



**UNIVERSIDAD NACIONAL AUTONOMA
DE MEXICO**

ESCUELA NACIONAL DE ESTUDIOS PROFESIONALES
IZTACALA

EFFECTO DEL IONOFORO DE CALCIO A23187
SOBRE LA PROLIFERACION DEL EPITELIO
LUMINAL DE UTERO EN RATAS
OVARIECTOMIZADAS

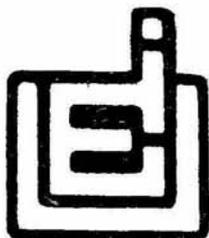
T E S I S

QUE PARA OBTENER EL TITULO DE:

B I O L O G O

P R E S E N T A :

CARMEN ALVAREZ RODRIGUEZ



LOS REYES IZTACALA, MEX.

1992



Universidad Nacional
Autónoma de México



UNAM – Dirección General de Bibliotecas
Tesis Digitales
Restricciones de uso

DERECHOS RESERVADOS ©
PROHIBIDA SU REPRODUCCIÓN TOTAL O PARCIAL

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

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

A MIS PADRES

ANA Y EULALIO, POR HABERME BRINDADO LA DICHA DE
VIVIR.

A MIS HERMANOS

ARTURO, EULALIO, MA. DE LA LUZ, GREGORIO, MIGUEL,
ANA IRMA, JAVIER Y ALICIA, PORQUE JUNTOS APRENDIMOS
A VIVIR Y A COMPARTIR MAS QUE ALEGRIAS.

A MIS AMIGOS

PORQUE DE LA AMISTAD PENDEN SENTIMIENTOS QUE NOS
MOTIVAN A SEGUIR VIVIENDO.

A MIS COMPAÑEROS Y AMIGOS DE LA UMF:

AL BIOL. MARTIN MARTINEZ TORRES, BIOL. MARTIN PALOMAR MORALES, P.
DE B.ROBERTO DE HARO HERNANDEZ, Y ESPECIALMENTE AL M. C. JESUS R.
QUIJANO VARGAS POR SUS SABIOS Y ACERTADOS CONSEJOS.

A LOS COMPAÑEROS DEL LAB. 4 DE GENETICA POR EL APOYO BRINDADO PARA
LA REALIZACION DE ESTE TRABAJO.

AL BIOL. DAVID SEGURA COBOS, POR SU AYUDA SIEMPRE OPORTUNA EN LA
ELABORACION DEL ESCRITO.

A MI ASESOR Y DIRECTOR DE TESIS:

M. EN C. LUIS ARTURO BAIZA GUTMAN, POR SUS ENSEÑANZAS, POR SUS
CONSEJOS, POR SU APOYO, POR SU PACIENCIA, POR SU TIEMPO,
PORTODO.

GRACIAS.

EL PRESENTE TRABAJO SE LLEVO A CABO EN EL LABORATORIO 3 DE
BIOLOGIA DE LA REPRODUCCION (UMF) DE LA ENEP IZTACALA BAJO LA
ASESORIA Y DIRECCION DEL M. EN C. LUIS ARTURO BAIZA
GUTMAN.

INDICE

	PAGINA
RESUMEN	1
INTRODUCCION	2
ANTECEDENTES	12
MATERIAL Y METODOS	24
RESULTADOS	32
DISCUSION	48
CONCLUSIONES	55
BIBLIOGRAFIA	56

RESUMEN

Los estrógenos inducen en el útero una serie de cambios genómicos y no genómicos que presentan una secuencia temporal específica. El aumento en la concentración intracelular de calcio ha sido relacionada con la proliferación de diversas células. Es posible que el aumento en calcio intracelular en el endometrio, contribuya o facilite la respuesta proliferativa subsiguiente.

En el presente trabajo se estudió el efecto del ionóforo de calcio A23187 sobre la proliferación del epitelio uterino en ratas ovariectomizadas, administrándoles en la luz uterina 20 μ l de una solución de ionóforo en tres dosis (0.01, 0.04 y 0.08 μ g/cuerno uterino), con o sin administración previa de 17 β -estradiol (10 μ g/Kg).

El tratamiento con A23187 en la dosis mayor (0.08 μ g/cuerno uterino) indujo un índice mitótico significativamente mayor al control (sólo con vehículo), lo cual sugiere un efecto del ionóforo sobre la proliferación celular, posiblemente debida al aumento de calcio intracelular. Sin embargo, no fueron observados incrementos en el peso uterino.

Cuando se aplicó el ionóforo en ratas tratadas con 17 β -estradiol no se observó un efecto proliferogénico adicional, ni en el índice mitótico ni en el peso uterino.

La inyección intraluminal de vehículo causó un aumento en la proliferación por sí misma, lo cual pudo deberse a la distensión uterina.

INTRODUCCION

El mecanismo o mecanismos que regulan la proliferación celular en diversos sistemas sólo es parcialmente conocido. La forma en que algunas hormonas como el 17β -estradiol promueve tal efecto tampoco se sabe del todo. Sin embargo, en diversas células se ha observado la participación del calcio en dicho proceso.

La proliferación celular, definida como el incremento en número de células resultantes de aquellas que han completado su ciclo celular (1), es un fenómeno que ocurre en varias poblaciones celulares tanto en condiciones normales como patológicas. En ocasiones el o los mecanismos que regulan este proceso se alteran provocando la formación de células que proliferan de manera descontrolada, es decir generando células cancerosas. En algunos casos, como en el cáncer mamario y prostático, la proliferación de células neoplásticas es dependiente de hormonas esteroides (2-6). Por ello, las aportaciones que se puedan dar sobre el mecanismo de acción de hormonas como el 17β -estradiol en provocar una respuesta de proliferación celular o de los mecanismos implicados en ésta son de gran importancia no solo en el avance del conocimiento sobre hormonas esteroides sino también por las implicaciones prácticas que puedan derivarse.

En el presente trabajo trataremos, en primer lugar, algunos aspectos generales sobre el aparato reproductor de la rata hembra y su relación con las hormonas del ovario, centrandonos en el útero, para a continuación plantear los estudios que hay acerca de la proliferación celular en respuesta a estrógenos y a la concentración de calcio citosólico, enfatizando el uso del ionóforo de calcio A23187.

I. MORFOFISIOLOGIA DEL UTERO

El aparato reproductor de la rata hembra está constituido por un par de ovarios y oviductos, el útero, la vagina y los genitales externos. Los órganos internos están apoyados por membranas denominadas, mesovario para el ovario, mesosalpinx para el oviducto y mesometrio para el útero (7).

El útero de la rata es de tipo duplex (7,8), es decir, presenta dos cuernos uterinos cada uno con un cuello o cérvix (Fig. 1) (9). Es un órgano hueco cuyas paredes consisten de una membrana mucosa que reviste el lumen, una capa intermedia de músculo liso y una envoltura serosa de peritoneo; desde el punto de vista fisiológico son de gran importancia dos capas: el endometrio y el miometrio, que corresponden a la mucosa y a la

capa intermedia respectivamente (7).

El endometrio presenta un revestimiento luminal formado por un epitelio cilíndrico y una capa superficial glandular con un soporte de tejido conectivo. Las glándulas endometriales son tubulares y ramificadas, se llegan a enrollar en la porción del adenómero. Las células del estroma son predominantemente fibroblastos; en algunas especies como en la rata, los fibroblastos se diferencian después de la implantación en células especializadas, conocidas como deciduales (7), las cuales juegan un papel importante durante la preñez. El grosor y la vascularidad de esta capa endometrial están influenciadas por las hormonas del ovario durante el ciclo estral, el cual representa un evento biológico característico de las hembras de mamíferos metaterios y euterios (excepto en primates) (9) que inicia cuando el animal ha alcanzado la madurez sexual y ocurre cada cierto período de tiempo. En la rata se presentan ciclos continuos cuya duración va de cuatro a seis días (10). En general el ciclo suele dividirse en cuatro etapas sucesivas: proestro, estro, metaestro y diestro. Durante éstas ocurren cambios morfológicos y funcionales en los órganos que constituyen el aparato reproductor; así como en los patrones de comportamiento y en las características físicas del animal (10). Uno de los criterios para distinguir cada una de las fases se basa en la citología observada en los lavados vaginales;

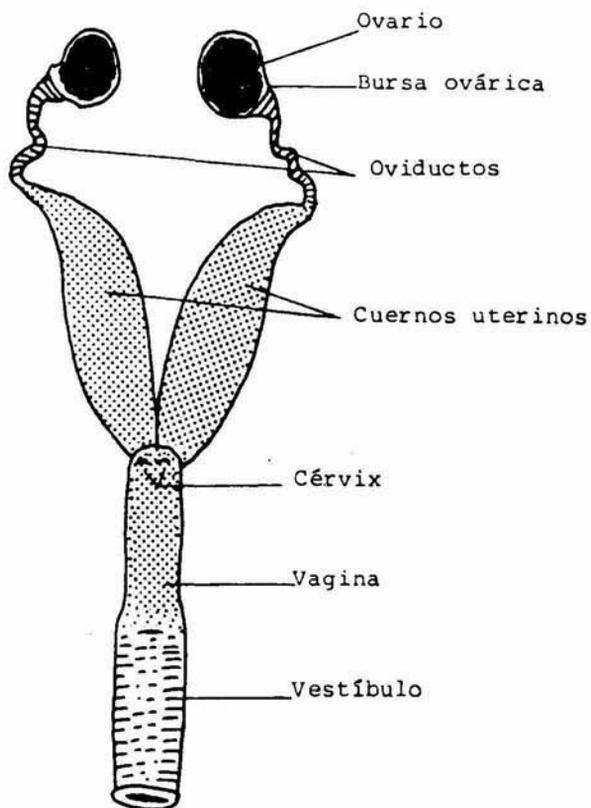


Fig. 1. Aparato reproductor de la rata. Observese el útero tipo duplex. Basado en van Tienhoven (9).

los cambios celulares presentes en la rata se muestran en la Fig. 2 (10).

En la rata, el fotoperíodo, la acción de feromonas y la dieta ejercen influencias sobre el ciclo estral, el cual también puede ser alterado por un mal funcionamiento de los órganos endócrinos (10).

En el útero, durante el proestro, el endometrio es condicionado por los estrógenos a incrementar su vascularidad; el epitelio luminal llega a ser bajo en altura y sus glándulas tienen algo de crecimiento, aunque permanecen rectas y se ramifican ligeramente. Durante el estro y el inicio del diestro, la estructura del endometrio es modulada por la progesterona y los estrógenos; el endometrio se engruesa, su superficie epitelial llega a ser más alta y las glándulas uterinas crecen a su máximo tamaño enrollándose y ramificándose más que en otras fases del ciclo, siendo su secreción por tanto más activa. En el diestro tardío, el endometrio se adelgaza y sus glándulas pierden tamaño y dejan de secretar (7).

Por su parte el miometrio, que es la porción muscular de la pared uterina, consiste de una gruesa capa circular interna y una capa delgada longitudinal externa de músculo liso entre las cuales

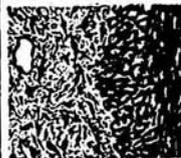
FASE DEL CICLO

PARED VAGINAL

LAVADO

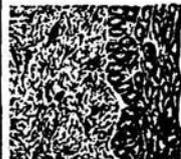
DURACION

ESTRO



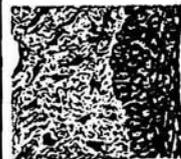
12 hr

METAESTRO



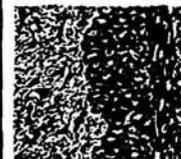
21 hr

DIESTRO



57 hr

PROESTRO



12 hr

Fig. 2. Ciclo estral. Morfología celular observada en la pared y en los lavados de la vagina durante las diferentes fases del ciclo. Tomado de Hafez (7).

está insertada una capa de tejido conectivo que contiene vasos sanguíneos, vasos linfáticos y nervios. La cantidad de tejido muscular se incrementa notablemente en la pared uterina durante la preñez (7).

El útero tiene varias funciones importantes: durante la copulación, su acción contráctil facilita el transporte de esperma hacia el oviducto para que se lleve a cabo la fertilización; durante el desarrollo preimplantacional, produce fluidos con los cuales se mantiene el blastocisto; después de la implantación, participa en la formación de la placenta y es el sitio en donde se desarrolla el embrión; y en el parto, participa en la expulsión del feto (7).

La morfología y función del útero está regulada por hormonas ováricas como veremos a continuación.

II. FUNCION ENDOCRINA DEL OVARIO SOBRE EL ENDOMETRIO

Las hormonas del ovario tienen efectos extensos sobre los tejidos del cuerpo. Estos pueden ser divididos en: 1) efectos sobre órganos blancos periféricos, sobre todo en el crecimiento y funcionamiento del tracto reproductivo, y 2) sobre los órganos

blancos centrales, especialmente en el sistema hipotalámico-hipofisiario (11).

Las estimaciones de los intervalos y las cantidades en que son secretadas las hormonas del ovario durante el ciclo estral (Fig. 3) (12) muestran que, justo antes de la ovulación, son secretados niveles relativamente altos de estrógenos alcanzando un nivel máximo preovulatorio. Después de este pico de estrógenos hay incremento en la secreción de progesterona, pero también son secretadas pequeñas cantidades de estrógenos.

El efecto de las hormonas del ovario sobre el tracto reproductivo, especialmente en el útero, ha sido ampliamente estudiado en hembras de rata o ratón inmaduras o maduras ovariectomizadas (13-24). Después de la ovariectomía el útero se llega a atrofiar y su suplemento de sangre se reduce. Los cambios característicos del estro son provocados en el endometrio con la administración de estrógenos, los que inducen un incremento inicial en peso del útero asociado con el aumento de aporte de sangre uterina y con el incremento en la permeabilidad de los capilares uterinos (11, 13, 25). Además han sido descritos cambios en las células epiteliales endometriales coincidentes con los efectos vasculares (18, 19, 23). Así, las células epiteliales que revisten el lumen y las glándulas proliferan e incrementan de

tamaño. El consumo de oxígeno del útero se eleva significativamente en respuesta a esta hormona y muchas enzimas llegan a ser activas; la cantidad de fosfatasa alcalina es relativamente baja, pero con la administración de estrógenos se presenta en cantidades considerables en la superficie luminal del epitelio y de las glándulas (11).

Los cambios inducidos por estrógenos son importantes para preparar el endometrio en la subsecuente respuesta a la progesterona. La progesterona que es secretada en forma creciente en un período subsecuente al pico preovulatorio de secreción de estrógenos también promueve ciertos efectos en el endometrio (11). Una de las principales respuestas del endometrio a esta hormona es el desarrollo de sus glándulas, lo cual no ocurre si los animales no han sido previamente sensibilizados con estrógenos. Durante el inicio de la preñez, en la rata y el ratón, los estrógenos estimulan a las células epiteliales a dividirse y a diferenciarse para el período posterior de implantación del blastocisto. La exposición a progesterona; después de que ha ocurrido proliferación por la acción de estrógenos, inhibe la respuesta mitótica de las células epiteliales del endometrio; estimula a las glándulas a secretar (la secreción inducida por la progesterona es muy limitada en ausencia de estrógenos). En tanto las células del estroma reaccionan a dicha hormona acumulando glucógeno en su citoplasma.

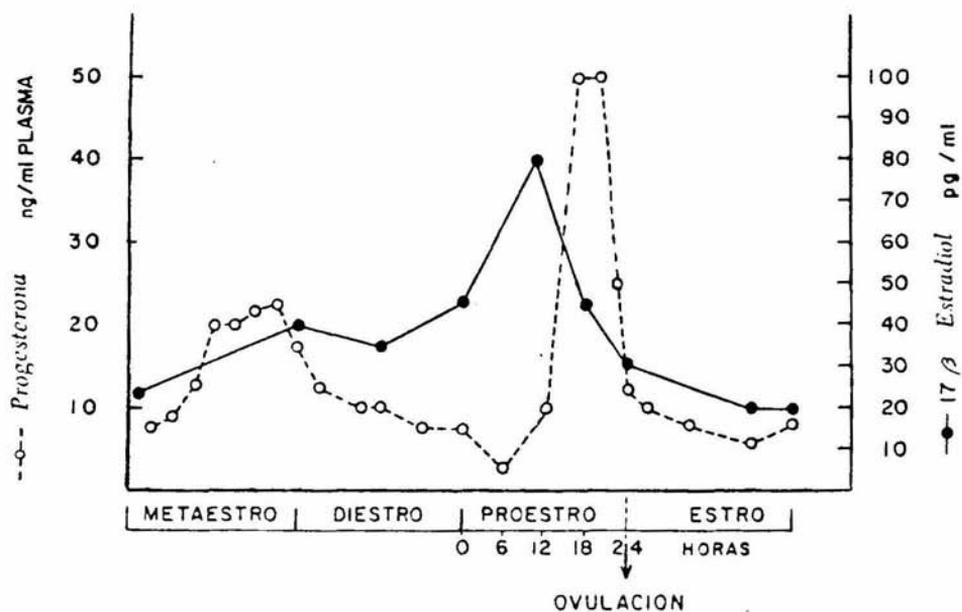


Fig. 3. Concentraciones plasmáticas circulantes de 17β-estradiol y progesterona durante el ciclo estral en la rata. Basado en Arrau (12).

ANTECEDENTES

I. PROLIFERACION DEL EPITELIO UTERINO

La proliferación celular, en el epitelio uterino, es inducida por los estrógenos (17β -estradiol) (18, 19, 23), los cuales al parecer presentan un amplio espectro de acción en el útero y otros órganos (9, 13-30). El útero responde de dos formas a esta hormona, una es denominada respuesta no genómica y la otra respuesta genómica. La respuesta no genómica está representada por la migración de eosinófilos al útero, incremento de la permeabilidad vascular, liberación de histamina e imbibición de agua (29); puede o no ser mediada por receptores y no se ve afectada por inhibidores de síntesis de ARN y de proteínas (29). La respuesta genómica tiene significancia en el incremento de ADN, ARN y síntesis de proteínas, así como en el crecimiento y división celular, ésta es mediada por receptores intracelulares (21, 28, 31-34).

Clásicamente, el mecanismo de acción de hormonas esteroideas supone la entrada inicial de la hormona a la célula blanco por difusión simple, posteriormente la hormona se une a un receptor citoplásmico de alta afinidad, formando un complejo

hormona-receptor (H-R) que luego es activado y transferido al núcleo, donde se une a sitios selectivos en la cromatina (14, 26, 29).

En el caso de los estrógenos ha sido propuesto que la hormona intreractúa con su célula blanco uniéndose a receptores proteicos en el citosol para formar un complejo H-R, el cual posteriormente es activado y luego traslocado al núcleo (14, 29-34). Los primeros estudios suponían la localización del receptor no ocupado en el citosol y su traslocación al núcleo después de unirse a la hormona (33). En la actualidad hay evidencias de que el sitio de localización es exclusivamente nuclear y que su presencia en el citosol se debía a un artificio metodológico (35)

La interacción entre el complejo H-R y el genoma conduce a la síntesis de ARN y proteínas. Esta síntesis de proteínas inducidas específicamente es finalmente la responsable de la respuesta fisiológica de la hormona (29, 34, 35).

No obstante lo anterior, se han planteado tres hipótesis para explicar el mecanismo por el cual el 17β -estradiol induce la proliferación celular: 1) la directa positiva, 2) la indirecta positiva y 3) la indirecta negativa. La hipótesis directa positiva establece que la proliferación celular sería resultado del

mecanismo de acción clásico mediado por receptores nucleares, a través del cual, los estrógenos inducirían directamente la proliferación en la célula blanco (18, 19, 33, 34). La hipótesis indirecta positiva sugiere a los estrógenos como promotores de la síntesis y/o liberación de un factor de crecimiento o estromedina (4, 23, 36). La hipótesis indirecta negativa propone que la hormona bloquea la síntesis y/o liberación de un inhibidor de crecimiento, o que neutraliza la acción de éste (26, 37).

Los trabajos que apoyan la hipótesis directa positiva, se basan en estudios en modelos *in vivo*, en los que se administran estrógenos (17 β -estradiol) y se observa la respuesta en algún órgano blanco; frecuentemente es en útero de rata o ratón. En éstos se muestra claramente que la administración sistémica (14, 21, 33, 34) o local de manera intraluminal en el útero (18) de tal hormona promueve proliferación celular a través de un mecanismo mediado por receptores a estrógenos.

La posibilidad de una acción proliferogénica indirecta de los estrógenos surge de la observación de algunas líneas celulares derivadas de células sensibles a estrógenos, en cultivo durante la fase de crecimiento exponencial, que no son afectadas por ellos (27) y de que en aves (codorniz) la administración de 17 β -estradiol en la circulación porta hepática, de modo que éste

sea metabolizado en el hígado y no se alteren sus niveles séricos sistémicos, induce proliferación de manera indirecta en el oviducto tal vez mediado por un factor hepático (26); sin embargo, en un procedimiento similar no pudo demostrarse el papel intermediario del hígado en rata (26).

Con respecto a la hipótesis indirecta positiva se han realizado diversos trabajos para mostrar la existencia de factores de crecimiento, que actúen directamente sobre los órganos blanco a estrógenos, producidos por otros tejidos en ocasiones estimulados por la acción de estrógenos. Así, se han probado extractos de diversos órganos (hipófisis, útero, riñón) después de la administración de 17β -estradiol a ratas ovariectomizadas y se ha encontrado que estos extractos tienen una capacidad proliferogénica sobre células blanco a esta hormona (36). Del mismo modo; en cultivos celulares de epitelio uterino de ratona inmadura, que crece en un medio suplementado con factor de crecimiento epidermal (EGF) y Ca^{2+} , se observa una respuesta de proliferación (23). Otros reportes en ratonas neonatas, cuyo útero aún carece de receptores a estrógenos, indican que hay síntesis de ADN en las células epiteliales lumbinales de tal órgano estimuladas por 17β -estradiol *in vivo*, lo cual sugiere una acción de esta hormona a través de un mecanismo no mediado por receptores a la misma (38).

Los datos reportados sobre la hipótesis indirecta negativa, son referentes a estudios *in vivo* e *in vitro*. Se ha sugerido, de estudios en órganos sexuales secundarios de ratas ovariectomizadas y adrenalectomizadas con hepatectomía parcial, que el hígado puede producir un inhibidor del crecimiento de éstos y que el 17β -estradiol puede suprimir la síntesis de este inhibidor y así actuar indirectamente sobre dichos órganos (26).

Por otra parte, en células tumorales de cáncer mamario clonadas, se han probado medios suplementados con sueros de humano y de bovino que tienen un efecto inhibitorio específico de la proliferación, observándose que este efecto solamente puede ser neutralizado por el 17β -estradiol o por la dilución del suero (37).

II. REGULACION DE CALCIO CELULAR

La regulación de la proliferación celular es un proceso complejo en el que intervienen cambios en los distintos componentes celulares, desde la membrana al núcleo, dentro de éstos se consideran importantes los cambios en el flujo de iones.

En las células de mamífero la concentración de calcio es de alrededor de $0.1 \mu\text{M}$ y en el fluido extracelular es del orden de

$1 \times 10^3 \mu\text{M}$ (39, 40). El calcio citosólico proviene de dos fuentes, una de origen extracelular y la otra de origen intracelular. Con respecto a la primera el ión penetra a la célula a través de canales de calcio, los cuales pueden ser dependientes o no de voltaje (41). Dichos canales corresponden a estructuras proteicas que forman poros a través de la membrana. En las células excitables estos canales se abren en respuesta a un potencial de acción (canales dependientes de voltaje). En otras células donde no se producen potenciales de acción, se cree que estos canales (canales independientes de voltaje) se encuentran permanentemente abiertos o que responden a un control por parte de AMPc (39), a proteína cinasa C (41, 42) o a proteínas G (41).

Los cambios en la concentración de calcio intracelular no sólo se deben a la entrada de iones calcio a la célula. Algunos organelos como la mitocondria y el reticulo endoplásmico son capaces de almacenar y liberar el calcio al citosol (39-41).

En algunos sistemas, cuando una hormona interactúa con su receptor, se activa una fosfolipasa C que cataliza la hidrólisis del fosfatidilinositol 4,5-bisfosfato de la membrana plasmática, lo cual conduce a la producción de diacilglicerol y de inositol 1,4,5-trifosfato (39-41). El diacilglicerol y el calcio activan a la proteína cinasa C, la cual se encarga de la

fosforilación de proteínas celulares (42). El segundo producto de la actividad de la fosfolipasa C, el inositol 1, 4, 5-trifosfato, induce la liberación de calcio de los reservorios intracelulares (39, 40).

El calcio intracelular es captado por proteínas receptoras de éste, la más común es la calmodulina presente en todos los tipos celulares de mamífero (39, 40), su función es mediar los efectos intracelulares de la señal promovida por el calcio (43).

Cuando el calcio intracelular se une a la calmodulina, ésta se enlaza a la bomba de calcio y la activa (39). Dicha bomba es una ATPasa, que permite al sistema traslocar calcio fuera de la célula. La ATPasa, puede acarrear el calcio, mientras una porción rompe ATP, la otra une y trasloca al ión. Esta bomba al tiempo que expulsa calcio introduce dos protones. La ATPasa también puede ser activada por otros compuestos aparte de la calmodulina, uno de ellos es el fosfatidilinositol 4, 5-bifosfato (39).

La ATPasa de la membrana plasmática, un transportador de alta afinidad, responde a aumentos minúsculos en la concentración de calcio citosólico (39). Cambios más drásticos de este ión, activan otro sistema para exportar calcio celular, el sistema de intercambio sodio-calcio, el cual está constituido por una

proteína particularmente abundante en las células excitables (41).

Las mitocondrias pueden regular variaciones pequeñas (submicromolares) y rápidas en la concentración de calcio citosólico, ya que su membrana externa es permeable al ión, el cual no es inerte dentro de este organelo, puesto que participa en los procesos metabólicos que abastecen la cadena respiratoria (39).

IV. CALCIO Y PROLIFERACION CELULAR

En algunos sistemas la proliferación celular ha sido relacionada a cambios en la concentración de calcio citosólico (44-48). El ión calcio tiene un papel importante en diversos procesos fisiológicos: sirve como un factor acoplador entre la excitación y la contracción en todos los tipos musculares; entre la excitación y la secreción en las terminaciones nerviosas y en las glándulas tanto endócrinas como exócrinas; está también involucrado en la regulación de la glucogenólisis en el músculo y en la gluconeogénesis en el riñón y posiblemente en el hígado; como intermediario en la acción de la hormona estimulante de los melanocitos; en la acción de la vasopresina sobre la vejiga de

sapo y en la acción de la hormona tiroidea sobre la función de las células del hueso (49).

El calcio ha sido implicado en la proliferación de diversas poblaciones celulares: en los condrocitos (44), en los fibroblastos 3T3 (45), en linfocitos T (46, 47), en timocitos (48), en células epidermales (50), en células de la glándula mamaria (51) y en células epiteliales uterinas de ratón (23). Los diversos agentes mitogénicos empleados en el estudio de la proliferación de algunas de estas poblaciones celulares tales como el EGF, la concavalina A o el ionóforo de calcio ionomicina promueven incrementos en la concentración de calcio citosólico (44-48). Además para que ocurra la proliferación de las células epiteliales uterinas, epidermales y de la glándula mamaria, en cultivo, es necesario que en el medio exista una concentración óptima de este ión que varía de acuerdo al tipo celular (23, 50, 51).

IV. IONOFORO A23187

En varios modelos implementados para el estudio del papel del calcio intracelular se han utilizado ionóforos de calcio (39-42), es decir, compuestos acarreadores de calcio extracelular que incrementan la permeabilidad de la membrana celular al ión.

Los ionóforos comprenden una variedad de compuestos sintéticos o sintetizados por microorganismos que tienen la capacidad de acarrear diversos iones. Estos compuestos presentan un peso molecular de 500 a 2000 daltones y poseen una parte hidrofílica central a la cual se une el ión (56).

El ionóforo A23187 es un antibiótico aislado de cultivos de *Streptomyces chartreusensis*, cuya composición química corresponde a la de un ácido carboxílico (Fig. 4) (56), con un peso molecular de 523 daltones. Actúa como un acarreador móvil para el transporte específico de cationes divalentes (Ca^{++} y Mg^{++}) de un medio acuoso amortiguado con pH de 7.4 a una fase orgánica (57). En virtud de su capacidad selectiva de transportar iones de calcio a través de la membrana celular, puede modular la actividad del ión, ya sea catalizando el intercambio electroneutro de Ca^{++} por dos protones (2H^{+}) a través de la membrana plasmática y/o movilizándolo Ca^{++} de los reservorios internos (54, 58).

Partiendo del conocimiento que se tiene acerca de la proliferación celular en el endometrio estimulada por estrógenos o en otros tipos celulares relacionada a cambios en la concentración de calcio citosólico y considerando que en células endometriales *in vitro* de ratas ovariectomizadas la administración de 17β -estradiol promueve variaciones intracelulares en el contenido

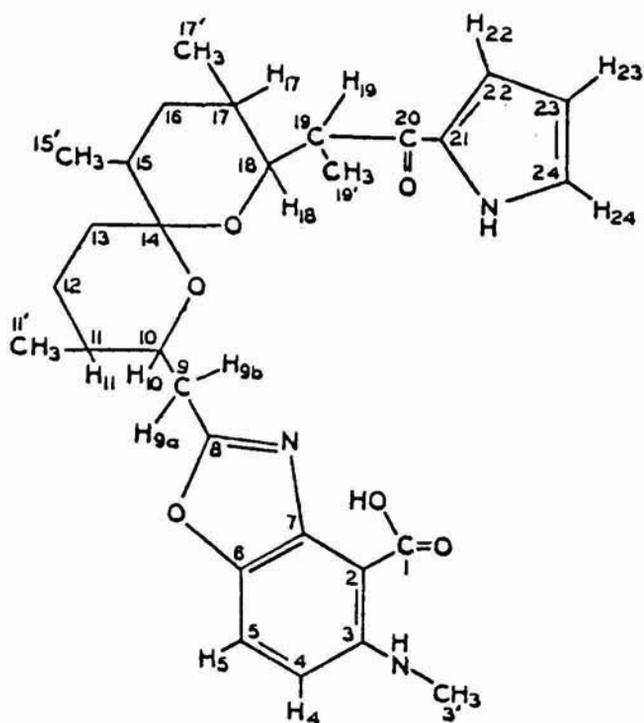


Fig. 4. Fórmula estructural del ionóforo A23187. Tomado de Deber y Pfeirffer (43).

neto de Ca^{2+} debidos a la salida y entrada de este ión (16), se puede suponer la existencia de una estrecha relación entre el mecanismo de acción de estrógenos y su efecto sobre el calcio citosólico con la respuesta de proliferación. Para apoyar tal hipótesis pretendemos cubrir los siguientes objetivos.

OBJETIVOS:

1) Evaluar si la administración intraluminal del ionóforo A23187 induce proliferación del epitelio luminal uterino.

2) Determinar si el ionóforo A23187 tiene un efecto sinérgico con el 17β -estradiol en la proliferación del epitelio luminal uterino al administrarlos simultáneamente.

MATERIAL Y METODOS

A. Animales

Se emplearon ratas Wistar vírgenes con un peso de 191 ± 24 gr., las cuales fueron mantenidas bajo un fotoperíodo de 14 hrs. de luz y 10 hrs. de oscuridad, con agua y alimento *ad libitum* a una temperatura de $22 \pm 1^{\circ}\text{C}$ (Bioterio ENEP Iztacala).

B. Ovariectomía

Las ratas se anestesiaron con pentobarbital sódico (0.063g/ml) (Anestesal, Smith Kline, Norden de México) a una dosis de 5mg por cada 100g de peso y se ovariectomizaron a través de dos incisiones dorsolaterales. Una semana después del proceso quirúrgico se tomaron frotis vaginales diariamente hasta completar la segunda semana, para verificar que permanecieran en diestro, lo que indica que se extirpó bien el ovario. Posteriormente fueron sometidas a tratamientos diferentes, especificados más adelante, hasta completar nueve grupos de cinco a ocho ratas cada uno y que se resumen en el cuadro 1.

TRATAMIENTO	A23187 (μ g/cuerno)			E ₂ (ng/kg)	VEHICULO (μ l/cuerno)
	0.01	0.04	0.08	1B	2B
TE1	**				
TE2		**			
TE3			**		
TC1					**
TE5		**		**	
TE6			**	**	
TC2				**	**
TC3				**	
TC4					

Cuadro 1. Se muestran las características de cada tratamiento. El cuadro relleno (**) indica la administración intraluminal de ionóforo A23187 o vehículo (etanol al 0.2%) y/o 17 β -ESTRADIOL (E2) subcutáneo a ratas previamente ovariectomizadas así como las dosis en que fueron administradas.

C. Tratamientos

I. Grupo Experimental

a) Administración de ionóforo A23187 a la luz uterina. El ionóforo A23187 (Sigma Chemical) fué diluído en etanol al 0.2% en solución salina amortiguada con fosfatos (PBS) estéril y preparado a tres concentraciones: 0.05, 2 y 4 $\mu\text{g}/\text{ml}$. Cada una de las cuales correspondió a un tratamiento diferente. Para su administración a las ratas previamente ovariectomizadas, se les practicó una insición abdominal aplicando 20 μl de las soluciones de diferente concentración del ionóforo intraluminalmente en ambos cuernos uterinos con una microjeringa Hamilton de 25 μl , por tanto se inyectó 0.01, 0.04 y 0.08 $\mu\text{g}/\text{cuerno}$ uterino (representados como TE1, TE2, TE3 respectivamente en el cuadro 1). Cada cuerno uterino se ligo con hilo absorbible (catgut crómico 3/0) en el extremo próximo al cérvix antes de la inyección de A23187. En cada uno de los tratamientos se inició con el cuerno uterino derecho y se inyectó por el extremo distal al cérvix (ver Fig. 5).

b) Administración intraluminal del ionóforo A23187 a ratas previamente estrogenizadas. El 17β -estradiol (Sigma Chemical) fué administrado subcutáneamente en una dosis de 10 $\mu\text{g}/\text{Kg}$ de peso,

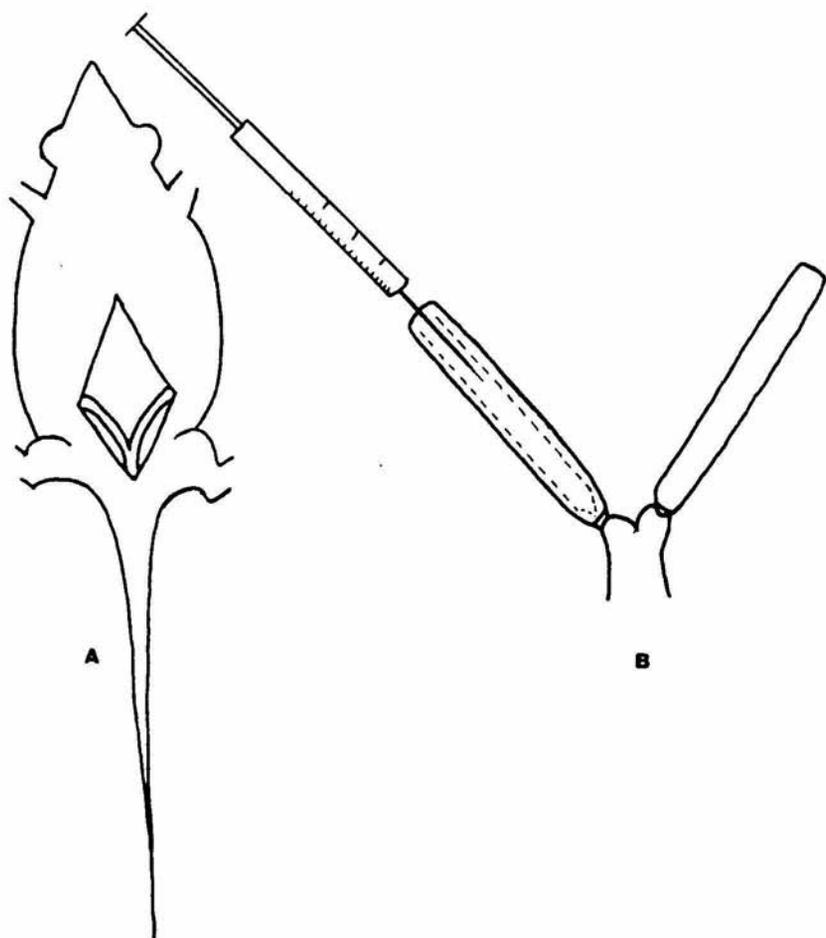


Fig. 5. Inyección intraluminal de A23187. Se muestra la aplicación del ionóforo en la luz del cuerno uterino de una rata ovariectomizada. En A se observa la insición abdominal que se realizó para tener acceso al útero y en B la forma en que se administró el ionóforo.

diluido en etanol al 1% en PBS. Después de cinco minutos aproximadamente se aplicó el ionóforo de acuerdo al esquema mencionado en la parte anterior; estos tratamientos están representados como TE4, TE5, TE6 en el cuadro 1.

II. Grupo Control

Los animales correspondientes a este grupo fueron sometidos a diversos tratamientos: a) administración de 20 μ l del vehículo del ionóforo en la luz uterina (etanol al 0.2% en PBS), representado como TC1 en el cuadro 1, y b) administración de 20 μ l de vehículo en la luz a ratas tratadas con 17β -estradiol (10 μ g/Kg subcutáneamente), representado como TC2 en el cuadro 1. Estos grupos corresponden a los controles de los tratamientos con A23187 y con 17β -estradiol + A23187, respectivamente.

Además se consideró la conveniencia de otros dos grupos controles en los que no se administrara vehículo en la luz uterina a ratas ovariectomizadas con o sin tratamiento hormonal (representados como TC3 y TC4 en el cuadro 1). Puesto que ha sido reportado que la distensión uterina por la inyección de líquidos intraluminalmente puede causar proliferación epitelial (59).

D. Aplicación de Colchicina

Del grupo experimental se formaron seis tratamientos (representados como TE1-TE6 en el cuadro 1) y del control, cuatro (representados como TC1-TC4 en el cuadro 1). En ambos grupos se administró colchicina (Sigma Chemical) subcutáneamente en una dosis de 0.1 mg/100g de peso, a las 21 hrs. después del tratamiento. Los animales se sacrificaron por dislocación cervical seis horas después de la aplicación de la colchicina (ver Fig. 6).

E. Extirpación y Procesamiento del Utero

A las ratas sacrificadas se les extirpó el útero, el cual fué disecado y limpiado de grasa y tejido conectivo, además se les quitaron las ligaduras de hilo absorbible. El útero completo también fué enjuagado en PBS y colocado sobre papel filtro humedecido con la misma solución en una caja Petri, mientras se terminaba de limpiar y se pesaba. Tanto el PBS utilizado para los enjuagues del útero como la caja Petri, donde se colocó éste, se mantuvieron sobre hielo. Posteriormente el órgano se pesó en una balanza analítica Sartorius y el tercio medio del cuerno derecho fué fijado en solución de Bouin y procesado mediante la técnica histológica rutinaria. Se hicieron cortes

histológicos transversales seriados de 3 μ m de grosor y se tiñeron posteriormente con hematoxilina y eosina.

F. Determinación del Índice Mitótico

Se determinaron los índices mitóticos (I. M.) (s) en base al conteo de núcleos en mitosis (metafase) en células del epitelio luminal de uno de cada ocho cortes del útero hasta completar un total de 3000 células por cada fragmento uterino. El I. M. se expresó como número de células en metafase por cada 1000 células epiteliales.

G. Análisis Estadístico

Los resultados obtenidos de dichos parámetros de ambos grupos, experimentales con respecto a los controles, fueron sometidos a un análisis de varianza. Posteriormente se aplicó la prueba de Tukey para determinar a que tratamiento se debían las diferencias. La prueba de t de student se aplicó solamente para los grupos pareados.

METODOLOGIA

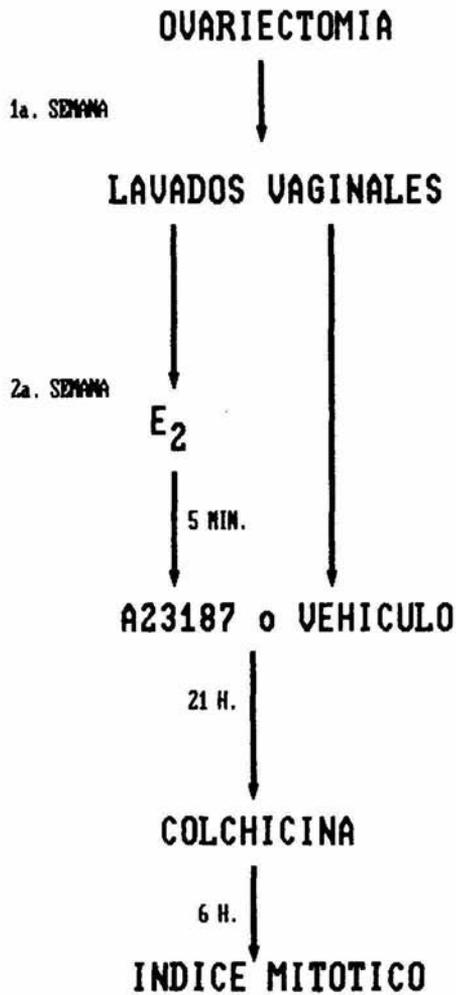


Fig. 6. Representa la cronología establecida del protocolo metodológico.

RESULTADOS

I. Efecto del ionóforo A23187 sobre la proliferación del epitelio luminal endometrial y el peso uterino en ratas ovariectomizadas.

La administración intraluminal de A23187 en los cuernos uterinos (C. U.) (ver gráfica 1) mostró que las dosis de 0.04 y 0.08 $\mu\text{g}/\text{C. U.}$ fueron capaces de promover incrementos en la proliferación celular epitelial, cuyos I. M. (s) fueron de 22 ± 9 y 81 ± 21 , respectivamente. Al comparar estos grupos con el control al cual se le había aplicado únicamente vehículo en la luz (dosis cero del ionóforo) y cuyo I. M. fue de 13 ± 6 ; resultó significativamente mayor el I. M. obtenido en la dosis más alta de ionóforo empleada ($P \leq 0.01$, ANOVA y prueba de Tukey). Cuando se realizó un análisis de correlación de los datos se encontró un coeficiente, entre la dosis de ionóforo y el índice mitótico de 0.89 por lo que podemos hablar de una tendencia del I. M. a incrementar cuando la dosis de ionóforo aumenta.

La estimulación de la proliferación celular por parte del ionóforo A23187 no fue manifiesta en el peso húmedo uterino (P. U.), ni aún en la dosis mayor de ionóforo empleada (0.08 $\mu\text{g}/\text{C. U.}$).

En las gráficas 2 y 3 donde se muestran los valores para el P. U. y de la relación de éste con el peso corporal (P.U./P.C.), respectivamente; no se observan cambios significantes ($P \geq 0.05$, ANOVA) para las diferentes dosis utilizadas de ionóforo en cada uno de estos parámetros.

II. Respuesta uterina a la administración simultánea de 17β -estradiol y A23187.

La administración de A23187 a ratas que recibieron previamente 17β -estradiol no causó cambios, en la proliferación celular determinada a través de los I. M. (s), adicionales a los promovidos únicamente por la hormona.

Como se observa en la gráfica 4, los I. M.(s) de las diferentes dosis de A23187 empleadas, no mostraron diferencias significativas ($P \geq 0.05$, ANOVA), con respecto a su grupo control, el cual recibió 17β -estradiol subcutáneo y vehículo en la luz uterina. Es notable, sin embargo, que el error estándar (E. E.) para cada media (\bar{X}), en esta misma gráfica, es relativamente grande, lo cual indica una enorme variabilidad en este parámetro en cuestión.

Así mismo, tampoco fueron observados cambios significativos ($P \geq 0.05$, ANOVA) en los pesos húmedos uterinos (ver gráfica 5) o en la relación de éstos sobre el peso corporal (ver gráfica 6) debidos al tratamiento con ionóforo.

Se debe señalar, además que la proliferación inducida por la dosis más alta de ionóforo fué menor a la inducida sólo por el 17β -estradiol (ver gráficas 1 y 4).

III. Efecto de la administración del vehículo intraluminal (etanol al 0.2% en PBS) sobre la proliferación del epitelio y el peso uterino.

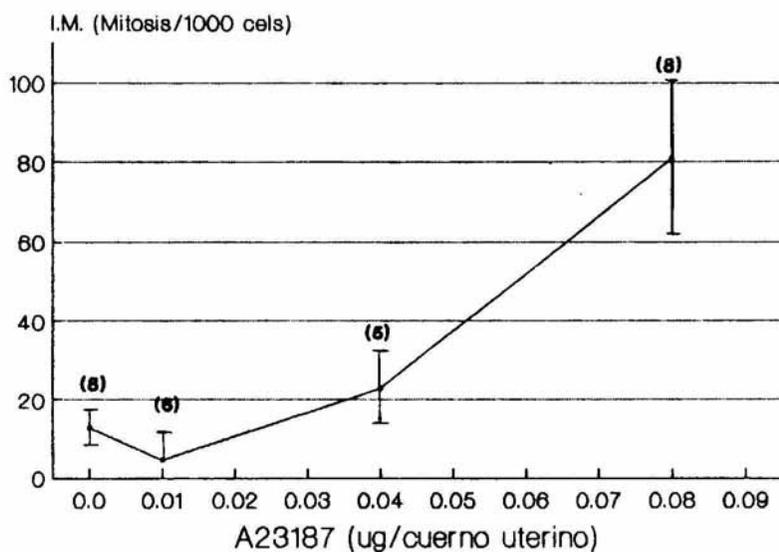
La aplicación de 20 μ l de vehículo a ratas ovariectomizadas produjo un incremento significativo ($P \leq 0.05$, t de student) en el índice mitótico, el peso húmedo uterino y la relación P. U./P. C. con respecto a sus grupo control.

El I. M. mostró un aumento notable de casi 30 veces en las ratas que recibieron el vehículo, con respecto a las ratas únicamente ovariectomizadas, lo cual se observa en la gráfica 7.

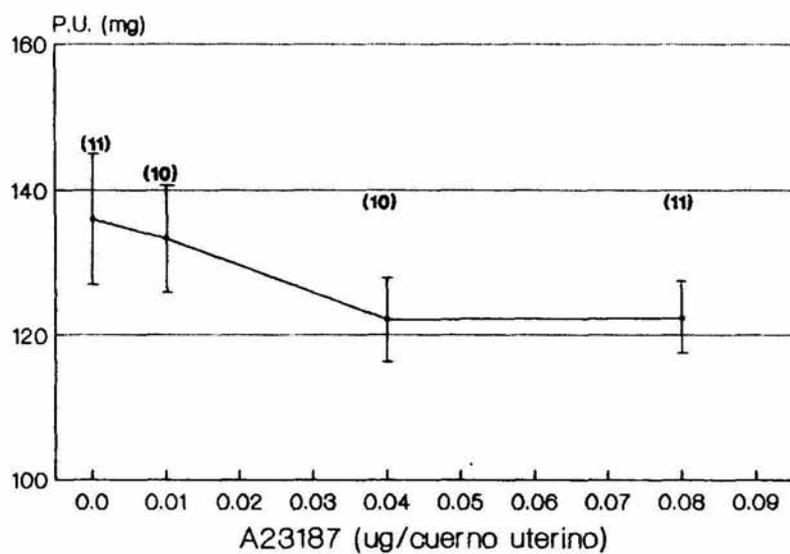
Los incrementos en P. U. y P. U./P. C. mostrados en las gráficas 8 y 9, respectivamente, fueron de alrededor de 1.4 veces

mayores en los cuernos uterinos tratados con vehículo.

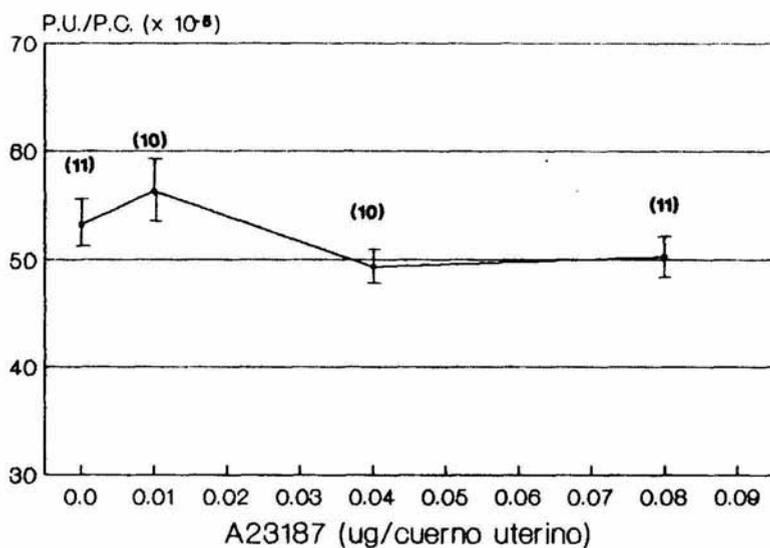
En las ratas que recibieron 17 β -estradiol y cuyos cuernos uterinos fueron tratados con vehículo en la luz, no se observaron incrementos significativos ($P \geq 0.05$, t de student) en cada uno de los parámetros mencionados anteriormente con relación a las que no se les administró vehículo (ver gráficas 10-12).



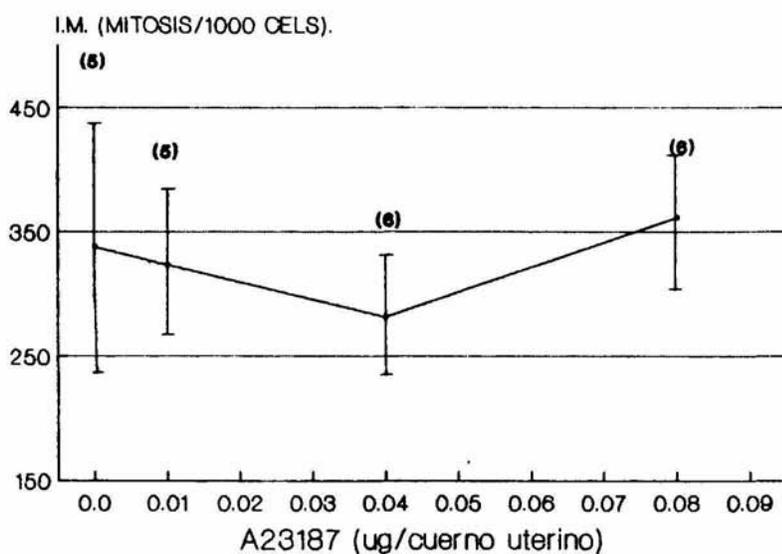
Gráfica 1. Efecto del ionóforo A23187 en el índice mitótico (I. M.) del epitelio luminal uterino de ratas ovariectomizadas. Cada valor representa la $\bar{X} \pm E.E.$ y (n) el número de animales utilizados.



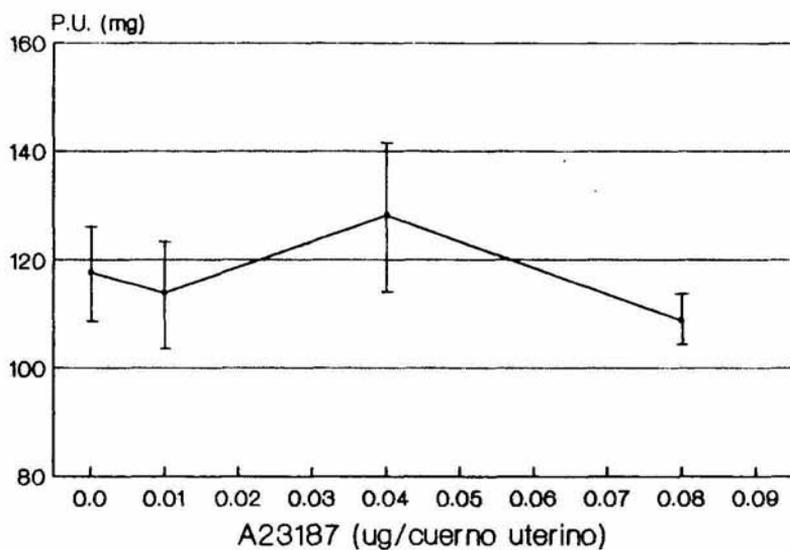
Gráfica 2. Efecto del ionóforo A23187 sobre el peso húmedo uterino (P. U.) de ratas ovariectomizadas. Cada valor representa la $\bar{X} \pm E.E.$ y (n) el número de animales utilizados.



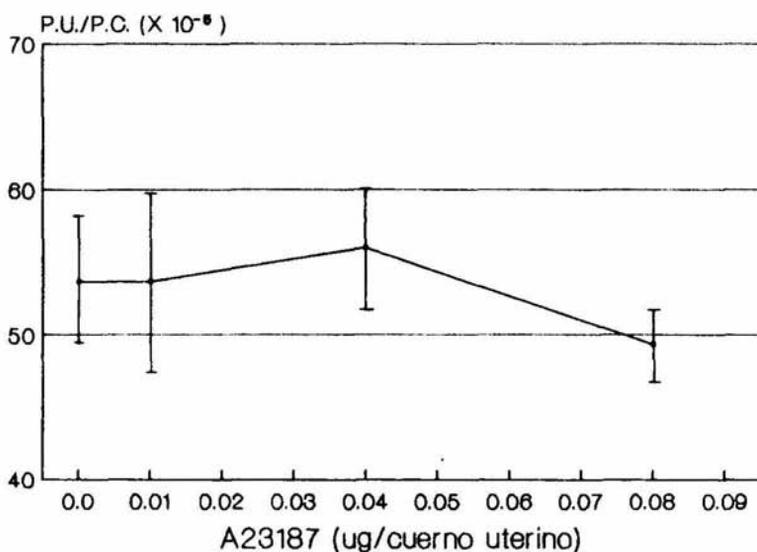
Gráfica 3. Efecto del ionóforo A23187 sobre la relación peso húmedo uterino (P. U.)/peso corporal (P. C.) en ratas ovariectomizadas. Cada valor representa la $\bar{X} \pm E.E.$ y (n) el número de animales utilizados.



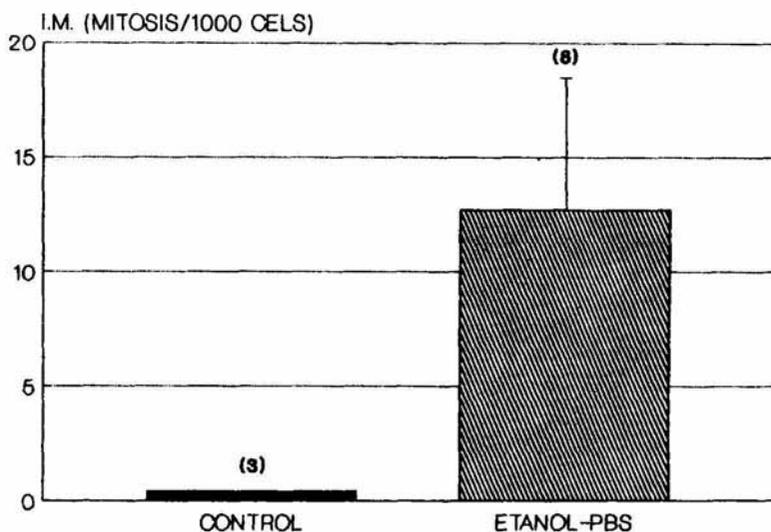
Gráfica 4. Efecto del ionóforo A23187 en el índice mitótico (I. M.) del epitelio luminal uterino de ratas ovariectomizadas estimuladas con 17β -estradiol ($10 \mu\text{g}/\text{Kg}$) subcutáneo. Cada valor representa la $\bar{x} \pm \text{E.E.}$ y (n) el número de animales utilizados.



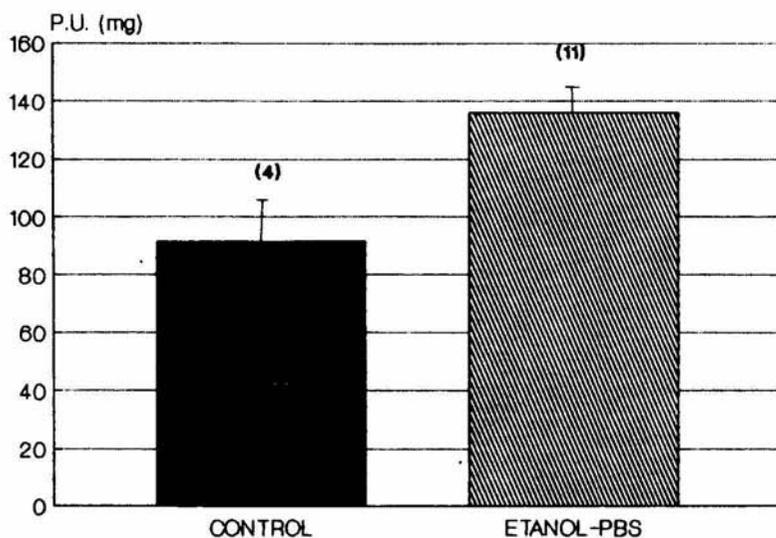
Gráfica 5. Efecto del ionóforo A23187 sobre el peso húmedo uterino (P. U.) de ratas ovariectomizadas estimuladas con 17β -estradiol ($10 \mu\text{g}/\text{Kg}$) subcutáneo. Cada valor representa la $\bar{X} \pm \text{E.E.}$ y (n=6) el número de animales utilizados.



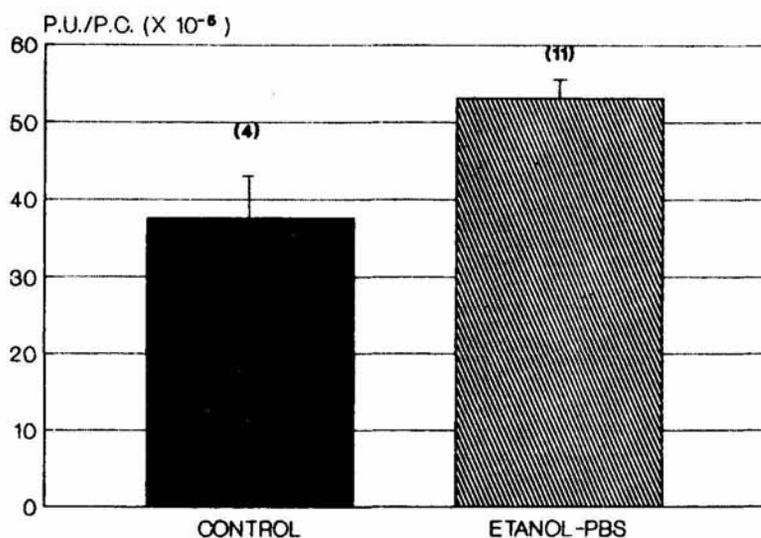
Gráfica 6. Efecto del ionóforo A23187 sobre la relación peso húmedo uterino (P. U.) / peso corporal (P. C.) en ratas ovariectomizadas estimuladas con 17β-estradiol (10 μg/Kg) subcutáneo. Cada valor representa la $\bar{x} \pm E.E.$ y (n=6) el número de animales utilizados.



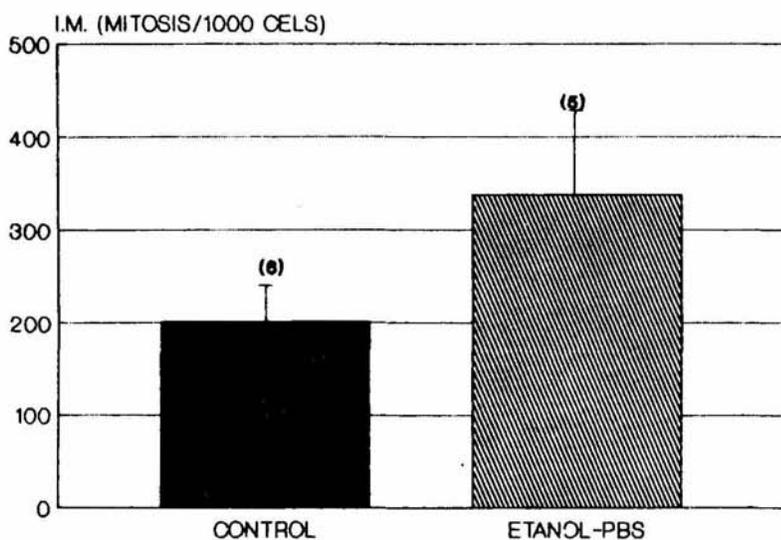
Gráfica 7. Efecto de 20 μ l del vehículo del ionóforo A23187 (etanol al 0.2 % en PBS) en el índice mitótico (I. M.) del epitelio luminal uterino de ratas ovariectomizadas. Cada valor representa la $\bar{X} \pm E.E.$ y (n) el número de animales utilizados.



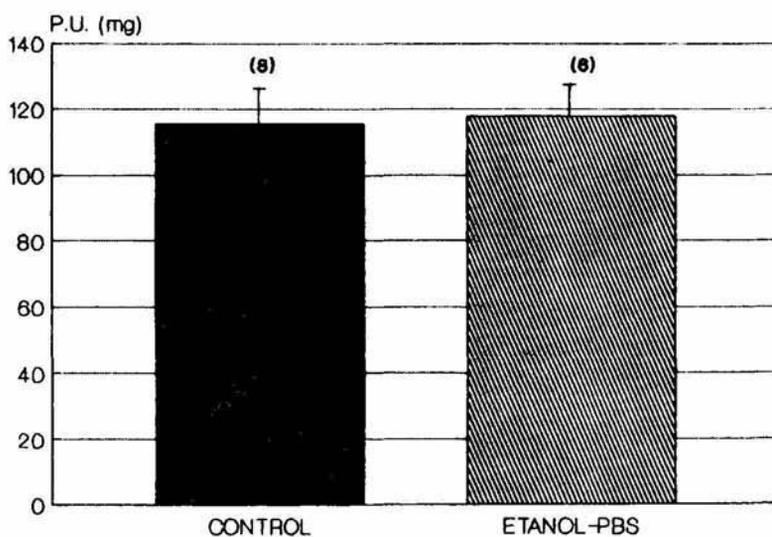
Gráfica 8. Efecto de 20 μ l del vehículo del ionóforo A23187 (etanol al 0.2 % en PBS) sobre el peso húmedo uterino (P. U.) de ratas ovariectomizadas. Cada valor representa la $\bar{X} \pm E.E.$ y (n) el número de animales utilizados.



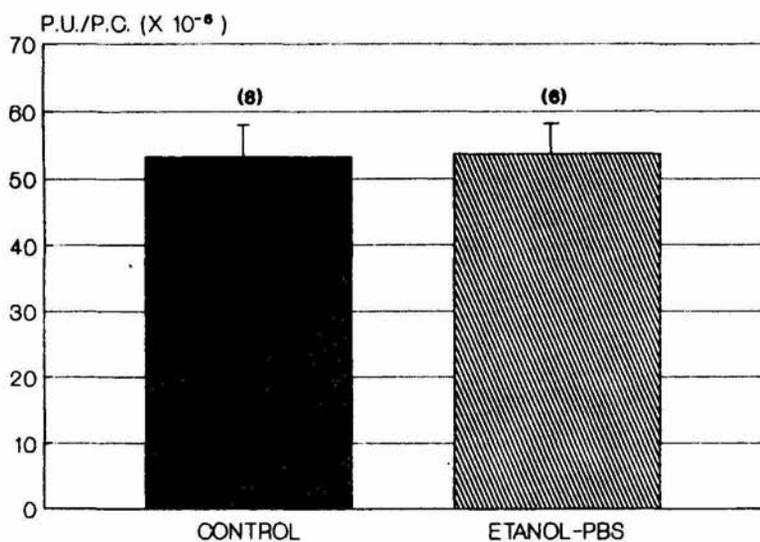
Gráfica 9. Efecto de 20 μ l del vehículo del ionóforo A23187 (etanol al 0.2 % en PBS) sobre la relación peso húmedo uterino (P. U.)/peso corporal (P. C.) en ratas ovariectomizadas no estimuladas con 17β -estradiol (10 μ g/Kg) subcutáneo. Cada valor representa la $\bar{X} \pm E.E.$ y (n) el número de animales utilizados.



Gráfica 10. Efecto de 20 μ l del vehículo del ionóforo A23187 (etanol al 0.2 % en PBS) en el índice mitótico (I. M.) del epitelio luminal uterino de ratas ovariectomizadas estimuladas con 17 β -estradiol (10 μ g/Kg) subcutáneo. Cada valor representa la $\bar{x} \pm$ E.E.y (n) el número de animales utilizados.



Gráfica 11. Efecto de 20 μ l del vehículo del ionóforo A23187 (etanol al 0.2 % en PBS) sobre el peso húmedo uterino (P. U.) de ratas ovariectomizadas estimuladas con 17 β -estradiol (10 μ g/Kg) subcutáneo. Cada valor representa la $\bar{X} \pm E.E.$ y (n) el número de animales utilizados.



Gráfica 12. Efecto de 20 μ l del vehículo del ionóforo A23187 (etanol al 0.2 % en PBS) sobre la relación peso húmedo uterino (P. U.)/peso corporal (P. C.) en ratas ovariectomizadas estimuladas con 17β -estradiol (10 μ g/Kg) subcutáneo. Cada valor representa la $\bar{X} \pm E.E.$ y (n) el número de animales utilizados.

DISCUSION

Los ionóforos de calcio, han sido ampliamente utilizados en el conocimiento del papel calcio en diversos fenómenos fisiológicos, uno de los más empleados es el A23187 (52-55). El cual fué usado en el presente trabajo para evaluar de manera indirecta la posible participación de este ión en la proliferación de las células del epitelio luminal de los cuernos uterinos de rata, cuya respuesta fué medida de acuerdo al I. M. y al P. U.

Las dosis empleadas de ionóforo fueron determinadas en base a aquellas utilizadas en cuernos uterinos de cobayo para el estudio de la liberación de prostaglandinas en donde se empleaba A23187 a una concentración de 1 μ l/ml en el medio de cultivo para este órgano (49), por lo que se estimó conveniente aplicarlo en tres concentraciones: 0.5, 2.0 y 4.0 μ g de A23187/ml de etanol al 0.2% en PBS, quedando como dosis de 0.01, 0.04 y 0.08 μ g en 20 μ l de la solución por cuerno uterino, respectivamente. Además como se pretendía observar si el ionóforo tenía la capacidad de potenciar la respuesta promovida por el 17 β -estradiol, se utilizó una dosis única de 10 μ g/Kg de esta hormona.

El I. M. obtenido del conteo de núcleos metafásicos por cada mil células, resultó mayor en los grupos tratados con

17 β -estradiol que en aquellos que recibieron únicamente A23187, al menos para las dosis utilizadas del ionóforo, lo cual puede ser observado si se comparan las gráficas 1 y 4. Las ratas con A23187, mostraron un incremento significativamente mayor en el I. M. en la dosis de 0.08 μ g/C. U.; de manera semejante al efecto promovido por el 17 β -estradiol sobre el epitelio uterino cuando se emplea de manera sistémica (subcutáneamente) o intraluminal (18, 19, 23, 26, 34); aunque en menor medida en relación a la respuesta promovida por la dosis de 17 β -estradiol administrada. De acuerdo con lo anterior es posible que el ionóforo (0.08 μ g/C. U.) haya facilitado la entrada de calcio al interior de las células epiteliales promoviendo un aumento en los niveles de calcio libre citosólico. Este cambio determinante en la concentración de este ión en el citosol desencadenaría la respuesta fisiológica de proliferación, de manera similar a como ocurre en otros sistemas ya sea estimulada por estrógenos y/o factores de crecimiento (18, 19, 23, 26, 34, 37, 62). En el útero de rata como ya es sabido, el 17 β -estradiol promueve la proliferación del epitelio del endometrio; aunque la forma en que lo hace todavía no es del todo conocida. Sin embargo, se debe hacer notar por una parte, que se requiere de una proteína cinasa estimulada por Ca²⁺ para fosforilar el receptor de 17 β -estradiol del útero de becerro (63), y por otra parte, que ha sido observada la presencia de receptores de EGF en las células epiteliales de este órgano (64), cuya

aparición puede ser regulada por 17β -estradiol (65), el cual también puede estimular la síntesis de este factor por el útero (66) y parece ser que tal factor sólo se ha encontrado en el tejido epitelial (67).

El mecanismo de acción del EGF implica la activación de un receptor de membrana que se encarga de la forforilación en los residuos de tirosina de la fosfolipasa C- γ 1 (PLC- γ 1) la cual se activa y realiza la hidrólisis del fosfatidilinositol 4, 5-bifosfato para producir inositol 1, 4, 5-trifosfato y diacilglicerol. El inositol trifosfato actúa como una molécula mensajera para liberar el calcio almacenado del retículo endoplásmico y así activar diversas proteínas y/o enzimas de la célula que promueven procesos que requieren calcio (68). Además ha sido observado en células de la línea derivada de carcinoma hepático, PLC/PRF/5, que después de la acción de EGF hay un incremento en los niveles de inositol 1, 4, 5-trifosfato, inositol 1, 3, 4, 5-tetrafosfato e inositol 1, 3, 4-trifosfato y de la concentración de calcio citosólico (69).

Las evidencias anteriores sugieren que el 17β -estradiol y/o el EGF, que actúan sobre el epitelio uterino y que inducen un incremento en el calcio citosólico, pueden promover tal vez parte de la respuesta a través de la participación del calcio. Por otro

lado, también se ha propuesto que el incremento local de calcio citosólico podría actuar junto con la calmodulina en la despolimerización selectiva de los microtúbulos cinetocóricos para facilitar el movimiento dirigido de los cromosomas durante la anafase (70). En función de lo anterior, es posible deducir la relevancia del calcio para las poblaciones celulares en crecimiento, como el epitelio uterino.

La división celular en los úteros tratados con 17β -estradiol y A23187, en la dosis de $0.08 \mu\text{g}/\text{C. U.}$, se ve ligeramente incrementada (ver gráfica 4) con respecto a su grupo control sin tratamiento con ionóforo; sin embargo, estadísticamente tal incremento no fué significativo, lo cual puede ser atribuído a la enorme variación en la respuesta mitótica de las células epiteliales luminales, que ya ha sido observada en otros trabajos a una dosis única de 17β -estradiol ($5 \mu\text{g}/\text{Kg}$) (26):

La administración de 17β -estradiol y A23187 simultánea no causó una proliferación potenciada como ya se planteó, lo cual hace suponer que quizá la acción de la hormona promueva su efecto proliferativo en parte por el cambio en el calcio citosólico y en parte también porque podrían estar involucrados otros eventos en la célula, por lo que el sólo cambio en el calcio provoque una ligera proliferación. Uno de tales eventos podría ser a través del

EGF, que promueve aumentos en la concentración de esta ión.

El calcio es requerido en las poblaciones celulares en proliferación. Sin embargo, todavía no se conoce cual sería la concentración de calcio óptima para que se lleve a cabo tal fenómeno o en qué intervalo debe estar.

Además no fueron detectados aumentos en el P. U. y el P.U./P. C. entre los grupos experimentales con A23187 y los que recibieron 17β -estradiol, en relación a sus grupos controles respectivos. Es reconocido que el 17β -estradiol promueve en el útero dos incrementos en peso; el primero y más temprano (después de seis horas de su administración), es asociado al efecto que tiene dicha hormona sobre el aumento en la irrigación y la permeabilidad vascular uterina; el segundo y más tardío, ocurre alrededor de las 20 hrs. después de la administración de la hormona; corresponde básicamente al incremento en la proliferación celular (13). En la rata adulta castrada esta hormona promueve, en el útero, principalmente la división de las células del epitelio luminal (61). En tanto que en las ratas inmaduras, el suministro de esta hormona promueve la división de las tres poblaciones celulares del útero: epiteliales, estromales y musculares (62). Por tanto de acuerdo a otros estudios (12, 62), las células

epiteliales, que son las que se están dividiendo en este caso, ocupan un porcentaje muy bajo (del 5 al 10%) de la composición celular uterina, por lo cual resultarían imperceptibles los cambios en los pesos uterinos debidos a la proliferación del epitelio luminal; primero, porque es una población celular muy baja; segundo, por la variabilidad existente en su respuesta al agente mitogénico, sobre todo para el 17β -estradiol; y tercero, en el grupo con A23187, porque la manipulación del útero durante la administración intraluminal del fármaco pudo inducir cambios que ocultan el pequeño incremento en peso con respecto al peso total del útero. No obstante lo anterior fué notoria la respuesta proliferativa del epitelio luminal.

Por otro lado, se debe señalar que, la división celular promovida por el fenómeno de distensión del lumen uterino como se ha descrito previamente (59), fué manifiesta con la administración intraluminal de 20 μ l del vehículo empleado puesto que, los parámetros estudiados de los grupos a los cuales se les aplicó éste, tuvieron incrementos significativamente mayores con respecto al control de ratas únicamente ovariectomizadas. La estimulación de la división mitótica promovida por el vehículo, pudiera corresponder a un efecto estimulatorio de la acción de la progesterona, que induce el aumento en la secreción glandular (11) y por ende un aumento en la cantidad de fluidos que se encuentran

en el lumen que pudieran generar cambios en la permeabilidad de la membrana epitelial que desencadenarían de alguna manera un efecto proliferogénico. Los cambios moleculares precisos por los que la distensión promueve este fenómeno se desconocen hasta el momento.

Las ratas que recibieron 17β -estradiol y vehículo en la luz uterina, no mostraron incrementos en esos mismos parámetros, quizá por la gran variabilidad existente debida, como ya se mencionó, al esquema metodológico seguido.

El hecho de no haber encontrado diferencias entre los pesos húmedos uterinos y la proporción de éstos con los pesos corporales de los distintos tratamientos experimentales (A23187 y 17β -estradiol + A23187) entre sí; pero si al comparar los grupos control con y sin vehículo, en estos valores, fué porque las respuestas para ambos grupos experimentales, como ya se mencionó, fueron altamente variables y no existieron diferencias significativas con respecto a sus controles, por lo que no se puede decir que el ionoforo A23187 promueva incrementos significantes en los pesos uterinos, al menos en las dosis empleadas, pero sí, que la distensión promueve aumentos importantes en los pesos uterinos de las ratas ovariectomizadas.

CONCLUSIONES

1. La aplicación intraluminal de 0.08 (ug/cuerno uterino) de A23187 causa un incremento en la proliferación del epitelio luminal uterino.

2. Cuando se administra el ionóforo A23187 a ratas tratadas con 17β -estradiol no se observa un efecto proliferogénico adicional en las condiciones experimentales empleadas.

3. No se observaron incrementos en peso uterino en ambas condiciones experimentales (A23187 y 17β -estradiol + A23187) con respecto a su grupo control.

4. La aplicación de 20 μ l de vehículo (etanol al 0.2% en PBS) provocó un incremento en el índice mitótico significativamente diferente con respecto al grupo control de ratas ovariectomizadas que no recibieron 17β -estradiol.

BIBLIOGRAFIA

1. Pardee, A. B. (1989) G1 Events and Regulation of Cell Proliferation. *SCIENCE* 246: 603-608.
2. Abul-Hajj, Y. J.; Thijssen J. H. H. y Blankenstein M. A. (1988) Metabolism of Estradiol by Human Breast Cancer. *EUR. J. CANCER CLIN. ONCOL.* 24(7): 1171-1178.
3. Jordan, V. C. (1988) The Control of Hormone-Dependent Breast Cancer Growth . Are we talking about estrogen alone? *EUR. J. CANCER CLIN. ONCOL.* 24(8): 1245-1248.
4. Karey, K. P. y Sirbasku, D. A. (1988) Differential Responsiveness of Human Breast Cancer Cell Lines MCF-7 and T47D to Growth Factors and 17β -estradiol. *CANCER RES.* 48: 4083-4092.
5. Reed, M. J. (1988) *In Vivo* Oestrogen uptake and Metabolism in Breast Cancer. *J. ENDOCRINOL.* 119 (Suplemento): 20.
6. Reese, C. C.; Warshaw, M. L.; Murai, J. T. y Siiteri, P. K. (1988) Alternative Models for Estrogen and Androgen Regulation of Human Breast Cancer Cell (T47D) Growth. *ANN. N. Y. ACAD. SCI.* 538: 112-121.
7. Hafez, E. S. E. (1970) Female Reproductive Organs. En: *Reproduction and Breeding Techniques for Laboratory Animals.* (editado por E. S. E. Hafez). Cap. 4, pp. 74-106. Lea y Febiger, Filadelfia.

8. Kohn, D. F. y Barthold, S. W. (1984) *Biology and Diseases of Rats*. En: *Laboratory Animal Medicine* (editado por F. James G., C. Bennet J. y F. M. Loew). Cap. 4, pp. 91-120. Academic Press Inc., New York.
9. van Tienhoven, A. (1983) *Reproductive Physiology of Vertebrates* 2da. ed. Cornell University Press. United Kingdom. pp. 196-249.
10. Fox, R. R. y Lair, C. W. (1970) *Sexual Cycles*. En: *Reproduction and Breeding Techniques for Laboratory Animals*. (editado por E. S. E. Hafez) Cap. 5. pp. 107-122. Lea y Febiger, Filadelfia.
11. Finn, C. A. y Booth, J. E. (1977) *The Physiological effects of Estrogens and Progesterone*. En: *The Ovary* (editado por Lord Zuckerman y B. S. Weir) Vol. II. Cap. 3. *Physiology* pp. 151-202. Academic Press, Inc. 2da. ed., New York.
12. Arrau, E. J.; Bustos, O. E. y Ramos, C. A. (1981) *Biología de la Reproducción Animal*. Ed. Andrés Bello, Chile. p. 128.
13. Szego, C. M. y Roberts, S. (1953) *Steroid Action and Interaction in Uterine Metabolism*. *RECENT. PROG. HORM. RES.* 3: 419-469.
14. 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.

15. Munns, T. W.; Sims, H. F. y Katzman, P. A. (1975) Effects of Estradiol on Uterine Ribonucleic Acid Metabolism Assessment of Transfer Ribonucleic Acid Methylation. *BIOCHEMISTRY* 14(21): 4758-4763.
16. Pietras, R. J. y Szego, C. M. (1975) Endometrial Cell Calcium and Oestrogen Action. *NATURE* 253: 357-359.
17. Castro-Vázquez, A.; Gómez, E. y De Carli, D. N. (1976) Further Evidence for Histamine Facilitating oestrogen Action in the Uterus. *J. ENDOCR.* 68: 121-126.
18. 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.
19. Quarmby, V. E. y Korach, K. S. (1984) The Influence of 17β -estradiol on Patterns of Cell Division in the Uterus. *ENDOCRINOLOGY* 114(3): 694-702.
20. Johnston, M. E. A. y Kennedy, T. G. (1984) Estrogen and Uterine Sensitization for the Decidual Cell Reaction in the Rat: Role of Prostaglandin E₂ and Adenosine 3 : 5 -cyclic Monophosphate. *BIOL. REPROD.* 31: 959-966.
21. Muller, R. E.; Traish, A. M. y Wotiz, H. H. (1985) Interaction of Estradiol and Estriol with Uterine Estrogen Receptor *In Vivo* and in Excised Uteri or Cell Suspensions at 37° C:

- Noncooperative Estradiol binding and Absence of Estriol Inhibition of Estradiol-Induced Receptor Activation and Transformation. ENDOCRINOLOGY 117(5): 1839-1847.
22. Koom, B. S.; Rusling, D. J. y Lyttle, C. R. (1986) Estrogen Regulation of Protein Synthesis in the Immature Rat Uterus: The Analysis of Proteins Released into the Medium During *In Vitro* Incubation ENDOCRINOLOGY 118(6): 2411-2416.
23. Tomooka, Y.; DiAugustine, R. P. y McLachlan, J. A. (1986) Proliferation of Mouse Uterine Epithelial Cells *In Vitro*. ENDOCRINOLOGY 118(3): 1011-1018.
24. Rasmussen, K. R.; Whelley, S. M. y Barker, K. L. (1988) Estradiol Regulation of the Synthesis of Uterine Proteins with Clusters of Proline- and Glycine- rich Peptide Sequences. BIOCHEM. BIOPHYS. ACTA 970: 177-186.
25. Hafez, E. S. E. (1980) Laboratory Animals. En: Reproduction in Farm Animals (editado por E. S. E. Hafez) Cap. 20, pp. 409-422. Lea y Febiger, 4a. ed. Filadelfia.
26. Schatz, 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.
27. Sonnenschein, C. y Soto, A. M. (1980) Butare Estrogen per se Growth-Promoting Hormones? JNCI 64(2): 211-215.
28. Stack, G. y Gorski, J. (1985) Relationship of Estrogen Receptors and Protein Synthesis to the Mitogenic effect of

Estrogens. ENDOCRINOLOGY 117(5): 2024-2032.

29. 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.
30. Grunert, G.; Fernández, S. y Tchernitchin, A. N. (1984) Methods for the Evaluation of Responses to Estrogen in Individual Cell Types or Regions of the Uterus. HORMONE RES. 19: 253-262.
31. William-Ashman, H. G. y Reddi, A. H. (1971) Actions of Vertebrates Sex Hormones. ANN. REV. PHYSIOL. 33: 31-82.
32. Gorski, J. y Gannon, F. (1976) Current Models of Steroid Hormone Action: A Critique. ANN. REV. PHYSIOL. 38: 425-450.
33. Clark, J. H.; Markaverich, B. Upchurch, S.; Eriksson, H.; Hardin, J. W. y Peck, E. J. Jr. (1980) Heterogeneity of Estrogen Responses. RECENT. PROG. HORM. RES. 36: 89-134.
34. 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.
35. Gorski, J.; Welshons, W. y Sakai, D. (1984) Remodeling the Estrogen Receptor Model. (Review) MOL. CELL. ENDOCRINOL. 36: 11-15.
36. Sirbasku, D. A. (1978) Estrogen Induction of Growth Factors

- Specific for Hormone-Responsive Mammary, Pituitary, and Kidney Tumor Cells. PROC. NATL. ACAD. SCI. U. S. A. 75(8): 3786-3790.
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): 1097-1103.
 38. Bigsby, R. M. y Cunha, G. R. (1986) Estrogen stimulation of deoxyribonucleic acid synthesis in uterine epithelial cells which lack estrogen receptors. ENDOCRINOLOGY. 119(1): 390-396.
 39. Carafoli, E. y Penniston, J. T. (1986) La Señal del Calcio. INVESTIGACION Y CIENCIA 12: 28-37.
 40. Rasmussen, H. y Barret, P. Q. (1984) Calcium messenger system: An integrated view. PHYSIOL. REV. 64(3): 938-980.
 41. Exton, J. H. (1988) Mechanism of action of calcium-metabolizing agonists: Some variations on a young theme. FASEB J. 2: 2670-2676.
 42. Kuo-Ping, H. (1989) The mechanism of protein kinase C activation. TINS 12(11): 425-432.
 43. Rasmussen, C. D. y Means, A. R. (1989) Calmodulin, cell growth and gene expression. TINS 12(11): 433-438.
 44. Taylor, A. M.; Mandona, 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. FEB 236(1): 33-38.
45. Heskett, T. R.; Morris, J. D. H.; Moores, J. P. y Metcalfe, J. C. (1988) Ca²⁺ and pH Responses to Sequential Additions of Mitogens in Single 3T3 Fibroblasts: Correlations with DNA Synthesis. J. BIOL. CHEM. 263(24): 11879-11886.
 46. 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 Triggered by Phorbol Esters and Calcium Ionophores. J. IMMUNOL. 141(11): 3747-3752.
 47. Gelfand, E. W.; Cheung, R. K.; Mills, G. B. y Grinstein, S. (1988) Uptake of Extracellular Ca²⁺ and not Recruitment from Internal Stores is Essential for T Lymphocyte Proliferation. EUR. J. IMMUNOL. 18: 917-922.
 48. 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.
 49. Rasmussen, H. (1970) Cell Communication, Calcium Ion, and Cyclic Adenosine Monophosphate. SCIENCE 170: 404-412.
 50. Hennings, H.; Michael, D.; Cheng, Ch.; Steinert, P.; Holbrook, K. y Yuspa, S. H. (1980) Calcium Regulation of Growth and Differentiation of Mouse Epidermal Cell in Culture. CELL 19: 245-254.
 51. McGranthy, Ch. M. y Soule, H. D. (1984) Calcium Regulation of

- Normal Human Mammary Epithelial Cell Growth in Culture. IN VITRO 20(8): 652-662.
52. Schatz, F.; Markiewicz, L. y Gurdip, E. (1987) Differential Effects of Estradiol, Arachidonic Acid, and A23187 on Prostaglandins F₂α Output by Epithelial and Stromal Cells of Human Endometrium. ENDOCRINOLOGY 120 (4): 1465-1471.
53. Cole, W. C. y Garfiel, R. E. (1988) Effects of Calcium Ionophore, A23187 and Calmodulina Inhibitors on intracellular Communication in the Rat Myometrium. BIOL. REPROD. 38:55-62.
54. Fasolato, C. y Pozzan, T. (1989) Effect of Membrane Potential on Divalent Cation Transport Catalized by the "Electroneutral" Ionophores A23187 and Ionomycin. J. BIOL. CHEM. 264 (33): 19630-19636.
55. Nichols, D. G. (1982) Ion Transport Across Energy-Transducing Membranes Cap. 2 en Bioenergetics, An Introduction to the Chemiosmotic Theory. Academic Press.
56. Deber, Ch. M. Pteifer, D. R. (1976) Ionophore A23187. Solution Conformations of the Calcium Complex and Free Acid Deduced from Proton and Carbon-13 Nuclear Magnetic Resonance Studies. BIOCHEMISTRY 15(1): 132-141.
57. Reed, P. W. y Lardy, H. A. (1972) A23187: A Divalent Cation Ionophore. J. BIOL. CHEM. 247(21): 6970-6977.
58. Babcock, D. F.; First, N. L. y Lardy, H. A. (1976) Action of Ionophore A23187 at the Cellular Level. Separation of Effects

- at the Plasma and Mitochondrial Membranes. J. BIOL. CHEM. 251(3): 3881-3886.
59. Leroy, F.; Bogaert, C. y Haeck, J. V. (1976) Stimulation of Cell Division in the Endometrial Epithelium of the Rat by Uterine Distention. J. ENDOCRINOL. 70: 517-518.
60. Poyser, N. L. (1985) Effect of trifluoperazine, a Calmodulin Antagonist, on prostaglandin output from the Guinea-Pig Uterus. J. REPROD. FERT. 73: 295-303.
61. Tsu-Hui, L.; Kirkland, J. L.; Mukku, V. R. y Stancel, G. M. (1988) Regulation of Deoxyribonucleic Acid Polimerase Activity in Uterine Luminal Epithelium after Multiple Doses of Estrogen. ENDOCRINOLOGY. 122(4): 1403-1409.
62. Brigstock, D. R.; Heap, R. B. y Brown, K. D. (1989) Polypeptide Growth Factors in Uterine Tissues and Secretions. J. REPROD. FERTIL. 85: 747-758.
63. Miglaccio, A.; Lastoria, S.; Moncharmont, B.; Rotondi, A. y Aurichio, F. (1982) Phosphorylation of Calf Uterus 17β -Estradiol Receptor by endogenous Ca^{2+} -Stimuled Kinase Activing the Hormone Binding of the Receptor. BIOCHEM. BIOPHYS. RES. COMMUN. 109(3): 1002-1010.
64. Mukku, V. R. y Stancel, G. M. (1985) Receptors for Epidermal Growth Factor in the Rat Uterus. ENDOCRINOLOGY 117(1): 149-154.
65. Mukku, V. R. y Stancel, G. M. (1985) Regulation of Epidermal

- Growth Factor Receptor by Estrogen. J. BIOL. CHEM. 260 (17): 9820-9824.
66. Brigstock, D. R.; Heap, R. B. y Brown, K. D. (1989) Polypeptide Growth Factors in Uterine Tissues and Secretions. J. REPROD. FERT. 85: 747-758.
67. Huet-Hudson, Y. M.; Chakraborty, C.; De, S. K.; Suzuki, Y.; Andrews, G. K. y Dey, S. K. (1990) Estrogen Regulates the Synthesis of Epidermal Growth Factor in Mouse Uterine Epithelial Cells. MOL. ENDOCRINOL. 4(3): 510-523.
68. Carpenter, G. y Cohen, S. (1990) Epidermal Growth Factor. J. BIOL. CHEM. 265(14): 7709-7712.
69. Gilligan, A.; Prentki, M.; Glennon, M. C. y Knowles, B. B. (1988) Epidermal Growth Factor-induced Increases in Inositol Triphosphates, Inositol Tetrakisphosphates, and Cytosolic Ca²⁺ in a Human Hepatocellular Carcinoma-Derived Cell Line. FEB. 233(1): 41-46.
70. Ratan, R. R. y Shelanski, M. L. (1986) Calcium and the Regulation of Mitotic Events. TIBS 11: 456-459.