis de 0.04 μg /cuerno.

Lote 3.- Ionóforo A-23187 en la luz uterina, a una dosis de 0.08 μg /cuerno.

Lote 4.-Aplicación previa de 17 β -estradiol, 10 $\mu\text{g}/\text{kg}$ subcutáneo e ionóforo A-23187 en la luz uterina a una dosis de 0.01 μg /cuerno.

Lote 5.-Aplicación previa de 17 β -estradiol, 10 $\mu\text{g}/\text{kg}$ subcutáneo e ionóforo A-23187 en la luz uterina a una dosis de 0.04 μg /cuerno.

Lote 6.-Aplicación previa de 17 β -estradiol, 10 $\mu\text{g}/\text{kg}$ subcutáneo e ionóforo A-23187 en la luz uterina a una dosis de 0.08 μg /cuerno.

GRUPO CONTROL

Lote 1.- Administración en la luz uterina de 20 μl del vehículo del ionóforo en cada cuerno.

Lote 2.- Aplicación previa de 17 β -estradiol, 10 $\mu\text{g}/\text{kg}$ subcutáneo y 20 μl /cuerno de vehículo del ionóforo.

Lote 3.- Administración subcutánea de 17 β -estradiol, a una dosis de 10 μ g/kg.

Lote 4.- Sin ningún tratamiento.

4.- Aplicación de colchicina para evaluar el índice mitótico.

Tanto al grupo experimental como al control se les aplicó colchicina (Sigma Chemical), a una dosis de 0.1 mg/100 g de peso por vía subcutánea 21 h después de cada tratamiento.

Los animales fueron sacrificados por dislocación cervical, seis horas después de la aplicación de la colchicina para estimar el índice mitótico y determinar las concentraciones de proteínas, DNA y RNA en el útero.

5.- Extirpación y procesamiento del útero

A las ratas sacrificadas se les extrajo el útero, el cual fue disecado para eliminar la grasa, el mesometrio y la ligadura de catgut. Los úteros completos fueron lavados en PBS. Se colectaron sobre papel filtro (Whatman No. 1) y se depositaron en una caja de Petri sobre hielo. Posteriormente fueron pesados en una balanza analítica Sartorius, el tercio medio del cuerno derecho se fijó en una solución de Bouin y se procesaron mediante técnicas histológicas rutinarias para obtener cortes transversales de 3 μ m de espesor, que se tiñeron con hematoxilina y eosina.

El resto del órgano fue triturado en un homogenizador Potter-Elvehjem en PBS en una proporción 1:15 p/v y se realizaron las mediciones bioquímicas de proteínas, DNA y RNA.

6.- Estimación del índice mitótico.

En los cortes del útero se contaron el número de metafases

presentes en 3 000 células del epitelio luminal. El índice mitótico (IM) se expresó como el número de células en metafase por cada mil células epiteliales.

7.- Estimación de proteínas, DNA y RNA

El tejido homogenizado fue procesado para determinar proteínas por el método de Lowry (47), DNA por el de Giles y Myres (48) y RNA empleando el reactivo de orcinol (49). Ver apéndice.

8.- Análisis estadístico.

Los resultados obtenidos de los grupos experimentales y sus respectivos controles, se sometieron a un análisis de varianza (ANOVA) y posteriormente a una prueba de Tukey para determinar a que grupo se deben las diferencias significativas. La prueba de t-Student se aplicó para comparar grupos por pares. Se hizo una correlación lineal para determinar la relación entre la dosis del ionóforo y la respuesta proliferativa del epitelio luminal.

RESULTADOS

A continuación se describe la acción del 17 β -estradiol sobre los parámetros uterinos estudiados, el efecto de la administración del ionóforo sobre úteros bajo acción estrogénica y sin ella.

EFFECTO DEL 17 β -ESTRADIOL SOBRE EL UTERO

El 17 β -estradiol modifica en forma marcada el aspecto histológico del endometrio, induciendo abundantes mitosis en el epitelio luminal, en el que se observaron regiones con más de una capa de células. No se apreció un aumento significativo de figuras mitóticas en otras capas celulares (figura 2).

El epitelio luminal se adoptó un aspecto cuboide en el organismo ovariectomizado y cúbico en el tratado con la hormona (figura 2).

En las ratas ovariectomizadas tratadas con 17 β -estradiol (10 μ g/kg) fue notable el aumento estadísticamente significativo ($p \leq 0.05$) del IM del epitelio luminal uterino (tabla 1). No se evaluó el IM para otras poblaciones celulares, sin embargo, en los cortes histológicos de los úteros sometidos a la acción estrogénica se observaron figuras mitóticas en el epitelio glandular, pero no en otros tejidos como el estroma y el miometrio) (figura 2).

El peso de los úteros y la relación del peso uterino al peso corporal (pu/pc) fue similar con y sin tratamiento estrogénico (tabla 1).

El estradiol también indujo un aumento en las concentraciones uterinas de RNA y proteínas y una disminución en la concentración de DNA. Estos cambios fueron evidentes cuando se emplean como parámetros de referencia al DNA y las proteínas. Si se toma como tal al peso húmedo, las concentraciones de proteínas fueron similares en los organismos

tratados con estrógenos y en los ovariectomizados (tablas 2 y 3).

EFFECTO DEL IONÓFORO A-23187 SOBRE EL ÚTERO

Cuando se administró el ionóforo en la luz uterina de ratas ovariectomizadas, se observaron en los cortes histológicos algunas células del epitelio luminal en división a la dosis de ionóforo de 0.8 μg / cuerno, sin embargo, la proporción no fue tan marcada como la detectada en los úteros tratados con estrógenos (figura 2).

La aplicación intraluminal del ionóforo a las dosis de 0.04 y 0.08 μg /cuerno induce un aumento en el índice mitótico del epitelio luminal de 22 ± 9 y 81 ± 21 respectivamente.

Cuando estos valores se comparan con los del grupo control (dosis 0) en el que se encontró un valor de 13 ± 16 , se observó una diferencia estadísticamente significativa sólo a la dosis más alta (ANOVA, prueba de Tukey) con una $p \leq 0.05$. En el análisis de correlación entre el IM y la dosis de ionóforo se encontró un coeficiente de 0.62, lo cual indica que el IM aumenta conforme aumenta la dosis del ionóforo (tabla 4 y figura 3).

Las concentraciones de DNA y RNA a las dosis de 0.01 y 0.04 fueron menores con respecto a las del grupo control, pero no se alteraron cuando se empleó la dosis de 0.08 μg (tablas 5 y 6).

No se observaron diferencias significativas entre las concentraciones de proteínas en el útero a las distintas dosis empleadas ($p > 0.05$); sin embargo, cuando se relacionaron con las del DNA, se apreció un incremento a las dosis intermedias, lo cual refleja la disminución de la concentración de DNA (tabla 6).

No hubo diferencias significativas entre el peso uterino, ni en la relación peso uterino / peso corporal (pu/pc) (tabla 4).

EFFECTO DEL IONOFORO A-23187 SOBRE EL UTERO BAJO ACCION ESTROGENICA

La imagen histológica de los cortes uterinos de los animales tratados solamente con estrógenos y con estrógenos más la administración intraluminal del ionóforo, fueron similares (figura 2). En ambos casos el IM no mostró diferencias significativas ($p \geq 0.05$, ANOVA). Tampoco se apreciaron cambios con respecto al control que recibió estradiol subcutáneo y vehículo en la luz uterina (tabla 7).

El ANOVA de las determinaciones bioquímicas de las proteínas, el DNA y el RNA) y la relación pu/pc no evidenció diferencias significativas ($p > 0.05$) (tablas 8 y 9).

En las tablas 7, 8 y 9 se presentan las medias y el error estándar (EE) obtenidos en la relación pu/pc, determinaciones bioquímicas e IM.

EFFECTO DE LA ADMINISTRACION INTRALUMINAL DE VEHICULO SOBRE EL UTERO CON Y SIN ESTIMULACION ESTROGENICA.

La aplicación en la luz uterina de 20 μ l/cuerno del vehículo a ratas ovariectomizadas indujo un incremento significativo ($p \leq 0.05$, t-Student) en el IM, la concentración de RNA, el peso uterino y el % de peso uterino respecto al peso corporal fue casi 1.4 veces más alta en cada caso (tabla 1, 2 y 3).

En las ratas que recibieron previamente 17 β -estradiol y cuyos cuernos uterinos fueron tratados con vehículo intraluminal, no se observaron diferencias significativas ($p > 0.05$, t-Student) ni entre la proliferación del epitelio y tampoco en los distintos parámetros bioquímicos (tabla 1, 2 y 3).

Figura 2.- Cambios histológicos en el epitelio luminal uterino inducidos por el ionóforo A 23187 y 17β -estradiol.- Se presentan microfotografías de cortes transversales de uteros de ratas después de 15 días de ooforectomía y de 24 h de la administración subcutánea de 17β -estradiol (b, d, f) o sin él (a, c, e); Sin ningún tratamiento en la luz uterina (a, b) o después aplicar intraluminalmente el vehículo (PBS-etanol) (c, d) o la dosis mayor del ionóforo empleada $0.08 \mu\text{g} / \text{cuerno uterino}$ (e,f). Los cortes fueron teñidos con heratoxilina y eosina. En todos los casos se tienen 1 500 aumentos.

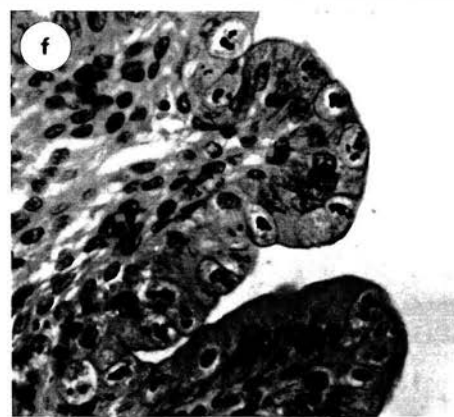
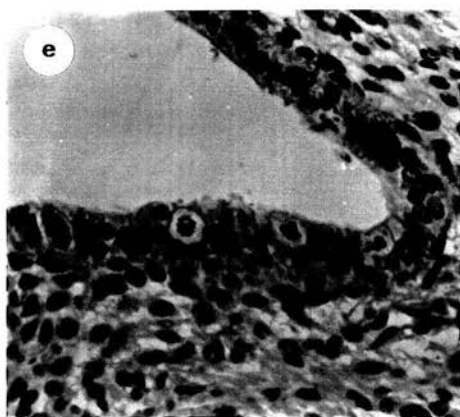
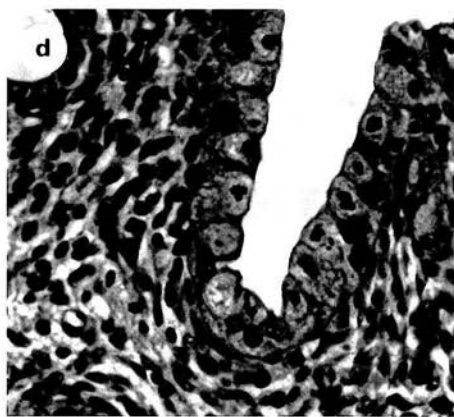
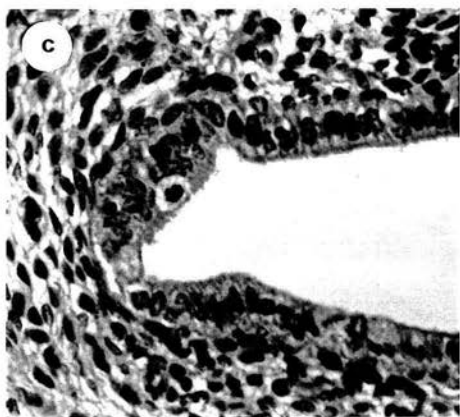
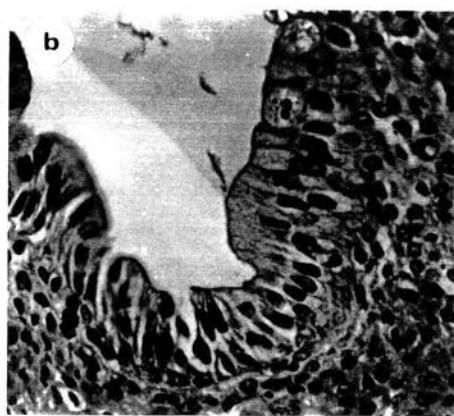
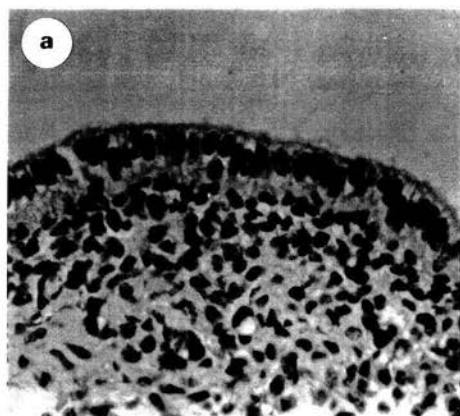


TABLA 1
 EFECTO DEL ESTRADIOL Y DEL VEHICULO SOBRE
 EL PESO UTERINO Y EL INDICE MITOTICO
 DEL EPITELIO LUMINAL.

E_2 ug/Kg	VEHICULO	PESO UTERINO mg	PESO UTERINO %	INDICE MITOTICO
0	NO	91.6 ± 16	0.037 ± 0.005 ^a	0.43 ± 0.11 ^a
	SI	127 ± 5	0.053 ± 0.002 ^b	12.7 ± 5.83 ^b
10	NO	115.3 ± 10	0.053 ± 0.004 ^{a,b}	201 ± 43.2 ^c
	SI	117.7 ± 9.6	0.053 ± 0.004 ^{a,b}	338 ± 101 ^c

Después de 15 días de ovariectomía se administraron en la luz uterina 20 µl -- del vehículo en que se disolvió el ionóforo (etanol al 0.2 % en PBS) a ratas con y sin tratamiento con estrógenos, después de 24 h los úteros se pesaron y se determinó el índice mitótico del epitelio luminal, como se indica en material y métodos, se presenta la media y el error estandar ($\bar{X} \pm E.E.$), con una n de 6 por cada condición. El índice mitótico indica el número de células en metafase por -- cada 1000 células. las letras iguales indican grupos de datos homogéneos.

TABLA 2

EFFECTO DE LA ADMINISTRACION DE ESTRADIOL Y DEL VEHICULO SOBRE LAS CONCENTRACIONES DE PROTEINAS, RNA Y DNA UTERINOS.

E_2 ug/Kg	VEHICULO	PROTEINAS ng/g DE TEJIDO	RNA ng/g DE TEJIDO	DNA ng/g DE TEJIDO
0	NO	99.7 ± 5.6 ^{a,b}	3.63 ± 0.49 ^a	11.12 ± 0.97 ^a
	SI	106.6 ± 3.4 ^a	4.87 ± 0.26 ^b	9.43 ± 0.47 ^{a,b}
10	NO	104.5 ± 5.0 ^a	6.07 ± 0.28 ^b	8.03 ± 0.28 ^b
	SI	88.4 ± 2.2 ^b	5.14 ± 0.30 ^b	7.07 ± 0.43 ^b

Las condiciones experimentales fueron iguales a las indicadas en la tabla 1, las proteínas, el DNA y el RNA se determinaron como se describe en material y métodos. Se presenta $\bar{X} \pm E.E.$, con una n de 6 para cada condición, las letras iguales -- grupos de datos homogéneos.

TABLA 3
EFECTO DEL ESTRADIOL Y DEL VEHICULO SOBRE
LAS RELACIONES ENTRE LOS DISTINTOS
PARAMETROS BIOQUIMICOS.

E_2 ug/Kg	VEHICULO	PROTEINAS mg/mg DE DNA	RNA mg/mg DE DNA	RNA mg/mg DE PROT.	DNA mg/mg DE PROT.
0	NO	9.83 ± 0.46^a	0.33 ± 0.010^a	0.03 ± 0.004^a	0.11 ± 0.006^a
	SI	11.98 ± 0.30^b	0.52 ± 0.03^b	0.04 ± 0.002^a	$0.08 \pm 0.002^{b,c}$
10	NO	13.23 ± 0.64^b	0.75 ± 0.025^b	0.05 ± 0.002^b	0.07 ± 0.004^c
	SI	11.23 ± 0.41^b	0.66 ± 0.05^b	0.06 ± 0.003^b	$0.09 \pm 0.003^{a,b}$

Las condiciones experimentales fueron similares a las de la tabla 1 y 2. Se presenta la $\bar{x} \pm E.E.$ con una n de 6 para cada condición. Las letras iguales indican grupos de datos homogéneos.

TABLA 4
EFECTO DEL IONOFORO SOBRE EL PESO UTERINO Y
EL INDICE MITOTICO DEL EPITELIO LUMINAL.

IONOFORO μg/cuerno	PESO UTERINO	PESO UTERINO %	INDICE MITOTICO
0.00	127 ± 5.0	0.053 ± 0.002	13 ± 6 ^a
0.01	133 ± 7.0	0.056 ± 0.002	4.5 ± 2.6 ^a
0.04	122 ± 6.3	0.045 ± 0.004	22 ± 9 ^a
0.08	122 ± 5.4	0.050 ± 0.001	91 ± 21 ^b

Después de 15 días de ooforectomía, se administraron en la luz uterina 20 μl de la solución de ionóforo a las dosis indicadas. 24 h después se determinó el peso uterino y el índice mitótico. Se presenta la $\bar{X} \pm E.E.$ de 8 experimentos. El índice mitótico expresa el número de células en metafase por cada 1 000 células. Las letras iguales indican grupos de datos homogéneos ($P \leq 0.05$).

Figura 3.- Correlación entre la dosis del ionóforo y el índice mitótico. El análisis de correlación se realizó empleando el programa Statgraphics y se obtuvo un coeficiente de correlación de 0.624 entre ambas variables.

INDICE MITOTICO

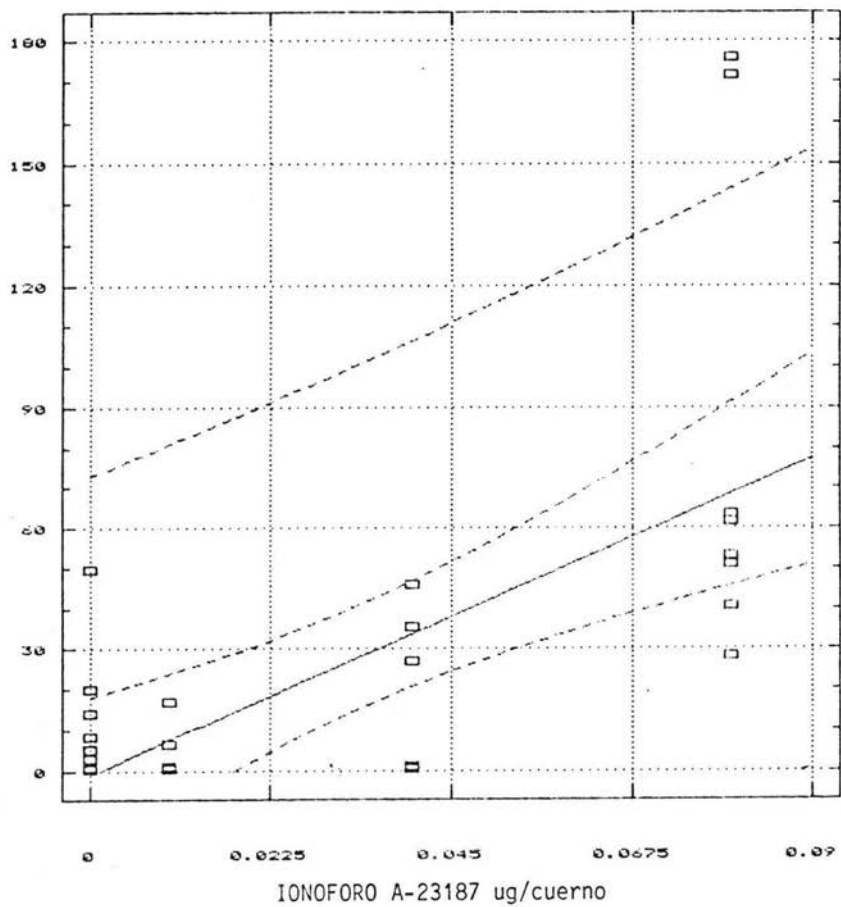


TABLA 5
 EFECTO DEL IONOFORO SOBRE LAS CONCENTRACIONES
 UTERINAS DE PROTEINAS, RNA Y DNA

IONOFORO μg/cuerno	PROTEINAS mg/g tejido	RNA mg/g tejido	DNA mg/g tejido
0	186.6 ± 3.4	5.0 ± 0.3 ^a	9.4 ± 0.5 ^a
0.01	111.6 ± 5.0	3.4 ± 0.3 ^b	7.7 ± 0.5 ^{ab}
0.04	187.9 ± 6.6	3.6 ± 0.8 ^b	7.2 ± 0.4 ^b
0.08	185.9 ± 7.3	4.4 ± 0.4 ^a	9.0 ± 0.6 ^a

Las condiciones experimentales fueron similares a las de la tabla 4, las determinaciones de proteínas, DNA y RNA se realizaron como se indica en material y métodos. Se presenta la $\bar{X} \pm$ E.E. de 6 experimentos separados. Las letras iguales indican grupos homogéneos de datos ($P \leq 0.05$).

TABLA 6
 EFECTO DEL IONOFORO SOBRE LAS RELACIONES ENTRE
 LOS DISTINTOS PARAMETROS BIOQUIMICOS .

IONOFORO μg/cuerno	RNA mg/mg de DNA	PROTEINAS mg/mg de DNA	RNA mg/mg de PROT.	DNA mg/mg de PROT.
0	0.52 ± 0.03	11.97 ± 0.30 ^b	0.043 ± 0.002	0.00 ± 0.002 ^b
0.01	0.44 ± 0.02	14.60 ± 1.02 ^a	0.030 ± 0.003	0.06 ± 0.006 ^a
0.04	0.49 ± 0.02	13.79 ± 0.44 ^b	0.034 ± 0.001	0.06 ± 0.002 ^a
0.08	0.40 ± 0.02	11.05 ± 0.79 ^b	0.042 ± 0.002	0.00 ± 0.003 ^b

Las condiciones experimentales fueron similares a las de la tabla 4. Se presenta la $\bar{x} \pm E.E.$ de 6 experimentos separados. Las letras iguales indican grupos de datos homogéneos ($P \leq 0.05$).

TABLA 7
 EFECTO DEL IONÓFORO SOBRE EL PESO UTERINO Y
 EL INDICE MITÓTICO DEL EPITELIO LUMINAL
 EN RATAS TRATADAS CON ESTROGENOS.

IONÓFORO μg/cuerno	PESO UTERINO	PESO UTERINO %	INDICE MITÓTICO
0.00	118 ± 9.6	0.053 ± 0.0045	338 ± 100
0.01	114 ± 10	0.053 ± 0.0065	323 ± 60
0.04	118 ± 13.6	0.056 ± 0.0045	281 ± 51
0.09	109 ± 5	0.049 ± 0.003	361 ± 60

Después de 15 días de ooforectomía se administraron en la luz del útero 20 μl del ionóforo a las dosis señaladas, a ratas tratadas 5 min antes con 17β-estradiol por vía subcutánea a una dosis de 10 μg/kg de peso, después de 24 h los úteros se pesaron y se determinó el índice mitótico del epitelio luminal como se describe en material y métodos. Se presenta la $\bar{x} \pm$ E.E. de 6 experimentos. El índice mitótico expresa el número de núcleos en metafase por cada 1 000 células. No se encontraron significativas entre los distintos tratamientos (P > 0.05).

TABLA 8
 EFECTO DEL IONOFORO SOBRE LAS CONCENTRACIONES
 UTERINAS DE PROTEINAS, RNA Y DNA EN RATAS
 TRATADAS CON ESTROGENOS

IONOFORO µg/cuerno	PROTEINAS mg/g tejido	RNA mg/g tejido	DNA mg/g tejido
0	88.4 ± 2.2	5.1 ± 0.3	7.9 ± 0.4
0.01	87.0 ± 2.6	5.0 ± 0.3	6.7 ± 0.2
0.04	92.0 ± 2.7	5.2 ± 0.4	7.9 ± 0.5
0.08	84.2 ± 3.2	5.2 ± 0.2	6.2 ± 0.7

Las condiciones experimentales fueron similares a las indicadas en la tabla 7. Las proteínas, el DNA y el RNA se determinaron como se indica en material y métodos. Se presenta la $\bar{X} \pm$ E.E. de 6 experimentos. No se encontraron diferencias significativas entre los distintos tratamientos ($P > 0.05$).

TABLA 9
 EFECTO DEL IONOFORO SOBRE LAS RELACIONES ENTRE
 LOS DISTINTOS PARAMETROS BIOQUIMICOS EN RATAS
 TRATADAS CON ESTROGENOS

IONOFORO μg/cuerno	RNA mg/mg de DNA	PROTEINAS mg/mg de DNA	RNA mg/mg de PROT.	DNA mg/mg de PROT.
0	0.66 ± 0.05	11.23 ± 0.41	0.057 ± 0.003	0.09 ± 0.003
0.01	0.72 ± 0.05	12.34 ± 0.92	0.058 ± 0.004	0.09 ± 0.004
0.04	0.66 ± 0.02	11.08 ± 0.04	0.056 ± 0.003	0.08 ± 0.005
0.08	0.98 ± 0.11	14.72 ± 1.08	0.060 ± 0.002	0.07 ± 0.009

Las condiciones experimentales fueron similares a las indicadas en la tabla 7. Se presenta la $\bar{X} \pm$ E.E. de 6 experimentos. No se encontraron diferencias estadísticamente significativas entre los distintos tratamientos ($P > 0.05$).

DISCUSION

En relación a los objetivos propuestos y para analizar la posibilidad de que el aumento temprano en la concentración de calcio intracelular inducido por estrógenos en las células del útero, participe estimulando o potenciando otras respuestas más tardías a la hormona como la proliferación celular, se estudió la acción de la administración del ionóforo A-23187 sobre los diversos parámetros bioquímicos y morfofuncionales uterinos con y sin la estimulación estrogénica previa. Lo anterior en vista de que el ionóforo permite la libre difusión de calcio a través de la membrana celular (43, 44, 46) y por tanto conduce a un aumento en la concentración intracelular de este catión.

En primer lugar se discute la acción del 17 β -estradiol sobre los parámetros bioquímicos estudiados, posteriormente se analiza la acción del ionóforo solo y asociado con estrógenos y si su acción imita o potencia a la de los estrógenos.

EFEECTO DEL 17 B-ESTRADIOL EN EL UTERO

La administración de estradiol subcutáneo a ratas adultas ovariectomizadas indujo la proliferación del epitelio luminal uterino como se nota en el incremento del IM de este tejido. No se evaluó cuantitativamente la proliferación en otros tejidos, sin embargo, en los cortes histológicos de los animales tratados con estrógenos se observaron imágenes mitóticas en el epitelio glandular, no así en los organismos ovariectomizados. Ello concuerda con la acción proliferativa de los estrógenos en el epitelio luminal y glandular, en ratas adultas ovariectomizadas, señalado por otros autores (10, 11, 36).

Lo anterior no se reflejó en el peso uterino (pu) tal vez debido a que los cambios fueron localizados en una pequeña porción del útero, el epitelio, por lo que el crecimiento de este tejido no se tradujo en un aumento notable del peso del útero completo.

El estradiol indujo un incremento en la concentración de

proteínas y RNA y una disminución de la concentración del DNA uterino. El aumento en proteínas y RNA pueden relacionarse con la inducción de crecimiento y proliferación celular, ya que los estrógenos inducen la síntesis de RNA y proteínas en el útero, incluso de proteínas específicas dependientes de su acción, lo que ocurre previo a la división celular (53-55). Es factible que también esté implicada una disminución de la velocidad en la degradación de proteínas y RNA.

Es posible que la acción de los estrógenos sobre las proteínas y el RNA, no se haya limitado sólo al epitelio, ya que los cambios encontrados, fueron evaluados en el útero completo. A pesar de que en las ratas adultas ovariectomizadas los receptores a estrógenos se localizan en los epitelios luminal y glandular, lo anterior es factible, debido a que estas hormonas, también inducen la síntesis de factores del crecimiento, como el de crecimiento epidérmico (EGF) y el insulinoide I (IGF-I) y estos a su vez podrían tener efectos paracrinos sobre otros tejidos (50-52).

A pesar del incremento en el IM del epitelio y por tanto del aumento previo en la síntesis del DNA, característico de la respuesta a estrógenos , se detectó una disminución en la concentración del DNA bajo la acción de la hormona, esto puede ser debido a un mayor crecimiento citoplásmico respecto al nuclear y por lo tanto al incremento en la proporción proteínas y RNA con respecto al DNA. Otra posibilidad es que los estrógenos hayan provocado la síntesis del DNA y la proliferación del epitelio, mientras que sus efectos sobre la concentración de proteínas y RNA también fuese sobre otros tejidos.

Los cambios en la concentración de proteínas, DNA y RNA fueron más notables cuando se correlacionan entre si y se elimina el probable efecto de la dilución por el contenido de agua del tejido.

EFEECTO DEL IONOFORO A-23187 SOBRE EL UTERO

Los ionóforos son antibióticos que permiten selectivamente la libre difusión de los iones a través de las membranas. Son herramientas útiles que se han empleado con frecuencia en el terreno experimental. Uno de éstos es el ionóforo A-23187, un acarreador de Ca^{+2} y Mg^{+2} que ocasiona un aumento en la concentración intracelular de calcio, que a su vez provoca una amplia variedad de respuestas (43, 57-59).

El calcio se ha relacionado con la proliferación celular y en cultivos de células, la estimulación con agentes mitogénicos o factores de crecimiento provoca un aumento importante en la concentración de calcio libre en el citosol previo a la división celular (9-11, 35-37, 60).

Los resultados demostraron que el empleo del ionóforo A-23187 a la concentración de $0.08 \mu\text{g}/\text{cuerno}$ induce una respuesta proliferativa del epitelio, la cual es estadísticamente significativa.

Las dosis de ionóforo fueron seleccionadas con base a las que otros investigadores han usado en modelos experimentales *in vitro* (61); sin embargo, no hay antecedentes de modelos en el organismo completo similares al empleado en el presente trabajo. De este modo en este estudio se detecta por primera vez una acción mitogénica del ionóforo cuando este es administrado *in utero*. El sistema es complejo y requiere de controles muy estrictos para poder establecer una conclusión. En primer lugar la manipulación del útero y la administración de líquidos en la luz uterina puede tener efectos en este órgano, los que se discutirán posteriormente. Así también, si el procedimiento causa daño al epitelio este puede proliferar para regenerarse del daño, de ahí que al control se le administró el mismo volumen del vehículo y el útero fue tratado de la misma manera que cuando se aplicó el ionóforo. Lo anterior fue esencial para discriminar entre el efecto del ionóforo y el efecto de la manipulación experimental y poder

concluir que la administración intraluminalmente del mismo, es capaz de inducir la proliferación del epitelio uterino.

EFECTO DEL IONÓFORO A-232187 SOBRE EL ÚTERO BAJO ACCIÓN ESTROGENICA

No se aprecia un efecto proliferativo del ionóforo en el útero bajo acción estrogénica. Lo anterior puede atribuirse a la gran variabilidad de la respuesta a estrógenos que también ha sido observada por otros autores empleando dosis única de 17β -estradiol (36), por ello los resultados obtenidos tienen una desviación estandar relativamente alta.

La administración simultánea de estradiol con el ionóforo no potenció el efecto proliferativo como se esperaba. Esto hace suponer que la acción mitogénica del estradiol puede deberse sólo en parte, a cambios intracelulares de calcio y operen otros mecanismos independientes de las concentraciones de calcio en la proliferación inducida por estrógenos. Esta idea concuerda con el hecho de que el ionóforo indujo una menor proporción de proliferación del epitelio respecto a la causada por el estrógeno.

El calcio es requerido en poblaciones de células en crecimiento, pero se desconoce cual sería su concentración óptima para que se lleve al cabo tal fenómeno, debido a que se ha observado que la movilización intracelular del catión no siempre promueve la proliferación cuando se emplean en otro tipo de células (63-67).

En la rata adulta ovariectomizada, el estradiol induce la división celular en el epitelio luminal (9-11,62), sin embargo, también puede ocasionar cambios en el peso uterino, no apreciados en el presente estudio, lo que obedece a dos eventos, el primero, más temprano y transitorio, que se observa 6 h después de su aplicación, está asociado con cambios en la irrigación y en la permeabilidad vascular que dan lugar a la imbibición de agua en el útero y el segundo se presenta después

de 24 h a la aplicación y corresponde básicamente al incremento de la proliferación celular (68).

De acuerdo con algunos autores (17,60), las células epiteliales representan del 5-10% del total de la población celular uterina. Esto, aunado a la gran variación de la respuesta mitogénica inducida por el estradiol, pudo enmascarar algunos cambios inducidos en el epitelio luminal, en el peso uterino y en los parámetros bioquímicos, aunque histológicamente se apreció un aumento del IM que no fue estadísticamente distinto al producido sólo por el estradiol.

En síntesis es posible que en la inducción de la proliferación celular por estrógenos participen diversos mecanismos, uno de ellos puede ser el cambio en el calcio libre intracelular, pero este quizá contribuya solo en parte al efecto global de la hormona.

EFFECTO DE LA ADMINISTRACION INTRALUMINAL DE VEHICULO SOBRE EL UTERO EN RATAS CON Y SIN ESTIMULACION ESTROGENICA.

La distensión del epitelio uterino ocasionada por la administración intraluminal de líquidos, promueve una respuesta proliferativa (70). Esta se puso de manifiesto al aplicar en la luz uterina 20 μ l de vehículo en cada cuerno y al compararla con el control (ratas con ooforectomía).

Los mecanismos moleculares precisos por los que la distensión del epitelio induce la respuesta mitogénica y el incremento en la concentración de RNA se desconocen. El aumento en el RNA puede indicar una mayor formación de proteínas en las células en fase de crecimiento (71).

En las ratas que recibieron estimulación estrogénica, la aplicación intraluminal del vehículo causó un aumento no significativo en el IM del epitelio luminal, lo que condujo a una mayor concentración del DNA por mg de proteínas

estadísticamente significativo, lo que indica que en estas condiciones se favorece la división respecto al crecimiento citoplásmico. La gran variabilidad de las respuestas encontradas pudo haber ocultado otros cambios.

CONCLUSIONES

- 1.- La administración de estrógenos en ratas adultas ovariectomizadas induce en el útero la proliferación del epitelio luminal, un aumento en la concentración de proteínas y RNA y una disminución en la del DNA.
- 2.- La aplicación intraluminal de ionóforo A-23187 induce una respuesta proliferativa estadísticamente significativa a la dosis de 0.08 μg /cuerno.
La respuesta proliferativa del epitelio no se acompaña de cambios significativos en las concentraciones de proteínas, DNA y RNA en el útero completo.
- 3.- La administración intrauterina del ionóforo A-23187 a ratas tratadas simultáneamente con estrógenos, no produjo cambios estadísticamente significativos con respecto a la proliferación del epitelio luminal, la concentración de proteínas, RNA, DNA y la relación peso uterino/peso corporal, cuando se compara con las ratas tratadas con estrógenos y el vehículo inyectado en la luz uterina.
- 4.- La aplicación intraluminal de 20 μl /cuerno del vehículo indujo el incremento en el índice mitótico, la concentración de RNA, el peso uterino y la relación peso uterino/peso corporal con respecto a los controles ovariectomizados.
La administración intraluminal del vehículo en ratas tratadas con estrógenos provocó un aumento no significativo del IM del epitelio luminal y uno significativo en la cantidad de DNA por mg de proteínas.

5.- Es posible que la proliferación del epitelio luminal inducida por los estrógenos sea mediada por diferentes mecanismos, entre los que se encuentra el aumento en la concentración del calcio libre intracelular.

APENDICE I.-CUANTIFICACION DE PROTEINAS, DNA Y RNA EN EL UTERO.

PROCESAMIENTO DEL TEJIDO.

Los úteros se cortaron en pequeños fragmentos y se homogeneizaron al 5 % p/v, en un homogeneizador Potter-Elvehjem de teflon-vidrio, manteniéndolo sobre un baño de hielo.

Posteriormente se agregó ácido tricloroacético, quedando a una concentración del 5 %, se mezcló e incubó por 15 min y se centrifugó a 5 000 rpm en una centrífuga clínica Sol-Bat por 5 min, a la pastilla obtenida se le agregó ácido perclórico 2 M, se mezcló e incubó a 70 ° C durante 30 min, después se centrifugó a 5000 rpm por 10 min , se recuperó el sobrenadante, en él se cuantificó el DNA por el método de Giles y Myres (48) y el RNA por el reactivo de orcinol (49). A la pastilla se le resuspendió en NaOH 1 N y se tomaron alícuotas para la determinación de proteínas por el método de Lowry (47).

DETERMINACION DE PROTEINAS POR EL METODO DE LOWRY.

REACTIVOS:

Solución A. Tartrato de sodio y potasio al 0.02 % , Carbonato de Sodio al 2 % (0.2 M) en hidróxido de sodio 0.1 N.

Solución B. Sulfato de cobre al 0.5%.

Solución C. Solución cupro-alkalina: Mezclar 50 volúmenes de la solución A mas un volumen de la B.

Reactivo de Folin-Ciocalteu. Diluido 1 a 2 al momento de usar.

Estándar de albúmina. Albúmina del suero de bovino 0.2 mg por ml.

PROCEDIMIENTO.

Colocar una alícuota de la solución problema en un tubo de ensayo, realizándolo por duplicado.

Procesarlos junto con el estándar de albúmina según el siguiente cuadro.

TUBO	ALBUMINA (ml)	PROBLEMA (ml)	AGUA DESTILADA (ml)	SOLUCION C (ml)
1	0.0	-	0.5	2
2	0.1	-	0.4	2
3	0.2	-	0.3	2
4	0.3	-	0.2	2
5	0.4	-	0.1	2
6	0.5	-	0.0	2
7	-	0.1 a 0.5	0 a 0.4	2

Mezclar cada tubo y reposar 10 min a temperatura ambiente.

Agregar a cada uno, 0.2 ml del reactivo de Folin, agitando y dejando reposar 20 min.

Leer la absorbencia a 550 nm en un espectrofotómetro Spectronic 21.

DETERMINACION DEL DNA POR EL METODO DE GILES Y MYRES.

REACTIVOS.

Solución A. Acido perclórico 2 M.

Solución B. Estándar de DNA.

a.-Solución concentrada (1 mg/ml).- Colocar 10 mg de DNA de timo de ternera y disolverlos en un matraz aforado de 10 ml con 8 ml de NaOH 5 mM. Agitar hasta su disolución (30 min) y aforar a 10 ml con la misma solución. Mantener en el congelador.

b.-Solución de trabajo (100 mg/ml). En un matraz aforado de 10 ml añadir 1 ml de la solución concentrada de DNA. Agregar 4 ml de ácido perclórico 2 M. Calentar a 70 ° por 15 min. enfriar y aforar a 10 ml con HClO₄ 2M. Mantener en el

congelador.

Solución C. Solución de acetaldehído. emplear material enfriado a 4 ° C.

a.-Solución concentrada. En un tubo mantenido en hielo se prepara una solución de acetaldehído a 16 mg/ml. Para ello se agregan 0.2 ml de acetaldehído a 9.8 ml de agua destilada.

Solución de trabajo. Se diluye 1:10 la solución concentrada, al momento de usarse.

Solución D. Difenilamina al 4 % en ácido acético glacial.

PROCEDIMIENTO.

Se realiza la siguiente curva estándar, procesando los problemas al mismo tiempo.

TUBO	ESTANDAR DE DNA (ml)	SOLUCION A (ml)	SOLUCION D (ml)	SOLUCION C (ml)
1	0.0	0.5	0.5	0.05
2	0.1	0.4	0.5	0.05
3	0.2	0.3	0.5	0.05
4	0.3	0.2	0.5	0.05
5	0.4	0.1	0.5	0.05
6	0.5	0.0	0.5	0.05
7	PROBLEMA			
	0.1 a 0.5	0.0 a 0.4	0.5	0.05

Incubar a 30 ° C durante 17 a 24 h.

Leer la absorbencia a 595 y 700 nm (la medición a 700 nm se realiza para corregir la turbidez debida a impurezas).

Se consideran las diferencias de absorbencia entre 595 y 700 nm.

DETERMINACION DEL RNA.

REACTIVOS.

Solución A. HClO_4 0.5 M.

Estándar de RNA. Hidrolizar 1 mg de RNA en un matraz aforado con 10 ml de solución A. Emplear RNA de levadura.

Solución B. 0.05 g de acetato cúprico disuelto en 10 ml de ácido acético glacial. Preparar al momento de usar.

Reactivo de orcinol. Orcinol al 1 % en HCl concentrado.

PROCEDIMIENTO.

Se realiza la siguiente curva estándar, procesando al mismo tiempo los problemas.

TUBO	ESTANDAR DE RNA (ml)	SOLUCION A (ml)	SOLUCION B (ml)	ORCINOL (ml)
1	0.0	1.0	0.2	1.5
2	0.2	0.8	0.2	1.5
3	0.4	0.6	0.2	1.5
4	0.6	0.4	0.2	1.5
5	0.8	0.2	0.2	1.5
6	1.0	0.0	0.2	1.5
7	PROBLEMA 0.2 a 1	0 a 0.8	0.2	1.5

Agitar los tubos e incubarlos en agua hirviendo durante 20 min.

Enfriarlos y leer la absorbencia a 660 nm.

BIBLIOGRAFIA.

1. Jensen, E. V.; Suzuki, T.; Kawashima, T.; Stumpf, W. E.; Jungblut, P. W. y De Sombre, E. R. (1968) A Two-Step Mechanism for the Interaction of Estradiol with Rat Uterus. PROC. NATL. ACAD. SCI. 59: 632-638.
2. Duval, D.; Durant, S. y Homo-Delarche, F. (1983) Non-Genomic Effects of Steroids. Interactions of Steroid Molecules with Membrane Structures and Functions. BIOCHEM. BIOPHYS. ACTA 737: 409-442.
3. Gorski, J.; Welhons, W. y Saki, D. (1984) Remodeling the Estrogen Receptor Model (Review) MOL. CELL. ENDOCRINOL. 36: 11-15.
4. Landers, J. P.; Spelberg, T. C. (1991) Updates and New Models for Steroid Hormone Action. ANN. N. Y. ACAD. SCI. 637:26-55.
5. Szego, C. M. y Davis, J. S. (1967) Inhibition of estrogen-induced elevations of cyclic 3', 5'-adenosine monophosphate in rats uterus. I. By β -adrenergic receptor blocking drugs. MOLEC. PHARMACOL. 5: 470-480.
6. 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.
7. Hicks, J. J. y Rosado, A. (1976) Steroids hormones and sperm metabolism. En: Briggs, H. H. (Edit.). Advances in Steroid Biochemistry and Pharmacology. Vol. 5. Academic Press, New York.
8. Pietras, R. J. y Szego, C. M. (1975) Endometrial Cell Calcium and Oestrogen Action. NATURE 253: 357-359.
9. Kirkland, J. L.; Mukku, V. R.; Hardy, M. y Stancel, G. M. (1984) Hormonal Control of Uterine Growth: Alterations in Luminal Epithelial Deoxyribonucleic Acid Synthesis after Intraluminal Application of Estrogen. ENDOCRINOLOGY 114(3): 969-973.
10. Quarumby, V. E. y Korach, K. S. (1984) The Influence of 17 β -estradiol on Patterns of Cell Division in the Uterus.

ENDOCRINOLOGY 114(3): 694-702.

- 11...Tomooka, Y.; Di Agustine, R. P. y McLachlan, J. A. (1986) Proliferation of Mouse Uterine Epithelial Cells In vitro. ENDOCRINOLOGY 118(3): 1011-1018.
- 12 Heskett, T. R.; Morris, J. D. H.; Moors, J. P. y Metcalfe, J. C. (1988) Ca^{2+} and pH Responses to Sequential Additions of Mitogens in Single 3T3 Fibroblasts: Correlation with DNA Synthesis. J. BIOL. CHEM. 263(24): 11879-11886.
13. Gelfand, E. W.; Cheung, R.K.; Mills, G.B. y Grinstein, S. (1988). Uptake of Extracellular Ca^{2+} and not Recruitment from Internal Stores is Essential for T Lymphocyte Proliferation. EUR. J. IMMUNOL. 18: 917-922.
14. Lakin-Thomas, P.L. y Brand. M.D. (1987) Mitogenic Stimulation Transiently Increases the Exchangeable Mitochondrial Calcium Pool in Rat Thymocytes. BIOCHEM. J. 246: 173-177
15. Finn, C.A. y Booth, J.E. (1977) The Physiological Effects of Estrogens and Progesterone. En: Zuckerman, * y Weir, B.S. (Edit.) The Ovary. Vol. II Cap. 3. pp. 151- 202. Academic Press, Inc. 2da. ed., New York.
16. Hafez, E.S.E. (1970) Female Reproductive Organs. En: Hafez, E.S (Edit.): Reproduction and Techniques for Laboratory Animals. Cap. 4, pp. 74-106 Lea y Febiger, Filadelfia.
17. Arau, E.J.; Bustos, O.E. y Ramos, C.A. (1981) Biología de la Reproducción Animal. Ed. Andrés Bello, Chile. p. 128
18. Hicks, J.J. (1981) Regulación endócrina de la implantación del cigoto de mamífero. Gac. Méd. Mex. 117: 510-520
19. Hicks, J.J. (1970). A propósito de la implantación del cigoto de mamífero. Ginec. Obstet. Méx. 50: 47-52
20. Fox, R.R. y Lair, C.W. (1970) Sexual Cycles. En: Hafez. E. S. (Edit.): Reproduction and Breeding Techniques for Laboratory Animals. (editado por E.S.E. Hafez) Cap. 5 pp 107-122. Lea y Febiger, Filadelfia.
21. Van Tiehoven, A. (1983) Reproductive Physiology of Vertebrates 2a. ed. Cornell University Press. United Kingdom.

pp. 196-249.

22. González-Merlo, J. (1988) Ginecología . Salvat, Barcelona, España.
23. Pérez-Palacios, G.; Larrea, F.; Cerbón, M.A. y Vilchis, F. (1988). Mecanismo de acción de hormonas esteroides. En: Hicks, J.J. y Díaz-Zagoya, J.C. (Edit.) Bioquímica. Facultad de Medicina, Universidad Nacional Autónoma de México, México, D.F. Vol. 2 pp. 93-125.
24. Stack, G. y Gorski, J. (1985) Relationship of Estrogen Receptors and Protein Synthesis to the Mitogenic effect of Estrogens. ENDOCRINOLOGY 117 (5): 2024-2032.
25. William-Ashman, H.G. y Reddi, A.H. (1971) Actions of Vertebrates Sex Hormones. ANN. REV. PHYSIOL. 33: 31-82.
26. Clark, J.H.; Markaverich, B.; Upchurch, S.; Ericksson, H.; Hardin, J.W. y Peck, E.J. Jr. (1980) Heterogeneity of Estrogen Responses. RECENT PROGR. HORM. RES. 36: 89-134.
27. Taylor, A.M.; Dandona, P.; Morrell, D.J. y Preece, M.A. (1988) Insulin like Growth Factor-I Protein Kinase-C, Calcium and Cyclic AMP: Patterns in the Regulation of Chondrocytes Mitogenesis and Metabolism. FEBS-Letters 236(1): 33-38.
28. Kumagai, N.; Benedict, S.H.; Mills, G.B. y Gelfand, E.W. (1988) Cyclosporin A Inhibits Inicitation but not Progression of Human T Cell Proliferation Triggers by Phorbol Esters and Calcium Ionophores. J. IMMUNOL. 141(11): 3747-3752.
29. Pardee, A.B. (1989) G1 Events and Regulation of Cell Proliferation. SCIENCE 246: 603-608.
30. Hill, D.J. (1989) Growth Factors and their cellular actions. J. REPROD. FERT. 85: 723-734.
31. Carafoli, E. y Penniston, J.T. (1986) La señal del calcio. INVESTIGACION Y CIENCIA 12: 28-37.
32. Rasmussen, H. y Barret, P.Q. (1984) Calcium Messenger System: and Integrated View. PHYSIOL. REV. 64 (3): 938-980.
33. Exton, J.H. (1988) Mechanism of action of Calcium-Metabolizing Agonists: Some Variations on a Young Theme. FASEB J. 2: 2670-2676.

34. Pestov, D.G. (1994) Genetic selection of growth-inhibitory sequences in mammalian cells. Proc. Natl. Acad. Sci. USA 91(26):12549-12553.
35. Mukku, V.R.; Kirkland, J.L.; Hardy, M. y Stancel, G.M. (1981) Stimulatory and Inhibitory Effects of Estrogen and Antiestrogen on Uterine Cell Division. ENDOCRINOLOGY 109(4): 1005-1010.
36. Schaltz, R.; Soto, A.M. y Sonnenschein, C. (1984) Estrogen-Induced Cell Multiplication: Direct or Indirect Effect on Rat Uterine Cells? ENDOCRINOLOGY 115(2): 501-506.
37. Soto, A.M. y Sonnenschein, C. (1984) Mechanism of Estrogen Action on Cellular Proliferation: Evidence for indirect and negative Control on Cloned Breast Tumor Cells. BIOCHEM. BIOPHYS. RES. COMMUN. 122(3): 1097-1102.
38. Rasmussen, C.D. y Means, A.R. (1989) Calmodulin, Cell Growth and Gene expression. TIBS 12(11): 433-438.
39. Ratan, R.R. y Shelan, M.L. (1986) Calcium and the regulation of mitotic events. TIBS 11: 456-459.
40. Moolenaar, W.H.; Aerts, R.J.; Tertoolen, L.G.J. y de Laat, S.W. (1986) The Epidermal Growth Factor-induced Calcium Signal in A-432 Cells. J. BIOL. CHEM. 261(1): 279-284.
41. Hennings, H.; Michel, D.; Steinert, P.; Holbrook, K. y Yusoa, S.H. (1980) Calcium Regulation of Growth and Differentiation of Mouse Epidermal cell in Culture. CELL 19: 245-254.
42. McGranth, Ch.M. y Sole, H.D. (1989) Calcium regulation of Normal Human Mammary Epithelial Cell Growth in Culture. IN VITRO 20(8): 652-662.
43. Fasolato, C. y Pozzan, T. (1989) Effect of Membrane Potencial on Divalent Cation Transport Catalized by the "Electroneutral" Ionophores A-23187 and Ionomycin. J. BIOL CHEM. 264(33): 19630-19636.
44. Babcock, D.F.; First, N.L. y Lardy, H.A. (1976) Action of Ionophore A-23187 at the Cellular Level. Separation of Effects at the Plasma and Mitochondrial Membranes. J. BIOL. CHEM. 251(3): 3881-3886.

45. Deber, Ch.M.; Pteiter, D.R. (1976) Ionophore A-23187 Solution Conformations of the Calcium Complex and Free Acid Deduced from Proton and Carbon-13 Nuclear Magnetic Resonance Studies. *BIOCHEMISTRY* 15(1): 132-141.
46. Reed, P.W. y Lardy, H.A. (1972) A23187: A Divalent Cation Ionophore. *J. BIOL. CHEM.* 247(21): 6970-6977.
47. Lowry, O.H.; Rosebrough, N.J.; Farr, L.A.; Randall, R.J. (1955) Protein measurement with the folin phenol reagent. *J. BIOL. CHEM.* 193: 265-275.
48. Giles, K.W.; Myres, H. (1966) An Improved Diphenylamine Method for the Estimation of Desoxyribonucleic Acid. *NATURE* 206:93.
49. Lin, R.J.; Soajeide, A. (1969) Microstimulation of RNA by the cupric ion catalized orcinol reaction. *ANNAL. BIOCHEM.* 27: 473-483.
50. Giudice, L. (1994) Growth factors and growth modulators in human uterine endometrium: Their potential relevance to reproductive medicine. *Fertil. Steril.* 61: 1-17.
- 51.- Mukku, V., Stancel, G. (1985) Regulation of epidermal growth factor receptor by estrogen. *J. Biol. Chem.* 260: 9820-9824.
- 52.- Carpenter, G., Cohen, S. (1979) Epidermal Growth factor. *Annu. Rev. Biochem.* 48: 193-216.
53. Tchernitchin, A.N., Mena, M.A.; Rodriguez A. (1985) Radioautographic localization of estrogen receptors in the rat uterus: a tool for the study of classical and nontraditional mechanism of hormone action. En: Perschuck, L.P.; Lee, S.H. (Edit.), *Localization of Putative Steroids Receptors*, Vol.1, Boca Ratón, F.L.: CRC Press. pp. 5-37.
54. Cicatiello, L.; Sica, V.; Bresciani, F.; Weisz, A. (1993) Identification of a specific pattern of "immediate-early" gene activation induced by estrogen during mitotic stimulation of rat uterine cells. *RECEPTOR* 3(1): 17-30.
55. Weisz, A.; Bresciani, F. (1993) Estrogen regulation of proto-oncogenes coding for nuclear proteins. *CRIT. REV.*

ONCOG. 4(4): 361-388.

56. Halling, A.; Fosberg, J.G. (1993) Acute and permanent growth effects in the mouse uterus after neonatal treatment with estrogens. REPROD. TOXICOL. 7(2): 137-153.
57. Schatz, F.; Markiewicz, L. y Gurside, E. (1987) Differential Effects of Estradiol, Arachidonic Acid, and A-23187 on Prostaglandins F α Output by Epithelial and Stromal Cells of Human Endometrium. ENDOCRINOLOGY 120(4): 1465-1471.
58. Cole, W.C. y Garfield, R.E. (1988) Effects of Calcium Ionophore A-23187 and Calmodulin Inhibitors on Intracellular Communication in the Rat Myometrium. BIOL. REPROD. 38: 55-62.
59. Nichols, D.G. (1982) Ion Transport Across Energy-Transducing Membranes. Cap. 2 en Bioenergetics, An Introduction to the Chemiostatic Theory. Academic Press.
60. Brigstock, D.R.; Heap, R.B. y Brown, K.D. (1989) Polipeptide Growth Factors in Uterine Tissues and Secretions. J. REPROD. FERTIL. 85: 747-758.
61. Rasmussen, H. (1970) Cell Communication, Calcium Ion, and Cyclic Adenosine Monophosphate. SCIENCE 170: 404-412.
62. Tsu-Hui, L. Kirkland, J. L.; Mukku, V. R. y Stancel, G. M. (1988) Regulation of Deoxyribonucleic Acid Polymerase Activity in Uterine Luminal Epithelium after Multiple Doses of Estrogen. ENDOCRINOLOGY. 122 (4): 1403-1409.
63. Harai, M.; Ishizuka, J.; Harai, A.; Bold, R. J.; Townsend, C. M. Jr. y Thomopson, J. C. (1993) Bombesin Stimulates intracellular Ca²⁺ mobilization but not proliferation on human colon cancer cells. LIFE SCI. 53 (24):1859-1865.
64. Martínez, J. y Santibañez, J. F. (1993) Extracellular calcium modulates proliferation of factor dependent hemopoietic cells. CELL. BIOCHEM FUNG. 11(2):101-105.
65. Short, A. D.; Bian, J.; Ghosh, T. K.; Waldron, R. T.; Rybak, S. L. y Gill, D. L. (1993) Intracellular Ca²⁺ pool content is linked to control of cell growth. PROC. NATL ACAD. SCI. 90 (11):4986-4990.

66. Sharpe, G.R.; Fisher, C.; Gillespie, J. I. y Greenwell, J. R. (1993) Growth and differentiation stimuli induce different and distinct increases in intracellular free calcium in human keratinocytes. ARCH. DERMATOL RES. 284(4):445-450.
67. Waldron, R.T; Short, A. D.; Meadows, J.J.; Ghosh, T. K. y Gill, D. L. (1994) Endoplasmic reticulum calcium pump expression and control of cell growth. J. BIOL. CHEM. 269(16):11927-11933.
68. Szego, C. M. y Roberts, S. (1953) Steroid Action and Interaction in Uterine Metabolism. RECENT. PROG. HORM. RES. 3:419-469.
69. Hafez, E. S. E. (1980) Laboratory Animals. En: Hafez, E.S. (Edit.): Reproduction in Farm Animals. Cap. 20, pp 409-422. Lea y Febiger, 4a. ed. Filadelfia.
70. Leroy, F.; Bogaert, C. y Hoeck, J. V. (1976) Stimulation of Cell Division in the Endometrial Epithelium of the Rat by Uterine Disention. J. ENDOCRINOL. 70:517-518.
71. Pardee, A. B.; Campisi, J. y Croy, R. G. (1982) Differences in Growth Regulation of Normal and Tumor Cells. ANN. N. Y. ACAD. SCI. --:121-129.