

00562.
3
2g.
Universidad Nacional Autónoma de México

FACULTAD DE QUIMICA



EFFECTO DEL ESPERMATOZOIDE SOBRE LA ACTIVIDAD DE ANHIDRASA CARBONICA Y EL PATRON DE PROTEINAS DEL ENDOMETRIO DE LA CONEJA.

TRABAJO DE INVESTIGACION

**QUE PRESENTA:
Q.F.B. MA. DE LOURDES COLLADO RODRIGUEZ
PARA OBTENER EL TITULO DE
MAESTRO EN CIENCIAS QUIMICAS**

MEXICO

1982

**TESIS CON
FALLA DE ORIGEN**



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 está 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.

INTRODUCCION

En los estudios clínicos que se realizaron como auxiliares en el diagnóstico de infertilidad en la mujer, destacan los tendientes a esclarecer las características ovulatorias y de permeabilidad tubaria. Sin embargo en la actualidad, es necesario considerar como factores etiológicos importantes las posibles fallas en el proceso de implantación, -- mismas que, al no ser tomadas en cuenta, han conducido al -- diagnóstico de la infertilidad idiopática.

Entre las condiciones necesarias para que se verifique que la implantación, destacan los cambios morfológicos y funcionales del endometrio, los cuales están regulados tanto -- por factores hormonales (1), como factores locales. De estos últimos podríamos señalar la influencia del espermatozoide en el tracto genital de la hembra (2), o del huevo después de la fertilización (3).

Desde las primeras observaciones en la coneja (4)-- se ha demostrado que existe una sincronización entre el desarrollo del huevo no implantado y las modificaciones uterinas debidas a su presencia en la luz del útero. Dependiendo estos cambios endometriales de la especie en estudio y del período que el blastocito permanece "Libre" en el útero, antes

de implantarse (5).

El blastocisto al permanecer varios días en el tracto genital de la hembra antes de su implantación, deberá continuar con su diferenciación y desarrollo, de tal manera que obtenga las características necesarias que le permitan interactuar con la pared endometrial (6).

Dado que las Trompas de Falopio y el útero tienen funciones metabólicas específicas en relación al proceso reproductivo, son precisamente sus secreciones las que facilitan la fertilización del óvulo y la implantación del blastocisto. Estas secreciones cambian continuamente en volumen, viscosidad, concentración y tipo de constituyentes, según la fase del ciclo reproductor, y muy especialmente en el período de la preimplantación (7), habiéndose reportado en esta fase modificaciones cualitativas y cuantitativas en componentes bioquímicos del endometrio y de los fluidos genitales (8).

Por ejemplo, se ha demostrado que durante la preimplantación algunas proteínas hacen su aparición, y otras más aumentan su concentración. Esto puede sugerir que estas macromoléculas participan en forma importante en los complejos fenómenos que involucran la preimplantación y la implantación

Analizando por técnicas electroforéticas las protef

nas contenidas en los tejidos de la coneja en estro, se encontró que existen dos bandas predominantes que correspondan a la albúmina y a la transferrina (9). Sin embargo, en las conejas embarazadas o pseudoembarazadas, las macroglobulinas y las lipoproteínas son las proteínas que se encuentran preferentemente aumentadas (10).

Las hormonas esteroides muestran un efecto importante en la concentración de estas proteínas. Por ejemplo, los estrógenos inducen en la coneja, la síntesis de albúmina; mientras que los progestágenos la disminuyen pero activan la síntesis de prealbúmina (11).

En la rata, los esteroides activan la síntesis de proteínas tanto "in vivo" como "in vitro" (12), efecto que también puede obtenerse con el AMPc (13).

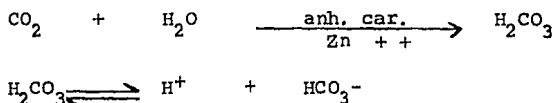
Algunas proteínas uterinas parecen aumentar progresivamente desde el momento del coito, hasta el séptimo día del embarazo, encontrándose su máxima concentración el día de la implantación, por lo que han sido llamadas útero-específicas.

Dentro de estas destaca una, la blastocinina o uteroglobina, que constituye del 40 al 60% de las proteínas totales presentes en el lavado del útero de la coneja al quinto día post-coito, día señalado como día de la implantación (14, 15).

Dupont-Mairesse y Galand, demostraron la secreción de una proteína a los fluidos genitales de la rata, inducida por los estrógenos. (16, 17, 18).

Dentro de las proteínas que constituyen los fluidos uterinos algunas enzimas parecen tener una participación importante para que se lleve a cabo la fertilización del óvulo (19, 20). Otras intervienen en la decidualización del endometrio (21), y otras más facilitan la implantación (22).

En 1953, Cecilia Lutwak-Mann demostró la participación de la enzima anhidrasa carbónica endometrial, en los procesos reproductivos (9). Esta enzima, que es inducida por la progesterona, cataliza la reacción entre el anhídrido carbónico y el agua, con la formación de iones bicarbonato (23).



Los iones formados H^+ y HCO_3^- , tienen un papel decisivo en la regulación del pH, tanto del endometrio y sus secreciones, como del oviducto y sus secreciones (24).

El bicarbonato formado es necesario para que se lleve a cabo la fertilización del huevo en el oviducto de la coneja, pues produce un aumento en el pH después de la ovula-

ción, el cual es también un factor importante para la dispersión de las células de la corona del óvulo durante la fertilización, además de proveer un medio favorable para el desarrollo del huevo (25).

Se ha comprobado que el bicarbonato también ayuda a la capacitación del espermatozoide, durante su paso por el oviducto (26).

Esta enzima tiene un peso molecular entre 26,000 y 30,000, con un contenido de 0.187% de Zn (27).

Por medio de una cromatografía en columnas de DEAE-Sephadex se han identificado tres isoenzimas (A, B Y C), -- las cuales se encuentran distribuidas en distintas proporciones, en los diferentes tejidos de mamíferos (28).

La distribución de la anhidrasa carbónica ha sido demostrada por técnicas histológicas, en el tracto reproductivo del humano y de otros mamíferos. (29).

Mc Intosh en 1970, empleando técnicas electroforéticas, observó en el útero de coneja, una banda de anhidrasa carbónica diferente a las isoenzimas ya conocidas (30). En 1972, Falk y Hodgen demostraron también en el endometrio humano, la presencia de una isoenzima específica, denominándola "U" (uteroespecífica), la cual aparece fundamentalmente en la fase lútea (31).

Los estudios en animales de laboratorio han demostrado que la actividad de la anhidrasa carbónica endometrial es sensible a un número considerable de progestágenos. Debido a esto, Miyake y Pincus desde 1958, habían sugerido la determinación de la anhidrasa carbónica como un índice de eficiencia progestogénica (32).

Se ha determinado la actividad de la anhidrasa carbónica en el moco cervical humano durante el ciclo menstrual normal, presentando su mínima actividad cerca del tiempo de la ovulación (33).

Por otro lado, el uso moderno de anticonceptivos, - ha llevado a los investigadores a estudiar las modificaciones en la actividad de esta enzima endometrial, debido al -- uso de los mismos. Así se demostró que, los anticonceptivos-orales combinados aumentan los niveles de esta enzima, pero no alteran su ciclicidad (34). Cuando se utilizan dispositivos intrauterinos se demostró que mientras que, con el asa - de Lippes no se altera su actividad endometrial, si es afectada por los dispositivos que contienen cobre que se sabe alteran la concentración del Zn en endometrio, disminuyendo la actividad de la enzima en la fase lútea y por lo tanto modicando de alguna manera a las enzimas dependientes del Zn (35).

En la actualidad se considera que la anhidrasa carbónica debe tener una función muy importante en la preimplantación (36), sugiriéndose incluso, que su inhibición, pudiera considerarse como un método anticonceptivo eficiente (37).

Otras enzimas también tienen participación importante en estos procesos de la reproducción.

Rosenfield en 1977, informó de la presencia de dos peptidasas en el útero de la rata, una de las cuales depende su función de la concentración de estrógenos y progesterona en (38) y la otra se ha relacionado con la lisis de la zona pelúcida del huevo y la penetración del óvulo por el espermatozoide (39). Este autor sugiere que la acción de estas enzimas es secuencial.

Krichner y col. demostraron la presencia de una proteasa en la fracción de B-glicoproteínas de lavados uterinos de coneja, con una actividad máxima al quinto día post-coito y que es regulada por las hormonas ováricas (40).

Ha sido demostrado por Ganguly y col, que la sialidasa o neuraminidasa pudiera tener un efecto importante sobre la polaridad de la superficie endometrial, ya que al modificarse las cargas de la superficie, se modifica la interacción entre el huevo y el endometrio, requisito necesario para que se verifique la implantación (41).

En el tejido endometrial y los fluidos uterinos de la mujer, la actividad de la neuraminidasa puede ser importante y tener un efecto considerable, ya que aumenta de la fase proliferativa a la fase secretora. La mayor actividad de esta enzima se encuentra durante el período de implantación y en el embarazo temprano (42).

También la concentración de componentes químicos como ácido siálico, parecen estar regulados por las hormonas sexuales. Por ejemplo en la rata, se observa una alta concentración de este compuesto el primero y cuarto día post-coito coincidiendo el primero con el pico de estrógenos en el proestro y el segundo con la descarga de estrógenos que ocurre antes de la implantación (43).

En el ratón, al tratamiento del útero con neuraminidasa, en un período entre el primero y quinto día del embarazo, produce una disminución en el número de implantes, probablemente al evitar la interacción del blastocisto con el endometrio, lo cual demuestra el importante papel del ácido siálico en estos procesos (44).

Rosado y col. encontraron en el endometrio humano mayor concentración de ácido siálico en la fase secretora, que en la fase proliferativa; y que la presencia de dispositivos intrauterinos aumenta considerablemente la concentra

ción de este ácido en el útero (45).

Por otro lado, el espermatozoide de mamífero, al ponerse en contacto con las secreciones y tejidos genitales de la hembra, especialmente en la mucosa endometrial y las trompas de Falopio, presenta una serie de modificaciones estructurales y funcionales, las cuales han sido incluidas bajo el término de "capacitación".

Para que este proceso de capacitación se lleva a cabo, se requieren condiciones esenciales como son:

- Niveles hormonales adecuados en la hembra (46, 47)
- Una fuerza iónica y un pH adecuados (48).
- Espermatozoides estructural y metabólicamente normales (49).

Las modificaciones que se observan en el espermatozoide durante el proceso de la capacitación son:

- Aumento en la viabilidad y en la movilidad (50).
- Aumento en el consumo de oxígeno (51).
- Aumento de la glicólisis, ciclo de Krebs y ciclo de las pentosas (52).
- Disminución de la polaridad de la membrana y modificaciones de la carga de superficie (53).

Aunque se conoce muy poco acerca de los mecanismos involucrados en el transporte del espermatozoide a través del

tracto genital femenino, se ha postulado que se debe a su -- propia movilidad, la cual puede verse afectada bioquímicamente por constituyentes de las secreciones de la hembra.

Es importante considerar también, el efecto que tienen algunas hormonas sobre el metabolismo del espermatozoide de mamífero. Mientras las hormonas de tipo proteínico aumentan su metabolismo, las hormonas esteroideas lo disminuyen -- (54).

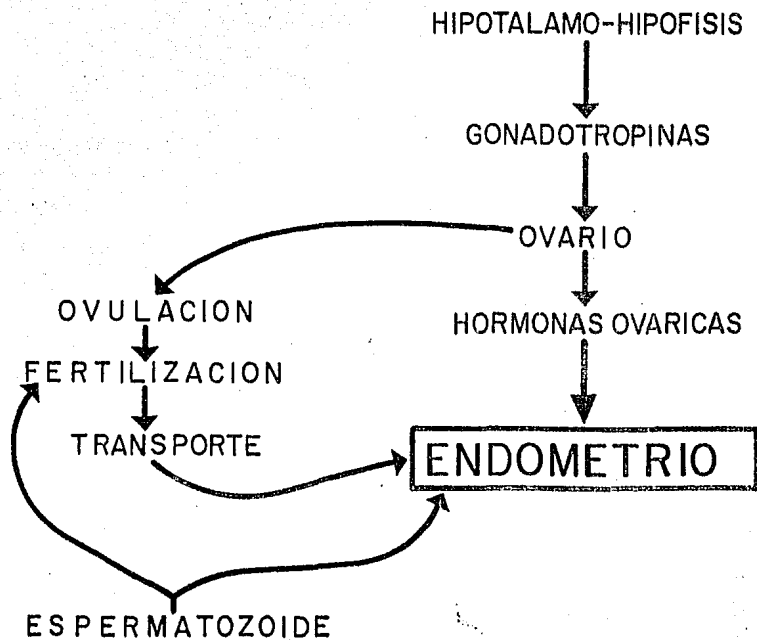
Se acepta en la actualidad que la capacitación no se lleva a cabo por un efecto directo del endometrio, sino por un mecanismo que involucra a las moléculas presentes en las secreciones vaginales y foliculares de la hembra, como son esteroideas, enzimas, proteínas, etc. (55).

Ya que se han demostrado que se requieren diez horas para que se efectúe la capacitación del gameto masculino de conejo (25), este tiempo podría ser suficiente para que el espermatozoide pueda inducir cambios metabólicos y estructurales importantes en la célula endometrial, que originen una respuesta para modificar al espermatozoide.

Por todo lo anteriormente expuesto, el objeto de este trabajo es considerar la posible función que el gameto masculino pueda tener como inductor de su propia capacitación, al interaccionar con las células endometriales de la--

hembra.

Para ello se estudió tanto la variación del patrón electroforético de las proteínas endometriales, como la actividad de las isoenzimas A y B de la anhidrasa carbónica en el útero de coneja, al introducir espermatozoides al útero durante diferentes tiempos y condiciones.



MATERIAL Y METODO

1.- Animales de experimentación e inseminación.

Se utilizaron conejas Nueva Zelandia adultas, con un peso de 4.5 ± 0.2 Kg, las cuales recibieron 48 horas antes del experimento, una inyección de 150 UI de gonadotropinas séricas de yegua embarazada (PMSG Sigma Chem.). para inducir el desarrollo folicular y mantener a la coneja, que no tiene ciclo hormonal, en condiciones endócrinas estables, (47).

Las conejas fueron intervenidas quirúrgicamente para ser inseminadas por vía abdominal. Antes de la inseminación, los cuernos uterinos fueron ligados en sus extremos distal y proximal a la vagina, para impedir la intercomunicación de fluidos entre ambos cuernos.

Se colocaron en uno de los cuernos, 0.5 ml. de solución salina isotónica conteniendo 5×10^7 espermatozoides -- preincubados en las diferentes condiciones que se detallan -- posteriormente. El cuerno contralateral sirvió como control al incubar en él, 0.5 ml. de solución salina ó 50 mg de Sephadex superfino, suspendido en 0.5 ml. de la misma solución.

Este último control se utiliza para eliminar cualquier efecto que pudiera tener el espermatozoide sobre endometrio como cuerpo extraño, y así afectar los parámetros en-

estudio.

Los controles y los espermatozoides preincubados en solución salina, permanecieron incubados en los cuernos uterinos por tiempos que variaron de 0 a 12 horas.

Los experimentos en donde los espermatozoides fueron tratados previamente con alguna de las enzimas que se describen a continuación, la incubación en el útero de las conejas fué a un tiempo fijo de 10 horas.

2.- Espermatozoides.

El semen de conejo, colectado en una vagina artificial a una temperatura de 40°C, fué centrifugado durante 10 minutos a 3,000 xg, desechando el plasma seminal y utilizando solo el paquete celular. Este se suspendió en NaCl 0.15 M a 37°C y se determinó la viabilidad, movilidad y número de espermatozoides; ajustándose finalmente a 5×10^7 células por cada 0.5 ml. de solución salina.

Esta suspensión fué preincubada, por separado, durante 30 minutos a 37°C., en cada uno de los tres sistemas siguientes:

- 1.- 0.5 ml. de la suspensión.
- 2.- 0.5 ml. de la suspensión más 535 UI de tripsina.
- 3.- 0.5 ml. de la suspensión más 1×10^5 UI de neuraminidasa.

Al final de la incubación, todas las muestras se cen

trifugaron a 3,000 xg durante 10 minutos y los espermatozoides fueron lavados varias veces con solución salina isotónica y centrifugados a la misma velocidad. Finalmente se resuspendieron en un volumen final de 0.5 ml. de NaCl 0.15 M para ser utilizados en la inseminación.

En los sobrenadantes obtenidos de las diferentes preincubaciones, se determinó la concentración de proteínas y ácido siálico, para comprobar la acción de las dos enzimas adicionadas.

3.- Endometrio.

Las conejas inseminadas con los diferentes grupos de espermatozoides fueron sacrificadas a diversos tiempos.

El útero se lavó varias veces con solución salina isotónica para eliminar los espermatozoides de la superficie, se abrió cada cuerno a lo largo y se fijaron a una tabla con alfileres.

El endometrio obtenido por medio de un raspado de la cara interna del útero, se pesó y homogeneizó en NaCl 0.15 M a una proporción de 20% (P/V).

Una alícuota del homogeneizado fué centrifugada a 3,000 xg durante 10 minutos y el sobrenadante fue utilizado para las siguientes determinaciones:

3.1. Determinación espectrofotométrica de las isoenzimas B y C de la anhidrasa carbónica.

Se siguió la técnica descrita por Verpoorte y col - (56) en la que se aprovecha la característica de la anhidrasa de actuar como esterasa. La reacción se realiza en un volumen final de 1 ml. con 10 μ l de la muestra y utilizando como sustratos el p-nitro-fenil-acetato 0.2 mM para la isoenzima C, y a un pH óptimo de 6.8 en buffer de fosfatos 0.1 M; y el o-nitro-fenil-acetato 0.2 mM a un pH óptimo de 7.3 en buffer de fosfatos 0.1 M, para la isoenzima B.

En ambos casos se adicionaron 50 μ l del sustrato, para la reacción de hidrólisis del éster correspondiente.

El registro continuo de la aparición de los compuestos coloridos, p-nitrofenol y o-nitro fenol, respectivamente, se obtuvo empleando un espectrofotómetro UNICAM modelo SP-1800 - - a una longitud de onda de 400 nm y a una temperatura de 25°C.

3.2. Electroforesis en gel de poliacrilamida.

Se prepararon geles de 7 x 75 mm, utilizando acrilamida al 7% y bis-acrilamida al 0.2%.

Las muestras que se utilizaron, fueron volúmenes -- que corresponden a 200 μ g de proteínas para cada una, y se colocaron en los geles.

La corrida fué hecha con una corriente de 5 mv/ gel, en buffer de tris-glicina a un pH de 8.3, hasta que el indicador azul de Bromo cresol se localizaba a 5 mm del final del gel.

La presencia de proteínas se reveló con azul de Coomassie al 0.05% en ácido tricloroacético al 12.5%.

Los perfiles de las proteínas teñidas fueron obtenidos en los geles completos empleando el dispositivo de barrido accesorio a un espectrofotómetro Gilford, modelo 2400 S.

3.3. Otras Pruebas.

Como índice de referencia, se determinó la concentración de DNA por el método de la difenil-amina (57) y la concentración de proteínas por el método de Lowry (58).

Los resultados obtenidos fueron analizados por la prueba de "t" de Student para muestras no pareadas.

RESULTADOS

Actividad de Anhidrasa Carbónica.

Al estudiar la actividad de las dos isoenzimas de la anhidrasa carbónica endometrial, se encontró que en condiciones basales, la isoenzima C presenta una mayor actividad que la isoenzima B, manteniéndose esta situación en todas las diferentes condiciones aunque en proporciones variables.

En los experimentos en que se incubaron los espermatozoides en el útero de la coneja, por tiempos variables entre 2 y 10 horas, se observó un aumento en la actividad de la enzima endometrial, proporcional al tiempo de permanencia del gameto masculino en el útero. (Tabla 1. Fig. 1).

Se observan diferencias significativas estadísticamente desde las dos horas en el caso de la isoenzima C, y desde las seis horas en el caso de la isoenzima B, cuando se comparan con los valores de los controles. Ya a las 8 y 10 horas, el incremento de la actividad enzimática muestra poca diferencia y no significativa entre sí.

Así observamos un máximo en la actividad desde las 8 horas para la isoenzima C, y desde las 10 horas para la isoenzima B, hasta las 12 horas que se determinó en los experimentos efectuados.

Una vez establecido el tiempo de máxima actividad de las dos isoenzimas, se decidió realizar los siguientes experimentos con 10 horas de incubación de los espermatozoides en el útero, tiempo que concuerda con el reportado por algunos autores, como el tiempo necesario para que se lleve a cabo la capacitación del gameto masculino de conejo.

Efecto del espermatozoide tratado con sialidasa y tripsina sobre la actividad de la anhidrasa carbónica endometrial.

La tabla 11 muestra que la presencia en el útero de la coneja, de partículas inertes como el Sephadex, no modifica la actividad basal de las dos isoenzimas de la anhidrasa carbónica.

En cambio, los espermatozoides pre-incubados con neuraminidasa (Grupo D), producen un marcado aumento en la actividad de ambas isoenzimas, teniendo un efecto mayor sobre la isoenzima B, cuando se compara con la presencia del espermatozoide sin tratamiento (Grupo C).

La preincubación de los gametos con tripsina (Grupo E) modifica de tal manera al espermatozoide que éste, no es capaz de producir ningún efecto sobre la actividad de la anhidrasa carbónica, siendo sus valores tan bajos como los controles (Grupos A y B).

Electroforesis.

En la Fig. 2 se presentan los trazos obtenidos en el espectrofotómetro, de los patrones electroforéticos de las -- proteínas endometriales de los cuatro grupos experimentales.

En estos experimentos se corrieron como control, - - muestras de plasma sanguíneo de una coneja (Perfil A), y del plasma seminal de uno de los machos empleados (Perfil B).

Al comparar el patrón de las proteínas del endome- - trio en el que se incubaron espermatozoides en solución salina (Perfil D), con el patrón del endometrio control (Perfil C), se observó que en el primero existe un aumento en la intensidad de una banda que se localiza en la zona descrita para las glicoproteínas, el cual se hace más pronunciado en el trazo de las proteínas del endometrio en el que se incubaron los espermatozoides previamente tratados con sialidasa (Perfil E).

En cambio, para el endometrio que estuvo en contacto con los espermatozoides tratados con tripsina, el patrón electroforético, (Perfil F), es diferente a los anteriores, e incluso diferente al endometrio control.

Al comparar la movilidad relativa de las bandas encontradas en el endometrio incubado en ausencia o presencia de espermatozoides, se encontró una banda con un Rf de 0.47,-

que se observa solamente en el endometrio que ha estado en contacto con los espermatozoides y que no está presente en el endometrio control. (Fig. 3).

Determinación de ácido siálico y proteínas en el sobrenadante de las incubaciones de los espermatozoides con tripsina y sialidasa.

En el sobrenadante de los espermatozoides preincubados con sialidasa, se obtuvieron valores de ácido siálico liberado que varían entre 2.5 - 2.3 $\mu\text{g}/\text{ml}$ lo que equivale a -- 1.25 - 1.75 $\mu\text{g}/5 \times 10^7$ células.

En el sobrenadante de aquellos espermatozoides preincubados con tripsina, los valores de proteínas liberadas de las células fué de 1.5 - 4.5 mg / ml , lo que equivale a -- 0.75 - 2.25 $\text{mg}/5 \times 10^7$ células.

Estos valores tienen un rango mucho mayor debido a la acción tan inespecífica de hidrólisis de la tripsina sobre las proteínas superficiales del espermatozoide.

Se midió la concentración tanto de ácido siálico como de proteínas a los sobrenadantes de los espermatozoides preincubados solamente en solución salina isotónica, y estos no dieron ninguna reacción con el reactivo de Lowry, ni para ácido siálico.

TABLA I

ACTIVIDAD DE ANHIDRASA CARBONICA ENDOMETRIAL EN PRESENCIA DEL ESPERMATOZOIDE

| No. DE EXPERIMENTOS | TIEMPO EN HRS. | nmolas nitrofenol/min/mg DNA | | | | | |
|------------------------|-------------------|------------------------------|--------|-------------|--------|--------------|---------|
| | | ISOENZIMA B | | ISOENZIMA C | | ENZIMA TOTAL | |
| | | \bar{X} | EE | \bar{X} | EE | \bar{X} | EE |
| 21 | 0 | 0.06 | ± 0.01 | 0.36 | ± 0.05 | 0.42 | ± 0.05 |
| 6 | 2 | 0.12 | ± 0.07 | 0.93 | ± 0.19 | 1.05 | ± 0.22* |
| 6 | 4 | 0.18 | ± 0.07 | 1.86 | ± 0.31 | 2.04 | ± 0.30 |
| 5 | 6 | 0.45 | ± 0.09 | 2.71 | ± 0.38 | 3.15 | ± 0.43 |
| 6 | 8 | 0.56 | ± 0.08 | 3.13 | ± 0.40 | 3.66 | ± 0.51 |
| 9 | 10 | 0.70 | ± 0.12 | 2.72 | ± 0.39 | 3.42 | ± 0.42 |
| 6 | 12 | 0.71 | ± 0.11 | 2.80 | ± 0.37 | 3.50 | ± 0.47 |

* P < 0.05 cuando se compara con el tiempo cero

P < 0.001 cuando se compara con el tiempo cero

T A B L A II

ACTIVIDAD DE ANHIDRASA CARBONICA EN ENDOMETRIO DE CONEJA

| No. DE EXPERIMENTOS | GRUPO | TRATAMIENTO* | nmolas/min/mg DNA | | | | | |
|------------------------|-------|--|-------------------|-------------------------|-------------|-------------------------|--------------|-------------------------|
| | | | ISOENZIMA B | | ISOENZIMA C | | ENZIMA TOTAL | |
| | | | X | ± EE | X | ± EE | X | ± EE |
| 21 | A | NaCl 0.15M | 0.059 | ± 0.01 | 0.363 | ± 0.05 | 0.422 | ± 0.05 |
| 6 | B | Sephadex G-75 Superfino | 0.075 | ± 0.02 | 0.480 | ± 0.03 | 0.555 | ± 0.03 |
| 9 | C | Espermatozoides | 0.700 | ± 0.12 ^{&} | 2.721 | ± 0.39 ^{&} | 3.420 | ± 0.42 ^{&} |
| 5 | D | Espermatozoides preincubados con sialidasa | 4.300 | ± 0.73 ^{&} | 3.300 | ± 0.51 ^{&} | 7.600 | ± 0.75 ^{&} |
| 5 | E | Espermatozoides preincubados con tripsina | 0.054 | ± 0.01 | 0.500 | ± 0.09 | 0.920 | ± 0.20 |

* Se coloca en utero in vivo durante 10 hrs.

& p < 0.001 cuando se compara con los grupos A y B.

ANHIDRASA CARBONICA ENDOMETRIAL

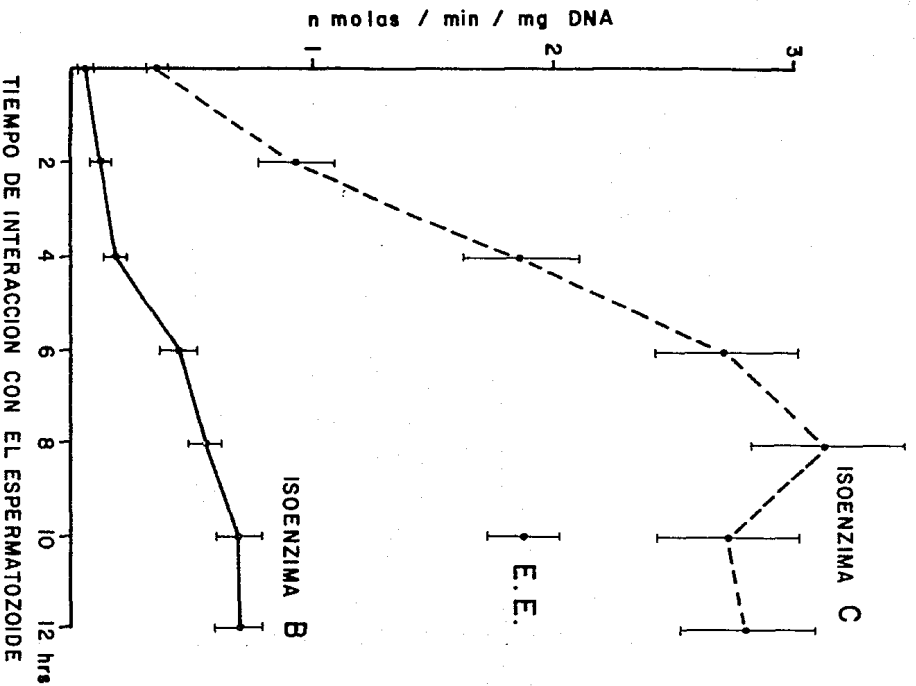
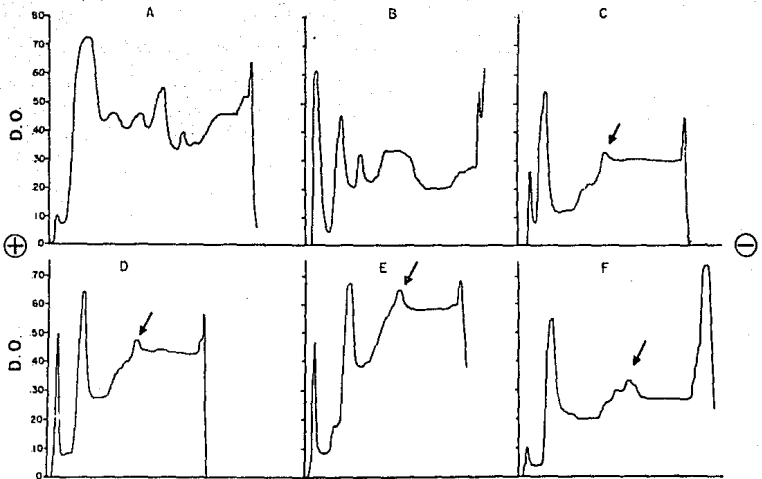


FIG. 1



A B C D E F

(A) PLASMA SANGUINEO, (B) PLASMA - SEMINAL, (C) ENDOMETRIO, (D) ENDOMETRIO CON ESPERMATOZOIDES SIN TRATAMIENTO, (E) ENDOMETRIO CON ESPERMATOZOIDES TRATADOS CON SIALIDASA, (F) ENDOMETRIO CON ESPERMATOZOIDES TRATADOS CON TRIPSINA.

FIG. 2

ENDOMETRIO

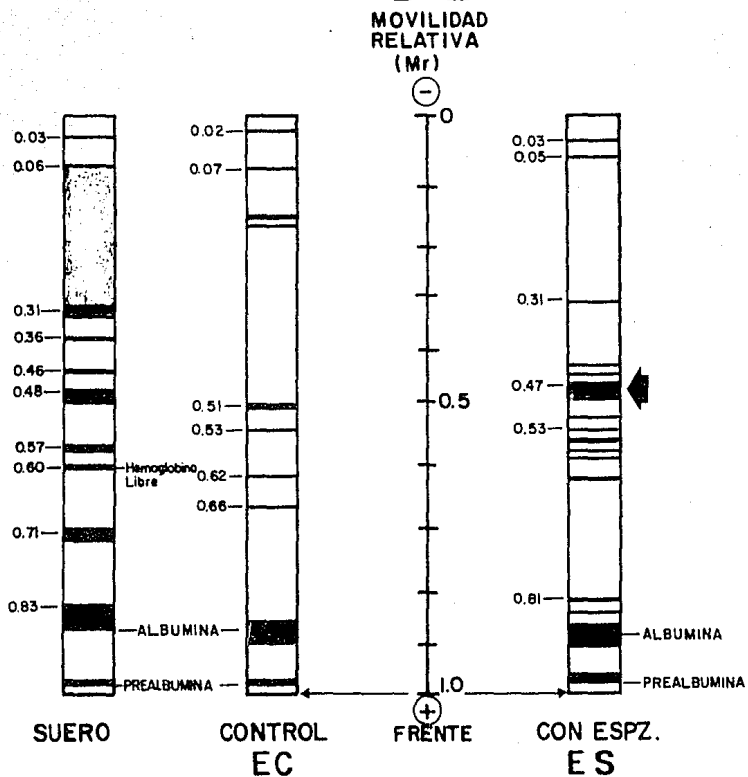


FIG. 3

DISCUSION

La presencia de la anhidrasa carbónica en el tracto genital femenino (19) y su actividad para regular la concentración de CO_2 (59), puede ser la respuesta de varios fenómenos importantes en los procesos reproductivos. Por ejemplo, - la presencia del ión HCO_3^- tanto en útero como en trompas (24) y su efecto capacitante sobre el gameto masculino (26), facilita la fertilización del óvulo en las trompas de Falopio --- (25).

Al mismo tiempo esta enzima está relacionada con la regulación del pH uterino (60).

Además, se sabe que la anhidrasa carbónica es una de las enzimas más importantes en los procesos de implantación - (61), demostrándose recientemente una actividad menor en los sitios de implante o sea los sitios de unión del blastocisto al endometrio, que en el resto del útero, lo que aparentemente permite una mejor interacción entre el blastocisto y el epitelio endometrial (62).

La actividad de la anhidrasa carbónica es regulada - por las hormonas esteroides, actuando en ciertas especies como activadores (19), mientras que en otras lo hacen como inhibidores (62).

Recientemente Falk y Hodgen (31) encontraron en el -

útero de la mujer y de la coneja una isoenzima uteroespecífica, a la que denominaron isoenzima U, la cual aparece solamente en la fase lútea, lo que demuestra una regulación de esta enzima por la progesterona (19).

Por todo lo anterior se planeó estudiar el efecto -- que podría tener el espermatozoide sobre el endometrio, desde el momento de su penetración al útero. Ese efecto se traduciría en una modificación de la actividad de una enzima tan importante durante los procesos reproductivos como es la anhidrasa carbónica y además como parte del efecto se produciría una modificación del patrón electroforético de las proteínas.

En este trabajo se demuestra que el espermatozoide -- es capaz de inducir un aumento en la actividad de las dos isoenzimas de la anhidrasa carbónica, B y C, presentes en el útero (Tabla I y II), así como un cambio en el patrón electroforético de las proteínas endometriales (Fig. 2), y que esta -- respuesta es directamente proporcional al tiempo de permanencia del espermatozoide en el útero.

Este efecto es máximo desde las 10 horas, tiempo que corresponde al lapso requerido para que se realice la capacitación del espermatozoide de conejo (49).

Se sabe que son los fluidos uterinos y sus componentes los que ayudan a la capacitación del espermatozoide (63).

pero no se ha demostrado hasta la fecha, el efecto que pudiera tener el espermatozoide sobre el endometrio como factor - desencadenante de la produccion de estas sustancias por el endometrio. Asi, el espermatozoide serfa la sefial que darfa como respuesta la produccion de sustancias que ayudaran a la capacitacion del gameto masculino, el cual al capacitarse dara una sefial amplificada, que provocaria una mayor respuesta del endometrio. Esto nos lleva a pensar en una cadena de interacciones entre el espermatozoide y el endometrio, con respuestas alternadas y cada vez de mayor magnitud, alcanzando una maxima reaccion endometrial al encontrarse el espermatozoide completamente capacitado.

Rosado y col. demostraron en 1973 (64), que al despojar la membrana del espermatozoide de acido sialico, mediante el tratamiento con neuraminidasa, se disminuyó la carga de superficie, lo que facilita una mayor interaccion de este gameto con el óvulo y que se lleve a cabo más facilmente la fecundación.

Consideramos entonces que, la acción de la neuraminidasa podría ser una forma de hiper-capacitación y así se obtendría una fecundación más rápida. En nuestros experimentos, pensamos que al pre-incubar el espermatozoide con sialidasa (Tabla 11), se logró disminuir las cargas de superficie, de

manera similar a la capacitación, pero en una forma más intensa, logrando una disminución de la repulsión que la célula del epitelio endometrial tiene debido a su carga también negativa (65). Esto provocaría que el espermatozoide desprovisto del ácido siálico membranaral, pueda interaccionar más fácilmente con la célula endometrial, induciendo en esta última una respuesta mayor.

Por otro lado ha sido reportada la presencia de proteasas en útero (40), las cuales además de actuar sobre la corona radiada del óvulo, podrían actuar sobre la superficie del espermatozoide participando en la selección de la población de gametos y dejando aquellos más capaces para la fertilización. En este trabajo suponemos que el espermatozoide --pre-incubado con tripsina sufre una distorsión de sus características membranales, de tal forma que no se permite --una interacción adecuada con la célula endometrial, y como consecuencia, no se induce respuesta uterina alguna, o si se induce, es una respuesta diferente (Tabla 11).

El cambio del patrón electroforético de las proteínas endometriales indica que existe realmente una respuesta del endometrio a la señal del espermatozoide, y que al introducir espermatozoides "hipercapacitados" (tratados con sialidasa), obtenemos una mayor producción de proteínas, sobre to

do en una banda con $R_f =$ de 0.47. Un aumento similar se ha reportado también durante el embarazo y en la preimplantación y en la implantación (66). El patrón tan diferente obtenido en el endometrio puesto en contacto con los espermatozoides pre-incubados con tripsina, nos muestra que este tipo de tratamiento modifica fuertemente la superficie del gameto.

Dada la movilidad electroforética de esta proteína que aparece o aumenta su concentración por la presencia del espermatozoide, podemos descartar que se trate de la uteroglobina (67), o de la isoenzima U de la anhidrasa carbónica (31). Sin embargo, se requiere de análisis posteriores dirigidos a su identificación.

Así, podemos concluir, que en los inicios de la etapa de pre-implantación que corresponde a la introducción del gameto masculino hasta la fecundación del óvulo, se presentaron cambios tanto en el patrón de electroforésis de las proteínas endometriales, como un aumento en la actividad de las isoenzimas de la anhidrasa carbónica, todo ello debido a la presencia del espermatozoide en el útero. Y que, las modificaciones químicas que se produjeron en el gameto, por el tratamiento con las enzimas, ocasionan respuestas endometriales diferentes a las obtenidas con los espermatozoides "normales".

Todo esto sugiere fuertemente, que la presencia del-espermatozoide y las modificaciones que va sufriendo durante-su paso por el tracto reproductivo femenino, son señales evi-dentes para el tipo de respuesta endometrial, lo que al final resulta en la facilitación de los procesos de fertilización-e implantación.

BIBLIOGRAFIA

1. Psychoyos, A.: Hormonal control of uterine receptivity for nidation. *J. Reprod. Fert. Suppl.* 25: 17, 1976.
2. Collado, M. L., Guzmán, M., Castro, G y Hicks, J.J.: Efecto del espermatozoide sobre el patrón de proteínas y la actividad de anhidrasa carbónica del endometrio de la coneja. *Rev. Inv. Clin. Méx.* 30: 194-5, 1973.
3. Winsatt, W. A: Some comparative aspects of implantation. - *Biol. Reprod.* 12:1, 1975.
4. Enders, A. C: Anatomical aspects of implantation. *J. Reprod. Fert., Suppl.* 25: 1, 1976.
5. Collado M.L., Gil-Recasens, M.E., Castro-Osuna, G. y Hicks, J.J.: Nuevos conceptos relacionados con la implantación. I. Período de Pre-implantación. *Ginecol. Obstet. Méx.* 44:63--84, 1978.
6. Hicks, J.J., Gil-Recasens, M. E.: Características morfológico-funcionales del cigoto de mamífero durante la preimplantación. *Ginecol. Obst. Méx.*
7. Beier, H.M.: Oviductal and uterine fluids. *J. Reprod. Fert.* 37:221, 1974.
8. Tucker, E.B. and Schultz, G. A.: Temporal changes in proteins of oviductal and uterine fluids during the preimplantation period in the rabbit. *Biol. Reprod.* 17:749, 1977.
9. Beier, H.M: Proteins patterns of endometrial - - secretion in the rabbit. In *Ovo-Implantation human, gonadotrophines and prolactin.* P. 157. Eds. P.O. Hubinot, F. Leroy, C. Robin and P. Leleux. Karger, Basel. 1970.
10. Beier, H.M.: Uteroglobulin and related biochemical changes in the reproductive tract during early pregnancy in the rabbit. *J. Reprod. Fert. Suppl.* 25:53, 1976.
11. Urzua, M.A., Stambaugh, R., Flickinger, C. and Mastroianni L.: Uterine and oviduct fluid protein patterns in the Rabbit before and after ovulation. *Fert. Steril.* 21:860. 1970.

12. Pennequin, P., Robel, P. and Baulieu, E.E.: Steroid induced early protein synthesis in rat uterus and prostate. - Eur. J. Biochem. 60:137, 1975.
13. Webb, F.T.G.: Cyclic AMP and the preparation of the mouse uterus for implantation. J. Reprod. Fert. 50:-83, 1977.
14. Daniel, J.C.: A blastokinin-like component from the human uterus. Fertil. Steril. 24:326, 1973.
15. Krishnan, R. S. And Daniel, J. C.: "Blastokinin" inducer and regulator of blastocyst development in the rabbit uterus. Scientia 158:490. 1967.
16. Dupont-Maiesse, N. and Galand, P.: Estrogen action: Induction of the synthesis of a specific protein (IP) in the myometrium, the stroma and the luminal epithelium of the rat uterus. Endocr 96:1587, 1975.
17. Dupont-Maiesse, N. and Galand, P.: Oestradiol induced synthesis of a specific uterine protein in propanolol-treated rats. J. Endocr. 65:215, 1975.
18. Katzenellengoben, B.S.: Synthesis and inducibility of the uterine estrogen-induced protein, IP, during the rat-estrous cycle: Clues to uterine estrogen sensitivity. Endocr. 96:289, 1975.
19. Lutwak-Mann, C.: Carbonic anhydrase in the female reproductive tract occurrence, distribution and hormonal dependence. J. Endocrinol. 13:26, 1955.
20. Collawn, S.S. and Bagget, B.: Increased ornithine decarboxylase activity in the mouse uterus during early decidua-lization. Abstract 631 Fed. Proc. 36: 388, 1977.
21. Pinsker, M.C., Sacco, A.G. and Mintz, B: Inplamation-associated in mouse uterine fluid. Develop. Biol 38:285, 1974.
22. Hall, K.: Lactic dehydrogenase and other enzymes in the mouse uterus during the pre-implantación period of pregnancy. J. Reprod. Fert. 34:79, 1973.
23. Bundy, J.F.: Carbonic anhydrase. Review. Comp. Biochem.--

Physiol. 57:1, 1977.

24. Vishwakarma, P.: The pH and bicarbonate-ion content of the oviduct and uterine fluid. *Fertil. Steril.* 13:481, 1962.
25. Staumbaugh, R., Noriega, C. and Mastroiani, L.: Bicarbonate ion; the coronal cell dispersing factor of rabbit tubal fluid. *J. Reprod. Fert.* 18:51, 1969.
26. Chang, M.C.: Development at fertilizing capacity of rabbit spermatozoa in the uterus. *Nature.* 175:1036, 1955.
27. Bullock, D. W. and Connell, K.M: Occurrence and molecular-weight of rabbit uterine "Blastokinine". *Biol. Reprod.* 9:123, 1973.
28. Armstrong, J. McD., Myers, D. V., Verpoorte, J. A. and Edsall, J.T.: Purification and properties of human erythrocyte carbonic anhydrase. *J. Biol. Chem.* 241: 5137, 1966.
29. Friedley, N.J. Rosen, S.: Carbonic anhydrase activity in the mammalian ovary, Fallopian tube, and uterus; histochemical studies. *Biol. Reprod.* 12:293, 1975.
30. McIntosh, J.E.A.: Carbonic anhydrase isoenzymes in the erythrocytes and uterus of the rabbit. *Biochem. J.* 120:299, 1970.
31. Falk, R.J. and Hodgen, C.: Carbonic anhydrase isoenzymes in normal human endometrium and erythrocytes. *Am J. Obstet. Gynecol.* 112:1047, 1972.
32. Miyake, T. and Pincus, G.: Hormonal influences on the carbonic anhydrase concentration in the accessory reproductive tract of the rat. *Endocrinology* 65:64, 1959.
33. Chantler, E.N., Lo, K. and Elstein, M.: Carbonic anhydrase activity in human cervical mucus and its response to various contraceptive regimes. *Br. J. Obstet, Gynecol* -- 84 (9): 705, 1977.
34. Chantler, E., Christoph, F., and Elstein, M.: Release of copper from copper-bearing intrauterine contraceptive devices. *Br. Med. J.* 2: 288, 1977.

35. Hicks, J.J. and Rosado, A.: Molecular distribution of trace metals in the normal and in the copper treated human - secretory endometrium. *Int. J. Fertil* 21:55, 1976.
36. Edgren, R.A., K.A. and Jones, R.C.: On the role of carbonic anhydrase in reproductive processes. *J. Reprod. Fert.* 27: 301, 1971.
37. Board, J.A.: Endometrial carbonic anhydrase after diethylstilbestrol as a post-coital antifertility agent. *Obs--tet. Gynecol.* 36: 347, 1970.
38. Joshi, M.S. and Rosenfeld, M.G.: Hormonal influence on the appearance of uterine specific peptidase in the rat and mouse. IN: *Protides of the Biological Fluids*. Vol 24: 109. Ed. H. Peeters. Pergamon. Oxford 1976.
39. Rosenfeld, M.G. and Joshi, M.S.: A possible role of a specific uterine fluid peptidase in implantation in the rat. *J. Reprod. Fert.* 51: 137, 1977.
40. Kirchner, C.: Hirschaeser - - - - . C. and Kionke, M.: Protease activity in rabbit uterine secretion 24 hours before implantation. *J. Reprod. Fert.* 27: 259, 1971.
41. Ganguly, S., Sarkar, D., Adn Gosh, J.J.: Sialic acid and sialidase activity in human endometrial tissue. Uterine - fluid and plasma under different conditions of uterine - disfunction. *Acta Endocrin.* 81: 574, 1976.
42. Ralajakshmi, M., Sankaran, M. S. and Prasad, R. N.: Changes in uterine sialic acid and glycogen during early pregnancy in the rat. *Biol. Reprod.* 6: 204, 1972.
43. Coppola, J. A. and Ball, J.L: Uterine sialic acid in relation to ovarian ateroids. *Steroids.* 8:355, 1966.
44. Gasic, G. and Gasic, T.B.: Total supression of pregnancy-in mice by post-coital administration of neuraminidase. - *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 67: 793, 1970.
45. Rosado, A., Hicks, J.J., Aznar, R, Martínez-Manautou. J.: Effect of the intrauterine contraceptive device upon the biochemical composition of human endometrium. *A. J. Obs--tet. Gynecol.* 144: 88, 1972.

46. Chang, M.C.: Capacitation of rabbit spermatozoa in the uterus with special reference to the reproductive phases of the female. *Endocrinology*. 63: 619, 1958.
47. Hammer, C.E. Jones J.P. and Sojka, N.J.: Influence of -- the hormonal state of the female on the fertilizing capacity of rabbit spermatozoa. *Fert. Steril.* 19: 137, 1968.
48. Bavister, B.D.: Environmental factors important for in vitro fertilization in the hamster. *J. Reprod. Fert.* 18:544, 1969.
49. Adms, C.E. and Chang. M.C.: Capacitation of rabbit spermatozoa in fallopian tube and the uterus. *J. Exp. Zool.* 151 165, 1962.
50. Yanagimachi, R.: In Vitro capacitation of hamster spermatozoa by follicular fluid. *J. Reprod. Fert.* 18:275, 1969.
51. Block, D.L., Crowley, L. V., Duby, R. T., and Spilman, C. H.: Oviduct secretion in the ewe and the effect of oviduct fluid on oxygen uptake by ram spermatozoa in vitro. *J. Fert.* 15: 127, 1968.
52. Hicks. J. J. y Pedrón, N.: Cambios metabólicos y estructurales del espermatozoide fértil. L. Maduración y Capacitación. *Ginec. Obstet. Mex.* 37: 35, 1975.
53. Ericson, R.J.: Technology, physiology and morphology of spermatozoa capacitation. *J. Reprod. Fert. Suppl.* 2:65, - 1967.
54. Gwatkin, R. B. L. and Williams, D. T.: Inhibition of sperm capacitation in vitro by contraceptive steroids. *Nature*, London. 227: 182, 1980.
55. Hicks, J.J.: Bases moleculares de la capacitación del espermatozoide. En: *Avances en Reproducción Humana*. Ed. Martínez-Manautou, J. y Giner, J., 1973.
56. Verpoorte, J.A.M Menta, S. and Edsall, J.T.: Esterase activities of human carbonic anhydrase B and C. *J. Biol. Chem.* 242: 4221, 1967.
57. Giles. K.W. and Myers. M.: An improved diphenylamine me-

thod for the estimation of DNA. Nature 206:93, 1965.

58. Lowry, O. H., Rosembrough, N. J., Farr, A.L. Randall, R.-J.: Protein measure with the folin-phenol reagent. J. Biol. Chem. 193: 265, 1951.
59. Lindskog, S. and Coleman, J.F.: The catalytic mechanism of carbonic anhydrase. Proc. Nat. Acad. Sci. 70 (9): - - 2505, 1973.
60. McLachlen J.A., Sieber, S.M., Cowherd, C. M., Straw, J. - A. and Fabro, S.: The pH values of the uterine secretions and preimplantation blastocyst in rabbit. Fertil. Steril. 21:84, 1970.
61. Gil-Recasens, M.E., Collado, E.L. Y Hicks, J.J.: Nuevos - conceptos relacionados con la implantación. III. Características bioquímicas. Gine Obstet. Mex. 44:491, 1978.
62. Collado, M.L. y Hicks, J. J.: Regulación endócrina de la actividad de anhidrasa carbónica endometrial. Rev. Clin.-Mex. 32: 155, 1980.
63. Hicks, J.J. y Pedrón, N.: Cambios metabólicos y estructurales del espermatozoide fértil. I. Maduración y capacitación. Ginec. Obstet. Mex. 57: 35, 1975.
64. Rosado, A., Velásquez, A. y Lara-Ricalde, R.: Cell polarography. II. Effect of the neuraminidase and follicular fluid upon the surface characteristics of human spermatozoa. Fertil Steril. 24: 349, 1973.
65. Clemetson C.A.B., Mooshfeghi, M.M. and Mallikarjuveswara-V.R.: Surface charge on the five-day blastocyst. In: Biology of the blastocyst. (R.J. Blandu. ed.). University of Chicago Press. 193, 1971.
66. Lambadarios, C., Hastings, C., Abo-Darub, J. and Cooke, - I. D. Steroids effects on human endometrial glycoproteins biosynthesis J. Reprod. Fert. 46: 383, 1975