

31960

1
Lej



UNIVERSIDAD NACIONAL AUTONOMA DE MEXICO

ESCUELA NACIONAL DE ESTUDIOS PROFESIONALES

IZTACALA

DIVISION DE ESTUDIOS DE POSGRADO

**PARTICIPACION DE LA ACTIVIDAD LISOSOMAL
ENDOMETRIAL DURANTE LA ETAPA DE
PREIMPLANTACION EN LA RATA**

T E S I S

QUE PARA OBTENER EL GRADO DE:

MAESTRIA EN BIOLOGIA

DE LA REPRODUCCION

P R E S E N T A

Q.B.P. GENOVEVA DURAN REYES

DIRECTOR DE TESIS:

DR. JUAN JOSE HICKS GOMEZ

IZTACALA, EDO. DE MEX.

1996

**TESIS CON
FALLA DE ORIGEN**

**TESIS CON
FALLA DE ORIGEN**



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.

Esta tesis fué realizada en el laboratorio de Bioquímica de la Unidad de Investigación
médica en Bioquímica del Hospital de especialidades del Centro Médico Nacional Siglo
XXI del IMSS bajo la dirección y asesoría del Dr. Juan José Hicks Gómez

Al Dr. J.J. Hicks,

por el apoyo, la confianza y las facilidades que me brindó.

A mis sinodales

Dr. Efraín Mercado Pichardo

Dr. Luis Arturo Baiza Gutman.

M en Biol. Martha Verónica Oropeza Blando.

M. en C. Martín Palomar Morales.

por sus valiosas aportaciones

A mis compañeros del laboratorio,

de quienes en todo momento encontré apoyo y estímulo

A Rodolfo mi esposo, con amor

A mis hijos Rodolfo e Iliana, mi orgullo

A mis padres

A mis hermanos.

INDICE

RESUMEN.

INTRODUCCION

Generalidades de los lisosomas

Participación de los lisosomas en los eventos regulados por hormonas.

La implantación embrionaria.

HIPOTESIS.

Planteamiento del problema.

Hipótesis alternativa (H_A).

Hipótesis nula (H_0).

OBJETIVOS.

Objetivo general.

Objetivos particulares.

METODOLOGIA.

Tratamiento de los animales

Actividad lisosomal en el sitio de implantación (lote "1").

Efecto de la dexametasona (lote "2").

Efecto de la colchicina (lote "3").

Transformación de colchicina a lumicolchicina.

Determinaciones.

Microscopía electrónica.

RESULTADOS.

Actividad lisosomal en el sitio de implantación (lote "1").

Efecto de la dexametasona (lote "2").

Efecto de la colchicina (lote "3").

DISCUSION.

CONCLUSIONES

BIBLIOGRAFIA

RESUMEN

Actualmente los lisosomas son considerados orgánulos que participan en los diversos procesos del metabolismo celular, incluyendo los regulados hormonalmente. La actividad lisosomal se ve alterada minutos después de la administración tanto de hormonas esteroides como de peptídicas. Efectos como la labilización de las membranas, cambios en la estructura química de las hidrolasas (latencia estructural) y migración perinuclear preceden a las alteraciones enzimáticas ocurridas.

El grupo de Clara Szego y col. observaron en la glándula prepucial y en el útero de la rata la penetración de enzimas lisosomales al nucleoplasma 15 minutos después de la inyección intravenosa de dosis fisiológicas de 17- β -estradiol, además, encontraron que dichos efectos fueron suprimidos por los glucocorticoides. Otras hormonas como la ACTH, la ADH, la LH, la hGC y la prolactina inducen el aumento de la actividad de hidrolasas lisosomales en sus células blanco. La administración de estrógenos por vía sistémica provoca en el endometrio de la rata un aumento en la permeabilidad de la membrana celular, así como cambios en el patrón de enzimas lisosomales indispensables para la formación de la cámara de implantación. En el presente trabajo se demostró la redistribución de las actividades de la fosfatasa ácida y la β -glucuronidasa provocada por el momento endócrino de la implantación, así como la importancia que tienen la labilización de las membranas lisosomales y la translocación de los lisosomas en este fenómeno. También se observaron los efectos sobre las actividades enzimáticas, la implantación y el desarrollo embrionario provocados al impedir la labilización (con dexametasona) y la translocación lisosomal (con colchicina). **Metodología:** Se determinaron espectrofotométricamente las actividades de la fosfatasa ácida y la β -glucuronidasa en el sitio (S) y no sitio de implantación (NS) de ratas normales y bajo tratamiento con dexametasona o colchicina. Además, se realizó un estudio histoquímico de microscopía electrónica para localizar la actividad de la fosfatasa ácida (FA) y la ubicación de los lisosomas. **Resultados:** Se encontró mayor actividad de las dos enzimas en los núcleos de las células del S que en los del NS. La microscopía electrónica reveló la presencia de precipitados correspondientes a la actividad de fosfatasa ácida en los núcleos de las células del S, así como la localización perinuclear de los lisosomas. La dexametasona y la colchicina impiden estos resultados. **Conclusión:** La actividad enzimática se encuentra más elevada en la fracción nuclear del S que en la del NS y la dexametasona y la colchicina impiden este aumento. La implantación y el desarrollo embrionario también se inhibieron por el efecto de estos compuestos.

INTRODUCCION

El antiguo concepto del lisosoma como "suicide bag" ha sido reemplazado por el papel de éste en los procesos regulados hormonalmente.

Generalidades de los lisosomas

Los lisosomas son espacios intracelulares rodeados de membrana fosfolipídica, que presentan gran diversidad y polimorfismo. Su identidad generalmente se hace al microscopio electrónico por medio de la identificación de sus enzimas; de estas técnicas, la determinación histoquímica para la fosfatasa ácida se utiliza con frecuencia¹.

Bioquímicamente estos orgánulos son vesículas con capacidades enzimáticas, de las cuales, destaca la reacción que produce el rompimiento de algunas macromoléculas del organismo en presencia de agua (hidrólisis). La batería de hidrolasas contenida en los lisosomas incluye más de 60 enzimas que hidrolizan entre otros, ácidos nucleicos, proteínas, carbohidratos y lípidos. Entre las enzimas lisosomales se pueden mencionar: ribonucleasa ácida, desoxiribonucleasa ácida, catépsinas, colagenasas, glucosidasas, β -N-acetil-glucosaminidasa, β -glucuronidasa, β -galactosidasa, manosidasa y aril sulfatasas, todas contenidas en un medio ácido intralisosomal de pH 4.5-5.5 que se mantiene por una bomba de protones dependiente del ATP².

Ya que las enzimas lisosomales son capaces de hidrolizar membranas, estos catalizadores se encuentran en el medio intralisosomal en forma inactiva (latencia estructural), la cual debe cambiar cuando las enzimas se liberan al medio

extralisosomal. Así mismo, las membranas lisosomales sufren cambios en su configuración bioquímica (labilización membranal) como un resultado no genómico producido inmediatamente después de la interacción del agonista con los receptores de la célula blanco³.

Participación de los lisosomas en los eventos regulados por hormonas

La participación de las enzimas lisosomales en el inicio de los eventos metabólicos que conducen a los procesos de crecimiento y diferenciación inducidos por las hormonas esteroides, ha sido ampliamente estudiado por el grupo de Clara Szego^{4,5,6}. En la glándula prepucial y en el útero de la rata, estos investigadores han observado la rápida penetración de enzimas lisosomales al nucleoplasma dentro de 2 a 15 minutos después de la inyección intravenosa de dosis fisiológicas de 17β -estradiol, testosterona o AMPc⁶, por lo que sugirieron que dichas enzimas podrían participar en los mecanismos de des-represión génica⁵. Además, dentro de los primeros minutos después de la administración intravenosa del 17β -estradiol (pero no su epímero 17α), en la glándula prepucial de la rata se han encontrado modificaciones en el patrón electroforético de las proteínas constituyentes de la cromatina, así como el aumento en la concentración del AMPc, ambos cambios son simultáneos al aumento de la actividad de enzimas lisosomales tales como la fosfatasa ácida y la β -glucuronidasa.

Otras hormonas como la ACTH en la corteza suprarrenal de la rata⁷, la ADH en la vejiga de anfibio⁸, la LH y hGC en los ovocitos⁹ y la prolactina en la glándula hipofisaria de la rata, inducen el aumento de la actividad de hidrolasas lisosomales en el medio extracelular de las células blanco minutos después de la administración de la

hormona, por lo que se apoya la hipótesis de que la actividad lisosomal es regulada hormonalmente.

En el endometrio de la rata, los estrógenos producen dentro de los dos minutos después de su administración, múltiples signos de perturbación de las membranas plasmáticas de las células blanco, como son la acumulación de receptores en sitios específicos y aumento del número de microvellosidades en las células del epitelio luminal¹⁰. En este órgano, la acción de los estrógenos es necesaria para el aumento de permeabilidad de la membrana celular, así como los para cambios en el patrón de enzimas lisosomales indispensables para la formación de la cámara de implantación en la rata y el ratón y para la reacción de unión del blastocisto en el conejo¹¹.

Por ser la implantación en la rata un fenómeno dependiente de estrógenos, nos hemos interesado en la participación que tienen los lisosomas durante este proceso.

La implantación embrionaria

La implantación embrionaria puede definirse como el proceso mediante el cual el embrión adquiere una posición fija en los tejidos maternos, normalmente el endometrio, y se establece una íntima relación entre ambos. Para que la implantación se efectue se requiere de la interacción coordinada entre el embrión y el útero, el embrión debe de haber alcanzado el estado de blastocisto y en el útero deben haber ocurrido cambios dependientes de hormonas que conduzcan al desarrollo de un endometrio receptivo¹².

La implantación del blastocisto marca, por lo tanto, el inicio de una asociación estrecha entre tejidos de distinta constitución genética y es un proceso clave en los organismos que se desarrollan dentro de la madre y cuya nutrición depende de ella.

Una vez realizada la fecundación del óvulo de mamífero se inician una serie de eventos paralelos que conducen por un lado al desarrollo del cigoto hasta el estadio de blastocisto¹³ y por el otro, a las modificaciones morfológicas y funcionales del endometrio, el que adquiere las características necesarias que lo hacen receptivo el día de la implantación¹⁴. Los factores extrínsecos al cigoto que influyen en su desarrollo y diferenciación, se originan fundamentalmente en los tejidos tubario y endometrial¹⁵, la composición iónica del medio y la presencia de elementos necesarios para la biosíntesis del ATP, son dos factores esenciales en estos procesos.

Empleando técnicas de cultivo de embriones preimplantados, se ha medido la utilización por éstos, de sustratos radioactivos a partir del medio, demostrándose que los embriones de una célula utilizan preferentemente piruvato y oxaloacetato; los de dos células ya emplean lactato y la capacidad para utilizar glucosa se presenta en el estadio de ocho células.

También se ha estudiado la incorporación de precursores de nucleótidos, ácidos nucleicos y proteínas¹⁶. Los embriones preimplantados incorporan nucleósidos, bases púricas (guanina) y pirimidicas (timina). La captación de guanina por embriones de ratón tiene un aumento lineal ente los estadios de 2 a 18 células. Al captarse esta base púrica por el embrión es rápidamente convertida en GMP, y éste nucleótido a su vez es fosforilado a GDP y GTP, teniendo a partir de éste momento otras dos posibles trayectorias metabólicas: incorporarse a los ácidos nucleicos o formar GMPc^{16, 17}. Además, el embrión cuenta con los sistemas de transporte para tomar del medio aminoácidos como metionina, glicina, asparagina, lisina, tirosina y leucina¹⁷.

Por otro lado, en la diferenciación del tejido endometrial durante la implantación, destaca la formación de zonas diferenciadas morfológica y funcionalmente denominadas sitios de implantación (rata, ratona, criceto y hurón)¹⁸. Los sitios de implantación en la rata, son zonas de tejido endometrial que se caracterizan por presentar las modificaciones fisiológicas y estructurales adecuadas que permitan la nutrición del embrión y eviten el rechazo inmunológico que debe desarrollar el útero¹⁹ ante la presencia del blastocisto. Estas zonas pueden ser detectadas unas horas antes de que el blastocisto se adhiera al epitelio luminal, ya que presentan una mayor permeabilidad cuando se comparan con las zonas tisulares adyacentes o con el endometrio de animales no gestantes. Esta última propiedad ha permitido la visualización macroscópica de bandas azules en la rata y la ratona²⁰ después de la administración endovenosa de azul de tripan al 5º día de embarazo (considerándose como día cero cuando se encuentran espermatozoides en el frotis vaginal)^{21, 22}.

El estímulo y los factores esenciales que se requieren para inducir este incremento en la permeabilidad vascular, no se han dilucidado perfectamente, sin embargo, se ha propuesto la participación de la histamina, nucleótidos cíclicos, estrógenos producidos por el blastocisto y de manera muy importante las prostaglandinas²², estas últimas se encuentran elevadas en aquellas zonas del endometrio capaces de recibir al blastocisto (SI)²³. Recientemente se ha demostrado que el tejido decidual del útero de la rata preñada aumenta su capacidad para sintetizar prostaglandinas²⁴ aproximadamente 5 minutos después de la estimulación local debida a la presencia del blastocisto y que los estrógenos estimulan la síntesis de esta hormona. En animales pseudopreñados, se demostró que la máxima concentración de prostaglandinas ocurre el día cinco, mientras que la de los estrógenos el día 4, por lo

que se ha sugerido que las prostaglandinas pudieran ser los mediadores de la acción estrogénica en este proceso²⁵.

La regulación endócrina del proceso de implantación ha sido exhaustivamente estudiada^{19, 21} principalmente en la rata, dada la facilidad metodológica para controlar el día de embarazo y el momento de la implantación¹⁹. En ésta especie es factible realizar ovariectomía dos días después de la fertilización, sin que se interrumpa el proceso de diferenciación endometrial (siempre y cuando la función ovárica se sustituya administrando progesterona por dos días a partir de la intervención quirúrgica y posteriormente un pulso de 17 β -estradiol), lo que permite que ocurra la implantación al 5º día^{26, 27}.

Los estrógenos estimulan el crecimiento, desarrollo y diferenciación uterina por medio de respuestas tempranas y tardías. Las tempranas incluyen cambios como irrigación sanguínea aumentada, liberación de histamina, producción de AMPc y aumento en la concentración de electrolitos activos osmóticamente, estos últimos inducen la retención de agua. Por otro lado, los eventos tardíos involucran aquellos cambios metabólicos que dependen de la existencia del complejo receptor-estrógeno.

Los esteroides suprarrenales, particularmente aquellos con los grupos 11-oxi y 17-hidroxi antagonizan muchas respuestas estimuladas por estrógenos en los tejidos del aparato reproductor. Por ejemplo, el cortisol reduce significativamente la incorporación de ³²P y de (¹⁴C)alanina en proteínas uterinas 20 horas después de la administración de estradiol (cuando el útero tiene un alto índice mitótico). Los glucocorticoides también inhiben actividades enzimáticas asociadas con el metabolismo estimulado por estrógenos²⁸.

Se sabe que uno de los efectos de la dexametasona es su acción inhibitoria sobre la síntesis de las prostaglandinas²⁹. Este glucocorticoide suprime dicha síntesis al estimular la producción de una proteína inhibitoria de la fosfolipasa A₂; sin embargo, la producción de esta proteína específica requiere de la síntesis de RNA, por lo que el efecto no es inmediato, no obstante, este glucocorticoide posee efectos tempranos que no dependen del complejo receptor-estrógeno.

La dexametasona administrada por 4 días es muy efectiva en bloquear la implantación que es inducida por 20 ng de estradiol³⁰. No se conoce el mecanismo por el cual se efectúa esta inhibición, pero se sabe que otros glucocorticoides producen una disminución en la afinidad y en el número de receptores estrogénicos en el útero³¹. La iniciación del proceso de implantación involucra acciones estrogénicas no genómicas³² que son evitadas por los glucocorticoides, por lo que estos compuestos podrían impedir la implantación por contraponerse a la acción de esta hormona sobre la permeabilidad lisosomal^{33, 34}.

La participación de los lisosomas durante la fase de implantación ha sido considerada en diversas especies (la rata³⁵, el conejo³⁶, los bovinos³⁷ etc) incluyendo al humano^{38, 39}. Se ha encontrado mayor actividad de las enzimas lisosomales tales como la fosfatasa ácida, la β -glucuronidasa, ribonucleasas y catepsinas en el medio intra y extracelular del sitio de implantación que en el intersitio.

La labilidad de la membrana de los lisosomas de las células endometriales obtenidas de ratas ovariectomizadas se aumenta minutos después de la administración de 17 β -estradiol y los glucocorticoides ejercen un efecto opuesto al estabilizar la membrana de éstos orgánulos³³. El efecto hidrolítico lisosomal producido después de la

La estabilización lisosomal es muy importante en el proceso de implantación, debido a que los lisosomas del epitelio endometrial intervienen en la remoción de barreras que impiden la penetración del blastocisto³⁹ y los "lisosomas blanco" de las células endometriales (decidua y su epitelio) participan como transportadores de estrógenos hacia el núcleo celular. Se ha demostrado³³ que estos orgánulos transportan esteroides de la periferia al núcleo al nucleoplasma de las células blanco y a su vez, sus enzimas se introducen al núcleo, donde pueden tener un efecto potencial como des-represores del DNA al poder hidrolizar represores de diferente composición molecular incluyendo histonas⁴⁰.

Los lisosomas están integrados al citoesqueleto, debido a que es necesario un rearrreglo de la citoarquitectura para que éstos se desplacen⁴¹. Dicho reacomodo es dependiente de hormonas, ya que después de la administración de estrógenos se presentan alteraciones en el sistema de microvellosidades y microtúbulos⁴¹.

Por microscopía electrónica se ha encontrado una estrecha relación entre lisosomas y microtúbulos, por lo que resultaría interesante demostrar que durante la implantación, la translocación de los lisosomas hacia el núcleo depende de la polimerización de tubulina⁴¹.

La tubulina participa en el movimiento saltatorio de los lisosomas (movimiento característico de los lisosomas sobre filamentos de tubulina que permite que éstos orgánulos se desplacen a distintos compartimentos celulares, incluyendo el núcleo), debido a que los fármacos que impiden la polimerización de tubulina (como la colchicina) paralizan este movimiento con sus respectivas consecuencias⁴¹.

La colchicina, vinblastina y otras drogas que despolimerizan microtúbulos inhiben el movimiento de inclusiones celulares tales como las vesículas de los axones nerviosos y gránulos de pigmento y de material de secreción. Además, estos fármacos alteran el movimiento saltatorio de los endosomas en los macrófagos y las células HeLa, y en las células de los tubulos proximales renales bloquean la migración basal de las vesículas endocíticas.

La colchicina inyectada en el epitelio uterino de la rata antes de la administración intraluminal de ferritina tiene poco efecto sobre la captura del marcador por las células epiteliales, pero inhibe significativamente el movimiento de los lisosomas que contienen ferritina desde el ápice a la base de las células. Dicho efecto depende de la dosis. La migración lisosomal hacia el núcleo es inhibida por glucocorticoides y activada por 3'5'dibutilil AMPc pero no por AMP³³.

HIPOTESIS

Planteamiento del problema.

Los lisosomas participan en los eventos regulados por estrógenos al translocar su contenido enzimático al núcleo y de ésta manera posiblemente contribuyen con la des-represión del DNA, (se ha encontrado la presencia de hidrolasas lisosomales en el núcleo minutos después de la administración de 17 β -estradiol). Ya que la implantación en la rata es un fenómeno dependiente de un pulso de estrógenos, nos planteamos las siguientes hipótesis:

HA.- En los núcleos de las células del sitio de implantación debe haber mayor actividad de hidrolasas lisosomales que en los de los intersitios, este efecto se debe al

momento endócrino (posiblemente estrógenos) y depende de la translocación de lisosomas a la región perinuclear. Como consecuencia de lo anterior, la implantación y la viabilidad fetal se ven afectadas.

Ho.-No hay diferencias entre las actividades nucleares del sitio e intersitio de implantación y un antagonista de estrógenos y otro de la translocación lisosomal no alteran los cambios ocurridos. La implantación y la viabilidad fetal no se ven afectadas por lo anterior.

OBJETIVOS

Objetivo general

Demostrar en el endometrio de la rata durante la implantación la redistribución subcelular de la actividad enzimática de dos hidrolasas marcadoras de los lisosomas; fosfatasa ácida y β -glucuronidasa (la implantación en la rata es dependiente de un pulso de estrógenos).

Objetivos particulares

a) Suprimir la redistribución enzimática encontrada, con un compuesto que antagoniza la labilización lisosomal producida por estrógenos (dexametasona), y de esta manera demostrar que la re-distribución es un fenómeno regulado por el momento endócrino.

b) Impedir la translocación lisosomal con un compuesto que evite la formación de microtúbulos (colchicina), con el fin de demostrar que la re-distribución enzimática es una consecuencia del desplazamiento de los lisosomas.

c) Observar macroscópicamente los efectos anteriores sobre la implantación y la viabilidad fetal.

METODOLOGIA

Tratamiento de los animales

Se utilizaron ratas hembras Sprague-Dowley de 2.5 meses de edad con un peso aproximado de 250 g las cuales se mantuvieron bajo condiciones controladas de luz y temperatura, así como con alimentación y agua *ad libitum*. Estas se aparearon por el método de trío con machos de fertilidad comprobada y 24 horas después se realizó citología vaginal; el día que se observaron espermatozoides en el lavado, se consideró como día cero de embarazo. En estas condiciones se utilizaron tres lotes de ratas (1, 2 y 3).

Lote "1": actividad lisosomal en el sitio de implantación.

Entre las 7.30 y 8.00 horas del 5º día de preñez, cada una de las ratas recibió 1 ml de colorante azul de tripán (1% p/v) por vía intravenosa y 60 minutos después se sacrificaron por dislocación cervical. Enseguida el útero se extrajo y se liberó de la grasa, y las regiones teñidas de azul (sitios de implantación) y no teñidas (sitios de no implantación) se procesaron por separado. En ambas regiones el epitelio luminal fue

separado del estroma utilizando el método de Fagg⁴²; éste consiste en someter cortes transversales del útero (de 5 mm) a la agitación mecánica con perlas de vidrio con la finalidad de separar el epitelio del estroma. Los dos tejidos obtenidos se homogeneizaron al 20% con una solución de sacarosa-Tris-HCl (0.25M., 50mM., pH 7.5), adicionada con Mg₂Cl 5mM y KCl. 25mM. El aparato utilizado para estos fines fué un homogeneizador "Caframo" Wiarion Ont Stirrer Tipe RZRI-64 con tubo y pistilo de vidrio. En seguida los homogenizados se centrifugaron a 3000 r.p.m por 15 min con la finalidad de obtener un sedimento enriquecido de núcleos, al que previa suspensión en un gradiente de sacarosa 2M se le practicó otra centrifugacion de 19 000 rpm durante 30 min. Por otro lado, el sobrenadante de las 3000 rpm también se recentrifugó a 19000 rpm por 30 min para obtener un paquete lisosomal y un sobrenadante citosólico⁴³. En todos los casos se utilizó una ultracentrifuga Sorval modelo RC2-B con un rotor 65 Ti y durante todo el proceso se trabajó a 4°C.

Para la microscopía electrónica se seccionó un fragmento de endometrio correspondiente al sitio y otro al no sitio e inmediatamente se colocaron en una solución de paraformaldehido al 10% hasta el momento de iniciar los cortes.

Lote "2": efecto de la dexametasona.

Este lote se dividió en 6 grupos de 10 ratas cada uno (A al F), en donde los grupos A,B y C se consideraron como controles y los grupos D,E y F fueron los tratados con dexametasona. A cada una de las ratas de los grupos D,E y F, se le administraron por vía subcutánea dos dosis de 0.8 mg. de 21-isonicotinato de dexametasona (Chinoín de México) contenidos en 50 µl de solución salina al 0.9%; la primera el día 3 y la

segunda el 4º día de embarazo. A las ratas de los grupos A, B y C se les trató solo con solución salina al 0.9%.

Al 5º día de embarazo (24 h después de la segunda dosis de dexametasona), las ratas de los grupos A,B,D y E recibieron por vía intravenosa 0.9 ml de colorante de azul de tripán al 1% p/v. Una hora después, las ratas de los grupos A y D se sacrificaron con la finalidad de extraer el útero y procesarse como en el lote "1" para la separación de los dos tejidos endometriales, el fraccionamiento subcelular y las determinaciones enzimáticas.

Las ratas pertenecientes a los grupos B y E se sometieron a laparotomía ventral (anestesiadas con 3 mg/Kg de droperidol como relajante muscular y 8mg/Kg de ketalar como anestésico) con la finalidad de contar las zonas teñidas con el colorante (sitios de implantación), después se suturaron para dejarlas evolucionar hasta el día 14 de preñez, tiempo en el cual se sacrificaron e hicieron todas las observaciones anatómicas relacionadas con el desarrollo embrionario. Las ratas de los grupos C y F no fueron sometidas a intervención quirúrgica; solo se dejaron evolucionar hasta el día 14 de embarazo, y como en el caso anterior se sacrificaron y se realizaron las observaciones morfológicas.

Lote "3": efecto de la colchicina.

El lote 3 formado por los grupos "a" y "b" (cada uno de 8 ratas del 4º día de preñez) fué utilizado para demostrar el efecto de la colchicina. Las ratas de los dos grupos se inyectaron (previa laparotomía ventral) en el lumen del cuerno uterino derecho (cuerno tratado) con una solución de 12.5 nmoles de colchicina contenidos en

50 μ l de solución salina isotónica y en el izquierdo (cuerno control) 50 μ l de *lumicolchicina a la misma concentración. Al día siguiente (5^o día de embarazo), las ratas del grupo "a" se sacrificaron por dislocación cervical una hora después de la inyección intravenosa de azul de tripán. Los sitios de implantación como los intersitios así obtenidos, se procesaron como en los grupos anteriores para separar epitelio y estroma, obtener las fracciones subcelulares y determinar en cada una de ellas las actividades de fosfatasa ácida y β -glucuronidasa. Para las observaciones morfológicas del desarrollo embrionario, las ratas del grupo "b" se dejaron evolucionar hasta el día 14 de embarazo.

**Debido a que la colchicina es un compuesto que presenta diversos efectos colaterales, el control elegido para medir su efecto es un isómero de este alcaloide, denominado lumicolchicina⁴⁴.*

Transformación de colchicina a lumicolchicina.

La colchicina en solución acuosa, es sensible a la irradiación con luz ultravioleta convirtiéndose en una mezcla de isómeros de colchicina (β - y γ -lumicolchicinas). La β - y γ -lumicolchicinas son estereoisómeros formados por un arreglo del anillo "C" de la colchicina⁴⁴

La colchicina se disolvió en solución salina 0.85% y se ajustó a una concentración tal que produzca una absorbancia de 0.5 a 350 nm. Posteriormente esta solución se colocó en una celdilla de cuarzo de 1.4 ml (1cm. de paso de luz) exactamente a 6 cm de una fuente de luz ultravioleta de 365 nm. Después de 5 min de irradiación la cubeta fué rápidamente transferida al espectrofotómetro para leer la

absorbancia a 350 nm y regresada a la fuente de luz ultravioleta para continuar la irradiación durante 90 min (con lecturas cada 5min), tiempo en el cual se llevó a cabo la completa transformación de la colchicina; ésta se manifestó por la disminución de la absorbancia. La irradiación se realizó en un Spectroline model ENF-260C 115 volts Spectronics Corporation Westbury, New York USA.

Determinaciones

En las fracciones subcelulares obtenidas se midió la actividad de dos hidrolasas marcadoras lisosomales: fosfatasa ácida y β -glucuronidasa, y como parámetros de referencia DNA y proteínas, además, se realizó microscopía de luz y electrónica.

La determinación de la fosfatasa ácida se llevó a cabo por el método de Besey⁴⁵ que mide la liberación de paranitrofenol a partir de la acción de la enzima sobre el sustrato de paranitrofenil-fosfato-disódico. Una alícuota de 0.1 mg de proteína en presencia de un amortiguador de acetato de sodio 0.1M ajustado a pH 4.8 se incubó durante 30' con 2 μ moles de paranitrofenol-fosfato-disódico. Transcurrido ese tiempo la reacción se detuvo con Na_2CO_3 0.25M y se leyó la absorbancia a 400nm para medir el paranitrofenol que en medio alcalino produce una coloración amarilla.

La actividad de la β -glucuronidasa⁴⁶ se midió por la acción de ésta sobre el conjugado de fenoltaleína-ácido glucurónico en un medio a pH de 5.0; de esta reacción se libera fenoltaleína, que en un medio básico produce una coloración rosa. Una alícuota que contenga 1 mg. de proteína de la fracción subcelular correspondiente se incubó por 1 h con 0.2 μ moles del conjugado de fenoltaleína-ácido glucurónico en presencia de un amortiguador de acetato de sodio 0.1M, pH 5.0. Transcurrido ese

tiempo, se midió a 540nm la aparición de un color rosa después de adicionar un amortiguador de glicina 0.5 M, pH 10.4.

Las proteínas se determinaron por el método de Lowry⁴⁷ con el reactivo de Folin Ciocalteu y las de DNA por el método de Giles y Myres⁴⁸ con difenilamina en ácido acético y en presencia de acetaldehído.

Para el análisis estadístico se utilizó la prueba de "t" de Student, y una $p \leq 0.05$ se consideró significativa.

Microscopía electrónica

Para determinar histoquímicamente la actividad de la fosfatasa ácida se procedió conforme el método de Holt⁴⁹ que tiene por fundamento agregar al tejido un sustrato liberador de fosfatos (paranitrofenilfosfato disódico). Los fosfatos liberados se hacen reaccionar con sales de metales pesados para formar compuestos densos al microscopio electrónico

La metodología consiste básicamente de los siguientes pasos:

1.- Prefijación (a 4°C): Colocar los segmentos de tejido tanto del sitio como no sitio durante 24 hr en paraformaldehído al 4%, amortiguador de fosfatos 0.1M pH 7.2 y sacarosa al 7.5%. Terminado este tiempo, colocar la muestra durante 30 min en glutaraldehído al 3% y amortiguador de cacodilato de Na 0.1M, pH 7.2.

2.-Lavado: durante 30 minutos en amortiguador de acetato de sodio 50 mM pH 4.5 y sacarosa al 7.5%, a 4°C.

3.-Incubación con el sustrato durante 30 min en amortiguador de acetato de sodio 50 mM pH 4.5 y sacarosa al 7.5%, 1mg/ ml de acetato de plomo y 1mg/ml de paranitrofenil fosfato disódico, a 37°C.

4.-Lavado por 30 min en amortiguador de acetato de sodio 50mM pH 4.5 y sacarosa al 7.5%, a 4°C.

5.-Post-fijación durante 60 minutos en OsO₄ al 1% y cacodilato de Na 0.21M pH 7.4.

6.- Deshidratar con alcohol etílico de 96° e incluir en araldita.

7.-Cortar secciones de 50 nm en un ultramicrotomo mecánico Reichert OMU-2 y montar en gradillas.

8.-Observar las preparaciones en un microscopio electrónico de transmisión Philips EM-300 que opera a 60 kV.

También se montaron controles omitiendo el acetato de plomo y el sustrato de paranitrofenil fosfato disódico. El acetato de plomo utilizado para delinear membranas produce precipitados densos al microscopio que podrían confundirse con los precipitados de fosfato de plomo formados a partir de los fosfatos que se liberan por acción de la fosfatasa ácida⁴⁹.

En los tres lotes se realizaron observaciones macroscópicas al 5° (día de la implantación) y 14° día de preñez con la finalidad de contar cuerpos lúteos (CL), sitios de implantación y embriones normales.

RESULTADOS.

Estandarización de técnicas.

La figura 1 muestra la actividad de fosfatasa ácida contenida en 4 alícuotas (5, 10, 20 y 40 μ l) de homogeneizado total; los controles sin sustrato, sin enzima y tiempo cero presentaron actividad despreciable, en tanto que en los problemas (P) la actividad enzimática fué directamente proporcional a la cantidad de proteína; la alícuota elegida para el sistema fué la de 10 μ l. Para la β -glucuronidasa se procedió de igual manera, lo mismo que para las fracciones nuclear y lisosomal.

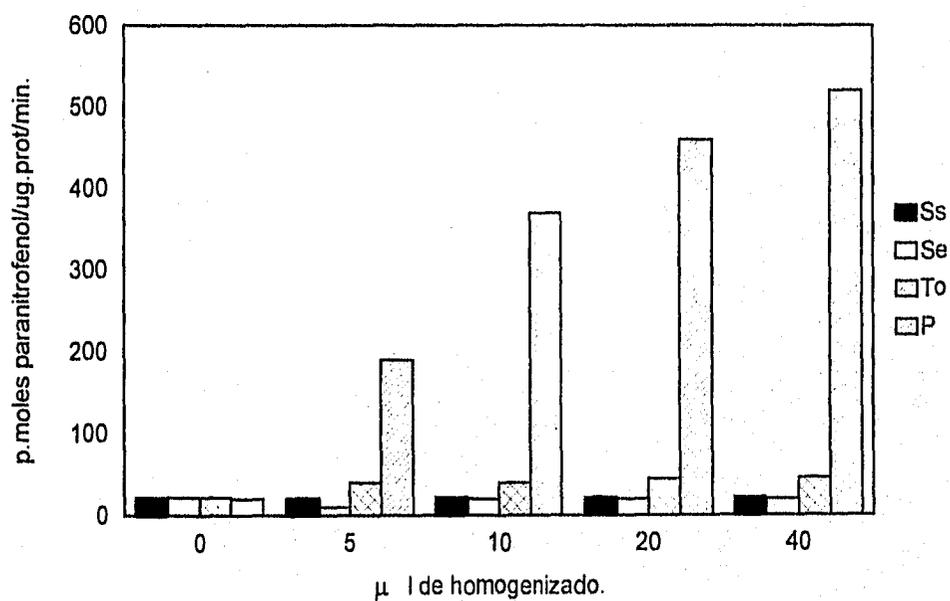


Fig 1.- Experimento para elegir la concentración adecuada de proteína en el sistema de reacción. Actividad de fosfatasa ácida en problema y controles con diferentes concentraciones de proteína. Ss(sin sustrato), Se(sin enzima), To(tiempo 0), P(problema). 10 μ l de homogeneizado corresponden a 21.5 μ g de proteína.

La figura 2 corresponde a la curva de actividad de la fosfatasa ácida ante diferentes concentraciones del sustrato de paranitrofenolfosfato disódico. La concentración utilizada en el medio de reacción fué la de 1.2 μ moles. Esta corresponde a la K_m .

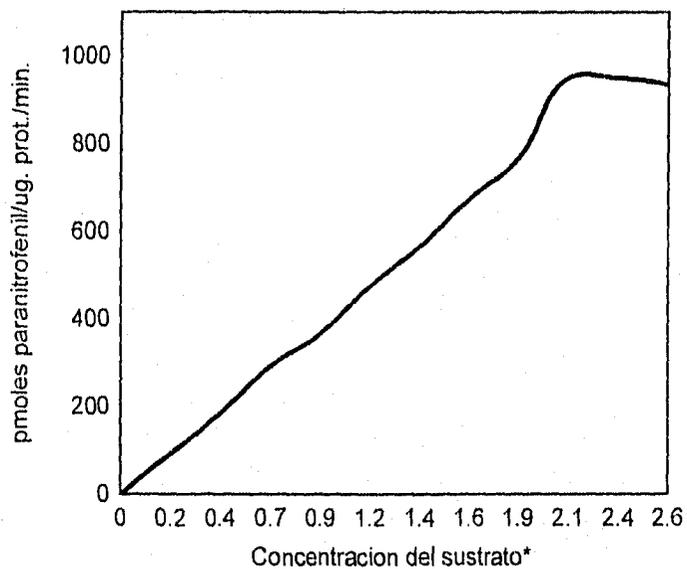


Fig.2.-Actividad de fosfatasa ácida con respecto al sustrato. La concentración de sustrato utilizada en el medio de reacción es la de 1.2 μ moles, ya que corresponde a la K_m . * μ moles de paranitrofenilfosfato disódico.

La figura 3 representa la curva de actividad de la β -glucuronidasa ante concentraciones diferentes de sustrato. La concentración de sustrato que se utilizó en el sistema de reacción para esta enzima fué de 0.24 μ moles, que corresponde la K_m calculada por la reacción de doble recíprocas de Lineweaver-Burk.

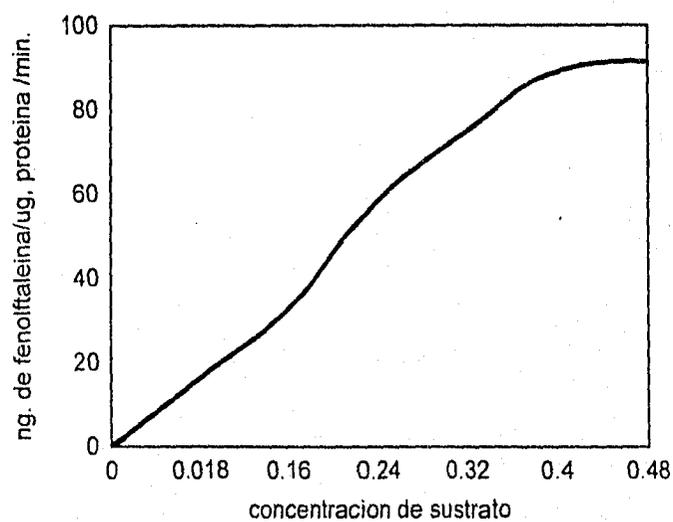


Fig.3.- Actividad de β -glucuronidasa con respecto al sustrato. La concentración de sustrato elegida para el medio de reacción es la correspondiente a 0.24 μ moles, por ser la que representa la K_m . * μ moles de fenoltaleína-ácido glucurónico.

La figura 4 indica la transformación de colchicina a lumicolchicina por medio de la irradiación con luz ultravioleta. A partir de los 45 minutos la transformación es total; nosotros irradiamos durante 90 minutos y para corroborar la transformación se realizaron espectos antes y después.

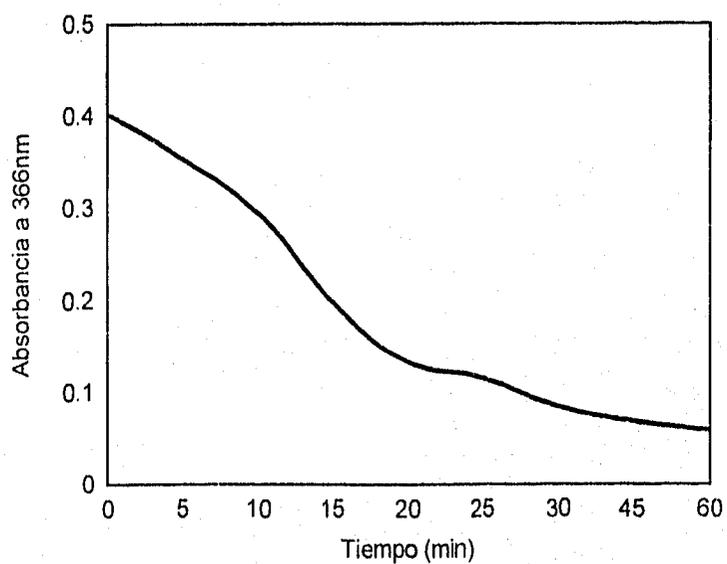


Fig.4.-Transformación de colchicina a lumicolchicina; irradiando con luz UV (366nm.) una solución de colchicina 25 μ molar. A los 60min hay una total transformación a lumicolchicina

Actividad lisosomal en el sitio de implantación (lote 1).

La figura 5 muestra que la actividad intranuclear de fosfatasa ácida fué mayor ($p < 0.01$) tanto en el epitelio (41.39 ± 4.2) como en el estroma (27.4 ± 3.9) del sitio de implantación que la del no sitio (20.53 ± 4.63 y 14.8 ± 2.18 para epitelio y estroma, respectivamente). Al graficar por proteínas el comportamiento se mantiene.

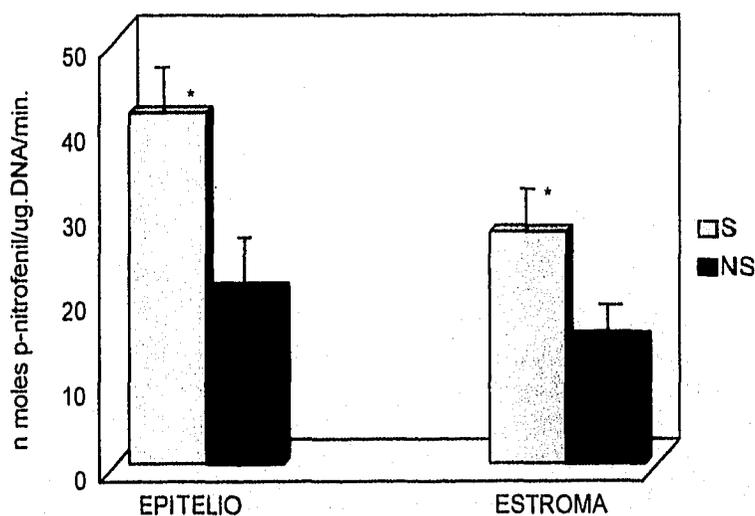


Fig. 5.- Actividad intranuclear de fosfatasa ácida en sitios y no sitios de implantación. Promedio de 8 experimentos. $\bar{x} \pm DE$. * $p < 0.01$ al comparar con el no sitio (NS).

La figura 6 muestra la actividad de la fosfatasa ácida en la fracción lisosomal; se encontró una mayor concentración ($p \leq 0.01$) en el epitelio del S (sitio) (380.12 ± 24.21) que en el del NS (no sitio) (206.41 ± 9.8) y en el estroma no hubo diferencias entre S y NS (39.14 ± 8.3 y 38.4 ± 6.9). El epitelio presentó mayor actividad específica de fosfatasa ácida que el estroma ($p \leq 0.01$).

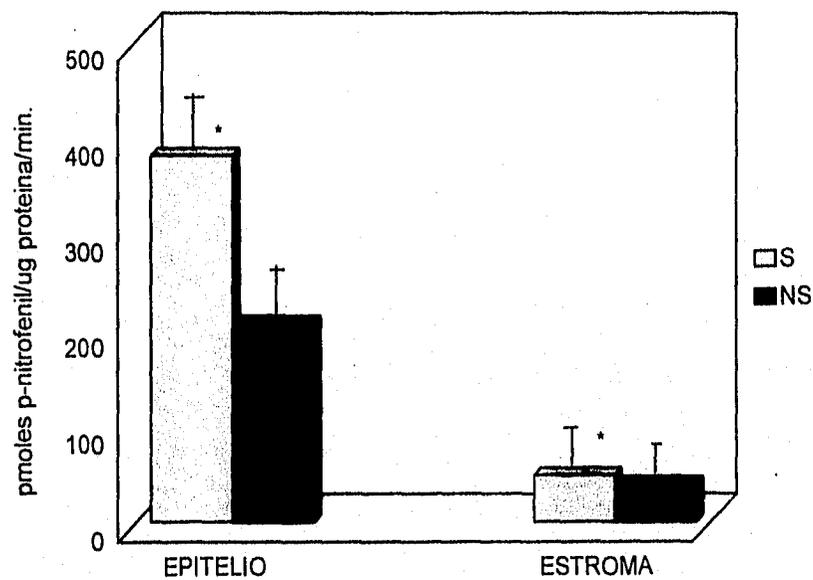


Fig. 6.- Actividad intralisosomal de fosfatasa ácida en el sitio (S) y no sitio (NS) de implantación del endometrio de rata. Promedio 8 experimentos. $\bar{x} \pm DE$. * $P < 0.01$ al comparar con el NS.

En la figura 7 se muestra que la actividad intranuclear de la β -glucuronidasa en el epitelio del sitio (9.91 ± 0.7) fué mayor ($p < 0.01$) que en el del NS (6.61 ± 0.6). El estroma presentó un comportamiento similar entre el sitio y el no sitio (9.14 ± 1.11 y 5.80 ± 0.3 respectivamente) ($p \leq 0.01$). Al graficar por proteínas el comportamiento se mantiene.

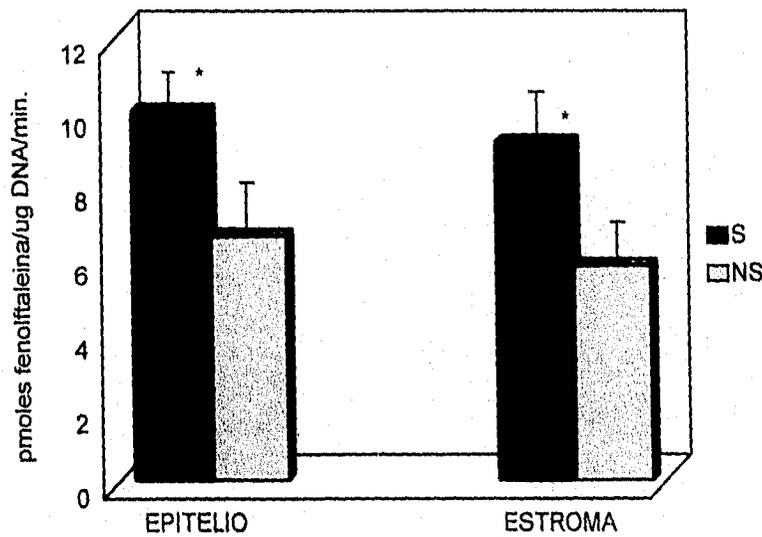


Fig.7.- Actividad intranuclear de β -glucuronidasa en sitio (S) y no sitio (NS) de implantación del endometrio de rata. Promedio de 8 experimentos. $\bar{x} \pm DE$. * $p < 0.01$ al comparar con el NS.

La figura 8 muestra que la actividad intralisosomal de la β -glucuronidasa es mayor ($p < 0.01$) en el NS (epitelio: 3.6 ± 0.71 ; estroma: 2.85 ± 0.28) que en el S (epitelio: 1.75 ± 0.42 ; estroma: 1.701 ± 0.39).

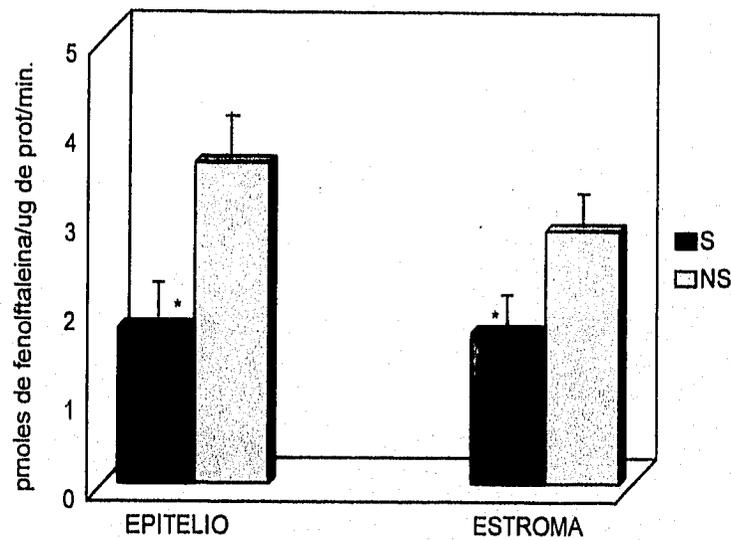


Fig.8.- Actividad intralisosomal de β -glucuronidasa en el epitelio y el estroma endometrial del sitio(S) y no sitio(NS) de implantación de la rata. Promedio de 8 experimentos. $\bar{x} \pm DE$. * $p < 0.01$, para S vs NS.

La figura 9 representa la distribución de la actividad de fosfatasa ácida en los tres compartimentos subcelulares, se encontró que en el sitio de los dos tejidos endometriales la actividad correspondiente a la fracción nuclear esta aumentada con respecto a la encontrada en los no sitios ($p \leq 0.01$).

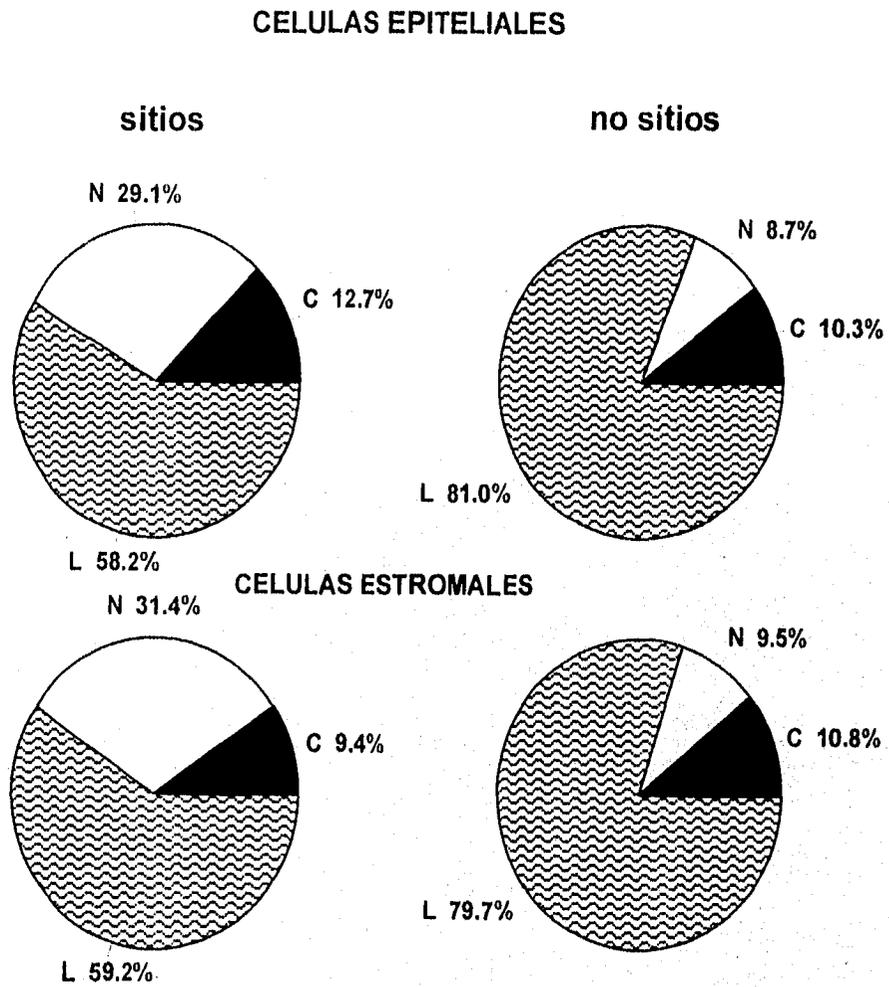
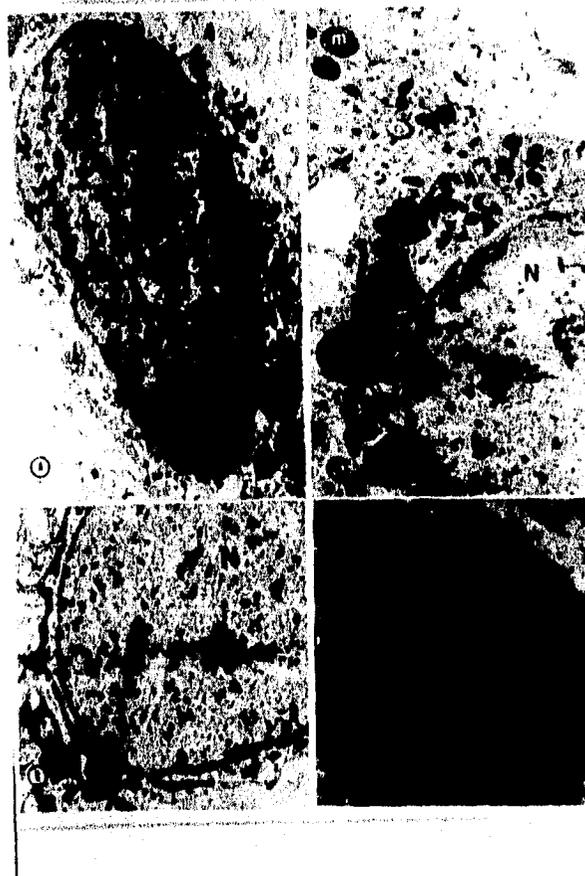


Fig.9.-Porcentaje de actividad de fosfatasa ácida en relación al peso seco. N(nucleos), C(citosol) y L(lisosomas).

Lo anterior pudo corroborarse por medio de microscopía electrónica. La fotografía 1 corresponde a cuatro núcleos (A, B, C y D) obtenidos a partir de tejido estromal del sitio de implantación: las cuatro muestras presentan un material puntiforme denso al microscopio electrónico que corresponde a la actividad de la fosfatasa ácida. En la foto "B" se aprecian cuatro lisosomas ubicados en la región perinuclear, de los cuales dos parecen estar descargando su contenido dentro del nucleoplasma, esto confirma la aumentada actividad enzimática encontrada en los núcleos del sitio de implantación. Debido a que el material utilizado para contrastar puede dar falsos negativos con los precipitados producidos por la acción de la fosfatasa ácida, la foto "D", en la cual también se observa la reacción, no se contrastó. La ubicación perinuclear no logramos encontrarla en los intersitios.

Fotografía 1 - 25000 aumentos.
Las flechas negras indican los precipitados de fosfato de plomo.
N(núcleos), L(lisosomas) y m(mi-
tocondrias).



Los controles de la foto 1 los representa la fotografía 2 (A y B). La "A" corresponde al núcleo de una célula estromal del intersitio (NS) y la "B" al núcleo de una célula estromal del sitio de implantación (S) en ausencia del sustrato para la fosfatasa ácida. Tanto la fotografía "A" como la "B" no presentan los precipitados típicos de la acción de la enzima.



Fotografía 2.- 25000 aumentos. L(lisosomas) y N (núcleos)

La fotografía 3 corresponde a una glándula epitelial del sitio de implantación; en ésta podemos observar la migración perinuclear de los lisosomas a la región apical de las células. Este fenómeno no lo encontramos en los intersitios.



Fotografía 3.- 7392 aumentos. N (núcleos) L (lisosomas) y I (luz de la glándula).

Por otra parte, la relación de proteínas/DNA se determinó en el sitio y no sitio de las cuatro fracciones subcelulares (homogeneizado, citosol, núcleos y lisosomas), y se encontró en el homogeneizado total, que esta relación es mayor en el sitio de implantación que en el NS (Tabla I).

TABLA I
Relación de proteínas/DNA en las fracciones subcelulares

	homogeneizado total	citosol	núcleos	lisosomas
S	17.30±3.4*	20.08±8.4	0.96±0.72	39.62±5.4
NS	12.10±4.9*	18.40±7.9	0.902±0.69	32.62±8.21

Relación de proteína/DNA en los tres compartimentos subcelulares y el homogeneizado total de células estromales pertenecientes al sitio de implantación. Promedio±desviación estándar. *significativamente diferentes: P<0.01. El epitelio presenta comportamiento similar.

Efecto de la dexametasona sobre la actividad lisosomal (Lote 2).

Se probaron 3 dosis de dexametasona (0.4, 0.8 y 1.6 mg) de las cuales la de 0.8mg/250 g de.p.c. se consideró la más adecuada porque en nuestro modelo corresponde a la dosis efectiva 50 para la actividad de la fosfatasa ácida. Estas mismas dosis inhiben de manera similar la actividad de la β-glucuronidasa (Tabla II).

TABLA II

Efecto de la dosis de dexametasona sobre la actividad de fosfatasa ácida

Dexametasona. (mg.)	Inhibición de Act. de FA intranuclear	Inhibición de implantación	Inhibición del desarrollo embrionario
0	0%	0	0
0.4	31.6%	47.8%	55%
0.8	47.36%	64.2%	100%
1.6	65%	85.5%	100%

Efecto de tres dosis de dexametasona sobre la actividad intranuclear de la fosfatasa ácida, la implantación y el desarrollo embrionario en el sitio de implantación de las células estromales. La implantación se midió por la presencia de nódulos de reabsorción, y el desarrollo embrionario por la presencia de embriones normales el día 14 de preñez. *In vitro* en un medio libre de células, la dexametasona no tiene efecto sobre la actividad de ambas enzimas. Valores similares se obtuvieron con el epitelio.

La figura 10 indica que la actividad intranuclear de fosfatasa ácida del epitelio (42.19 ± 7.6) y el estroma (28.52 ± 4.5) del sitio de implantación de ratas sin tratamiento fué significativamente ($p \leq 0.01$) más alta que en los tejidos de ratas tratadas con dexametasona (23.2 ± 1.0 y 13.5 ± 1.3 respectivamente). Los no sitios (NS) de las ratas tratadas no muestran diferencias significativas con respecto a sus controles, ni en epitelio ni en estroma.

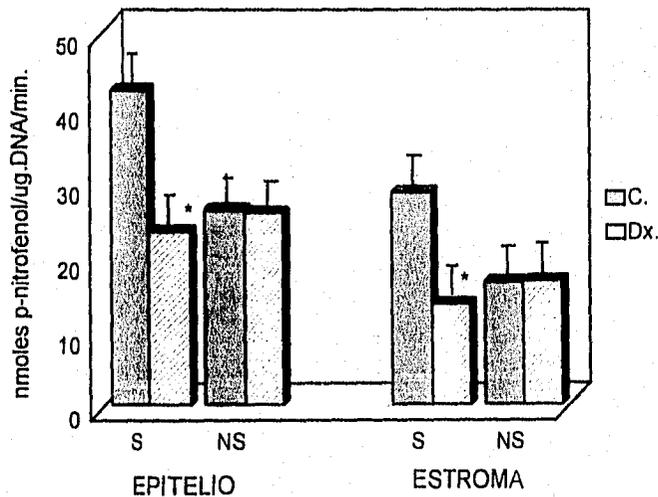


Fig.10.- Efecto de la dexametasona(Dx) sobre la actividad Intranuclear de la fosfatasa ácida en sitio(S) y no sitio(NS) de implantación. $\bar{x} \pm DE$. N=8. *P < 0.01 al comparar con el control (C).

La actividad intralisosomal de la fosfatasa ácida se muestra en la figura 11: en el epitelio y el estroma del sitio (S) de se aprecia un efecto opuesto; se encuentra más alta la actividad en el grupo tratado con dexametasona que en el control: 558.61 ± 96.58 vs 339.11 ± 75.07 y 206.81 ± 19.71 vs 75.02 ± 11.8 respectivamente. Como en el caso anterior el NS no responde al tratamiento en forma significativa.

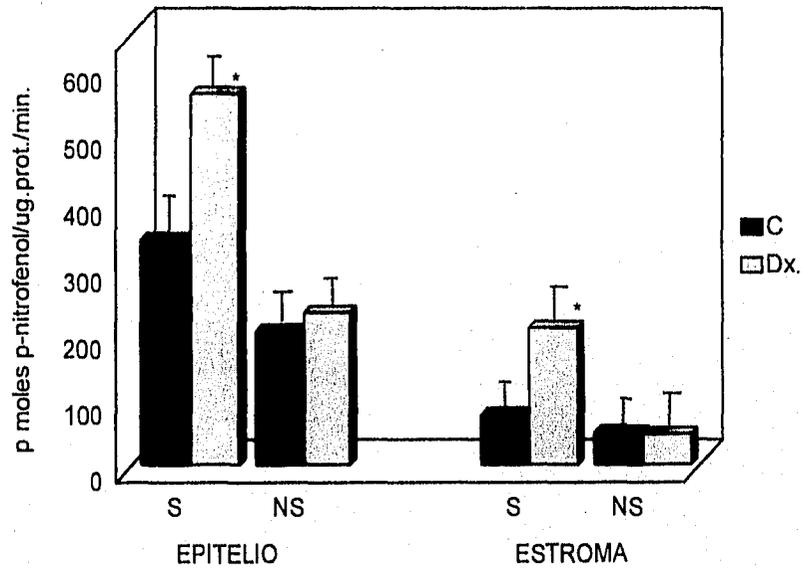


Fig. 11.- Efecto de la dexametasona(Dx) sobre la actividad intralisosomal de fosfatasa ácida en el sitio(S) y el no sitio(NS) de implantación tanto del epitelio como del estroma endometrial. $\bar{x} \pm DE$. Promedio de 8 experimentos. *P menor de 0.001 al comparar con su control(C).

El efecto de la dexametasona sobre la actividad intranuclear de la β -glucuronidasa estromal se observa en la figura 12. Los NS no presentan diferencias entre el tratado con dexametasona y el control, en tanto que el S obtenido de animales tratados presenta menor actividad cuando se compara con su control (5.28 ± 0.5 vs 9.5 ± 1.2) ($p \leq 0.001$).

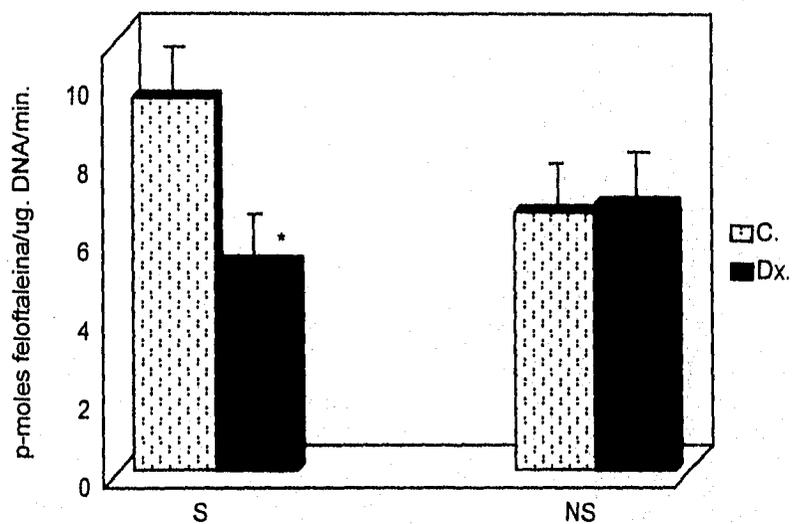


Fig.12.- Efecto de la dexametasona sobre la actividad intranuclear de β -glucuronidasa en sitio(S) y no sitio(NS) de implantación del estroma. $\bar{x} \pm DE$. N=8. * $p < 0.001$ al comparar con su control.

En la figura 13 se aprecia que la actividad de la β -glucuronidasa correspondiente a la fracción lisosomal de las células estromales del S es mas alta en el tejido tratado que en el control (4.8 ± 0.4 vs 1.9 ± 0.4) ($p < 0.001$)

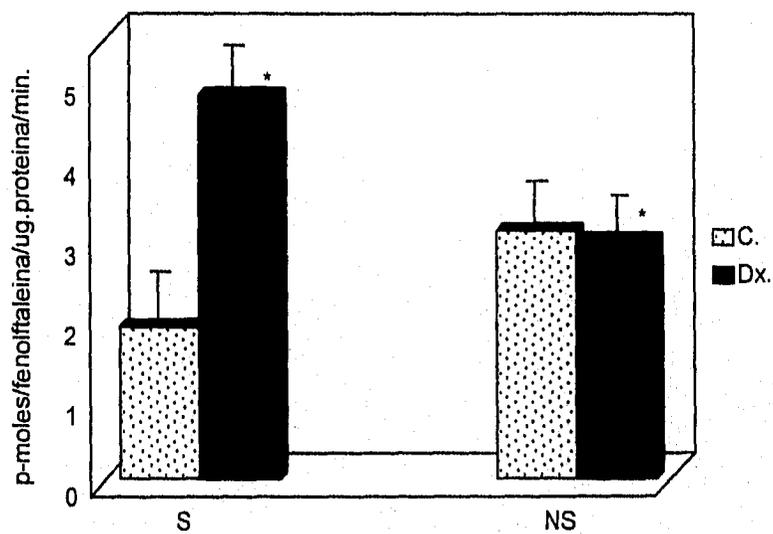


Fig.13.- Efecto de la dexametasona sobre la actividad intralisosomal de β -glucuronidasa en sitio(S) y no sitio(NS) de implantación del estroma.x±DE. N=8. * $p < 0.001$ al compar con su control.

La figura 14 muestra la distribución intracelular de la actividad de fosfatasa ácida en el estroma del sitio de implantación tanto en muestras tratadas como no tratadas, encontrando que las que reciben el tratamiento presentan menor actividad en el núcleo.

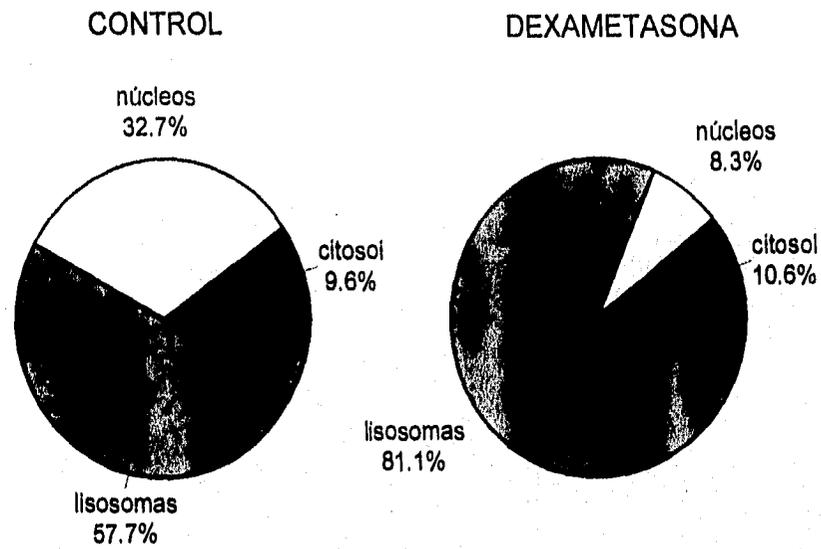


Fig.14.- Efecto de la dexametasona sobre la distribución intracelular de la actividad de fosfatasa ácida en el tejido decidual. Parametro de referencia peso seco. El epitello presenta comportamiento muy similar.

Los efectos de la dexametasona sobre la implantación y el desarrollo embrionario se muestran en la tabla III. Tanto en el grupo control como en el tratado el número de S corresponde con el de cuerpos lúteos. Cuando se dejó evolucionar la gestación hasta el día 14, en las ratas tratadas no hubo desarrollo embrionario, en tanto que en las controles el promedio de embriones fué 7.3 ± 1.3 . La inhibición de la implantación en las ratas tratadas fué del 64.28%, considerando que el de nódulos de reabsorción (tejido fetal reabsorbido) fué del 35.7% (Tabla III).

TABLA III

Efecto de la de dexametasona sobre la implantación y preñez en la rata.

	SI	CL	embrio (peso:g).	placent. (peso:g)	NR	% de R.	% de I de I
E (tratado)	11.2+2.9	9.8±2.5	0	0	4.0+1.1	35.71	64.28
B (control)	11.4+2.1	10.1+2.4	7.3±1.3 (1.3±0.4)	7.3±1.2 (0.5±0.3)	1.8±0.5	0	12

SI(sitio de implantación); CL(cuerpos lúteos); embrio(embriones); placent(placentas); NR(nódulos de reabsorción); R(reabsorción); I de I(inhibición de implantación). Grupo B: tratado con 0.8mg de dexametasona/250g de peso. Grupo E: tratado con solución salina. Promedio±desviación estandar.El número de ratas en los dos casos fué de 32.

Los controles sin intervención quirúrgica los representan los grupos "C" y "F". El grupo C (16 ratas), que consiste de animales tratados con solución salina en la misma forma que aquellos con dexametasona pero sin laparotomía, presenta resultados similares al grupo B (control con laparotomía) en cuanto al número de embriones al día 14. El grupo F (16 ratas) correspondiente a animales tratados con dexametasona presenta desarrollo embrionario similar al E.

Efecto de la colchicina (lote3).

La tabla IV muestra el efecto de la dosis de colchicina sobre la actividad intranuclear de la fosfatasa ácida en las células estromales del sitio de implantación, así como su efecto sobre la implantación y el desarrollo embrionario. Aunque todas las dosis utilizadas afectan el desarrollo embrionario en igual magnitud, la actividad de la fosfatasa ácida y la implantación se afectan de manera dependiente de la dosis. La dosis elegida es la de 12.5 nmoles.

TABLA IV

Efecto de la dosis de colchicina

Colchicina (nmoles/50 μ l/250g.pc)	% inhibición FA	% inhibición implantación	%inhibición desarrollo embrionario
0	0	0	0
6.25	12%	92%	100%
12.5	19%	94%	100%
25.0	45%	100%	100%

Efecto de diferentes dosis de colchicina sobre la actividad intranuclear de la fosfatasa ácida (FA) de células estromales del S. la implantación y el desarrollo embrionario. La lumicolchicina en las tres dosis usadas no tiene efecto. El efecto de inhibición sobre la actividad para β -glucuronidasa es similar. En el medio libre de células la colchicina no tiene efecto sobre la actividad de ambas enzimas.

Fig. 15.- muestra el efecto de la colchicina sobre la actividad intranuclear de la fosfatasa ácida en el epitelio y el estroma endometrial tanto del sitio como del no sitio de implantación. La actividad de esta enzima en el epitelio que recubre el sitio de

implantación del cuerno uterino control tratado con lumicolchicina (Lu S) fué significativamente más alta con una $p \leq 0.01$ (189.9 ± 34.3 nmoles de p-nitrofenol/mg de DNA/min.) que la que se encontró en el cuerno tratado con colchicina (CoS: 148.81 ± 16.80). El epitelio del no sitio (NS) no mostró cambios significativos entre el cuerno control (Lu NS: 158.4 ± 25.7) y el tratado (Co NS: 148.8 ± 16.8). El tejido estromal en general presentó menos actividad que el epitelial y no respondió al efecto de la colchicina: 98.0 ± 5.8 (LuS), 84.1 ± 10.3 (LuNs), 104.4 ± 17.3 (Co S) y 104.5 ± 10.4 (Co NS).

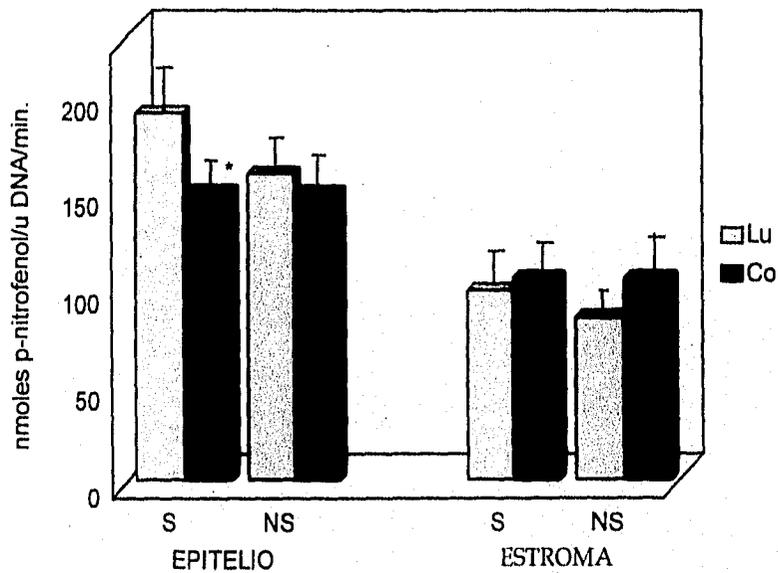


Fig. 15.-Efecto de la colchicina sobre la actividad intranuclear de la fosfatasa ácida. S(sitio de implantación), NS(no sitio de implantación), Lu(cuerno control) y Co(cuerno tratado con colchicina).Promedio de 8 experimentos. $\bar{x} \pm DE$. * $P < 0.01$ al comparar con el control.

La figura 16 muestra el efecto de la colchicina sobre la actividad intralisosomal de la fosfatasa ácida en el epitelio y el estroma del sitio (S) y no sitio (NS) de implantación. La actividad de esta enzima en el epitelio del sitio de implantación del cuerno tratado con colchicina (Co S) fué menor con una $p \leq 0.05$ (306.3 ± 51.0 nmoles p-nitrofenol/mg proteína/min.) que aquella del control tratado con lumicolchicina (S Lu: 358.5 ± 43.8). El epitelio que recubre el NS tanto del cuerno tratado como el del control no presentó diferencias significativas entre sí: 246.4 ± 51.3 y 237.0 ± 57.4 . Con respecto al tejido estromal existen diferencias ($p < 0.05$) entre el sitio tratado (97.8 ± 8.9) y el no tratado (142.0 ± 15.4). Los no sitios no presentaron diferencias entre el tratado y el control (NS tratado: 141.5 ± 14.0 y NS control: 145.2 ± 19.7).

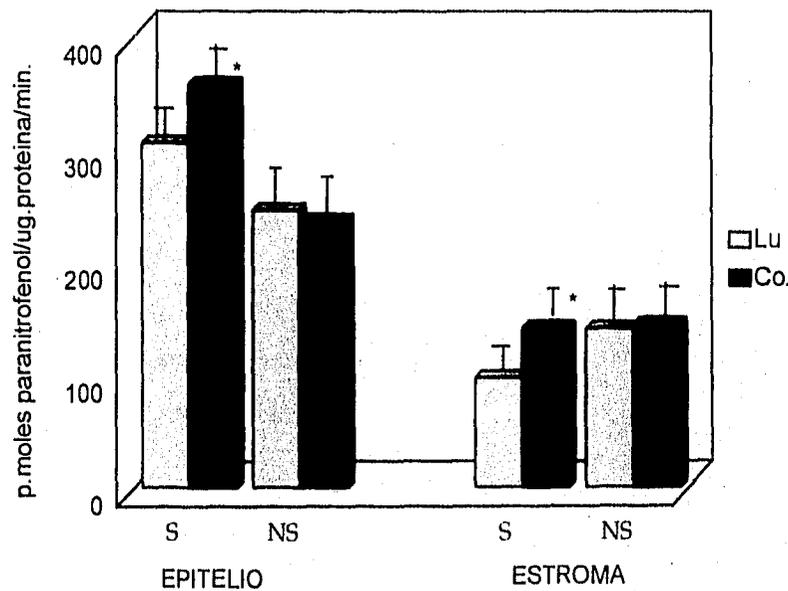


Fig. 16.- Efecto de la colchicina sobre la actividad de fosfatasa ácida intralisosomal. S (sitio), NS(no sitio), Lu(cuerno control) y Co(cuerno tratado con colchicina). Promedio de 8 experimentos. $\bar{x} \pm DE$. *P < 0.05 al comparar con el control.

En la figura 17 se muestra el efecto de la colchicina sobre la actividad intranuclear de β -glucuronidasa en las células estromales del sitio y no sitio de implantación: el sitio de implantación del cuerno tratado con colchicina presentó actividad enzimática considerablemente menor (5.1 ± 0.7 nmoles de fenolftaleína/ μ g DNA/min.) con una $P \leq 0.001$ que la del control tratado con lumicolchicina (9.8 ± 1.2 control). El no sitio no mostró diferencias entre el cuerno control (5.9 ± 0.5) y el tratado (6.2 ± 0.3).

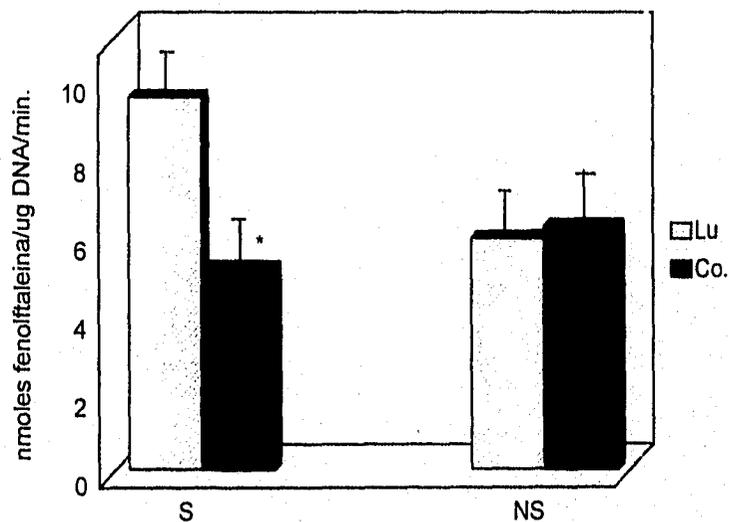


Fig.17.-Efecto de la colchicina sobre la actividad intranuclear de β -glucuronidasa en estroma endometrial. S(sitio de implantación) NS(no sitio de implantación), Lu(cuerno tratado con lumicolchicina), Co (cuerno tratado con colchicina). $\bar{x} \pm DE$. * $p < 0.001$ al comparar con el control

En la figura 18 se aprecia el efecto de la colchicina sobre la actividad intralisosomal de la β -glucuronidasa; se encontró que la actividad del sitio de implantación del cuerno tratado con colchicina fué mayor (4.9 ± 0.4 nmoles de fenoltaleína/ μ g proteína/min.) que la del control (1.7 ± 0.4). El NS no mostró cambios entre el cuerno control (3.1 ± 0.4) y el tratado (3.0 ± 0.6).

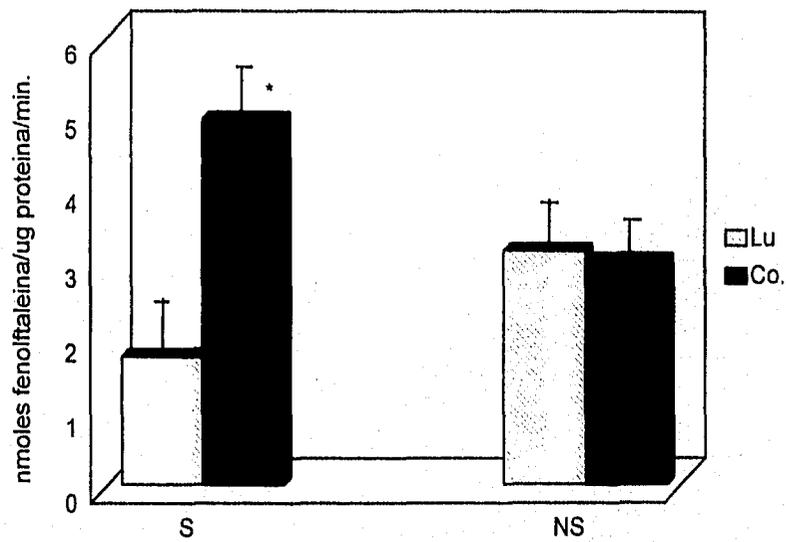


Fig.18.- Efecto de la colchicina sobre la actividad intralisosomal de β -glucuronidasa en estroma. S(sitio de implantación), NS(sitio de no implantación), Lu(cuerno uterino tratado con lumicolchicina), Co.(cuerno tratado con colchicina). $\bar{x} \pm DE$. * $p < 0.001$ al comparar con el control.

La figura 19 muestra la distribución intracelular de la actividad de fosfatasa ácida en el sitio de implantación de los cuernos tratado y no tratado con colchicina.

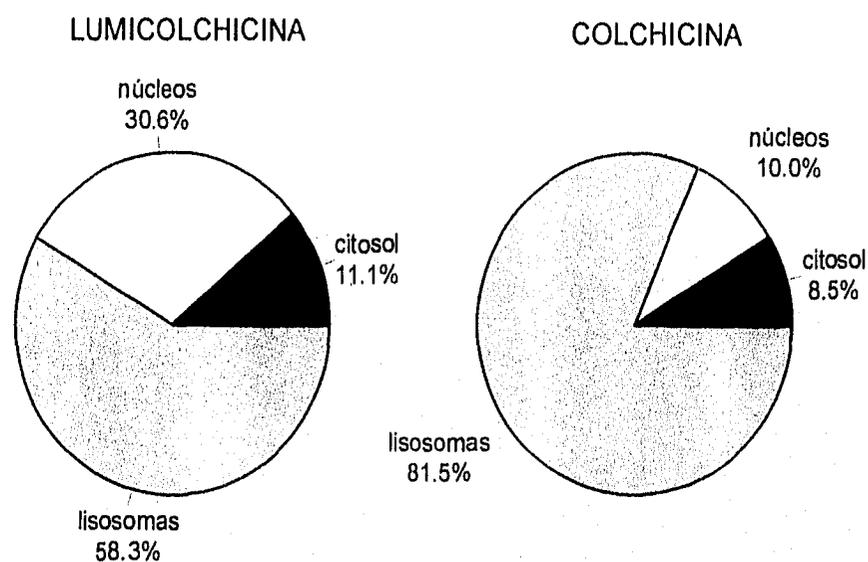


Fig.19.- Efecto de la colchicina sobre la distribución intracelular de la actividad de fosfatasa ácida en el tejido decidual control y tratado. Parámetro de referencia, el peso seco. El epitelio presenta distribución similar.

La tabla V muestra que la implantación embrionaria, se inhibió al 100% por el efecto de la colchicina. Así mismo, la inhibición de la respuesta vascular fue de 90.7%, tomando en cuenta que existieron 0.61 número de sitios de implantación, los que se comparan con los 6.5 del control.

TABLA V.
Efecto de la colchicina sobre la implantación embrionaria de la rata

Cuerno	No de ratas	Sitios de implantación	Cuerpos lúteos	Inhibición de resp.vascular	Inhibición de implantación.
Control	10	6.5±2.25 (*2±1.0mm)	7.72±1.25	0%	0%
Tratado	10	0.61±0.75 (*2±1mm)	7.56±2.85	90.7%	100%

Promedio±desviación estandar. Control:cuerno uterino izquierdo tratado con lumicolchicina. Tratado: cuerno uterino derecho tratado con colchicina. Un lote de ratas sin tratamiento da un número de sitios de 6.7±3.4 en el cuerno izquierdo. *Medida de los sitios de implantación. La inhibición de la respuesta vascular se midió en base al número de regiones pintadas con el colorante de azul de tripán. La inhibición de la implantación se consideró por el número de nódulos de reabsorción.

El efecto de la colchicina sobre el desarrollo embrionario se aprecia en la tabla VI: se encontró que la inhibición del desarrollo embrionario al día 14 es del 100%.

TABLA VI
Efecto de la colchicina sobre el desarrollo embrionario (día 14) de la rata.

Cuerno uterino	No.de ratas	No. de embriones (peso)	No. de placentas (peso)	No.de nódulos de reabsorción	No.de cuerpos lúteos	Inhibición: desarrollo embrionar.
Control	10	4.16±1.32 (1.25+0.05)	4.16±1.32 (0.36+0.19)	2.0±1.5	6.71±1.25	29.24%
Tratado	10	0	0	0	6.57±0.78	100%

Promedio±desviación estandar. Control:cuerno uterino izquierdo tratado con lumicolchicina. Tratado:cuerno uterino derecho tratado con colchicina. En una rata normal sin tratamiento, el número de nódulos de reabsorción es semejante al obtenido por nuestro control. A éstos se les considera como inhibición del desarrollo embrionario pero no de la implantación.

DISCUSION.

El desarrollo del tejido decidual maduro involucra tanto proliferación y/o diferenciación de las células estromales, por lo que no sorprende encontrar en este tejido cambios significativos tanto en el contenido como en la velocidad de la síntesis del DNA, RNA y proteínas. Se ha demostrado por la incorporación de timidina marcada, que la síntesis de DNA en las células estromales endometriales se incrementa significativamente en el sitio de implantación⁵⁰ durante el 4º y 5º día de preñez o pseudopreñez (día uno presencia de espermatozoides) en la rata. Parece ser que las células deciduales que ya se han definido no sintetizan más DNA, pero aquellas de la periferia del nido continúan incorporando timidina⁵¹. En el ratón se ha observado que 11 a 15 horas después del estímulo decidualizante existen dos poblaciones de células que inician la síntesis de DNA: unas que se diferencian a células deciduales maduras sin división y otras que se dividen antes de la diferenciación⁵². Las células deciduales típicas son binucleadas y poliploides^{53, 54}: en la rata los núcleos a veces son 32n y en el ratón 64n, este efecto se debe a replicación más que a fusión^{55, 56}.

La síntesis de proteínas medida por la incorporación de aminoácidos presenta un patrón bifásico en el periodo de perimplantación en la rata. De esta manera la incorporación de precursores marcados aumenta al 3º día de preñez, al 4º disminuye y nuevamente aumenta al 5º y 6º día (día uno: presencia de espermatozoides) en los sitios de implantación pero no en los intersitios^{57, 58}. En general, se ha detectado un aumento en la síntesis de gran número de proteínas celulares en el sitio de implantación poco antes de que el blastocisto se una al epitelio materno.

Nosotros encontramos que la relación de proteínas/DNA en el sitio de implantación se encuentra incrementada con respecto al intersitio, ésto posiblemente se

debe a la síntesis de gran cantidad de proteínas necesarias para la unión del blastosisto al endometrio materno⁵⁸.

Es importante para los objetivos trazados en nuestro trabajo haber encontrado que la relación proteínas/DNA de los tejidos tratados con dexametasona o colchicina no varía significativamente cuando se compara con los no tratados, ya que lo contrario significaría que hay efectos colaterales importantes, principalmente en el caso de la colchicina que se sabe que a ciertas dosis provoca arresto en metafase a células en proliferación y a otras dosis estimula la síntesis del DNA.

En el presente trabajo, encontramos que la actividad lisosomal exhibe básicamente dos comportamientos diferentes: Primero, la distribución apical de los lisosomas de las células epiteliales del sitio de implantación (fotografía 3) y la actividad enzimática intralisosomal mayor en el sitio que en el no sitio del mismo tejido. Segundo, la localización perinuclear de los lisosomas y su aumentada actividad enzimática dentro de los núcleos de las células estromales del S.

La aumentada actividad intralisosomal en el epitelio del S se relaciona con una función digestiva, ya que la implantación en la rata requiere de lisis celular y apoptosis (muerte celular programada). Cabe mencionar, que una importante población de lisosomas localizada cerca del borde apical de las células epiteliales del sitio de implantación (Fotografía 3) podría participar en la formación de la cámara de implantación en la rata y el ratón y en la reacción de unión del embrión en el conejo⁵⁹.

Por otro lado, la distribución perinuclear (foto 1B) y la presencia de actividad intranuclear de enzimas lisosomales en el sitio de implantación (Fig. 5 y 7) conducen a pensar en su participación a nivel de des-represión del DNA.

Es importante mencionar que en el endometrio de cerdos tratados con progesterona, se producen más de dos gramos de una fosfatasa ácida resistente al tartrato llamada uteroferrina, cuya función principal es el transporte de hierro al útero⁶⁰. Aunque en la rata no se ha reportado alguna enzima con dicha función, parte de la actividad de la fosfatasa ácida encontrada en los lisosomas pudiera tener también esta función, ya que nuestra enzima también es resistente al tartrato. No obstante, habría que demostrarlo.

Smith y Wilson⁶¹ reportaron que en la rata y el ratón, la fosfatasa ácida es una enzima lisosomal asociada con la lisis y fagocitosis de las células epiteliales luminales del sitio de implantación, lo cual apoya nuestros resultados. Sin embargo, Singh⁶² encontró concentraciones elevadas de fosfatasa ácida en el fluido uterino de mujeres infértiles durante todo el ciclo menstrual. La actividad de esta enzima se correlaciona negativamente con la actividad de la amilasa⁶³, ayudando esta última a la capacitación espermática. De lo anterior y de nuestros resultados, se deduce que la actividad de la fosfatasa ácida a niveles óptimos ayuda a la implantación, mientras que una elevación impide la preñez.

Mecanismos locales y hormonales están relacionados con la diferenciación endometrial que toma lugar desde los pasos iniciales de la sensibilización uterina, hasta el momento en el cual se lleva al cabo la interacción del epitelio materno con el blastocisto. En la rata, los estrógenos maternos son esenciales para la implantación en un útero sensibilizado previamente con progesterona^{9, 14}. Durante la implantación ocurren muchas alteraciones morfológicas y bioquímicas incluyendo el aumento de receptores a estradiol y progesterona. En el presente trabajo, demostramos el papel adicional de los lisosomas en este proceso. La actividad de la fosfatasa ácida en la

fracción nuclear obtenida de células deciduales (S) (Figura 5) fué casi del doble de la obtenida en el tejido adyacente (NS). Estos resultados están de acuerdo con la participación de los lisosomas en los procesos hormono-dependientes^{4,7}.

La dexametasona administrada por vía subcutánea en dos dosis de 0.8mg (48 y 24 h antes del momento de la implantación en la rata) suprimió el aumento de la actividad de la fosfatasa ácida y β -glucuronidasa producido en los núcleos de las células endometriales (epitelio y estroma) durante la implantación. Dicha supresión no se presentó en los no sitios, por lo que se sugiere que los estrógenos labilizan las membranas lisosomales permitiendo así la fuga selectiva de hidrolasas. Se sabe que para que se lleve al cabo la implantación es necesario un pulso de estradiol²¹ y que la dexametasona antagoniza la labilización producida por este estrógeno^{22,31}. En modelos experimentales con implantación retardada se ha encontrado que cuando se administra 1mg de dexametasona 3 horas antes de un pulso adecuado de estradiol, el porcentaje de sitios de implantación baja a 50% y cuando la administración es 6 horas antes del estrógeno, baja a 28. Otros autores¹⁸ han observado que el número de blastocistos recuperados no se afecta por la dexametasona administrada por vía subcutánea.

El aumento de permeabilidad vascular que se observa previo al contacto del blastocisto con el epitelio endometrial materno no se ve afectado por la dexametasona, por lo que se piensa que el mecanismo de acción de este glucocorticoide no es vía la síntesis de prostaglandinas, ya que éstas son necesarias para que se lleve a cabo la reacción vascular durante la implantación. Fenómenos subsecuentes como la implantación y el desarrollo embrionario se inhiben en un 64.2 y 100% respectivamente. Debido a que los efectos sobre la implantación y la actividad de la fosfatasa ácida y β -glucuronidasa son inversamente proporcionales a la dosis de dexametasona, se

demuestra que la presencia de estas dos enzimas en el núcleo, es indispensable para que se lleve a cabo la implantación, probablemente por su participación en la desrepresión del DNA o la potencialización de los receptores nucleares a estrógenos. Nooshine y col⁶³ han identificado tres formas interconvertibles de receptores a estrógenos en el oviducto de pollos estimulados con estrógenos: los de nula, de baja y de alta afinidad. La forma que carece de afinidad para unirse al estradiol puede convertirse a la de baja afinidad por un proceso que requiere la forma γ -fosforilada del ATP. La actividad enzimática esencial para esta "potenciación del receptor" parece deberse a fosfatasa, ya que la conversión de los receptores es bloqueada por los inhibidores de fosfatasa: vanadato y pirofosfato⁶³.

Campbell y col han demostrado que la administración subcutánea de 1mg de dexametasona 25 min antes de una inyección de 1 μ g de estradiol, reduce la formación del complejo estradiol-receptor nuclear en células endometriales, sin embargo, la captura del (³H)estradiol no se ve afectada significativamente; estos autores suponen que los efectos tardíos del glucocorticoide en cuestión sobre la acción de los estrógenos ocurren a nivel del genoma a través de la reducción del complejo estradiol-receptor nuclear como un resultado de la restricción del transporte del estradiol dentro de las células uterinas⁶⁴.

Más adelante Naoki⁶⁵ y col. demostraron que 1 mg de dexametasona administrada por vía s.c antes (pero no después) de 10 μ g de 17- β -estradiol inhibe completamente el incremento del peso de la hipófisis de la rata y la concentración de receptores para progesterona en este mismo órgano. No obstante, un antiglucocorticoide bloquea el efecto de la dexametasona. Por su parte estos autores, encontraron que la dexametasona no afecta la dinámica estradiol-receptor inducida por

el estradiol en la hipófisis, por lo que el efecto inhibitorio de la dexametasona no es mediado por el sistema de receptores para el estradiol.

Nosotros suponemos que el tratamiento con dexametasona al 3º y 4º día de preñez, antagoniza los efectos producidos por el pico de estradiol del 5º día (día cero presencia de espermatozoides). Este antagonismo se ejerce sobre efectos tempranos como son la translocación lisosomal y la presencia de la actividad de enzimas lisosómicas en el núcleo.

Es sin lugar a dudas que los lisosomas y su contenido juegan un papel hormono-dependiente que es muy importante de para los procesos no genómicos de la implantación y del desarrollo embrionario.

La colchicina evita el aumento de actividad de fosfatasa ácida y β -glucuronidasa producido en el núcleo de las células endometriales durante la implantación en la rata. Dicho efecto es paralelo a la implantación y demuestra ser dependiente de la dosis.

Otros autores⁴¹ demostraron por microscopía electrónica que la administración intraperitoneal de colchicina inhibe la migración basal de lisosomas en células epiteliales uterinas, demostrando además, que dicho alcaloide también disminuye el contenido de microtúbulos de manera dependiente de la dosis.

Shinohara y col⁶⁶. encontraron que el tratamiento con 0.01-10 μ M de colchicina en cultivos quiescentes de fibroblastos de embriones, induce la síntesis de DNA y la división celular en ausencia de factores de crecimiento, sugiriendo que el rompimiento de los microtúbulos puede producir señales intracelulares de proliferación celular. Otro grupo⁶⁷ determinó la existencia de un subgrupo de microtúbulos presentes en el citoplasma capaces de reprimir ciertos signos de transducción mitogénica; los

microtúbulos pueden estar involucrados en la modulación del estado de los receptores para factores de crecimiento en la membrana celular⁶⁷. Evidencias al respecto, sugieren que los microtúbulos participan en la agregación e internalización de los receptores para estos factores⁶⁶.

Szego y col¹⁰ demostraron que la inyección intravenosa de 0.5 µg/100g.p.c. de 17β-estradiol en ratas ovariectomizadas, produce una disminución significativa en el número y longitud de los microtúbulos dentro de los primeros 35 min después de la administración del esteroide. Dicha alteración se presenta simultáneamente con otros signos de transducción y/o propagación de señales hormonales, incluyendo la elevación del cAMP, la alteración de la actividad eléctrica y la actividad de ciertas hidrolasas lisosomales en la superficie celular, el citoplasma y el núcleo¹⁰.

Por lo anterior, concluimos que la supresión de las actividades de la fosfatasa ácida y β-glucuronidasa en las células endometriales, se debe al impedimento que tienen los lisosomas para transportar su contenido al núcleo, ya que la colchicina no presenta efecto directo sobre las actividades enzimáticas. Además, a la dosis y tiempo utilizado por nosotros, los efectos colaterales de la colchicina son poco probables, debido a que su isómero la lumicolchicina carece de efectos.

CONCLUSIONES.

1.-La actividad intralisosomal de la fosfatasa ácida y la β -glucuronidasa se encuentra elevada en el sitio de implantación, y puede deberse a que éstas son necesarias para la lisis celular que se presenta en el epitelio endometrial previo a la implantación.

2.-La actividad intranuclear de las dos enzimas se encuentra elevada en el sitio de implantación, ésto podría deberse a su participación a nivel de la des-represión del DNA.

3.-Los fenómenos de redistribución lisosomal y liberación enzimática son hormono-dependientes, ya que la dexametasona (compuesto que antagoniza la labilización lisosomal producida por estrógenos) suprime estos efectos.

4.-La translocación lisosomal producida durante la implantación se lleva al cabo con la colaboración del sistema microtubular, debido a que la colchicina impide los efectos de distribución de enzimas.

REFERENCIAS

1. Berger L and Rudolph GN: Alkaline and acid phosphatase in methods of clinical chemistry. S, Ed New York, Academic Press, 1963
2. De Duve C: Lysosomes revisited. *European J. Biochem.* 137, 391-397. 1983
3. Szego CM: Lysosomal function in nucleocytoplasmic communication. In lysosomes in Biology and Pathology, Vol. 4. J.T. Dingle editors. North Holland Publishing Company. Amsterdam. 385-377. 1975
4. Szego, C.M., Nazareno, y Porter, D.: Estradiol-induced redistribution of lysosomal proteins in rat preputial gland. *J. Cell. Biol.* 73: 354-365, 1977.
5. Szego, C.M., Steadman, R.A., y Seeler, B.J.: Intranuclear concentration of lysosomal hydrolases in steroid target cells. Acute response to administration of gonadal hormones in vivo. *Biochem Eur. J.* 46: 377-386, 1974.
6. Szego, C.M. The role of cyclic AMP in lysosome mobilization and their nucleotropic translocation in steroid hormonal target cells. En Greengard Robinson, A. y Paoletti, D. *Advances In Cyclic Nucleotide Research.* Vol. I, pp. 541-564. Raven Press, New York, 1972.
7. Szego, C.M.: Lysosomal labilization: Rapid target specific Effect of ACTH. *Endocrinology* 95: 863. 1974.
8. Pietras, R.J.: Influence of antidiuretic hormone on release of lysosomal hydrolase at mucosal surface of epithelial from urinary bladder. *Nature* . 257:493-495. 1975.
9. Ezzell, R.H.: Luteinizing hormone-acelerated redistribution of lysosome-like organelles preceding dissolution of the nuclear envelope in rat oocytes maturing in vitro. *J. Cell. Biology*, 82:264-277. 1979.
10. Szego, C.M., Sjostrand, B.M., Seeler, B.J., Baumer, J.W., y Sjostrand, F.S.: Microtubule and plasmalema reorganization: Acute response to estrogen *Am. J. Physiol.* 254 (Endocrinol Metab. 17): E755-E785, 1988.
11. Pietras, R. J. y Szego, C.M.: Estrogen-induced membrane alterations and growth associated with proteinase activity in endometrial cells. *J. Cell Biol.* 81: 649-663, 1979.
12. Psychoyos, A. Uterine receptivity for nidation. *Ann. N.Y. Acad. Sci.* 476: 36-42. 1986
13. Hicks, J.J. y Gil-Recasens, M.E.: Características morfológicas y funcionales del cigoto de mamífero durante la preimplantación. *Ginec. Obstet. Méx.* 47: 275, 1980.
14. Collado, M.L., Gil-Recasens, M.E., Castro-Osuna, G y Hicks, J.J.: Nuevos conceptos relacionados con la implantación. I. Periodo de preimplantación. *Ginec. Obstet. Méx.* 44: 63, 1978.
15. Hicks, J.J. y Collado, M.L. Nuevos conceptos relacionados con la implantación. IV Función de moco cervical y el fluido endometrial. *Ginec. Obstet. Méx.* 46: 51, 1979.
16. Hicks, J.J.: Características morfológicas y funcionales del cigoto de mamífero durante la preimplantación. *Ginec. Obstet. Méx.* 47(282):275-291. 1980.
17. Epstein C.J.: Gene expression and macromolecular synthesis during preimplantation embrionic development. *Biol Reprod* 12(82):105. 1975.
18. Gil-Recasens, M.E., Collado, M.L. y Hicks, J.J.: Nuevos conceptos relacionados con la implantación. *Ginec. Obstet. Méx.* 44: 211, 1978.
19. Hicks, J.J.: Regulación endocrina de la implantación del cigoto de mamíferos. *Gaceta Med. Méx.* 117: 510, 1983.
20. Psychoyos, A.: Nouvelle contribution a l' etude la nidation de l' oeuf chez la ratte. *C.R. Hebd. Séanc. Acad. Sci. Paris* 251: 3073, 1960.
21. Psychoyos, A.: Hormonal control of uterine receptivity for nidation. *J. Reprod. Fert. Suppl.* 17 1976.
22. Johnson, D.C. y Dey, S.K.: Role of histamine in implantation: Dexametasone inhibits estradiol-induced implantation in the rat. *Biol. Reprod.* 22: 1136, 1980.

23. Saksena, S.K., Lau, I.F. y Chang, M.C.: Relationship Between oestrogen, prostaglandin F_{2α} and histamine in delayed implantation in the mouse. Acta Endocrinol. 81:801, 1976.
24. Phillips, C.A. y Poyser, N.L. Prostaglandins Leukotrienes and essential fatty acids. Studies on the involvement of Prostaglandins in Implantation in the rat. J. Reprod. Fert. 62:(73):163-65. 1981.
25. Blackdwell, G.J., Flower, R.J., Nijkemp, F.P. y Vane, J.: Phospholipase A2 activity of guinea pig isolated perfused lungs. Stimulation and inhibition by anti-inflammatory steroids. Brit. J. Pharm. 62:79.
26. Brandon, J.M. y Raval, P.J.: Interaction of estrogen and histamine during ovum implantation in the rat. Eur. J. Pharm. 57: 171, 1979.
27. Dey, S.K. y Johnson, D.C.: Adrenal gland modulates oestrogen requirement for implantation in the rat. J. Reprod. Fert. 79: 655. 1987.
28. Kennedy, T.G.: Evidence for a role for prostaglandins in the initiation of blastocyst implantation in the rat. Biol. Reprod. 16: 286, 1977.
29. Ruso-marie, F., Paing, M.M. y Duval, D.: Involvement of glucocorticoid of prostaglandin secretion. J. Biol. Chem. 254:8498, 1979.
30. Johnson, D.C. y Dey, S.K. Role of Histamine in implantation: Dexametasone inhibits estradiol-induced implantation in the rat. Biol. Reprod. 22:1136-1141, 1980.
31. Campbell, P.S.: Mechanism of the inhibition of uterotrophic responses by acute dexametasone pretreatment. Endocrinology, 103:716, 1978.
32. Dey, S.K. y Johnson, D.C.: Embryonic signals in pregnancy. Ann. N.Y. Acad. Sci. 476:49, 1986.
33. Szego, C.M.: The lysosome as a mediator of hormone action. Prog. Horm. Res. 30: 171, 1974.
34. Pérez Palacios, G., Larrea, F., Cerbón, M.A., Vilchis, F.: Mecanismo de acción de hormonas esteroides. En: J.J. Hicks y Díaz-Zagoya, Ed. Bioquímica e Inmunología. Vol II, 93 Ed. Facultad de Medicina UNAM, 1988.
35. Wood, J.C. y Berley, V.L. Biochemical changes in forming and regressing deciduoma in rat uterus. J. Reprod. Fertil. 23: 469, 1970.
36. Habraham, R., Hendy, R., Doubherty, W.J., Fulfs, J.C. y Goldberg, L.: Participation of lysosomes in early implantation in the rabbit. Exp. Mol. Pathol. 13, 229, 1970.
37. Lindford, E. y Losson, J.M.: A quantitative study of some lysosomal enzymes in the bovine endometrium during early pregnancy. J. Reprod. Fertil. 44: 249, 1975.
38. Wood, J.C., Williams, E.A., Barley, V.L., Cowdell, R.H.: The activity of hydrolytic enzymes in the human endometrium during the menstrual cycle. J. Obstet. Gynaec. Br. Common. 76: 724, 1969.
39. Bergstrom, S.: Estimation of proteolytic activity at mouse implantation sites by the gelatin digestion method. J. Reprod. Fertil. 23, 481, 1970.
40. Szego, C.M.: Mechanism of hormone action: parallels in receptor-mediated signal propagation for steroid and peptide effectors. Life Sciences. 35:2383, 1984.
41. Parr, Margaret.: A morphometric analysis of microtubules in relation to the inhibition of lysosome movement caused by colchicine. Eur. J. Cell Biol. 20:189-194, 1979.
42. Fagg, B. Martin, L., Rogers, B., Clark, E. y Quarmby, V.E.: A simple method for removing the luminal epithelium of the mouse uterus for biochemical studies. J. Reprod. Fert. 57:335, 1979.
43. Rosado, A., Mercado, E., Gallegos, J.A., Wens, M.A. y Aznar, R.: Subcellular distribution of lysosomal enzymes in the human endometrium. i. Normal menstrual cycle. Contraception 16:287, 1977.
44. Gardner, P.D. Brandon, R.L. Breakdown of colchicine and some derivatives upon irradiation with ultraviolet light. J. Am. Chem. Soc. 79, 6334, 1957.
45. Besey, O.A., Lowry, O.H., and Brock, M.J.: A method for rapid determination of acid phosphatase. J. Biol. Chem. 164: 321, 1947.
46. Fishman, W.H.: In Methods of Enzymatic Analysis. Ed. H.V. Bergmeyer Academic Press Inc. N.Y. p.869, 1963.

47. Lowry, O.H., Rosebrough, N.J., Farr, A.L. and Randall, R.J.: Protein measure with the folin-phenol reagent. J. Biol. Chem. 193:265-275, 1951.
48. Giles, K.W. and Myers, R.: An improved diphenylamine method for the estimation of deoxyribonucleic acid. Nature 206: 93, 1965.
49. Etherton, J.E. and Botham, M.M.: Lead method for acid phosphatase. Histochem. J., 2:507, 1970.
50. Shinkin, L.N., and Shumilina, N.A.: DNA synthesis and cell proliferation during formation of decidualoma in mice. J. Embryol. Exp. Morphol., 17:593-605, 1967.
51. Lobel, B.L., Levy, E., and Shelensky, M.C.: Studies on the mechanism of nidation. XXXIV. Dynamics of cellular interaction during preimplantation and implantation in the rat. Acta Endocrinol. (Suppl.), 123:7-109, 1967.
52. Sachs, L., and Shelensky, M.C.: The development and suppression of poliploidy in the developing and suppressed decidualoma in the rat. J. Endocrinol., 12: 146-151, 1965.
53. Dupont, H., Duluc, J.A., and Maillat, G. (1971): Evolution cytologique et genese de la poliploidie dans le deciduome experimental chez la ratte en gestation unilaterale. CR. Acad. Sci. Paris Ser D, 272: 2360, 1771.
54. Ansell, J.D., Barlow, P.W., and McLaren, A. (1974): Binucleate and polyploid cells in the decidua of the mouse. J. Embryol. Exp. Morphol., 31:223-227, 1974.
55. Moulton, B.C.: Separation of decidual cells by velocity sedimentation at unit gravity. Biol. Reprod. 18: 141-147, 1978.
56. Moulton, B.C. and Kesting, B.B. (1984): Uterine deoxyribonucleic acid synthesis during preimplantation in precursors of stromal cells differentiation during decidualization. Endocrinology, 11:1302-1307.
57. Heald, P.J. (1979) Changes in ornithine decarboxylase during early implantation in the rat. Biol. Reprod., 20:1195-1199, 1979.
58. Reid, R.J. and Heald, P.J. (1979): Protein metabolism of the rat uterus during the oestrous cycle, pregnancy and pseudopregnancy and as affected by an anti-implantation compound. ICI 46, 474. J. Reprod. Fertil., 27: 73-82, 1979.
59. Sengupta J, Roy SK, and Bandyopadhyay K: Hormonal control of implantation: A possible role of lysosomal function in the embryo-uterine interaction. J. Steroid Biochem 11:729-744, 1979.
60. Roberts, R.M., and Bazer, F.W. (1984) Uteroferrin a protein in search of a function. Bioessays 1, 8-11, 1984.
61. Smith, M.S.R., L.B. Wilson: Histochemical observations of early implantation in the mouse. J. Embryol. Exp. Morph. 25: 165-175, 1971.
62. Singh, V.N. J.N.: Amylase and acid phosphatase activities in luminal fluid of rat. Curr. Sci. 57(19):1088-1089, 1988.
63. Nooshine Dayani., Reid W., and McNaught. Receptor interconversion model of hormone action 2. requirement of both kinase and cyclic phosphatase activities for conferring estrogen binding activity to the estrogen receptor. Biochemistry, 29:2691-2698, 1990.
64. Capbell P.S. The mechanism of the inhibition of uterotrophic responses by acute dexamethasone pretreatment. Endocrinology, 103:7-16, 1978.
65. Naoki Terakawa, Ikuya Shimizu, Toshihiro Aono, Osamu Tanizawa and Keishi Matsumoto. Dexametasone inhibits the effects of oestrogen on the pituitary gland in rats. Acta Endocrinologica, 112: 64-70, 1986.
66. Shinohara Y., Nishida E., and Hata H. Initiation of DNA syntesis by microtubule disruption in quiescent rat 3Y1 cells Eur. J. Biochem 183:276-280, 1989.
67. Yarden, Y., & Schlessinger, J.: Human proto-oncogene c-kit: a new cell surface receptor tyrosine kinase for an unidentified ligand. Biochemistry 26, 1434-1442, 1987.