



123
2ej

UNIVERSIDAD NACIONAL AUTÓNOMA DE MÉXICO

FACULTAD DE QUÍMICA

PARTICIPACION DE LOS LISOSOMAS ENDOMETRIALES EN LA RESPUESTA ENDOCRINA

T E S I S

Que para obtener el título de

D. F. B.

P r e s e n t a :

LUCIA SANCHEZ GURIDI

México, D. F.

1991

TESIS CON
FALLA DE ORIGEN



Universidad Nacional
Autónoma de México

Dirección General de Bibliotecas de la UNAM

Biblioteca Central



UNAM – Dirección General de Bibliotecas
Tesis Digitales
Restricciones de uso

DERECHOS RESERVADOS ©
PROHIBIDA SU REPRODUCCIÓN TOTAL O PARCIAL

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

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

INDICE

<u>CAPITULO 1</u>	INTRODUCCION.....	4
	ESTRUCTURA HISTOLOGICA DEL UTERO.....	6
	IMPLANTACION Y REACCION DECIDUAL.....	7
	REACCION DECIDUAL.....	9
	ETAPAS DEL PROCESO DE IMPLANTACION.....	11
	MODELO TRADICIONAL DEL MECANISMO DE ACCION HORMONAL.....	13
	LOS LISOSOMAS COMO MEDIADORES DE LA ACCION HORMONAL.....	15
<u>CAPITULO 2</u>	HIPOTESIS Y OBJETIVOS.....	20
	HIPOTESIS.....	20
	OBJETIVOS.....	21
<u>CAPITULO 3</u>	MATERIAL Y METODOS.....	22
	OBTENCION DE FRACCIONES SUBCELULARES.....	23
	DETERMINACION DE PROTEINAS TOTALES.....	24
	DETERMINACION DE DNA.....	25
	DETERMINACION DE LA ACTIVIDAD ENZIMATICA...26	
	EVALUACION ESTADISTICA.....	27
	UNIDADES.....	28
<u>CAPITULO 4</u>	RESULTADOS.....	29
<u>CAPITULO 5</u>	ANALISIS DE RESULTADOS.....	37
<u>CAPITULO 6</u>	CONCLUSIONES.....	40
<u>CAPITULO 7</u>	BIBLIOGRAFIA.....	41

CAPITULO 1









INTRODUCCION

En los mamíferos, los ciclos sexuales se dividen en menstruales y estruales (1 y 2). Los primeros se presentan solo en los primates, mientras que los segundos se presentan en los demás mamíferos. En la rata, que es el animal más estudiado experimentalmente, el ciclo estrual dura 4 ó 5 días. Consiste en 4 fases sucesivas de duración variable, que pueden distinguirse por el análisis al microscopio de las células de descamación vaginal (3).

Estas fases son: Diestro, Proestro, Estro y Metaestro. Se diferencian entre sí por tener una citología distinta, producto de la diferenciación celular. Concomitantemente la hembra presenta una conducta sexual que depende de la fase del ciclo estrual en que se encuentre.

Es en el estro cuando se presentan las mejores condiciones bioquímicas y morfológicas para la fecundación; a la vez que ocurre la ovulación (4) y la hembra se comporta receptiva al macho. De esta manera la especie asegura la presencia de ambos gametos para que la fecundación se lleve a cabo. El estro se reconoce por la aparición de células cornificadas que se han diferenciado a partir de sus precursoras del proestro (figura 1.1). El número de estas células disminuye durante el metaestro y con su desaparición y substitución por leucocitos se inicia el diestro del siguiente ciclo.

Figura 1.1
 Características citológicas y conductuales
 durante el ciclo estrual de la rata.

FASE DEL CICLO	CITOLOGIA		DURACION	CONDUCTA SEXUAL
	PARED VAGINAL	VAGINAL		
DIESTRO			57 HRS.	NO ACEPTACION DEL MACHO
PROESTRO			12 HRS.	SENALES DE ACEPTACION DEL MACHO AL FIN DE ESTA FASE.
ESTRO			12 HRS.	ACEPTACION DEL MACHO, LORDOSIS
METAESTRO			21 HRS.	NO ACEPTACION DEL MACHO.

Citología vaginal del ciclo sexual de la rata y respuesta a la monta del macho. Tomado de Bennett et al. (3).

La sucesión de fases en el ciclo estrual es consecuencia de la producción cíclica y alternada de estrógenos y progestágenos por los ovarios (5,6,7). Así mismo, estas hormonas son las responsables de la diferenciación del epitelio vaginal que usamos como marcador para el reconocimiento de cada fase.

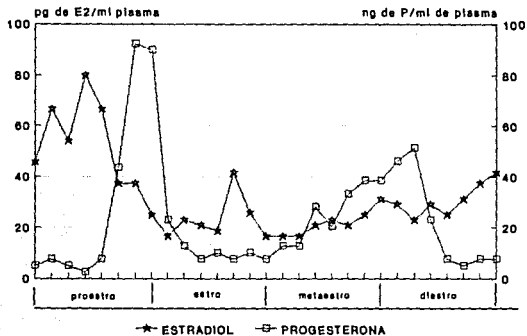
La regulación del ciclo sexual de la rata es uno de los fenómenos endocrinológicos mejor estudiados. Los estrógenos, que favorecen la proliferación y diferenciación del tejido blanco, tal como el endometrio uterino (8,9), aumentan su concentración en el proestro, lo cual condiciona el estro.

Por otra parte, la progesterona, que se encarga de la proliferación glándular del estroma uterino en vista de una posible implantación (10), presenta mayores niveles al fin del metaestro y proestro (figura 1.2). Es importante señalar que dada la organización jerárquica del sistema endócrino, la regulación del ciclo sexual está dada por la secreción de gonadotropinas hipofisarias (hormona luteinizante o LH y hormona folículo estimulante o FSH) y por el hipotálamo, a través de sus hormonas liberadoras (Hormona liberadora de LH y FSH o LH-RH y FSH-RH)(12) (Figura 1.2)(13).

Durante el embarazo, en la rata el ciclo sexual se mantiene en diestro debido a la alta concentración y constante producción de progesterona, se mantiene hasta los últimos días del embarazo (14).

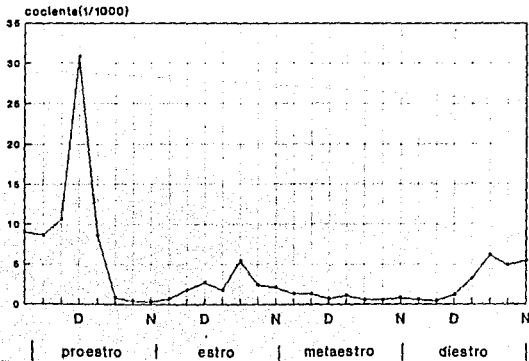
Figura 1.2

CONCENTRACIONES HORMONALES DURANTE EL CICLO ESTRUAL DE LA RATA



Tomado de KALRA y KALRA, 1977

RELACION ESTRADIOL/PROGESTERONA EN EL CICLO ESTRUAL DE LA RATA



Basado en KALRA y KALRA, 1977

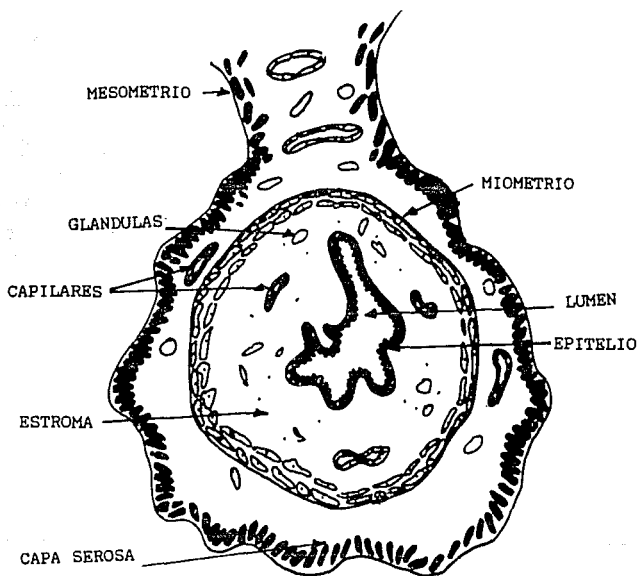
ESTRUCTURA HISTOLOGICA DEL UTERO

La pared del útero consta de tres capas:

1. La capa externa serosa muy delgada o perimetro;
2. La capa media gruesa de músculo liso o miometrio;
3. Una capa interna o endometrio que comprende dos tejidos: el estroma y el epitelio endometriales. Durante las fases del ciclo se pueden diferenciar tres capas del estroma endometrial:
 - 3.1 Una capa compacta delgada y superficial que consta de células estromales;
 - 3.2 La capa esponjosa que consta de estroma edematoso que contiene el cuerpo dilatado y edematoso de las glándulas;
 - 3.3 La capa basal, que contiene los extremos ciegos de las glándulas. Esta capa profunda es delgada y presenta su propio riego sanguíneo. No se desprende en animales con ciclo menstrual ni durante el parto (Figura 1.3).

Las hormonas ováricas causan cambios cíclicos en la estructura del endometrio principalmente. Aunque, tanto en el ciclo estrual como en el ciclo menstrual, estos cambios son continuos y cada fase pasa gradualmente a la siguiente (9.15).

Figura 1.3
Diagrama de los tejidos principales del útero de rata.
Tomado de Fin & Porter (9).



IMPLANTACION Y REACCION DECIDUAL

Dentro de los conceptos relacionados con la implantación destacan: la reacción decidual y las características bioquímicas que acompañan a los periodos de preimplantación, implantación y post-implantación (16,17,18,19).

Después de la fecundación en el oviducto, el cigoto, empieza su desarrollo experimentando segmentaciones hasta el estado de mórula, estado en el que entra a la cavidad uterina donde, posteriormente, alcanza el estado de blastocisto por la formación de la cavidad del blastocele y diferenciación de su masa celular en macizo celular interno y trofoblasto (6,20).

Es muy importante la sincronización entre el desarrollo del cigoto no implantado y las modificaciones uterinas responsables de su receptividad (21). Es por esto que el periodo en el cual el blastocisto permanece "libre" (periodo de preimplantación) es característico de cada especie (figura 1.4) (16)..

Al permanecer varios días en el tracto genital de la hembra antes de la implantación, el blastocisto continua su diferenciación y desarrollo para adquirir características que le permitan fijarse a la pared endometrial (22).

De igual manera el endometrio presenta cambios. Se han sugerido factores bioquímicos y quimiotróficos (23) positivos que atraen al blastocisto, sin embargo, no existe evidencia suficiente para apoyar esta aseveración.

ESPECIE ESTUDIADA	TRANSPORTE EN EL OVIDUCTO (DIAS)	IMPLANTACION (DIAS)
MARSUPIALES	1	INMEDIATA
INSECTIVOROS	1-2	?
QUIROPTEROS:		
MURCIELAGOS	12-16	10-16
PRIMATES	4-5	8-9
HOMBRE	3-4	6-7
ROEDORES:		
CONEJO	3-4	6-7
RATON	3-4	5-6
RATA	4	5-6
HAMSTER	3-4	4
CUYO	3-4	6
CARNIVOROS:		
PERRO	4-5	11-12
GATO	6-7	13-14
UNGULADOS:		
CABALLO	?	19-63
CERDO	2-3	11-20
OVEJA	2-3	15-17
VACA	4	40

Tabla 1.4
Tiempo necesario para que se verifiquen los cambios morfológicos y funcionales del enométrico (Fase de preimplantación). Tomado de Collado y col.(16).

Por otro lado, se ha demostrado en animales de laboratorio de distintas especies, que no todo el endometrio es capaz de recibir al huevo (23).

Entre las condiciones necesarias para que se verifique la implantación están los cambios endometriales tanto morfológicos como funcionales, los cuales están regulados por factores hormonales sistémicos y locales.

Influye también la presencia del espermatozoide en el tracto genital de la hembra o la del huevo después de la fecundación. Se define la implantación como la adopción de una porción fija del blastocisto en el endometrio debido a su mutua interacción (19,24). La presencia de zonas endometriales diferenciadas con gran receptividad para el blastocisto son denominadas "*sitios de implantación*" (18).

Durante la maduración de los sitios de implantación las microvellosidades del epitelio luminal disminuyen en algunas células, considerándose que esta modificación facilita la interacción con el blastocisto (9). También se presentan variaciones en la composición y concentración de sus secreciones, las cuales son vertidas hacia la luz uterina, facilitando el desarrollo del huevo. Como son fuentes de metabolitos y permiten así el desplazamiento del trofoblasto en la proximidad del tejido endometrial (16).

REACCION DECIDUAL

Una de las consecuencias de la interacción del blastocisto con el endometrio es la reacción decidual, la cual comprende la diferenciación de las células del estroma endometrial en una masa de células deciduales con características peculiares. Las células deciduales son grandes, redondas o poligonales, con citoplasma basófilo y frecuentemente son binucleadas; poseen núcleo grande, regularmente con varios nucleolos. La basofilia o afinidad por colorantes básicos se debe al elevado contenido de RNA. En etapas tempranas de maduración contienen gránulos de glucógeno (18).

Desde el punto de vista metabólico, las células deciduales se caracterizan por ser más activas que sus precursoras (células estromales), tanto en lo que consiste a la síntesis de proteínas y ácidos nucleicos como al metabolismo energético. Se ha postulado que esta actividad metabólica capacita a estas células para proporcionar, en caso de embarazo, los nutrimentos que el embrión requiere en los primeros días de la implantación, antes de la formación de la placenta (17).

Otra función fundamental de las células deciduales es impedir la penetración desordenada del trofoblasto en el tejido endometrial ya que este es muy invasivo (9). Esta posibilidad está apoyada por la elevada concentración de colesterol total y no esterificado en las células deciduales respecto a las estromales (25); este fenómeno dá lugar a un aumento en la rigidez membranal por lo cual la célula modifica su permeabilidad y como consecuencia su respuesta a cambios iónicos, dado que la

concentración de colesterol afecta la fluidez membranal; así mismo la célula se hace más resistente a la posible ruptura membranal ante diferentes estímulos (26), lo que impide la penetración desordenada del trofoblasto (17). Por lo tanto la decidua regula el crecimiento del trofoblasto en aquellas especies en las que se requiere una degeneración del epitelio para permitir la implantación, evitando el daño excesivo del endometrio así como proporcionando los nutrimentos que permiten el crecimiento del embrión (18).

ETAPAS DEL PROCESO DE IMPLANTACION

La secuencia de eventos que permiten la posición "fija" del huevo comprenden (figura 1.5) (27,28,29,30,31):

1. Orientación:

El blastocisto se sitúa próximo a la porción específica del endometrio en que la implantación toma lugar. Así, en la rata el polo embrionario del blastocisto se dirige hacia la superficie antimesometrial o membrana contraria a la zona mesometrial del endometrio (6,24). Durante este proceso ocurre la pérdida de la zona pelúcida del huevo.

2. Contacto o Aposición:

Se refiere a la yuxtaposición entre el trofoblasto y el epitelio luminal uterino (18,23,32), puede ocurrir por diversos mecanismos a saber:

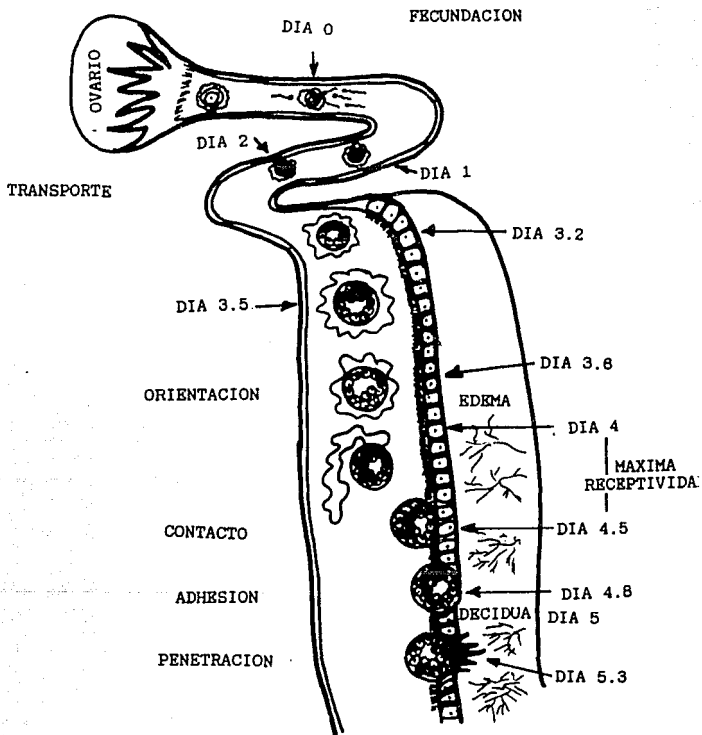
a. Por envolvimiento: El endometrio se hincha y envuelve al blastocisto (ratón y rata) estableciéndose el contacto del trofoblasto con células del epitelio uterino (6,24).

b. Por expansión: El blastocisto incrementa su volumen llenando la luz uterina (conejo, carnívoros, algunos monos) (6,19).

c. Por acercamiento activo: Del blastocisto a la mucosa uterina (cuyo, chimpancé, hombre) (6).

Durante este proceso ocurre la interdigitación de las microvellosidades del trofoblasto y epitelio luminal (6,19). En el endometrio aumenta la permeabilidad sanguínea con la producción de edema y

Figura 1.5
Cronología del proceso de implantación



extravasación de proteínas séricas. Cuando se inyectan colorantes de alto peso molecular (azul de tripán, azul de pontamina, azul geigy, etc.)(33,34) estos se extravasan también permitiendo diferenciar las zonas de implantación del resto del útero (reacción azul) (19, 33,34). Se inicia con esto la reacción decidual.

3. Adhesión:

Se establece una unión trofoblasto-epitelio endometrial resistente a la ruptura física (24) con el establecimiento de desmosomas, y uniones estrechas entre las superficies membranales; son importantes en este proceso los cambios de carga en la membrana así como grupos activos (SH, COOH, NH₂, etc.) y compuestos (ácido silícico, etc.) de superficie (19,22,35,36).

4. Penetración:

El blastocisto penetra a través del epitelio uterino por diversos mecanismos: fagocitosis, desplazamiento mecánico o actividad enzimática (19,22), en el conejo ocurre una fusión de las membranas del trofoblasto y células epiteliales (19); el grado de penetración del endometrio varía según el tipo de implantación (35,36).

La implantación implica una serie de fenómenos los cuales requieren una estricta sincronía entre los eventos embrionarios y uterinos (6), cuando ocurre la fecundación el ciclo sexual se interrumpe, existiendo un predominio de la acción de la progesterona, la cual prepara al útero para la reacción decidual. En la rata y ratón se requieren estrógenos para el inicio de la ovoiimplantación (6,7), ocurriendo una elevación de la concentración de estrógenos en la tarde del día 3 de preñez (7).

MODELO TRADICIONAL DEL MECANISMO DE ACCION HORMONAL
(ACCION HORMONA-RECEPTOR)

Las hormonas esteroides ejercen una gran variedad de efectos en diferentes sitios del organismo; sin embargo, los mecanismos bioquímicos y moleculares involucrados en la expresión de su actividad, a diferentes niveles de la organización biológica, permanecieron sin ser completamente entendidos por un largo tiempo.

La observación experimental es realmente pionera en la dilucidación del modo de acción hormonal. Fue el descubrimiento de que el estradiol, después de su administración, es retenido por los órganos sensibles y/o dependientes de este esteroide fenólico con actividad estrogénica. Esta observación condujo a la demostración de la existencia de un componente de naturaleza protéica, de especificidad estricta y con un obvio significado biológico: el receptor intracelular de las hormonas esteroides (Figura 1.6)(37). Estudios subsecuentes permitieron establecer que estas moléculas receptoras intracelulares tienen una afinidad muy alta por hormonas esteroides ($K_d=10^{-10}$ M), que se encuentran en muy baja concentración en las células blanco (2 a 6×10^4 moléculas) y que sus características son ciertamente diferentes de las que poseen otras proteínas con capacidad de unir esteroides, que se encuentra en el plasma y en otros fluidos biológicos, pero que tienen una función confinada exclusivamente a su transporte (37); a diferencia de las hormonas de origen protéico las cuales tienen un modo de acción diferente a las hormonas esteroides (Tabla 1.7)(38).

Debe señalarse que los estudios *in vitro* que inicialmente caracterizaron la dinámica de la interacción hormona-receptor en citosol, fueron posibles gracias a la

EVENTOS DEL MECANISMO DE ACCION DE HORMONAS ESTEROIDES *

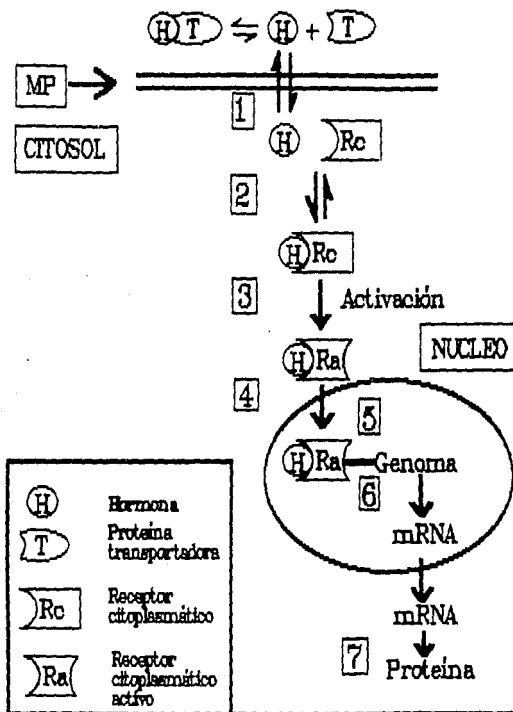


Figura 1.8
* Modificado de
Pérez Palacios y
col. 1988 (37).

DICOTOMIA POSTULADA EN LOS MODOS DE ACCION
DE HORMONAS ESTEROIDES Y PROTEICAS

<u>PARAMETROS</u>	<u>PEPTIDOS</u>	<u>ESTEROIDES</u>
Localización del receptor	Plasmalema externo	Citosol
Entrada a la célula	NO	Entrada libre a todas las células. Retenida solo por las "células blanco".
Actividad de nucleótido ciclasas	SI	NO
Acción en núcleo	Indirecta	Directa

Tabla 1.7
Tomado de Szego, C.M., 1978 (38).

introducción de nuevos avances y técnicas en la metodología bioquímica, incluyendo:

1. La disponibilidad de hormonas esteroideas marcadas con isótopos radioactivos (H^3) de alta actividad específica;
2. El uso de técnicas de ultracentrifugación en gradiente de sacarosa; y
3. El empleo de adsorbentes para hormonas esteroideas.

Se han identificado receptores para cada uno de los cinco tipos diferentes de hormonas esteroideas (Tabla 1.8). En efecto, además del receptor de estrógenos (RE), existen receptores para progesterona (RP), andrógenos (RA), glucocorticoides (RG) y mineralocorticoides (RM). La importancia de estas macromoléculas receptoras, topográficamente ubicadas en el citoplasma y/o en el núcleo celular (Tabla 1.9), reside en que, al unirse a la hormona esteroide correspondiente, se forma un complejo esteroide-proteína "activado", el cual tiene afinidad por varios sitios de unión en el núcleo (particularmente por un sitio receptor en el DNA), lo cual permite a la hormona influir (alterar) en la expresión genética. Estos sitios están localizados en, o muy cerca de, las secuencias de DNA cuya transcripción es hormono-regulada. Los cambios moleculares que ocurren como resultado de la interacción esteroide-receptor o la transcripción genética específica, el procesamiento del mRNA precursor y la traducción a nivel ribosomal en proteínas específicas, que son capaces de modificar la función celular (crecimiento y diferenciación). Se puede por lo tanto concluir que el mecanismo primario de acción de las hormonas esteroideas se realiza a nivel de núcleo celular por la modulación de la transcripción

CARACTERISTICAS DE LOS RECEPTORES A HORMONAS ESTEROIDES

1. Capacidad de union: saturación
2. Afinidad: $K_d = 10^{-12}$ a 10^{-9} M
3. Especificidad.
4. Efecto biológico.
5. Características fisicoquímicas e inmunoreactividad establecidas.

TIPOS DE RECEPTORES:

1. Biosíntesis dependiente o no de otras hormonas.
 - *Receptor de progesterona dependiente de estrógenos (endometrio y glándula mamaria).
 - *Receptor de progesterona independiente de estrógenos. (cerebro).
2. Según su afinidad.
 - *Alta afinidad (K_d de 10^{-10} a 10^{-9} M)
 - *Baja afinidad (K_d 10^{-7} M)

Tabla 1.8

Tomado de Pérez Palacios y col., 1988 (37).

LOCALIZACION DE RECEPTORES A HORMONAS
ESTEROIDES EN LA CELULA

1. Gorski y col. 1968

*Receptor en citosol y núcleo.

*En ausencia del esteroide, el receptor está confinado al citosol, cuando se une al esteroide se moviliza hacia el núcleo.

2. Gorski y Lieberman, 1984

King y Greene, 1984

*El receptor vacío se localiza exclusivamente en núcleos.

3. Szego y Pietras, 1970's--1984.

*Receptores en membranas extranucleares de células blanco, incluyendo a la membrana plasmática.

+Fraccionamiento subcelular analítico.

+Afinidad de células intactas al esteroide inmovilizado.

*La localización preferencial y más abundante de receptores a esteroides en el citosol, tan ampliamente reportada, se debe principalmente a la extracción inadvertida de receptores nativos por los procedimientos de homogeneización los cuales producen daño extensivo a las membranas.

+Cien publicaciones aproximadamente.

Tabla 1.9

genética, lo cual necesariamente requiere la interacción de la hormona con el genóma celular.

No obstante que el mecanismo de acción de una hormona esteroide se inicia en el momento en que penetra en la célula es de gran importancia explicar el mecanismo transportador interno que lleva a estas hormonas hasta su sitio de acción dentro del núcleo.

LOS LISOSOMAS COMO MEDIADORES DE LA ACCION HORMONAL

En los últimos años se ha buscado un canal de comunicación entre los compartimentos citoplásmico y nuclear (38) que tenga la sensibilidad, selectividad, capacidad y velocidad de expansión de acuerdo con estímulos variados.

Sabemos que los eventos fisiológicos que rigen a las células dependen del núcleo y pueden ser inducidas por hormonas, tanto en condiciones de reposo como en el crecimiento y la diferenciación (38 y 39).

Desde hace algún tiempo, se observó la existencia de un intercambio de constituyentes entre el citoplasma y el núcleo, en ciertas condiciones metabólicas y en ciertas células en las que los lisosomas parecen representar el vector necesario para el tráfico hormonal en dirección interna (38).

Es ahora cierto que el sistema lisosomal no solo se involucra con procesos patológicos que llevan a la involución y destrucción de las células (38); ahora hay suficiente información para tomar al sistema lisosomal con

una función metabólica normal de la célula (38). Ya no es apropiado visualizar la actividad de la membrana lisosomal como un proceso de "todo o nada" llevando a la liberación explosiva de hidrolasas ácidas de la "bolsa suicida", seguido inevitablemente por la muerte celular.

La información ahora disponible demuestra que la liberación parcial de las hidrolasas y la extrusión de solo una porción de una proteína ácida de la matriz son consecuencias de las perturbaciones membranales a estímulos pequeños y no máximos (38). Por lo tanto nos permite observar "pequeñas fugas" de lisosomas estructuralmente intactos así como "explosiones", esto propone que el grado de desestabilización membranal es función de la intensidad y calidad del estímulo (38).

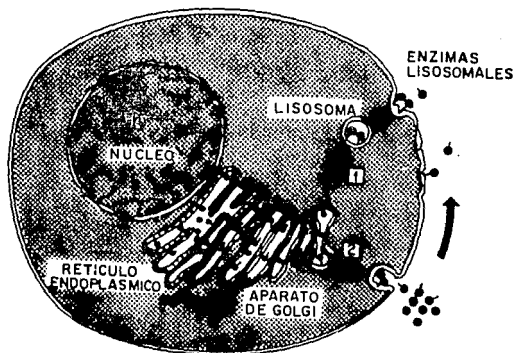
Las observaciones hechas revelan la participación del sistema endosoma-lisosoma en respuestas hormonales específicas que llevan a la invasión del nucleoplasma por los componentes lisosomales que provocan alteraciones en el medio citoplásmico e intranuclear.

Se ha demostrado que los lisosomas coalescen con la membrana plasmática (endocitosis) y que este proceso se hace reversible cuando las membranas interaccionan con efectores externos (e.g. hormonas) del lisosoma (Figura 1.10)(38).

Los lisosomas exhiben movilidad intracelular y su redistribución hacia el núcleo se modifica por una variedad de cambios en el medio celular (38).

Por las propiedades fundamentales de los lisosomas y sus membranas de superficie, por un lado, y sus influencias hormonales generalizadas y pleiotrópicas hacia la célula de respuesta, por el otro, se propuso que la población lisosomal primaria de blancos a hormonas esteroides

Figura 1.10
Origen de los lisosomas.
Tomado de Szego et al.(38).



funciona recibiendo a un agente activo en las fronteras de la célula y sirve como vector para su rápida translocación hacia la zona nuclear (38).

El modelo lisosomal se apoya en la evidencia siguiente:

a. Movimiento.

1. Acumulación *in vitro* de 17β -estradiol tritiado en extracto purificados de lisosomas (38).
2. Aidez del H^3 . 17β -estradiol por lisosomas obtenidos de fracciones macromoleculares del citosol de homogeneizado de glándula prepucial en solución salina isotónica (38).
3. Acumulación de la hormona en lisosomas a $0^\circ C$. (38).
4. H^3 . 17β -estradiol captado preferencialmente en la fracción lisosomal al ser administrado *in vivo* por vía endovenosa.
5. Esta captación selectiva y rápida de la hormona está correlacionada con la actividad micropinocítica en la superficie la membrana de células receptoras, con un arreglo perinuclear de los lisosomas, penetración en el nucleoplasma, y con alta fragilidad de los organelos (38).
6. Estudios recientes examinan con más detalle las características de la asociación de H^3 . 17β -estradiol con macromoléculas extraídas en condiciones isotónicas de preparaciones de lisosomas purificadas de órganos receptores blanco, usando el método de carbón recubierto con dextrán (38).

7. La unión de H^3 .17 β -estradiol con fracciones de glándula prepucial de rata ricas en lisosomas, muestra ser mayor que en la correspondiente fracción de hígado (38).
8. Estereoespecificidad comprobada al utilizar el epímero 17 α . Este resultó ser inefectivo pues se requiere de una solución diez veces más concentrada mientras que con el epímero 17 β se obtiene una reacción con solo una concentración de 10^{-10} M de hormona (38).
9. La microscopía electrónica y de epifluorescencia en campo oscuro con acridín-naranja mostraron aglomeración lisosomal en la periferia de los núcleos de células de órganos reproductores blanco al añadir hormonas esteroideas (38).
10. Usando microscopía de fluorescencia se observó que 2 min después de la inyección de 0.1 μ g de 17 β -estradiol *in vivo* en una rata ovariectomizada mostró la redistribución intracelular de los lisosomas hacia el núcleo en células del endometrio uterino de rata (38).
11. Se han implicado a los microtúbulos en la dinámica lisosomal dada la linealidad que presenta su movimiento. 0° o 180° del punto de inicio (38).
12. Ningún otro organelo presenta la misma respuesta bajo las mismas condiciones (38).

b. Anclaje.

1. El anclaje del núcleo al plasmalema involucra también al material fibrilar (38).

2. El AMPc promueve la agregación de las subunidades microtubulares, por lo que el movimiento lisosomal hacia el núcleo provocado por los estrógenos en sus células blanco y llevado por el AMPc involucra a una o más fosfoquinasas microtubulares específicas (38).
3. La membrana lisosomal es lábil al reto lítico *in vitro* después de la exposición a la hormona (38).
4. La testosterona en concentración de 1 $\mu\text{g}/100\text{mg}$ peso produjo efectos comparables en células de glándula prepuccial en rata de ambos sexos (38).

CAPITULO 2

HIPOTESIS Y OBJETIVOS

HIPOTESIS

Es muy importante recordar que el ciclo estrual de la rata se representa por variaciones hormonales importantes de progesterona y estradiol. Con base en lo anterior, el útero de rata es un buen modelo para estudiar la participación de los lisosomas como mediadores de la respuesta hormonal tomando en cuenta las diferentes fases del ciclo estrual.

Con gran interés en la regulación de la respuesta hormonal de la implantación y tomando en cuenta toda la información ya descrita, se decidió investigar la intervención de los lisosomas en la modulación de la respuesta hormonal partiendo de que:

Los lisosomas participan en la modulación de la respuesta hormonal, refiriéndose a su acción como vectores translocadores de hormonas esteroides desde el exterior hacia el núcleo de las células endometriales de ratas normales.

Si lo anterior resulta cierto entonces se espera encontrar una migración de los lisosomas hacia el núcleo durante el ciclo estrual.

OBJETIVOS

Establecer un modelo experimental que permita estudiar los posibles cambios en la distribución de lisosomas de endometrio de rata, el cual podría estar inducido por las diferentes condiciones hormonales.

Se medirán las actividades de dos enzimas lisosomales (α -manosidasa y α -glucosidasa) en fracciones subcelulares de endometrio de rata en las diferentes fases del ciclo estrual.

Las enzimas utilizadas como marcadores se escogieron con base al criterio siguiente:

1. Existen isoenzimas (lisosomal y citosólica).
2. Estas isoenzimas muestran grandes diferencias en su reactividad por lo tanto hay la posibilidad de diferenciarlas (40 y 41).

Adicionalmente el medir la enzima lisosomal tanto en citosol como en núcleos nos permitirá estudiar si los posibles cambios que se encuentran son o no exclusivos de los lisosomas.

CAPITULO 3

MATERIAL Y METODOS

Ratas hembras Long-Evans, adultas, virgenes, de 2 a 3 meses de edad. con un peso de 200 g \pm 30 g y con un ciclo estrial de 5 días, se mantuvieron en un cuarto con temperatura y luz controladas, alimentadas con purina rat chow y agua ad libitum (7,18,19,21).

Se efectuaron frotis vaginales diariamente antes de las 10:00 am. durante 5 días para asegurar la ciclicidad. Las etapas del ciclo fueron identificadas como se explicó anteriormente (Figura 1.1) (2,6,13,42).

La obtención del epitelio y estroma uterinos se basó en la técnica de Fagg (43) que consiste básicamente en:

1. Una vez determinada la fase del ciclo estrial las ratas se sacrificaron. Se extrajeron los úteros y estos se mantuvieron a 4 °C. Se eliminó el tejido graso y se abrieron longitudinalmente.

2. Se colocaron 0.5 g de útero en un tubo de ensayo con 1 ml de una disolución de sacarosa de 0.25 M.

Se agitaron con 5 perlas de vidrio al vortex durante 2 min. asegurando que el tubo sea de fondo redondo, a velocidad máxima.

De esta manera se extrajo la fracción epitelial.

Con el tejido restante se obtuvo la fracción estromal, utilizando un homogeneizador tipo Potter Evelheim a la mínima velocidad en 1 ml de solución de sacarosa 0.25 M. El resto de tejido (miometrio) se descartó.

3. Cada fracción se aforó a 1 ml con sacarosa 0.25 M.

De estas fracciones se tomaron alícuotas (50 μ l) para cuantear proteínas, DNA, y actividad enzimática. Estas muestras se etiquetaron como "Fracciones Crudas" y se mantuvieron en congelación hasta ser necesitadas.

Obtención de Fracciones Subcelulares.

4. El material biológico sobrante se centrifugó a 2000 rpm en un rotor de 8 cm de diámetro durante 10 min:

a. El paquete se suspendió de nuevo en 5 ml de solución de sacarosa 0.25 M, se tamizó a través de un filtro malla de nylon de 85 μ m para desechar restos de tejido. El filtrado se centrifugó a 2000 rpm para lavar el paquete nuclear. Este se suspendió de nuevo en 0.5 ml de un amortiguador citrato fosfato 0.06 M tritón 1% a pH=4.5 para epitelio y 1 ml del mismo amortiguador para estroma. Se tomaron alícuotas de 50 μ l para cuantear proteínas, DNA y actividad enzimática. Esta fracción se etiquetó como "Fracción Nuclear" y se mantuvo en congelación hasta ser necesitada.

b. El sobrenadante se centrifugó a 11500 rpm durante 30 min a 4 °C en una centrifuga refrigerada Sorvall RC-5B y RC-2B de Dupont instruments.

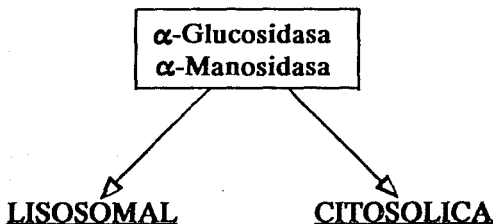
b.1. El paquete obtenido se suspendió de nuevo en 0.5 ml de amortiguador citrato-fosfato 0.06 M, tritón 1%, pH=4.5 para epitelio y en 1 ml del mismo amortiguador para estroma. Se tomaron alícuotas de 50 μ l para cuantear proteínas y actividad enzimática. Esta fracción se etiquetó como "Fracción Mitocondrial-Lisosomal (M+L)" y se mantuvo en congelación hasta ser necesitada.

METODOLOGIA

1. Glicosidasas Lisosomales

Opheim y Touster, 1978.

Jeffrey y col., 1970.



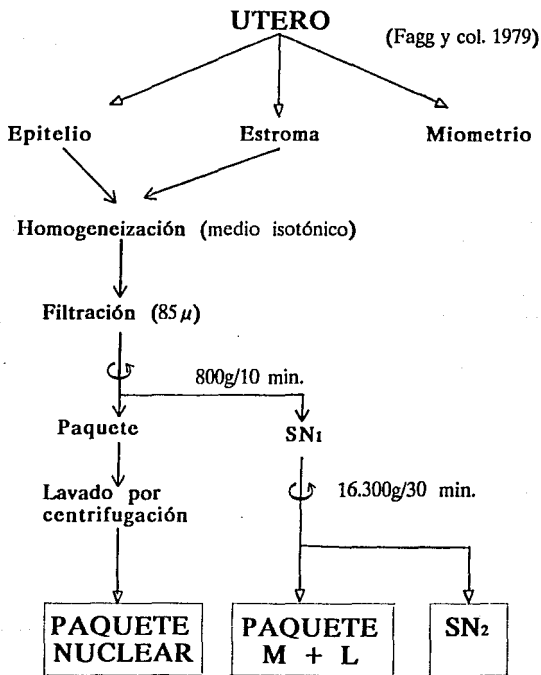
Diferencias:

- PM
- Cinética
- Especificidad
- pH

DETERMINACION DE LA ACTIVIDAD

- PNF - Glicósido
- Tritón X-100
- Medición espectrofotométrica del PNF liberado

2. Obtención de Fracciones Subcelulares de Endometrio



b.2. El sobrenadante representó la "Fracción Citosólica". De esta se tomaron alícuotas de 50 μ l para cuantear proteínas y actividad enzimática. Estas muestras se mantuvieron en congelación hasta ser necesitadas.

Determinación de Proteínas Totales

En 50 μ l de extracto se sigue el método de Lowry (44) como se describe en la tabla a continuación. Se debe probar la linealidad del método en curvas patrón de absorbancia contra concentración de proteínas para establecer el intervalo de trabajo. El método se basa en la formación de un complejo con ácido molibdo-tungstico que es colorido y tiene su máxima absorbancia a 550nm (Figura 3.1).

Curva Patrón para Proteínas Totales. Método de Lowry.

TUBO	ALBUMINA (0,3mg/ml)	AGUA	SOL. C		SOL. D			
B	0.0 ml	0.5 ml	2.0 ml	R	0.2 ml	R		
1	0.1 ml	0.4 ml	2.0 ml	E	0.2 ml	E		L
2	0.2 ml	0.3 ml	2.0 ml	P	2 0.2 ml	P	2	E
3	0.3 ml	0.2 ml	2.0 ml	O	O' 0.2 ml	O	O'	E
4	0.2 ml	0.1 ml	2.0 ml	S	0.2 ml	S		R
5	0.1 ml	0.0 ml	2.0 ml	O	0.2 ml	O		

Reactivos:

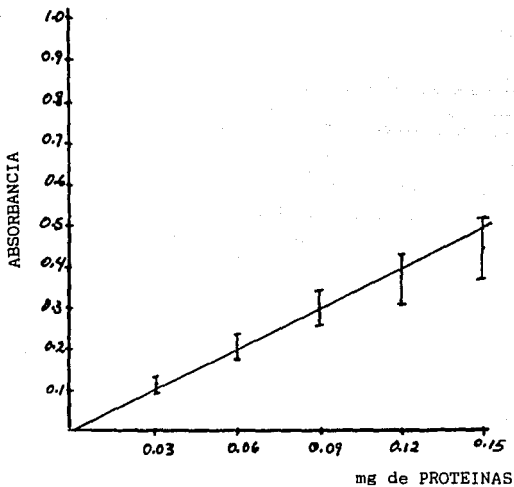
Solución A.

Preparar 250 ml con Na_2CO_3 al 2% y tartrato de Na al 0.02% en NaOH 0.1 M

Solución B.

Preparar 50 ml con CuSO_4 al 0.5% en agua.

Figura 3.1
Curva patrón para proteínas.



Solución C.

50ml de solución A con 1.0 ml de solución B.

Solución D.

Reactivo de Folin-Cicanteau en agua. 1.1 ml folin + 1.4 ml H₂O.

Al momento de usarse.

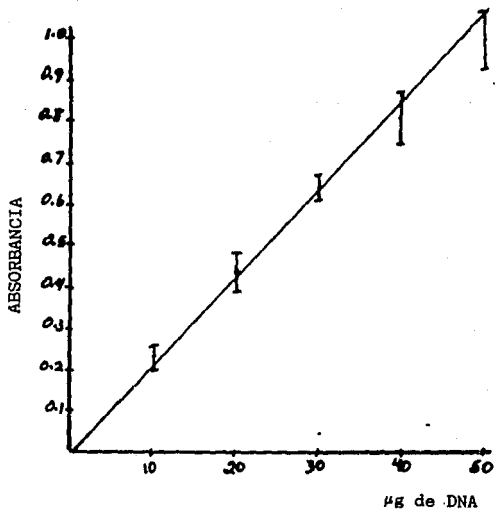
Determinación de DNA

Se utiliza el método de Burton modificado por Giles-Meyers (45,46) para cuantearlo en 50 μ l de homogeneizado según el protocolo, previa demostración de linealidad de las curvas de absorbancia contra concentración de DNA en dicho intervalo (Figura 3.2). La base de esta técnica es la formación de un complejo difenilamina-desoxiribosa de cadena abierta (por acción del acetaldehído) el cual tiene un máximo de absorción a 600 nm.

Curva Patrón de DNA Método de Giles-Meyers.

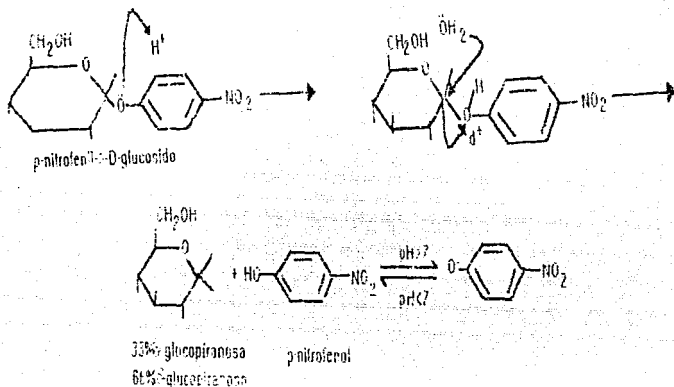
TUBO	DNA (100 μ g/ml)	SOL.F		SOL.G	SOL.H		
B	0.0 ml	0.5 ml	7	50 μ l	0.5 ml		
1	0.1 ml	0.4 ml	0	50 μ l	0.5 ml	Toda la	L
2	0.2 ml	0.3 ml	°C	50 μ l	0.5 ml	noche a	E
3	0.3 ml	0.2 ml		50 μ l	0.5 ml	37°C	E
4	0.4 ml	0.1 ml	3	50 μ l	0.5 ml		R
5	0.5 ml	0.0 ml	0	50 μ l	0.5 ml		

Figura 3.2
Curva patrón para DNA.



Determinación de la actividad enzimática

Las enzimas utilizadas como marcadores enzimáticos de lisosomas son α -manosidasa (E.C.3.2.1.24) (40) y α -glucosidasa (E.C.3.2.1.3) (41).



La actividad de estas enzimas se determina cuantificando espectrofotométricamente mediante la liberación de p-nitrofenol del glicosido correspondiente por acción enzimática. El p-nitrofenol tiene un pico de absorción a 400 nm, por lo que las determinaciones se hacen a esta longitud de onda (Figura 3.3) (40 y 41).

El protocolo para la curva patrón de p-nitrofenol es la siguiente:

Curva Patrón para p-nitrofenol

TUBO	PNP 0.2mM	AGUA	AMORTIGUADOR CARBONATOS 0.5M pH=10.4
B	0.0 μ l	250 μ l	250 μ l
1	50 μ l	200 μ l	250 μ l
2	100 μ l	150 μ l	250 μ l
3	150 μ l	100 μ l	250 μ l
4	200 μ l	50 μ l	250 μ l
5	250 μ l	0.0 μ l	250 μ l

Evaluación Estadística

Se aplica la prueba de t de student para evaluar diferencias significativas en un ensayo de dos colas a $p < 0.05$ y $p < 0.01$ (47). Esto debe hacerse para poder comparar significativamente las fases del ciclo estrual.

t = estadístico t

σ = desviación estandar poblacional

n = numero de casos

x = medidas muestrales

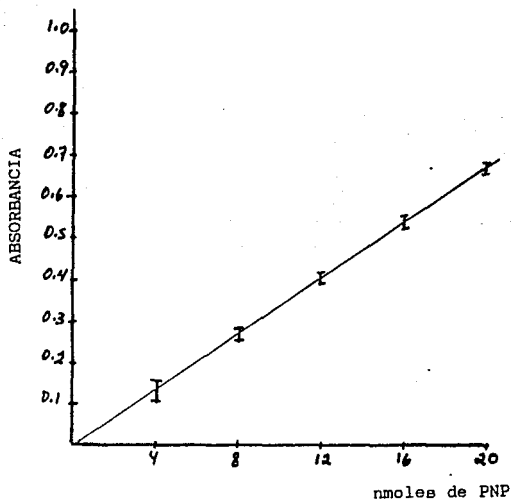
s = desviación estandar muestral

v = grados de libertad

$$\sigma = \sqrt{\frac{\sum(x - x_1)^2}{n - 1}} \quad t = \frac{x_1 - x_2}{\sqrt{(s_{x_1})^2 + (s_{x_2})^2}}$$

$$v = n_1 + n_2 - 2$$

Figura 3.3
Curva patrón para p-nitrofenol



UNIDADES

La actividad enzimática se reporta en pKatales, unidades poco usadas que se definen como (37):

$$1 \text{ UI} = 1 \mu\text{mol}/\text{min} = 16.67 \text{ nmol}/\text{seg} = 16.67 \text{ nkatal}$$

$$1 \text{ UI} \times 16.67 = 1 \text{ nkatal}$$

$$1 \text{ mUI} \times 16.67 = 1 \text{ picokatal}$$

CAPITULO 4

RESULTADOS

A. Actividad enzimática en función de proteínas durante el ciclo estrual:

1. Estroma.

1.1. α -manosidasa (Figura 4.1):

a. "Fracción Cruda":

La actividad enzimática obtenida en esta fracción es alta para todas las fases del ciclo estrual mostrando picos durante el proestro y el metaestro: sin embargo las diferencias estadísticas entre las fases se muestran no significativas por lo que la actividad se toma como alta para todo el ciclo en esta fracción.

b. "Fracción Nuclear":

En esta fracción tenemos un incremento notable en la actividad enzimática durante el estro. Esta diferencia es significativa ($p < 0.05$) al compararse con las otras fases.

Se nota claramente que durante el diestro y el proestro la actividad enzimática es baja y estable y que esta actividad aumenta casi un 60% en el estro y baja un 20% durante el metaestro.

c. "Fracción M+L":

La actividad enzimática se encuentra baja y estable, con un pequeño incremento en el proestro que resulta significativo ($p < 0.05$) con respecto a las otras fases. Sin embargo, este aumento no es mayor a 2 μ katales. Si se compara esta fracción con las ya estudiadas se nota que la actividad es baja.

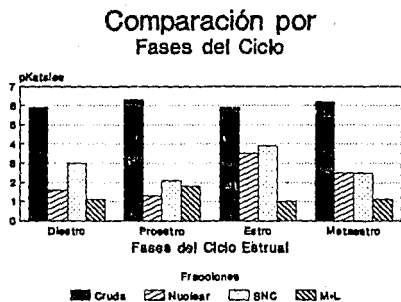
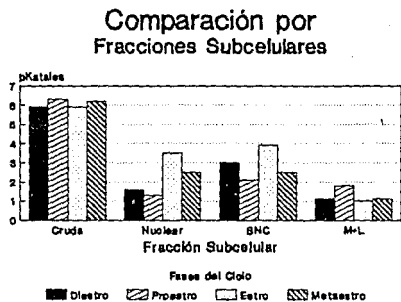


Figura 4.1

Actividad de Manosidasa en Estroma Durante el Ciclo Estrual

Es muy importante comparar esta fracción con la fracción nuclear; se observa que durante el estro la actividad enzimática lisosomal baja, mientras que en la fracción nuclear hay un pico en la actividad. Se puede pensar entonces en el transporte de enzimas lisosomales al núcleo celular.

d. "Fracción citosólica":

Al contrario de lo que se observa que en la fracción cruda, en esta fracción las actividades enzimáticas más altas están en el diestro y el estro pero las diferencias no son significativas, por lo que la actividad debe tomarse como constante y estable durante todo el ciclo para esta fracción.

Estos resultados para α -manosidasa en estroma parecen mostrar que las enzimas lisosomales se mantienen constantes en citoplasma, pero en los lisosomas y núcleos varían en concentración significativamente en proestro y estro respectivamente.

1.2. α -glucosidasa (Figura 4.2):

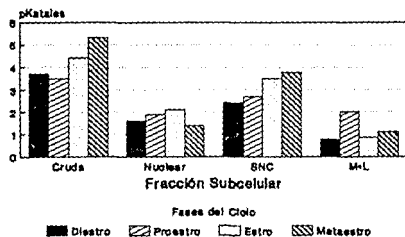
a. "Fracción Cruda":

Las diferencias estadísticas son significativas en esta fracción. Por lo que la actividad se nota alta durante estro y metaestro y no tanto para diestro y proestro.

b. "Fracción Nuclear":

En este caso la actividad enzimática no muestra diferencias. En el metaestro, sin embargo, la actividad cae un poco lo que muestra que esta es mayor en el estro.

Comparación por
Fracciones Subcelulares



Comparación por
Fases del Ciclo

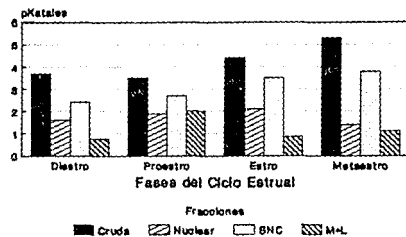


Figura 4.2

Actividad de Glucosidasa en Estroma Durante el Ciclo Estrual

c. "Fracción M+L":

La actividad enzimática es alta y significativa durante el proestro. Al comparar el estro de esta fracción con el de la fracción nuclear se nota que la actividad enzimática es significativamente mayor ($p < 0.05$) en núcleos. Esto es un comportamiento similar a la enzima α -manosidasa estromal.

d. "Fracción Citosólica":

La actividad enzimática en esta fracción tiende a incrementarse desde el diestro hasta el metaestro, de una manera similar a la actividad total de la fracción cruda.

La actividad de la glucosidasa es menor que la de la manosidasa. Aunque el comportamiento de las dos enzimas es similar a lo largo del ciclo.

2. Epitelio.

2.1. α -manosidasa (Figura 4.3):

a. "Fracción Cruda":

En esta fracción la actividad enzimática es notablemente más alta ($p < 0.05$) en el proestro, baja más de 60% en el estro y alcanza un mínimo en el diestro.

b. "Fracción Nuclear":

Igual que en la fracción anterior la actividad enzimática es más alta en el proestro ($p < 0.05$), las otras fases se mantienen constantes.

c. "Fracción M+L":

El proestro tiene una actividad 60% mayor que el estro ($p < 0.05$ para todas las fases).

Al comparar esta fracción con la fracción nuclear no se pueden percibir diferencias significativas.

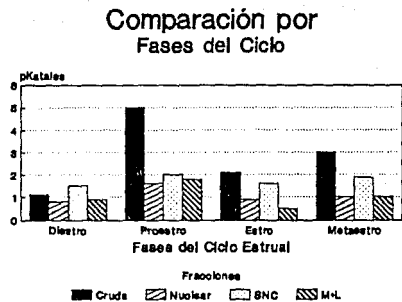
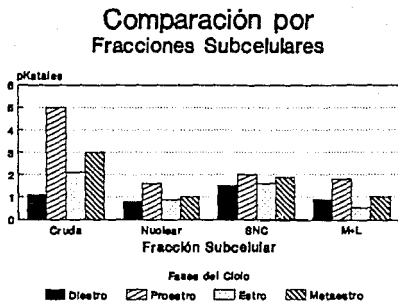


Figura 4.3

Actividad de Manosidasa en Epitelio Durante el Ciclo Estrual

d. "Fracción Citosólica":

En esta fracción la actividad se mantiene constantes en todo el ciclo.

2.2. α -glucosidasa (Figura 4.4):

a. "Fracción Cruda":

El proestro muestra ser la fase en donde se encuentra una actividad enzimática 40% mayor que en las otras fases siendo esta diferencia bastante notable. Entre las demás fases no hay diferencias significativas.

b. "Fracción Nuclear":

De manera semejante, el proestro tiene la actividad enzimática más alta y es la única significativamente diferente a las demás.

c. "Fracción M + L":

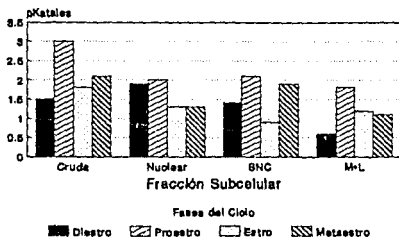
Se observa el mismo comportamiento enzimático que en las fracciones anteriores. Siendo en el proestro donde esta la actividad más alta del ciclo.

d. "Fracción Citosólica":

En el estro y el metaestro es donde la actividad enzimática aumenta significativamente. La actividad del estro es casi 50% menor que la del proestro.

Es muy difícil comparar las fases del ciclo estroal en las fracciones epiteliales ya que la actividad enzimática no es alta como es el caso en el estroma. No parece haber diferencias significativas entre las fracciones nuclear y M+L para poder sugerir un movimiento lisosomal. Sin embargo, la actividad enzimática en citoplasma muestra una variación en concentración al compararlo con la fracción nuclear, esta variación si es significativa.

Comparación por Fracciones Subcelulares



Comparación por Fases del Ciclo

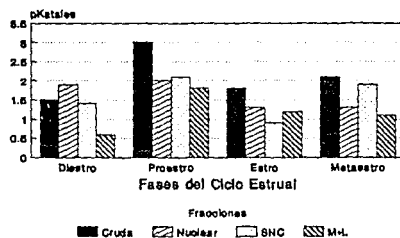


Figura 4.4

Actividad de Glucosidasa en Epitelio Durante el Ciclo Estrual

Tanto la α -manosidasa como la α -gucosidasa tienen una variación cuantitativamente semejante en casi todas las fases en relación a la concentración de enzimas: mayor en el proestro, menor en el diestro. Esta variación está dada porque la enzima lisosomal aumenta pues, en el proestro se tiene la máxima concentración de estrógenos del ciclo estrual de la rata.

B. Actividad enzimática en función de DNA durante el ciclo estrual.

1. Estroma.

1.1. α -manosidasa (Figura 4.5):

a. "Fracción Cruda":

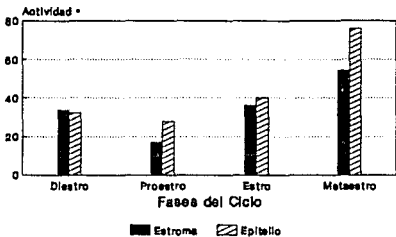
Las actividades más altas se notan en el estro y metaestro, bajando un poco durante el diestro y perdiendo caso 50% en el proestro. Estas diferencias son estadísticamente significativas ($p < 0.05$).

b. "Fracción Nuclear":

Aunque notablemente menor que la fracción anterior, la actividad enzimática muestra el mismo comportamiento. El estro y metaestro son las fases de mayor actividad y el diestro y proestro las de actividad menor.

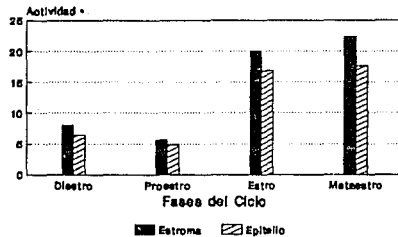
La actividad enzimática en función de DNA indica la cantidad de enzimas por célula, ya que la concentración de DNA indica el número de células con las que se trabaja. Es lógico pensar, entonces, que la actividad enzimática es mayor en el estro y metaestro porque hay una mayor cantidad de manosidasa por célula en diestro y proestro.

Actividad Total de Manosidasa Durante el Ciclo Estrual



• unidades PNP/ng DNA min

Actividad de Manosidasa en Nucleos Durante el Ciclo Estrual



• unidades PNP/ng DNA min

Figura 4.5

Actividad de Manosidasa en Función del DNA Durante el Ciclo Estrual

1.2. α -glucosidasa (Figura 4.6):

a. "Fracción Cruda":

La actividad enzimática es estadísticamente mayor en el estro y metaestro. Disminuye un poco en el diestro y tiene un mínimo en en proestro.

b. "Fracción Nuclear":

Se observan las mismas tendencias, aunque la actividad es notablemente más baja en esta fracción.

Al igual que los resultados de α -manosidasa, la α -glucosidasa tiene mayor actividad en el estro y metaestro.

2. Epitelio.

2.1. α -manosidasa (Figura 4.5):

a. "Fracción Cruda":

La actividad del metaestro es mucho mayor que en las otras fases, el mínimo de actividad está en el proestro, en el estro y diestro no hay ningún cambio.

b. "Fracción Nuclear":

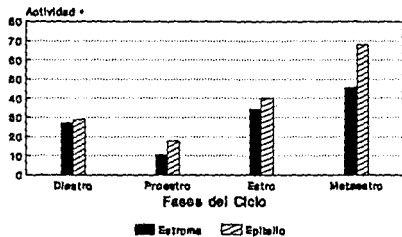
Se vé la misma tendencia que en la fracción cruda donde el mínimo está en el diestro y proestro y el máximo en el metaestro y estro.

2.2. α -glucosidasa (Figura 4.6):

a. "Fracción Cruda":

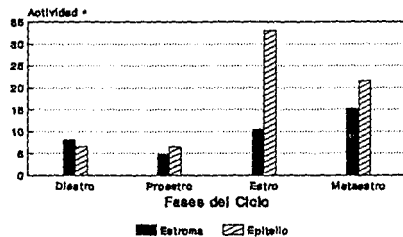
La actividad en el metaestro es estadísticamente mayor que todas las fases y la actividad baja considerablemente en el proestro.

Actividad Total de Glucosidasa Durante el Ciclo Estrual



* unidades PNP/mg DNA min

Actividad de Glucosidasa en Nucleos Durante el Ciclo Estrual



* unidades PNP/mg DNA min

Figura 4.6

Actividad de Glucosidasa en Función de DNA Durante el Ciclo Estrual

b. "Fracción Nuclear":

Curiosamente el pico en la actividad está en el estro y baja casi 60% en el metaestro. El diestro y proestro tienen la actividad menor.

Las tendencias en estroma y epitelio son semejantes.

C. Relación proteínas:DNA.

1. Estroma (Figura 4.7):

a. "Fracción Cruda":

El pico en la relación de proteínas:DNA está en el estro y baja significativamente durante el diestro y proestro.

b. "Fracción Nuclear":

La relación es baja y constante a lo largo del ciclo, aunque aumenta 50% en el diestro.

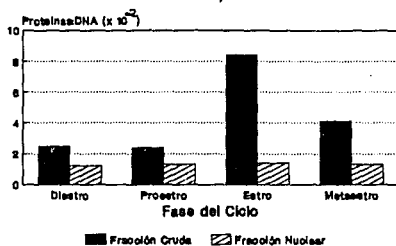
La relación proteínas:DNA indica la concentración total de proteínas por célula. En el estro la concentración de proteínas totales por célula es mayor, lo cual corrobora los resultados obtenidos en las figuras anteriores en donde la concentración de enzima es mayor en el estro y metaestro. En núcleo la relación aumenta un poco en el diestro, lo cual indica un aumento de proteínas totales por célula en el núcleo en esa fase; desciende y se mantiene constante en las otras fases.

2. Epitelio:

a. "Fracción Cruda":

La relación es máxima en el estro, baja 50% y se mantiene constante en las otras fases.

Relación de Proteínas:DNA en el Epitelio



Relación de Proteínas:DNA en Estroma

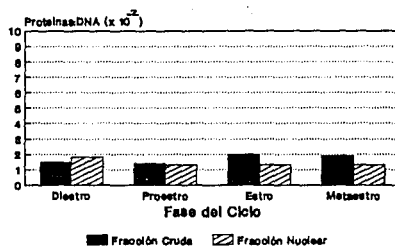


Figura 4.7

Relación de Proteínas:DNA

b. "Fracción Nuclear":

Al igual que en la fracción nuclear estromal, en epitelio la relación es muy baja y aumenta un poco durante el estro pero sin ser significativo.

Tanto en estroma como en epitelio se tienen las mismas tendencias en la relación de proteínas:DNA. Esto indica que durante el estro y metaestro hay un aumento en la concentración de proteínas totales por célula pero este aumento no se dá en núcleo.

Es tal vez extraño que la relación sea mayor en epitelio que en estroma; sin embargo, si se piensa en la existencia de un epitelio glándular y por lo tanto secretor de gran cantidad de proteína con el que se está trabajando, es posible que haya una mayor cantidad de proteína por DNA.

CAPITULO 5

ANALISIS DE RESULTADOS

El estudio del metabolismo del útero es muy complejo y debido a la función que desempeña en la reproducción presenta varios intereses para su estudio.

Las dificultades que se presentan al tratar de estudiar el útero son las diferencias entre este y otros órganos, por lo que se debe estudiar de forma independiente y los resultados obtenidos son difíciles de comparar con los de los otros órganos; las razones que explican lo anterior son:

1. El útero es tejido blanco a hormonas ováricas, las cuales inducen diferenciación cíclica en sus células, alternando su metabolismo.

2. El útero no está en contacto directo con fluctuaciones dietéticas, por esto su sistema de adaptación y regulación por medio de inducción responde lentamente y con menos intensidad.

Los experimentos presentados en este trabajo son un avance en el conocimiento de la fisiología celular durante el ciclo estrual normal de la rata.

Existen trabajos en donde se describen perfectamente las enzimas que se tomaron como modelos en este trabajo. Se sabe que ambas enzimas tienen isoenzimas. La α -D-manosidasa tiene tres isoenzimas (40) una citosólica, otra en aparato de Golgi y la tercera en lisosomas, fueron purificadas de hígado de rata. Aunque se sabe muy poco del papel biológico que desempeñan las isoenzimas no lisosómicas, se conoce que tienen un pH óptimo distinto: y de acuerdo con sus

interrelaciones inmunológicas se sabe que estas son distintas y codificadas por genes diferentes.

Los experimentos iniciales demostraron que la α -manosidasa tiene una actividad óptima a pH=4.5: en la fracción nuclear (13.4 + 1.1)* y en la fracción M+L (22.6 + 1.02)*, mientras que el sobrenadante post-M+L tiene una máxima actividad a pH=6.0-6.5 (12.0 + 1.3)*.

* (nmoles PNP/mg prot. min.).

Estos resultados indican la presencia de la isoenzima de origen lisosomal en los núcleos de células endometriales (Figura 5.1).

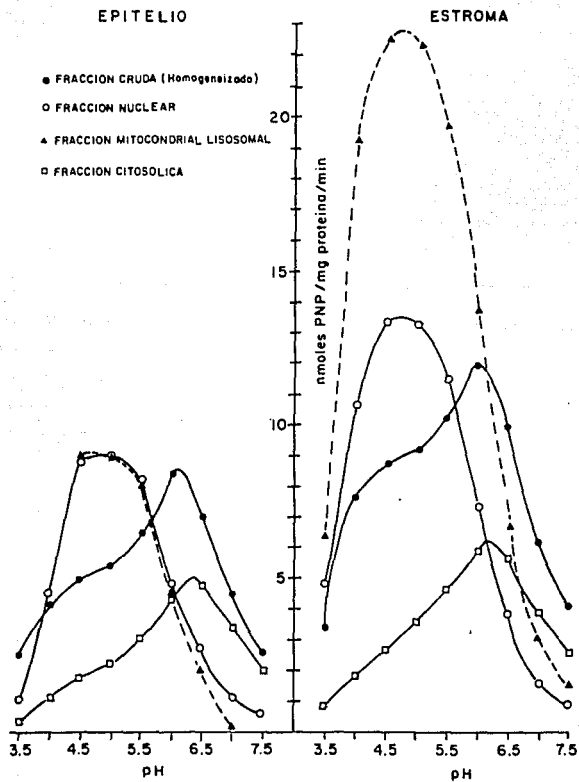
La enzima α -D-glucosidasa presenta también isoenzimas, estas fueron purificadas de hígado humano en autopsia (41). La isoenzima lisosomal tiene una actividad óptima a pH=4.4 a 4.6 (41).

El haber trabajado a un pH=4.5 constantemente asegura que la actividad enzimática reportada se deba a las isoenzimas lisosomales exclusivamente.

En el proestro se encuentran las concentraciones séricas mayores de estradiol (75pg/ml) y progesterona (48ng/ml) (Figura 1.2). Se considera que esta elevación en la concentración hormonal es un prerequisite en el endometrio tanto para la formación de receptores citosólicos como para el inicio de la movilización de los lisosomas hacia el núcleo, condición que se expresa claramente durante las dos fases siguientes (estro y metaestro) de acuerdo con los resultados. Un requerimiento hormonal similar, para que los lisosomas se desplacen, ha sido demostrado por otros autores en diversos órganos blanco: testículos, glándula prepucial de rata y vesícula urinaria de rana (38).

Figura 5.1

α -MANOSIDASA (Estro)



Los resultados se reportaron tanto por mg de proteína minuto como por mg de DNA minuto. Las tendencias observadas son las mismas, esto indica que la elevación de hormonas induce la elevación de la actividad enzimática en general, la proliferación celular en el endometrio y la concentración de enzimas intracelulares (48).

Es importante discutir el origen de la actividad de estas dos glicosidasas en las fracciones nucleares; es decir que existe la posibilidad que sean producto de un artefacto de contaminación (por enzimas citosólicas y/o por células integras) de las preparaciones de los núcleos. Las evidencias que muestran lo contrario y que por el momento son disponibles:

1. La relación actividad nuclear con respecto a la total (Figuras 5.2 y 5.3)(por DNA) varía durante el ciclo estrual (tanto en epitelio como en estroma).

Nota: Si fuese producto de contaminación se esperaría que esta fuese constante y por lo tanto la relación anterior también, en todas las fases del ciclo. No que en determinadas fases la contaminación sea mayor.

Sin embargo, se obtiene una variación siendo el estro de 2 hasta 3.5 veces mayor que las demás. Lo cual apoya la hipótesis de migración lisosomal hacia el núcleo.

2. La deshidrogenasa láctica que es una enzima típicamente citosólica la cual, puede medirse fácilmente con un método de alta sensibilidad, nos sirve como marcador de proteínas de origen citosólico por lo que podemos saber que tanta contaminación es de origen citosólico.

Cuando se toma la enzima LDH como marcador de contaminación por proteínas citosólicas en las fracciones nucleares obtenidas, se encuentra una actividad de 6-8% del total de actividad de LDH en núcleo (49). se puede decir que este

Distribución de la Actividad Enzimática Durante el Ciclo Estrual

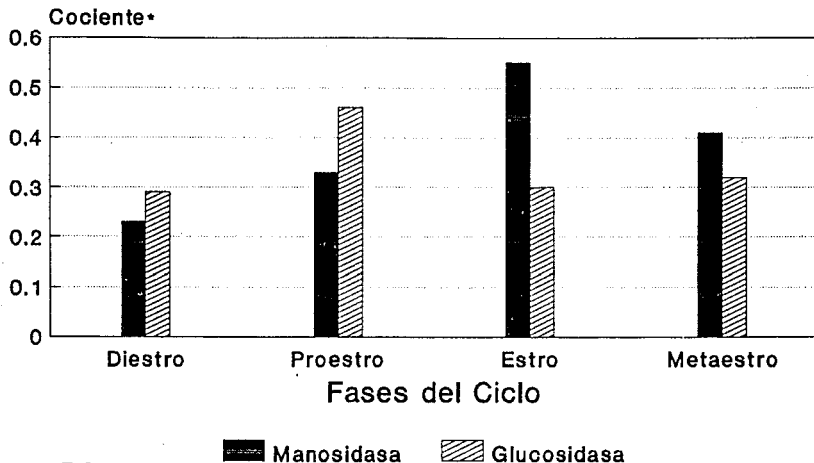


Figura 5.2

* Actividad Nuclear/Actividad Total(DNA)
(Estroma)

Distribución de la Actividad Enzimática Durante el Ciclo Estrual

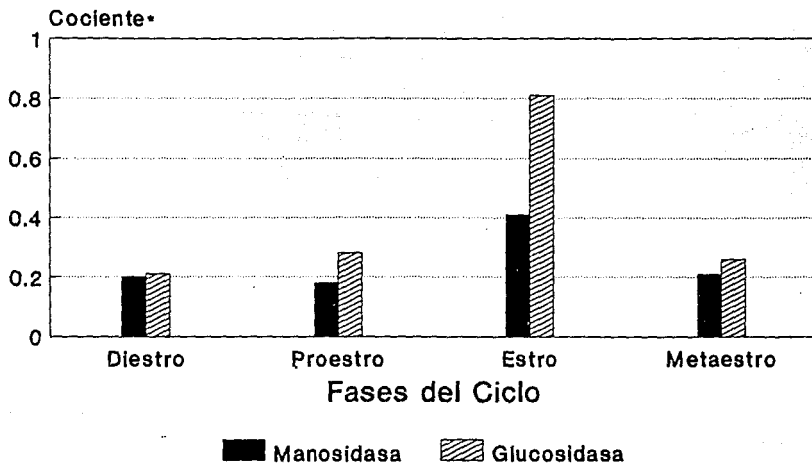
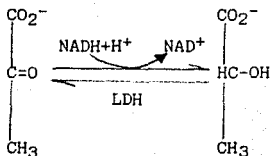


Figura 5.3

* Actividad Nuclear/Actividad Total(DNA)
(Epitelio)

percentage no es de importancia porque la actividad enzimática de las enzimas estudiadas fue mayor de 50%, por lo tanto, existe muy poca contaminación de proteínas de origen citosólico (figura 5.4).

La reacción que cataliza la LDH es la siguiente:



El NADH se puede medir espectrofotométricamente a 360 nm.

Figura 5.4

ACTIVIDAD DE LDH EN FRACCIONES SUBCELULARES*

FRACCION	ACTIVIDAD (%)
HOMOGENEIZADO	100
NUCLEAR	8.3
M + L	5.8
CITOSOLICA	86

*Promedio de dos determinaciones
independientes.

CAPITULO 6

CONCLUSIONES

Desde su caracterización como organulos intracelulares, los lisosomas han sido involucrados con fenómenos de involución y destrucción celular, en procesos patológicos y normales. En la actualidad se ha obtenido evidencia suficiente para adjudicarles una función adicional como receptores a hormonas, transportadores hacia el nucleoplasmas y desrepresores de la expresión genética, permitiendo así la propagación y amplificación de los efectos hormonales en sus respectivas células blanco.

Dados los resultados de este trabajo, la hipótesis a demostrar si pudo probarse, por lo que podemos concluir que:

Los lisosomas si participan en la modulación hormonal, actuando como vectores de hormonas esteroides desde el exterior hacia el núcleo de células endometriales. Por lo tanto, la migración de estos organulos hacia el núcleo depende de las condiciones hormonales en que se encuentran los animales de experimentación.

Por estas razones se puede concluir también que las enzimas α -manosidasa y α -glucosidasa pueden utilizarse como modelos experimentales para medir la migración lisosomal. Además, la distribución de la migración lisosomal al núcleo se modifica en las diferentes condiciones hormonales del ciclo estrual.

BIBLIOGRAFIA

1. Terán Benitez, J.C: Tesis: Actividad de tirosina aminotransferasa y triptofano en el útero de rata. Universidad Iberoamericana, México D.F., 1978.
2. Fox, R.R., Laird, C.W: Sexual cycles. Cap. 5. E.S.E. Hafez: Reproduction and breeding techniques for laboratory animals. Philadelphia USA. 1970.
3. Bennett, J.P., Vickery, B.H: Rats and mice, chap. 17. E.S.E. Hafez. Reproduction and breeding techniques for laboratory animals. Lea. Febiger Phil. USA, 1970.
4. Greep, R.O., Koblinsky, M.A. Jaffe, E.S: Reproduction and human welfare. MIT. press, Cambridge, 1976.
5. Van Der Shoot, P., De Greef, W.J: Diestrous progesterone and proestrous LH in four and five days cycle of female rats. Endocrinology 70: 61-68, 1978.
6. Psychoyos A: Hormonal control of oovimplantation. Vitamines and hormones 31: 201-256, 1973.
7. Psychoyos A: Hormonal control of uterine receptivity for nidation. J. of Reoroduction and Fertility suppl. 25: 17-28, 1976.
8. Boshier D.P., Katz, J.M: Effect of ovarian steroid hormones on estrerases in the rat epithelium. J. of Endocrinology 64: 465-474, 1975.
9. Fin, C.A., Porter, D.G: The uterus. Ed. Elek Science, London, 1975.

10. Surani, M.H.A: Uterine luminal proteins of the time of implantation in rats. *J. of reproduction and fertility* 48:141-145, 1976.
11. Mood, A.M., Graybill, F.A: *Introducción a la Teoría Estadística*. Ed. Aguilar. México D.F., 1972.
12. Lehninger, A.L: *Biochemistry*. Ed. North, N.Y., 1975.
13. Kalra, P.S., Kalra, S.P: Temporal changes in the hypothalamic and serum luteinizing hormone-releasing hormone (LH-RH) levels and the circulating ovarian steroids during the rat oestrous cycle. *Acta de Endocrinología* 85:449-455, 1977.
14. Denker, H.W: Blastocyst protease and implantation: Effect of ovariectomy and progesterone substitution in the rabbit. *Acta de Endocrinología* 70:591-602, 1972.
15. Keith, L.M: *Embriología clínica*. Nueva editorial interamericana S.A. de C.V. 2a. ed. 1979.
16. Collado, M.L., Recasens, M.E., Castro, G., Hicks, J.J: Nuevos conceptos relacionados con la implantación. I. Período de preimplantación. *Ginec. Obstet. Mex.* 44:63-70, 1978.
17. Hicks, J.J: Regulación endócrina de la implantación del cigoto de mamífero. *Trabajos de ingreso* 117.12:510-520, 1981.
18. Gil, M.E., Collado, M.L., Hicks, J.J: Nuevos conceptos relacionados con la implantación. II. Reacción decidual. *Ginec. Obstet. Mex.* 44:211-218, 1978.

19. Gil, M.E., Collado, M.L., Hicks, J.J: Nuevos conceptos relacionados con la implantación. III. Características bioquímicas. Ginec. Obstet. Mex. 44:491-507, 1978.
20. Patten, B: Foundation of embryology, Mc.Graw Hill, Tokio Jap. pp. 68-79, 1964.
21. Wimsatt, W.A: Some comparative aspects of implantation. Biol. Repr. 12:1, 1975.
22. Boving, B.G., Larsen, J.F: Implantation. en: Human reproduction, conception and contraception. Ed. Hafez and Evans. London pp. 133, 1973.
23. Enders, A.C: Anatomical aspects of implantation. J. of Reproduction and Fertility suppl. 25:1, 1976.
24. Enders, A.C: Fertilization, cleavage and implantation. en: Hafez (edit): Reproduction and breeding techniques for laboratory animals, Phil. USA p. 137-156, 1970.
25. Ibañez, M.A., Hicks, J.J: Composición lipídica del endometrio de rata en el quinto día de preñez. XVI Congreso mexicano de química pura y aplicada, 1981.
26. Runby, M.G: Organization in biological membranes. en: Companion to Biochemistry. Bull. A.T. Ed. Longman, London 2:161, 1979.
27. Nicolls, K.E: Endometrial vascular transport of protein during implantation in the rat. Anat. Rec. 184:488, 1976.

28. Bates, C.A., Mathies, D.L: Observations of vascular morphology in the region of implantation in the rat uterus. *Anat. Rec.* 184:354, 1976.
29. Nilsson, O: The morphology of blastocyst implantation. *J. of Reprod. Fert.* 39: 187, 1974.
30. Nilsson O: Attachment of rat and mouse blastocyst onto uterine epithelium. *Int. J. Fert.* 12:5, 1967.
31. Aitken, R.J: Delayed implantation in doe deer (*Capreolus capreolus*). *J. Reprod. Fert.* 39:225, 1974.
32. Enders A.C: Mechanisms of implantation of the blastocyst. Chap 32 en: *Biology of reproduction basic and clinical studies*. Ed. J. T. Velardo, B. A. Kaspro, Loyola University of Chicago, New Orleans, Louisiana USA, 1972.
33. Ljunokuist, I., Nilsson, O: Blastocyst-endometrial contact and pontamine blue reaction during normal implantation in the rat. *J. Endocr.* 60:149-151, 1974.
34. Wardo, O., Donovan, B: Implantation and induced decidulization of the uterus in the guinea pig as indicated by pontamine blue. *Biol. Reprod.* 5:220-273, 1971.
35. Nilsson, O., Lindquist, I., Ronquist, G: Blastocyst surface charge and implantation in the mouse. *Contraception* 11:441, 1975.
36. Schlafke, S., Enders A: Cellular basis of intesaction between trofoblast and uterus at implantation. *Biol. Reprod.* 12:41-65, 1975.

37. Hicks, J.J., Diaz-Zagoya, J.C: Bioquímica e Inmunología. cap.6 p.93-95. Ed.Piensa S.A. da C.V. y facultad de medicina UNAM, 1988.
38. Szego C.M: The lysosome as a mediator of hormone action. Prag. in Horm. Res. 30:171. 1974.
39. Stevens, B.J., André, J: Handbook of molecular cytology. (A. Lima de Faria, Ed). North-holland publ. Amsterdam. 1969.
40. Opheim, D.J., Touster, O: Lysosomal α -D-mannosidase of rat, purification and comparison with the golgi app. Cytosolic α -D-mannosidase. S.J. biol. chem. p.1017, 1023 USA, 1978.
41. Murray, A.K., Brown, B.I., Brown, D.H: The molecular heterogeneity of purified human liver lysosomal α -glucosidase (acid α -glucosidase). USA, 1977.
42. Porter, R., Fitzsimons, D.W. ed: Locomotion of tissue cells. Ciba Found. Symp. No.14. Churchill, London, 1973.
43. Fagg, B., Martin, L., Rogers, L., Clark, B., Valery, E: A simple method for removing the luminal epithelium of the mouse uterus for biochemical studies. J.Reprod. Fertil. 57:335-339. 1979.
44. Lowry, O.H., Rosenburgh, N.J., Farr, A.L., Randall, R.J: Protein measure with the folin-phenol reagent. J. Biol. Chem. 193:265, 1951.
45. Burton, K.J: A study on the conditions and mechanism for estimation of diphenylamine reaction for the colorimetric estimation of deoxyribonucleic acid. Biochemistry 62:315, 1956.

46. Giles, K.W., Meyers, A: An improved diphenylamine method for the estimation of deoxyribonucleic acid. Nature 206:93. 1965.

47. Perez-Cierra, R., Stander, V.M., Hicks, J.J: Practicas de Farmacología. UNAM p1-12, 1978.

48. Rosado, A., Mercado, E., Gallegos, A.J., Wens, M.A., Aznar, R: Subcellular distribution of lisosomal enzymes in the human endometrium. I. Normal menstrual cycle. Contraception. vol. 16, No. 3, 1977.

49. Guzman, M., Velazquez, A: Determinación de la actividad de la hormona deshidrogenasa láctica LDH en fracciones subcelulares de útero de rata. Laboratorio de biología de la reproducción IMSS. Trabajo sin publicar.