

Tesis de Posgrado

Regulación hormonal del epitelio uterino del conejo

Conti, Claudio Jorge

1983

Tesis presentada para obtener el grado de Doctor en Ciencias Biológicas de la Universidad de Buenos Aires

Este documento forma parte de la colección de tesis doctorales y de maestría de la Biblioteca Central Dr. Luis Federico Leloir, disponible en digital.bl.fcen.uba.ar. Su utilización debe ser acompañada por la cita bibliográfica con reconocimiento de la fuente.

This document is part of the doctoral theses collection of the Central Library Dr. Luis Federico Leloir, available in digital.bl.fcen.uba.ar. It should be used accompanied by the corresponding citation acknowledging the source.

Cita tipo APA:

Conti, Claudio Jorge. (1983). Regulación hormonal del epitelio uterino del conejo. Facultad de Ciencias Exactas y Naturales. Universidad de Buenos Aires.
http://digital.bl.fcen.uba.ar/Download/Tesis/Tesis_1760_Conti.pdf

Cita tipo Chicago:

Conti, Claudio Jorge. "Regulación hormonal del epitelio uterino del conejo". Tesis de Doctor. Facultad de Ciencias Exactas y Naturales. Universidad de Buenos Aires. 1983.
http://digital.bl.fcen.uba.ar/Download/Tesis/Tesis_1760_Conti.pdf

UNIVERSIDAD DE BUENOS AIRES
Facultad de Ciencias Exactas y Naturales

REGULACION HORMONAL DEL EPITELIO UTERINO DEL CONEJO

Claudio Jorge Conti

Director: Dr R.L.Cabrini

Departamento de Radiobiología

Comisión Nacional de Energía Atómica

Tesis presentada para optar al Título de Doctor en Ciencias Biológicas

- 1983 -

J760
Ej.2

A mis padres

A mi esposa

A mis hijos

Quiero expresar mi especial reconocimiento a la Dra Irma B. Gimenez de Conti quien me brindó su incondicional apoyo y colaboración desde el inicio de este trabajo.

Mi agradecimiento:

a mi Director de Tesis, Prof. Dr R.L.Cabrini quien con sus enseñanzas y constante apoyo posibilitó mi carrera como investigador básico.

Al Dr L.E. Gerschenson en cuyo laboratorio desarrollé las técnicas de este trabajo y con quien completé mi formación en el campo de la cinética celular.

al Dr J.M.Azcurra, mi Consejero de estudios, por todo el apoyo brindado durante la carrera del Doctorado.

a J. Murai, R. Liberman, G.O.Zerbe y D. Orlicky del Dto de Patología del Centro Médico de la Universidad de Colorado, USA, por toda su colaboración en la realización de este trabajo.

a la Dra B.Molinari de Rey y la Lda D.R.Tasat por la ayuda y estímulo que me brindaron para mi presentación al Doctorado en Ciencias Biológicas.

a la Sra Silvana Ragone de Braillard por su colaboración en la preparación de este manuscrito.

a mis compañeros y amigos del Dto de Radiobiología de la Comisión Nacional de Energía Atómica.

I N D I C E

INTRODUCCION.....	2
MATERIALES Y METODOS.....	7
Animales de Experimentación.....	7
Tratamiento hormonal.....	7
Determinación de proliferación "in vitro"	8
Estudio de cinética celular "in vivo".....	10
Estudios de migración celular.....	10
Estudios microespectrofotométricos e histométricos.....	11
Determinación de Uteroglobina (blastoquinina).....	11
Microscopía Electrónica.....	12
Inmunohistoquímica de la Membrana Basal.....	12
RESULTADOS.....	14
Estudios de proliferación "in vitro"	14
1.- Animales control.....	14
2.- Efecto de Estrógeno y Progesterona	14
3.- Estudio en animales ovariectomizados.....	19
4.- Tratamiento crónico con Estrogenos.....	19
5.- Estudio de la pseudopreñez y relación con Uteroglobina.....	24
Efecto hormonal sobre poblaciones celulares proliferan- tes y en reposo.....	24
Estudios histométricos en conejos tratados con Estrog.....	33
Acción de la 20-OH-P y otras hormonas ováricas.....	33
a.- Microscopía óptica y electrónica.....	33
b.- Interacción de 20-OH-P y otras hormonas ováricas	33
c.- Efecto de la suspensión del tratamiento con 20-OH-P.....	37
d.- Determinación de ADN en nucleos individuales.....	37
Estudio Inmunohistoquímico de la Membrana Basal.....	40
DISCUSION.....	46
RESULTADOS Y CONCLUSIONES	58
REFERENCIAS BIBLIOGRAFICAS.....	62

INTRODUCCION

Las hormonas ováricas ejercen un remarcable efecto trófico sobre el tracto genital en los mamíferos y es necesaria una continua exposición a las mismas para el óptimo crecimiento y función de estos tejidos.

Los mecanismos de acción de estas hormonas a nivel celular, así como los efectos que las mismas ejercen sobre la cinética de las distintas poblaciones celulares son poco conocidas debido a las dificultades que se generan en los estudios "in vivo". Entre estas dificultades es importante destacar la complejidad de los órganos "target" de las hormonas ováricas, la interacción entre las distintas hormonas y la posibilidad de múltiples interacciones entre órganos, tejidos y aún subpoblaciones celulares. Muchos de estos problemas han podido ser obviados parcialmente usando como modelos de estudio, células en cultivo. De esta forma se han estudiado los efectos de hormonas ováricas sobre cultivos celulares de glándula mamaria normal y neoplásica (1,2,3), de epitelio vaginal (4,5,6), de endometrio humano (7,8) y de endometrio de conejo (9, 10). Este último ha sido uno de los modelos clásicos, tanto "invivo" como "in vitro", mas usados en el estudio de la biología de la reproducción.

Desde hace muchos años, se conoce que, a diferencia de la mayor parte de los mamíferos, el conejo carece de ciclo estral, permaneciendo en un estado de estro continuo por largos períodos de tiempo, siempre que las condiciones ambientales y nutricionales sean adecuadas (11, 12). El estrógeno de acuerdo a estos estudios clásicos induciría la proliferación en el endometrio y mantendría el trofismo del organo, ejerciendo una acción preparatoria para la posterior acción de la progesterona. A esta segunda hormona se atribuye la formación del endometrio secretorio que se produce en la primera fase de la preñez o pseudopreñez. Esta propiedad de la progesterona de inducir el endometrio secretorio fue utilizada durante muchos años para el ensayo biológico de esta hormona (13). Esta transformación del endometrio de proliferativo a secretorio

ocurre como resultado de la ovulación, la que no se produce espontáneamente en esta especie, sino como consecuencia de mecanismos reflejos producidos en la copulación. En ausencia de ovulación existen en el ovario, folículos en todos los estados de desarrollo incluido numerosos folículos atrésicos (11,12,14,). Durante la formación del endometrio secretorio ocurren drásticos cambios en el epitelio uterino que incluyen una importante actividad proliferativa que lleva a la formación de glándulas o criptas características de este tipo de endometrio. Este proceso que se conoce como arborización del endometrio, se completa a los 4-5 días post-ovulación y está relacionado a los cambios que establecen las condiciones necesarias para la implantación del blastocisto (15-16). Está asociado además a la secreción de una proteína de peso molecular 16.000. Esta proteína primitivamente llamada blastoquinina por que se le atribuía un efecto sobre el crecimiento del blastocisto (17) fue posteriormente llamada Uteroglobina, nombre con la que actualmente se la conoce (18). Johnson (19) y Kirchner (20) usando un anticuerpo específico contra la uteroglobina, encontraron un patrón específico de fluorescencia en cortes de utero de conejas preñadas, aunque también observaron algún grado de reacción en conejos en estro. Una proteína de similares características bioquímicas e inmunológicamente indistinguible de la uteroglobina fue descrita en oviducto (21-22), y en tejidos no pertenecientes al aparato reproductivo como pulmones, intestino tiroides, etc.(23-24). La función de estas proteínas permanece aún oscura aunque han sido postuladas distintas funciones tales como inductores de la proliferación en endometrio, ligadoras de la progesterona y estimuladoras del crecimiento embrionario (10-18-25).

Además de estrógenos y progesterona, el ovario del conejo segrega $20\ \alpha$ -hydroxi-pregn-4 en-3 ona (20-OH-P). De acuerdo a los estudios de Hilliard y Eaton (26) estas hormonas serían secretadas por el ovario intersticial, el cual está muy desarrollado en el conejo. Rennie y Davies (27) consideraron a la 20-OH-P como metabolito de hormonas ováricas con debil acción progestacional. Sin embargo, recientemente, Connors y Col. no pudieron demostrar

ninguna acción progestacional de la 20-OH-P pero observaron que esta hormona era capaz de inducir un tipo celular característico en el epitelio luminal. Estas células, de mayor tamaño que el resto de las células luminales, entre las que se encuentran intercaladas, poseen un citoplasma claro y núcleos de gran tamaño con cromatina difusa y parecen estar relacionadas con células ciliadas descritas en el endometrio humano proliferativo o hipertrófico (28).

Un intento de describir, a nivel de cinética celular, los efectos de las hormonas ováricas sobre el endometrio del conejo, fue realizado por Lee y Dukelow (29). Estos autores estudiaron, mediante incorporación de timidina tritiada y determinación de índices de marcación y mitótico, los efectos de las hormonas ováricas sobre la proliferación celular. En esta forma describieron un aumento de proliferación inducida por estrógeno, aunque mucho menor que la inducida por la progesterona, no diferenciando entre los valores obtenidos para epitelios luminal y glandular. En el mismo trabajo también estudiaron la explosión proliferativa que ocurre después de la ovulación, sugiriendo que podría estar relacionada con la secreción de 20-OH-P

Si bien estos estudios "in vivo" han brindado la información básica de los efectos de las hormonas ováricas sobre el epitelio del endometrio, la íntima relación entre ellas y las distintas poblaciones celulares que componen dicho epitelio, se comenzó a vislumbrar a partir de los trabajos de Gerschenson y Colaboradores quienes desarrollaron un cultivo celular para estudiar dichos efectos "in vitro" (30). Este modelo consistía en el cultivo de células epiteliales, obtenidas mediante tratamiento de uteros evertidos con una solución enzimática compleja de hialuronidasa, tripsina y colagenasa. Las células eran sembradas en un medio químicamente definido, Ham F 12, adicionado con albúmina, insulina y tamponado con buffers orgánicos. Por medio de estudios autorradiográficos determinaron que los estrógenos naturales o sintéticos actuaban como factor de crecimiento en estos cultivos y su efecto era antagonizado por la progesterona. Esta última no provocó aumento

en los índices de proliferación como sugerían experiencias previas realizadas "in vivo", pero indujo la aparición de células multinucleadas (30). Estudios estereológicos ultraestructurales en estos cultivos confirmaron la existencia de células de tipo secretorio inducidas por el tratamiento con progesterona, lo cual sugiere que esta hormona produce la diferenciación de las células epiteliales hacia células de tipo secretor, mientras que el tratamiento con estrógeno mantiene el tipo proliferativo (31). Por otra parte tanto los estrógenos como la progesterona aumentan la incorporación de uridina y aminoácidos radiactivos en los cultivos y la estimulación proliferativa de los estrógenos no se modifica por la presencia de hidrocortisona o AMP-cíclico (32). Las hormonas ováricas no alteran las actividades de la fosfatasa ácida y alcalina, ni la incorporación de 3-O-metil-Dglucosa y ácido aminobutírico, indicando que los cambios proliferativos no parecen estar mediados por alteraciones en el transporte de membranas (32). Desde el punto de vista de la cinética celular, el mecanismo de acción de los estrógenos sobre la proliferación es fundamentalmente desbloquear células detenidas en G₀ permitiendo su entrada al ciclo celular (33).

Estos resultados se confirmaron mediante una técnica que permitió aislar de los cultivos, dos poblaciones celulares, proliferantes y no proliferantes ó G₀. El estrógeno inducía solamente aumento proliferativo en las células no proliferantes, mientras que estimulantes no específicos de la proliferación como la prostaglandina F₂ alfa, y el factor de crecimiento epidérmico (EGF), lo hacían sobre ambas poblaciones celulares (34). Este sistema permitió también investigar el efecto antagónico que la progesterona tiene sobre la proliferación inducida por estrógenos. Se observó que la progesterona antagonizaba al estrógeno solamente en presencia de células proliferantes. Estos hallazgos permitieron postular la existencia de un factor putativo de la progesterona que sería producido por la interacción de esta hormona con células proliferantes. Controles con otros tipos celulares y con otros esteroides emparentados con la progesterona demostraron la especificidad de este factor (10-34). Recientemente fue descrito en estos cul-

tivos, un segundo factor capaz de modular el efecto de los estrógenos (35). Este factor dependiente de la densidad de los cultivos y que parece estar relacionado con el factor putativo de la progesterona mostró ser sensible al calor y a la tripsina, no dializable y precipitable con sulfato de amonio, con un peso molecular en el rango de 10-20 Kd. Estas características indicarían que se trata de un polipéptido capaz de producir inhibición específica del efecto de estrógeno sobre la proliferación. Su mecanismo de acción es todavía desconocido.

Los estudios "in vitro" hasta ahora descriptos han abierto la posibilidad de formular una serie de hipótesis que requieren confirmación mediante estudios "in vivo". La finalidad del presente trabajo es llegar a conocer los mecanismos de la regulación hormonal del epitelio uterino del conejo a nivel de la proliferación y diferenciación celular y correlacionarlo con los hallazgos e hipótesis obtenidos "in vitro". Con este motivo se ha procurado probar la existencia en el epitelio uterino de subpoblaciones celulares con distinta respuesta a las hormonas ováricas, así como también se han estudiado otros parámetros de la cinética celular tales como la migración y pérdida celular, y se ha buscado definir el rol de la 20 (OH) P en estos tejidos y la capacidad de esta hormona de generar una población independiente no proliferativa de células ciliadas. Por último se ha intentado correlacionar cambios en la membrana basal con los procesos de migración y pérdida celular y con la organogénesis del endometrio secretorio. Con estos elementos se ha formulado un modelo capaz de explicar el funcionamiento en conjunto de la cinética del epitelio uterino del conejo con el objeto de interpretar los mecanismos íntimos de la acción hormonal y definir el rol de estas hormonas en la patogenia de la hiperplasias y neoplasias hormonodependientes.

MATERIALES Y METODOS

Animales de Experimentación

Se usaron conejos adultos hembra de aproximadamente 6 meses de edad y 3-4 Kg. de peso, manteniéndolos en cajas individuales y en habitaciones separadas de conejos machos para evitar la ovulación espontánea.

En algunos experimentos que así lo requerían, los animales se ovariectomizaron por incisión ventral, bajo anestesia con Nembutal, 8 semanas antes de comenzar los tratamientos programados, examinándolos en el momento del sacrificio para detectar la posible presencia de restos de tejido ovárico. En ninguno de los casos se detectaron evidencias de una ovariectomía incompleta.

Tratamiento hormonal

Las hormonas 17 β -estradiol, progesterona y 20 α -hidroxipregn -4 - en 3 ona (20-OH-P) se disolvieron en un pequeño volumen de etanol y se diluyeron en aceite de maíz. Se administraron intramuscularmente en una dosis de 2.5 mg/Kg/día la progesterona, 10 mg/Kg/día la 20-OH-P y 1 mg/Kg/día el 17 β - estradiol. Los animales se sacrificaron con una inyección intracardíaca de pentobarbital sódico a las 24 y 48 horas del comienzo del tratamiento hormonal.

La pseudopreñez fué inducida mediante una inyección intramuscular de 100 Unidades de Gonadotrofina Coriónica Humana (HCG, Sigma) El sacrificio de los animales se realizó como en el caso anterior a los 2, 4, 6 y 9 días post-inyección. El cuerno uterino izquierdo fue utilizado para el ensayo de uteroglobina y el derecho como control histológico y para estudios de proliferación.

Los estudios de estimulación crónica con Estrógenos se llevó a cabo mediante el uso de preparaciones hormonales farmaco-

lógicas de liberación lenta, poliestraduran fosfato (Estradurin, Ayerst), en una dosis de 2 mg/conejo.

Determinación de proliferación "in vitro"

Los conejos que habían recibido el tratamiento hormonal fueron sacrificados con una inyección intracardíaca de pentobarbital. Los cuernos uterinos fueron extraídos en forma ascéptica, lavados en solución salina fría y el tercio medio o distal del cuerno derecho fue cortado en secciones de 1-2 mm. de espesor. Cada sección de forma anular fue a su vez cortada en 6-8 partes en forma de arco (figura 1). Experimentos previos mostraron que no existen diferencias significativas de proliferación entre los cuernos derecho e izquierdo o entre los distintos tercios de cada cuerno. Las pequeñas piezas fueron incubadas a 37° C en medio de cultivo F 12 de Ham, modificado según Gerschenson, (30). Este medio de cultivo, libre de suero y de timidina fría (no radiactiva), se adicionó con 1 mg/ml de albúmina bovina (Sigma), e Insulina 10 M. Los estudios de proliferación se realizaron agregando al medio 2 μ Ci de (H-metil) timidina (actividad específica 62 Ci/mM, New England Nuclear) por ml. Las piezas se incubaron durante períodos de tiempo variable en un incubador de Dubnoff con un agitado vigoroso. Posteriormente las piezas fueron lavadas en solución salina, fijadas en formol neutro y procesadas con técnicas histológicas de rutina de inclusión en parafina. Cortes de 5 micrones se desparafinaron con xilol y se procesaron para autorradiografía con emulsión NTB-2 (Kodak). Las autorradiografías fueron teñidas con hematoxilina y eosina. Se incubaron por cada animal, un promedio de 18 piezas, obteniéndose, varios cortes histológicos de cada una. Se contaron más de 1.000 células por animal. Se consideraron marcadas aquellas células cuyos núcleos poseían mas de 5 granos. Los datos se expresaron como el porcentaje de células epiteliales con nuqueo marcado por el número total de células epiteliales.

El error del método, que se calculó como Desviación Standard x 100/media, fue de 3,1% para diez determinaciones del mismo corte y 5,8% para diez determinaciones de distintos cortes

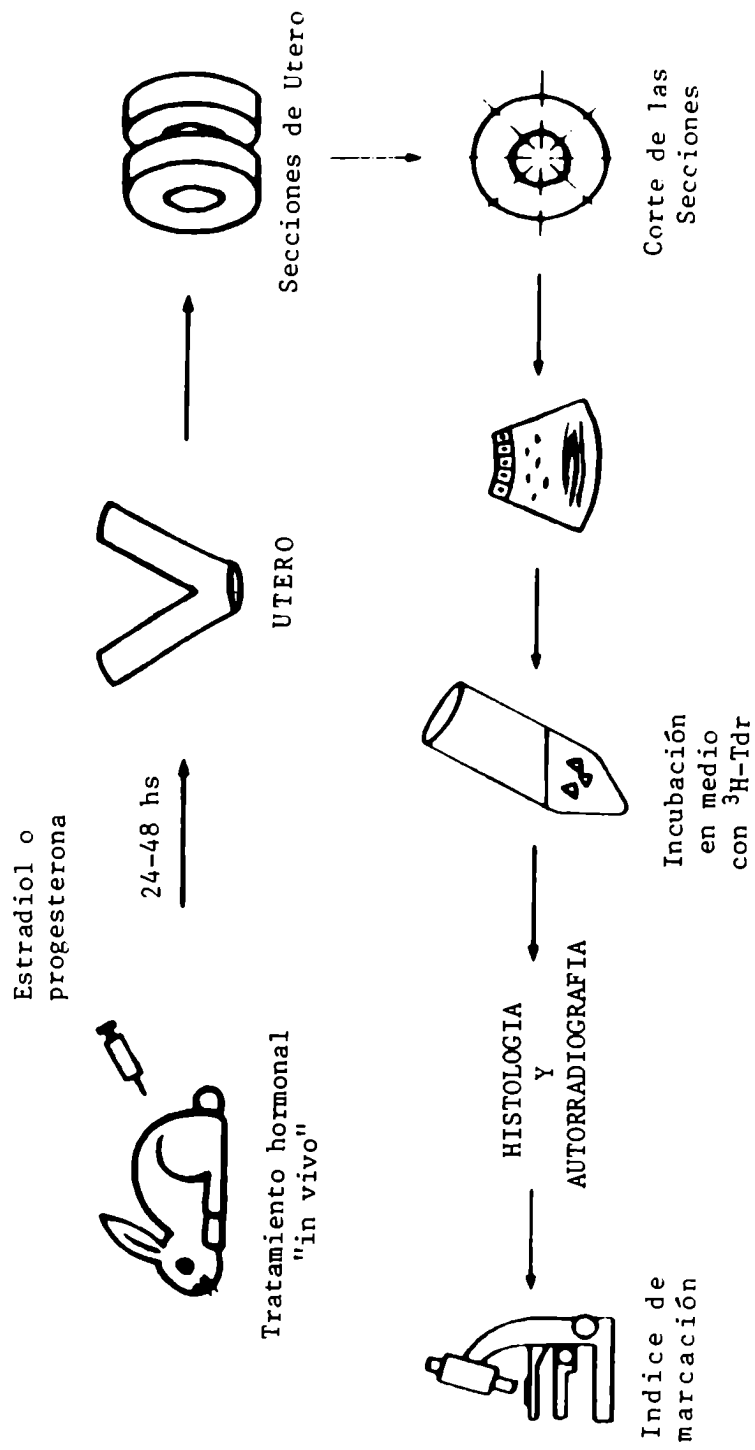


Fig. 1. Esquema de la técnica para la determinación de los índices de marcación "in vitro".

pero del mismo animal.

Estudios de cinética celular "in vivo"

Los conejos fueron inyectados subcutáneamente con 0,65 mCi de (³H-metil) timidina (actividad específica 62 Ci/mmol, New England Nuclear) cada 6 horas durante 3 días. Al tercer día algunos conejos fueron sacrificados. El resto recibió una dosis de 17 β estradiol, progesterona o vehículo. A las 24 horas (cuarto día) recibieron una segunda inyección e la misma hormona y al día siguiente (quinto día) fueron sacrificados. Los uteros fueron extraídos, fijados en formol neutro y procesados para autorradiografía como se describió en el punto anterior. Se determinó el porcentaje de células marcadas y el número de granos por núcleo en los epitelios luminal y glandular. Los cortes histológicos fueron obtenidos del tercio medio de ambos cuernos uterinos y se contaron más de 2.000 células epiteliales tomadas de un promedio de 8 cortes histológicos de diferentes piezas de cada animal. Se trató siempre de obtener igual número de piezas de la región mesometrial y antimesometrial. Los datos se expresaron como el porcentaje de células epiteliales con núcleos marcados (más de 5 granos) por el número total de células epiteliales. El error del método calculado como en el punto anterior fue para diez determinaciones del mismo corte 2,7% y para determinaciones de 10 cortes de diferentes piezas del mismo animal 4,2%

Estudios de migración celular

Una dosis única de 1 mCi de (³H-metil) timidina (actividad específica) 62 Ci/mmol, New England Nuclear) en un volumen de 1 ml se administró a tiempo cero. Tres horas después algunos conejos fueron sacrificados y al mismo tiempo al resto de los animales recibieron una dosis de 17 β estradiol o vehículo (aceite de maíz). Este segundo grupo de animales fue sacrificado a las 24 y 48 horas. En todos los casos los úteros fueron extraídos y proce

sados para autorradiografía como fue descrito anteriormente, Finalmente, se determinó el porcentaje de células marcadas en el epitelio luminal y en los tercios superior, medio e inferior de las glándulas cortadas longitudinalmente.

Estudios microespectrofotométricos e histométricos

Para la determinación del ADN mediante métodos microespectrofotométricos, se realizó la tinción de gallocianina cromóalumbre según Sandritter (36). Los cortes histológicos se desparafinaron y se trataron con ARNasa (Sigma) 0,1 mg/ml a 37°C durante 4 horas; luego se lavaron y colorearon en la solución de gallocianina a pH 1,8 durante 48 horas. Después de lavados y deshidratados los cortes se montaron en Permount. Las mediciones del ADN se llevaron a cabo en un microfotómetro 03 Zeiss empleando el método de "multiple plug" (37). Linfocitos del mismo tejido se usaron como indicadores de la cantidad diploide de ADN e hígado como marcador de los valores diploide y tetraploide.

La determinación de la circunferencia interna del lumen uterino, se llevó a cabo con un curvímetro (Minerva, Suiza) sobre la imagen del tejido proyectado en una pantalla de televisión, usando una cámara montada sobre un microscopio óptico. El número de células luminales por unidad de longitud, el número de glándulas por corte y el número de células en la circunferencia de la glándula cortada transversalmente fueron determinadas usando un microscopio óptico con un ocular graduado.

Determinación de Uteroglobina (blastoquinina)

Después del tratamiento con HCG (inductora de ovulación) los conejos fueron sacrificados a distintos tiempos y el cuerno uterino izquierdo desecado y ligado en ambos extremos. La luz uterina fue varias veces lavada con solución fisiológica y el líquido de lavado recuperado se centrifugó para librarlo de células y

detritus tisulares. Posteriormente el líquido de lavado se concentró por liofilización y la uteroglobina se determinó por inmunoelectroforesis (38) empleando un anticuerpo antiuteroglobina desarrollado en el laboratorio del Dr. Gerschenson en la Universidad de Colorado (9).

Microscopia Electronica

Los tejidos se fijaron en glutaraldehído al 2,5% en 0,14 M buffer fosfato, pH 7,2 durante 2 horas a 4°C. Posteriormente se lavaron en el mismo buffer y se postfijaron en tetróxido de Osmio al 1% en el mismo buffer. El material se deshidrató en etanol y se incluyó en Epon (39) utilizándose como intermediario el óxido de propileno. Los cortes de aproximadamente 60 nm. se realizaron con un micrótomo Sorvall MT 2 y se tiñeron con acetato de uranilo y solución de plomo de Reynolds. La observación se llevó a cabo en un microscopio Philips EM 200.

Inmunohistoquímica de la Membrana Basal

Para estudiar las modificaciones de la membrana basal en el útero sometido a distintas condiciones hormonales, se preparó un anticuerpo antimembrana basal en oveja. El antígeno utilizado fue la cápsula del cristalino del conejo, la que fue obtenida por disección en ojos de conejos recién sacrificados. Las cápsulas fueron lavadas en solución fisiológica y homogenizadas a 20.000 rpm. en un homogenizador Virtis, sonicadas en un baño de hielo durante 5 minutos y centrifugadas a 10.000 xg a 4°C durante 30 minutos. El proceso se repitió 3 veces y el pellet con el material insoluble fue lavado varias veces en solución fisiológica. El antígeno así obtenido suspendido en Adyuvante completo de Freund se inyectó a un ovino. Inyecciones de refuerzo fueron posteriormente administradas con Adyuvante de Freund incompleto.

El antisuero obtenido fue ensayado en cortes por conge-

lación. El material fresco fue congelado inmediatamente en nieve carbónica hasta el momento del corte, el cual se realizó en un criotato a -18°C . Los cortes se fijaron en acetona a 0°C durante 10 minutos y se lavaron en solución salina tamponada con tris pH 7,4 durante 10 minutos. Los cortes fueron coloreados con la técnica de la Inmunoperoxidasa descrita por Nakane (40) que consiste en exponer los preparados al suero antimembrana basal en una dilución 1: 200 a 1:400 durante 15 minutos. Después de lavarse cuidadosamente en solución salina-Tris para extraer el exceso de este suero, se exponen al segundo anticuerpo, anti Inmunoglobulina G de oveja preparado en conejo y conjugado con peroxidasa (Cappel) durante 10 minutos. Los preparados son lavados repetidamente y la peroxidasa es revelada con Diaminobencidina (41).

La característica de extrema insolubilidad del antígeno imposibilitó los ensayos inmunoquímicos del suero antimembrana basal, por lo que el análisis del mismo se llevó a cabo en cortes por congelación de riñón que tiene una membrana basal característica que permite el estudio del título y especificidad del suero.

R E S U L T A D O S

ESTUDIOS DE PROLIFERACION "IN VITRO"

1.- Animales Control. En la figura 2 y 3 se observan microfotografías de autorradiografías de fragmentos de utero incubados en medio de cultivo con timidina tritiada. Los fragmentos de utero de conejo control (intactos) incubados con timidina tritiada ($^3\text{H-Tdr}$) durante periodos de tiempo variable mostraron una relación lineal entre los índices de marcación y los tiempos de incubación, con una pendiente mayor del epitelio glandular con respecto a la del luminal (figura 4). Estos valores fueron sujetos a un análisis de la curva tiempo respuesta como la discutida por Grizzle and Allen (41). Se estimó la recta de regresión para cada tipo de epitelio. Las rectas de regresión media estimada responde a las funciones: $I.M. = 0,75 + 0,14t$ y para el epitelio glandular y $I.M. = 2,27 + 0,4t$ para el epitelio glandular, siendo I.M.: indica de marcación y t: tiempo de incubación. De acuerdo a estos datos la pendiente de la recta, que representa el flujo celular a travez del ciclo celular y por lo tanto un indicador válido de proliferación, es significativamente mayor que en el epitelio glandular ($p < 0,01$). Sin embargo, para ambos tipos de epitelio la pendiente es significativamente mayor que cero ($p < 0,01$). Las dos curvas difieren también en su ordenada al origen (estimador del periodo S) con un $p < 0,05$. Por otra parte todos los valores del epitelio glandular son significativamente mas altos que los del epitelio luminal.

2.- Efecto de Estrogeno y progesterona. Cuando se estudió la marcación "in vitro" de animales que habian sido inyectados 24 horas antes con 17β -estradiol se encontró que el índice de marcación de las células glandulares se incrementó significativamente, pero no se apreciaron cambios detectables en el epitelio luminal (Figuras 5 y 6). Contrariamente los animales tratados con Progesterona por 24 horas, mostraron un visible incremento en el índice de marcación que fue estadísticamente significativo para el epitelio luminal pero no para el glandular mientras que los animales tratados con pro

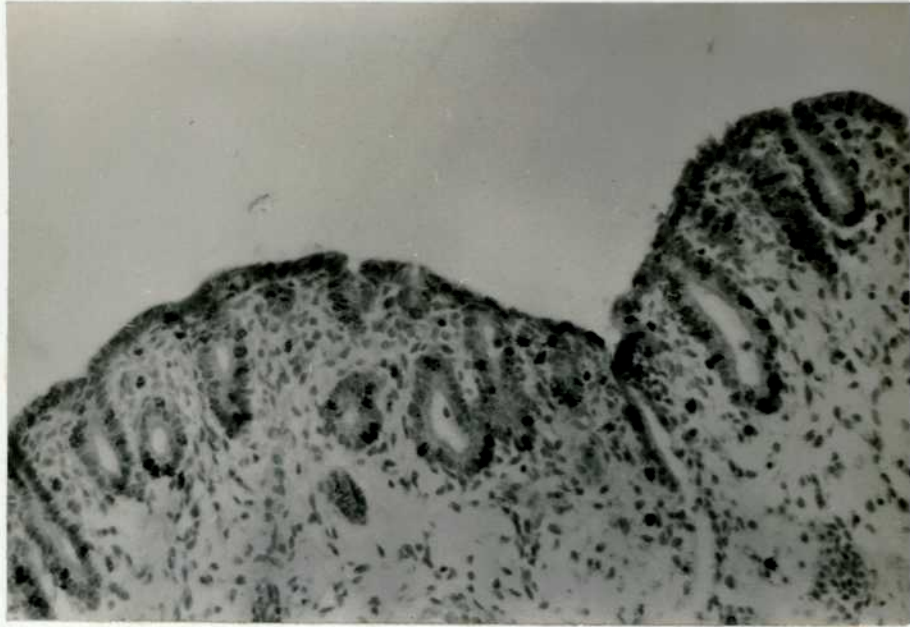


Fig. 2. Microfotografía de una autorradiografía de un fragmento de útero incubado en medio con ^3H -Tdr. X 200.

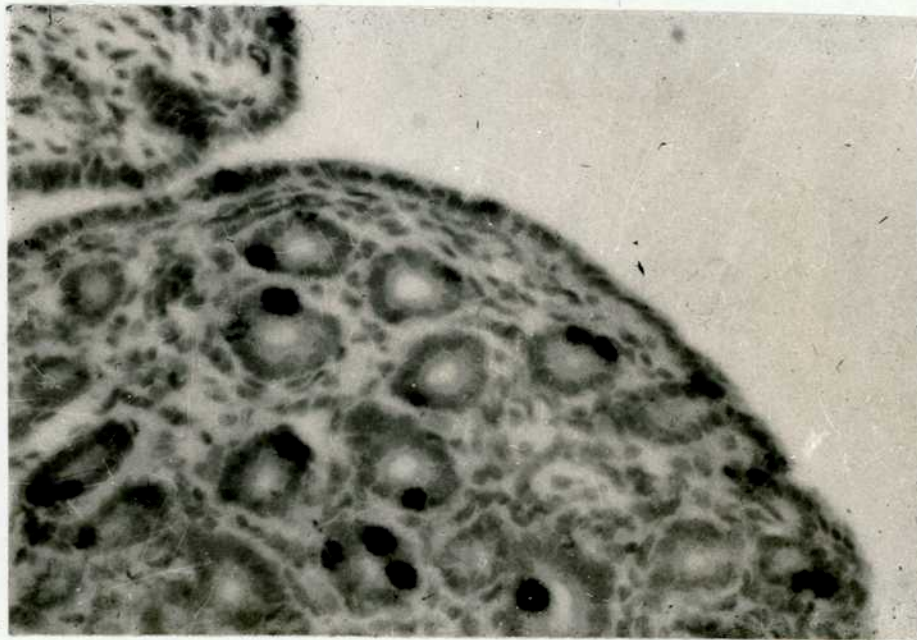
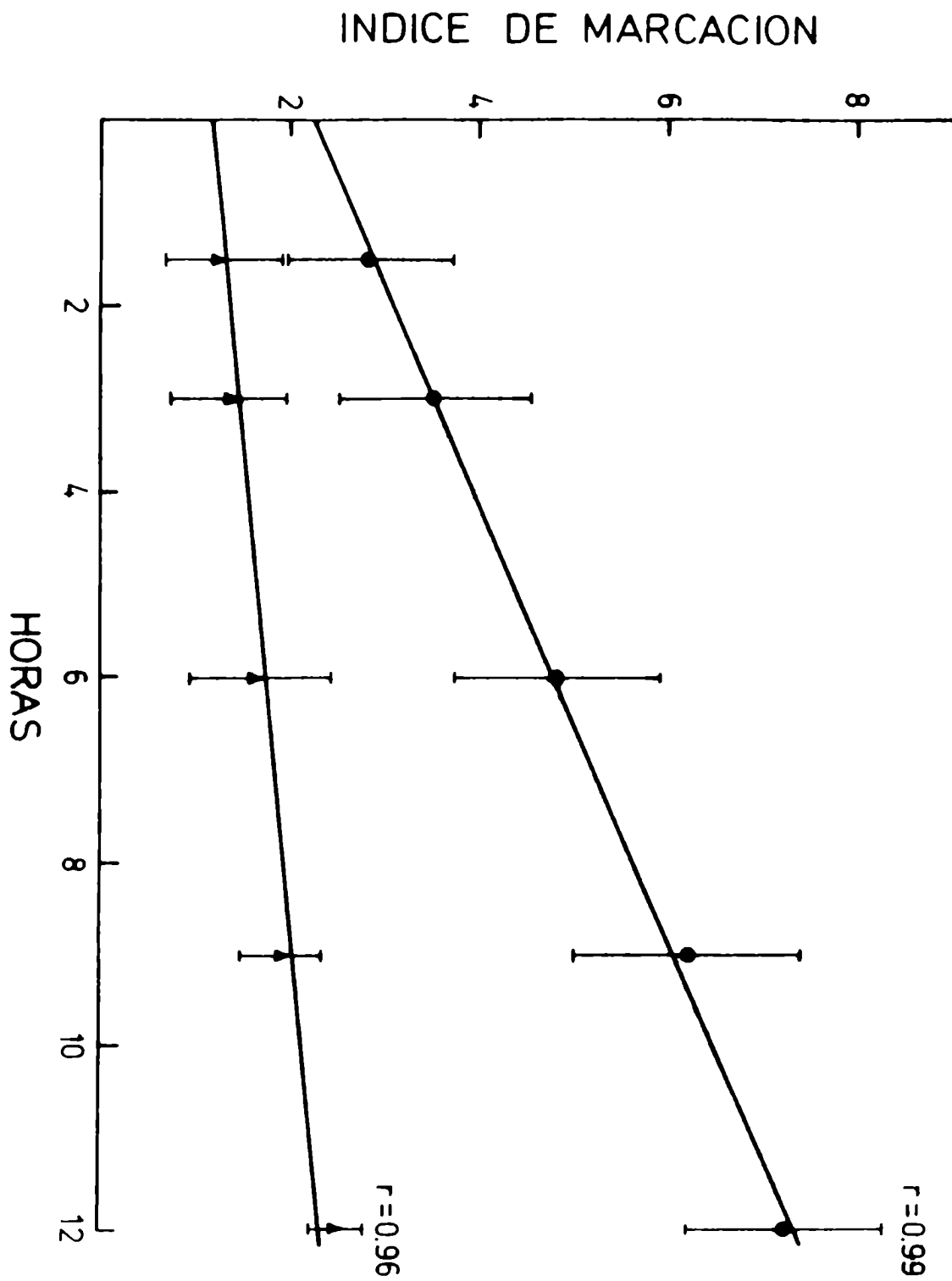


Fig 3. Detalle a mayor aumento de cortes transversales de glándulas con células marcadas. X 700.



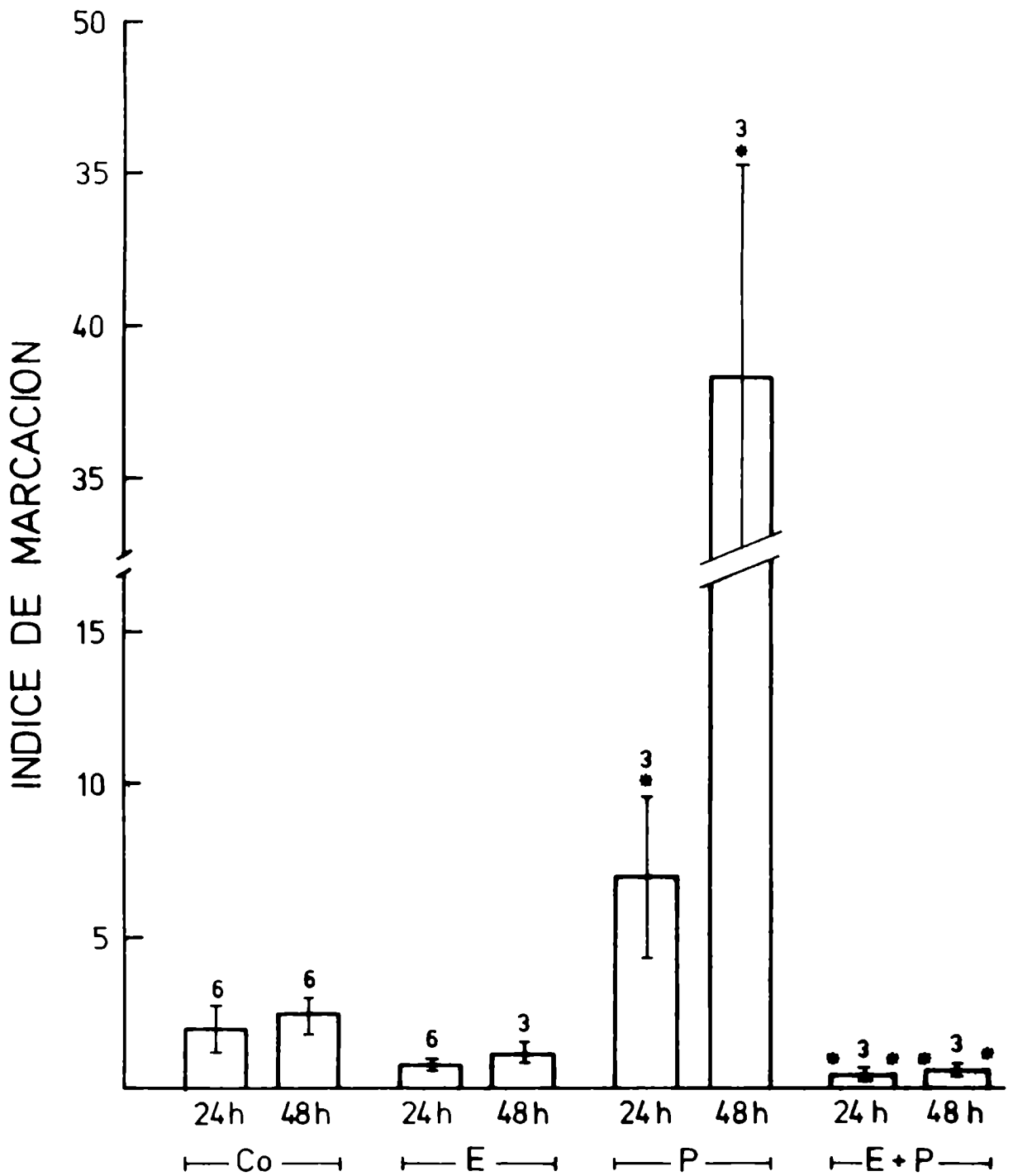


Fig. 5. Índice de marcación del epitelio luminal en conejos intactos: Control (Co) y tratados con 17β -estradiol, progesterona (P) o ambas hormonas simultáneamente (E + P) durante 24 ó 48 horas.

En todos los casos se incubaron los especímenes durante 3 horas. Los datos son expresados como $\bar{X} \pm \sigma$ y el número de animales está indicado sobre las barras. Significación estadística: * $p < 0.05$; ** $p < 0.01$.

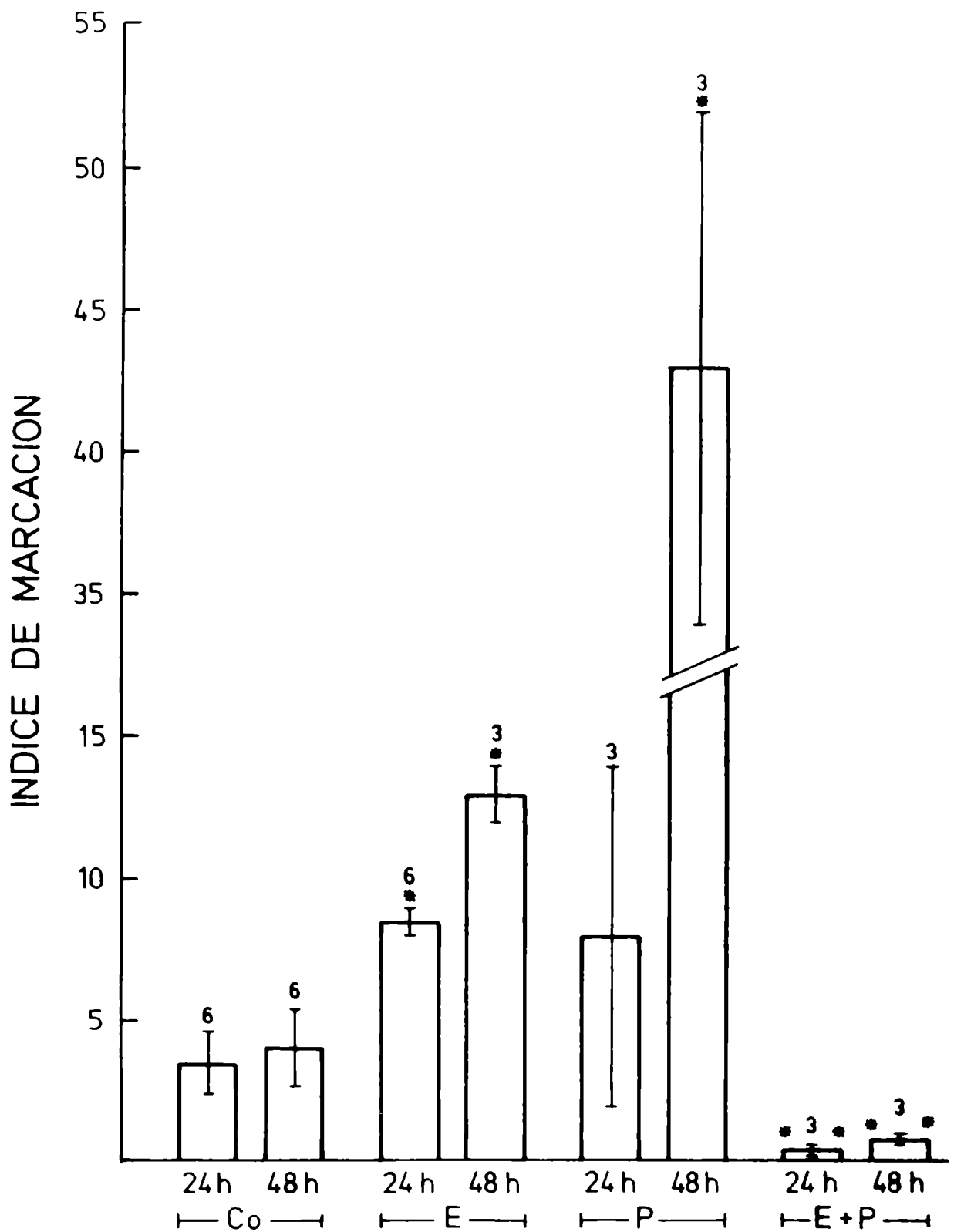


Fig. 6. Índice de marcación de epitelio glandular en conejos intactos: Control (Co) y tratados con 17β -estradiol (E), progesterona (P) o ambas hormonas simultáneamente (E + P) durante 24 ó 48 horas.

En todos los casos se incubaron los especímenes durante 3 horas. Los datos son expresados como $\bar{X} \pm o$ y el número de animales está indicado sobre las barras. Significación estadística: * $p < 0.05$; ** $p < 0.01$.

gesterona por 48 hrs presentaron un marcado incremento de los índices para ambos epitelios.

La administración simultánea de estradiol y progesterona produjo un efecto mutuamente antagónico para ambas hormonas en los dos tipos de epitelio.

En los úteros de conejos tratados con progesterona durante 24 horas se observaron áreas en el epitelio luminal con un alto índice de marcación y brotes glandulares (figura 7). Secciones seriadas de estas áreas determinaron que no se tratan de artificios de técnica debidos al plano de corte. Además este tipo de estructura no fue observado en los conejos inyectados con aceite (vehículo) o estrógeno, sino solamente en aquellos tratados con progesterona. Un esquema de las distintas estructuras encontradas con su índice de marcación se presenta en la figura 8.

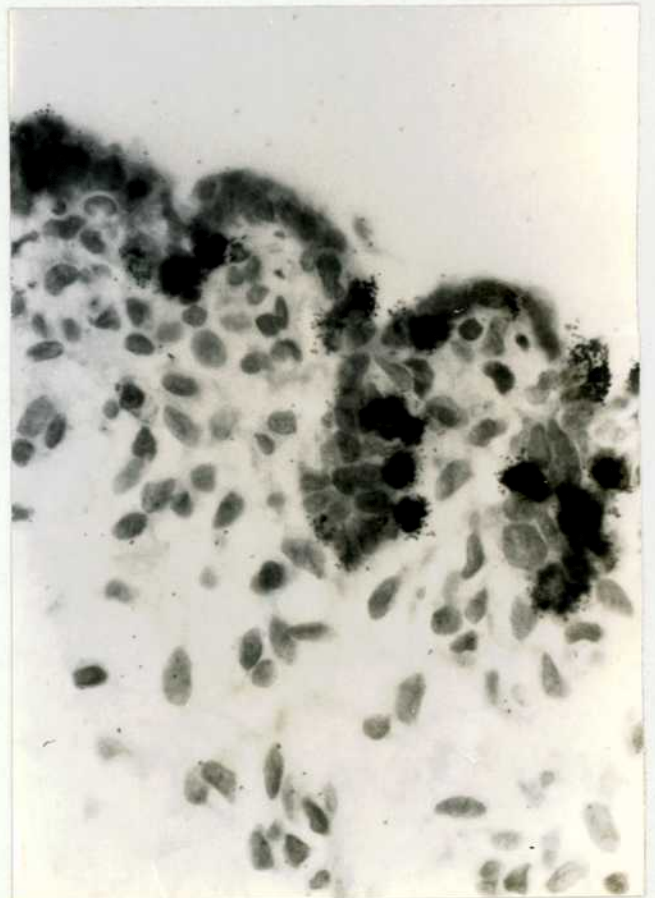
3. - Estudios animales ovariectomizados. El análisis de los índices de marcación en animales ovariectomizados mostró porcentajes muy bajos de células marcadas en ambos epitelios, desapareciendo las diferencias proliferativas que se observan en los epitelios luminales y glandulares de los conejos control (Tabla I). El tratamiento con estrógenos aumentó el índice de marcación del epitelio glandular pero no el del epitelio luminal. La progesterona por su parte indujo un marcado efecto proliferativo en ambos epitelios y el tratamiento combinado de ambas hormonas produjo una mutua inhibición del efecto de ambas hormonas.

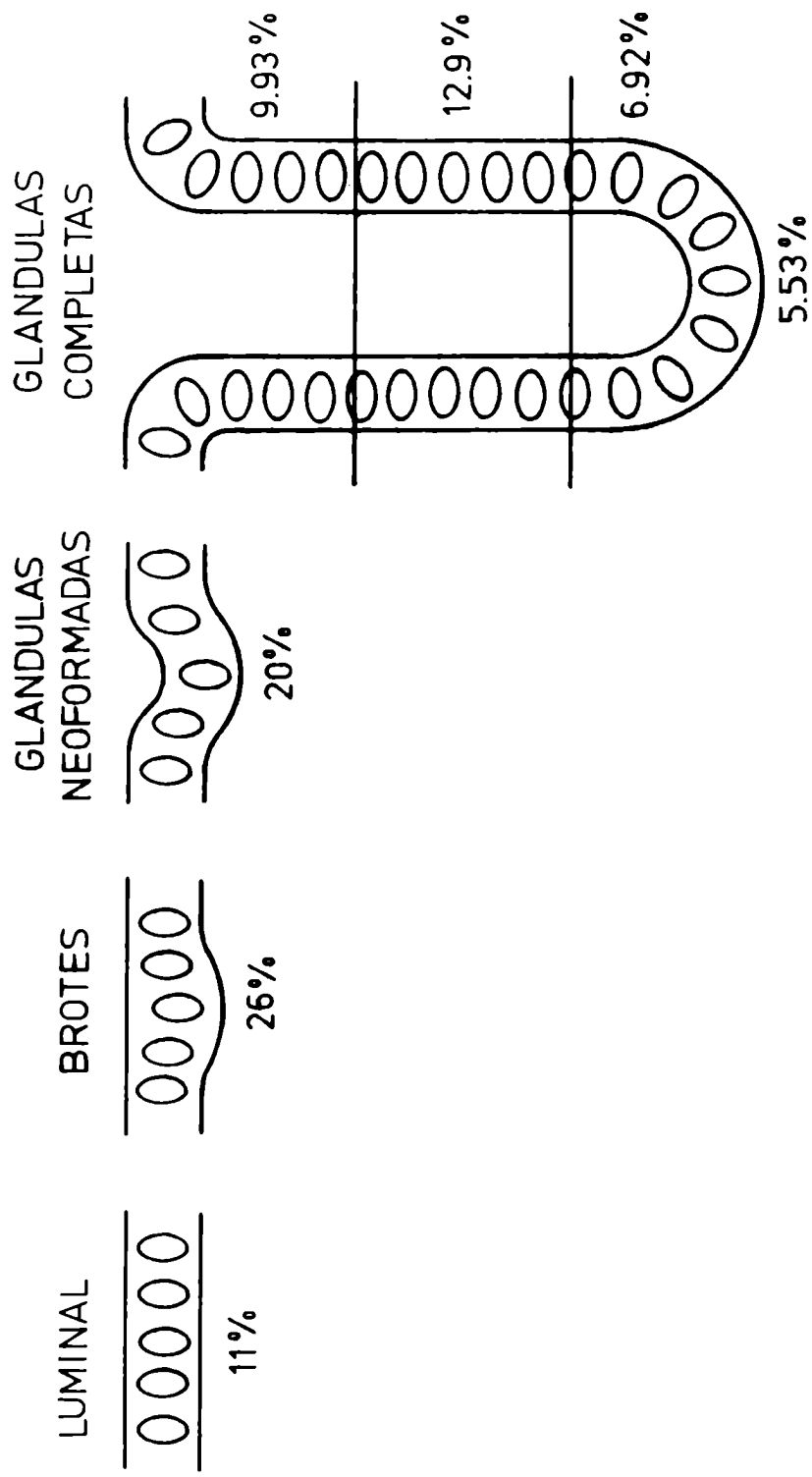
4. - Tratamiento crónico con estrógenos. También se estudió con este sistema los efectos que sobre los epitelios glandular y luminal del endometrio tiene la administración crónica de estrógenos (poliestradiol forfato) durante 14 y 28 días. Como se puede observar en la Tabla II, a diferencia de lo que ocurre con el 17β -estradiol en los tratamientos a corto plazo, los estrógenos administrados en forma crónica no producen aumento en los índices de marcación del epitelio glandular. El epitelio luminal tampoco fue afectado por este tratamiento.



Fig 7a. Utero de conejo trata-
do con progesterona por 24
horas. Intensa marcación
del lumen y glándulas.
x 1400.

Fig. 7b. Areas focales de
proliferación y brotes
epiteliales. X 1400





_ Fig. 8. Esquema teórico de la formación de glándulas, de acuerdo a las estructuras obser--
vadas microscópicamente. Los porcentajes señalan el índice de marcación.

TABLA I

TRATAMIENTO HORMONAL	GLANDULA	LUMEN
NINGUNO (n = 4)	0.51 ± 0.88	0.97 ± 0.95
17β-ESTRADIOL (n = 4)	2.80 ± 3.20	0.77 ± 0.89
PROGESTERONA (n = 2)	35.95 (31.8-43.1)	37.49 (31.8-43.1)
ESTROGENO + PROGESTERONA (n = 1)	0.15	0.07

Efecto de las hormonas ováricas sobre el índice de marcación en animales ovariectomizados 60 días antes del tratamiento.

TABLA II

TRATAMIENTO HORMONAL	GLANDULA	LUMEN
NINGUNO (Sol. Salina una vez en 14 días)	A 3.01 ± 0.33	E 0.74 ± 0.08
NINGUNO (Sol. Salina dos veces en 28 días)	B 3.24 ± 0.36	F 0.90 ± 0.10
POLIESTRADIOL FOSFATO (una vez en 14 días)	C 2.93 ± 0.11	G 0.87 ± 0.12
POLIESTRADIOL FOSFATO (dos veces en 28 días)	D 2.97 ± 0.15	H 0.77 ± 0.08

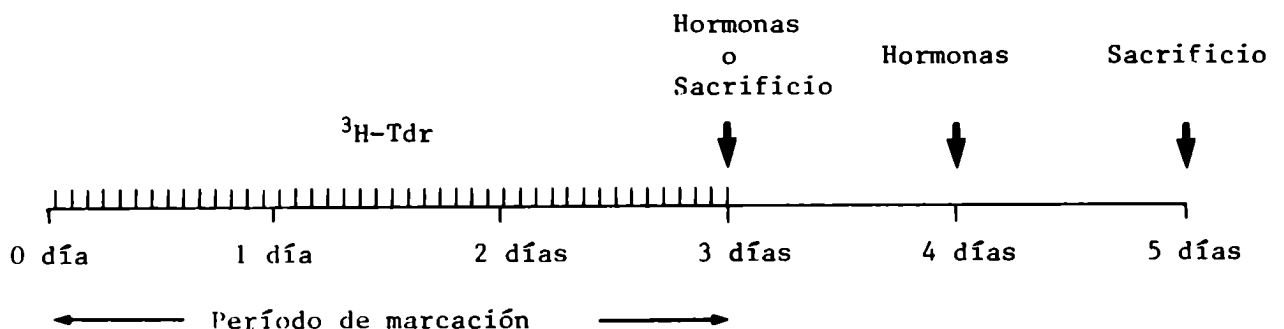
Indices de marcación del epitelio uterino despues de la administración de Estrógeno durante 14 y 28 días.

Los datos son expresados como $\bar{X} \pm \sigma$, n = 5 conejos. Las únicas comparaciones estadísticamente significativas son: A vs E, B vs F, C vs G, D vs H = p < 0.001.

5. - Estudio en la pseudopreñez y relación con uteroglobina. Se estudió la proliferación celular a los 2,4, 6 y 9 días de pseudopreñez inducida por la inyección de gonadotropina coriónica humana. En los mismos conejos el cuerno izquierdo fue ligado y la concentración de uteroglobina en el fluido uterino fue determinado por métodos inmunoquímicos. Los resultados demostraron un considerable incremento proliferativo en ambos epitelios al segundo día de la inyección de gonadotropina, que declina marcadamente al cuarto día, encontrándose muy pocas células marcadas al sexto y noveno día (Figura 9). Contrariamente la producción de uteroglobina es baja al segundo día y se incrementa sensiblemente en los días cuarto y sexto, decreciendo al día noveno. Se corroboró mediante un estudio histológico, la inducción del endometrio secretorio en los uteros utilizados en este experimento. (Figura 10 y 11).

EFEECTO HORMONAL SOBRE LAS POBLACIONES CELULARES PROLIFERANTES Y EN REPOSO

En este experimento se administró a las conejas timidina tritiada cada 6 horas durante 3 días con el objeto de marcar todas o al menos la mayor parte de las células en proliferación. Cuando se suspendió la administración de timidina tritiada, las hormonas ováricas fueron administradas durante dos días. Un esquema de este experimento es mostrado seguidamente:



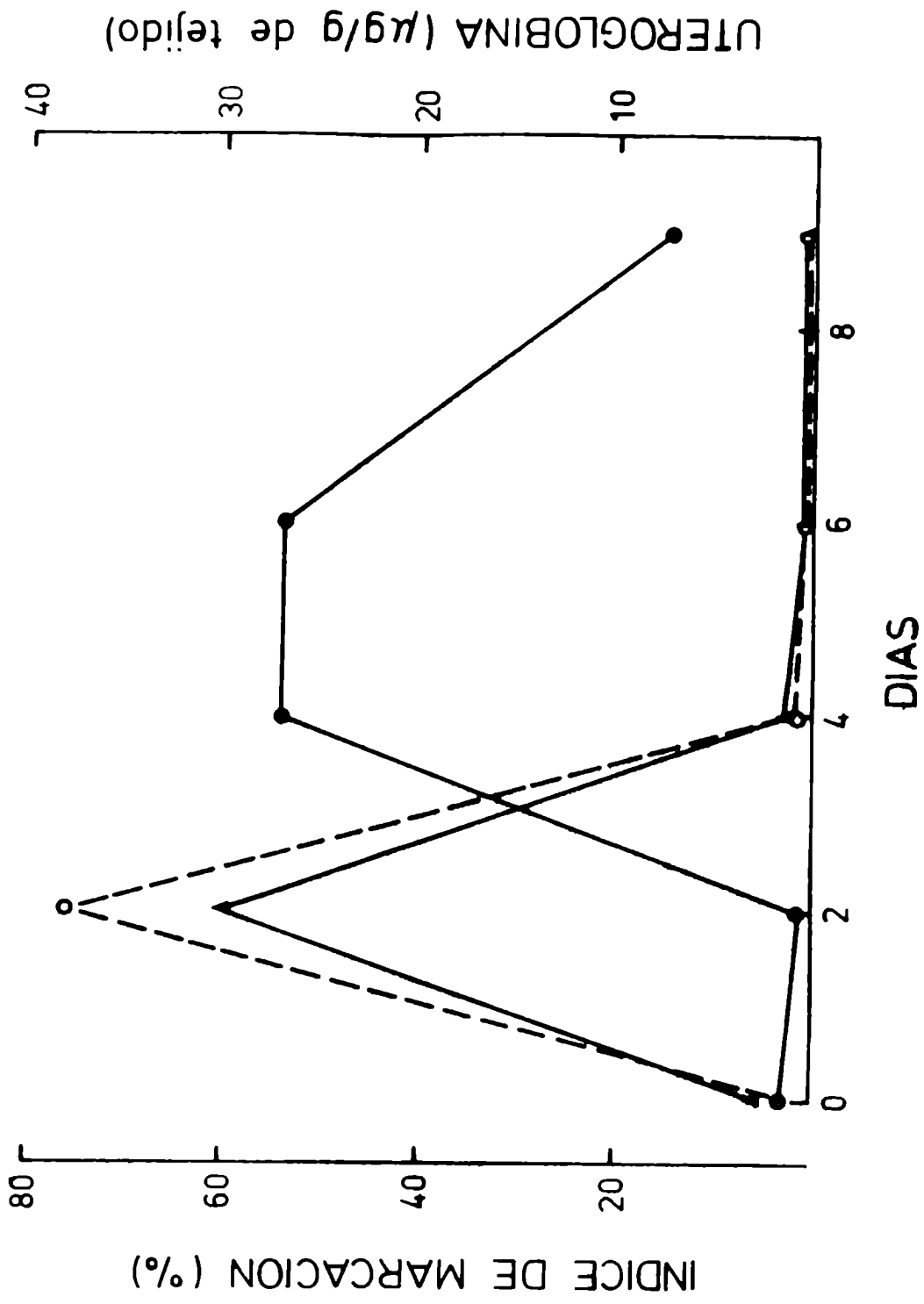


Fig 9. Relación temporal entre la proliferación y la producción de Uteroglobina.

Todos los puntos representan $\bar{X} \pm \sigma$, n = 3 conejos. Índices de proliferación en células luminales (▼) y glandulares (●); uteroglobina (○).

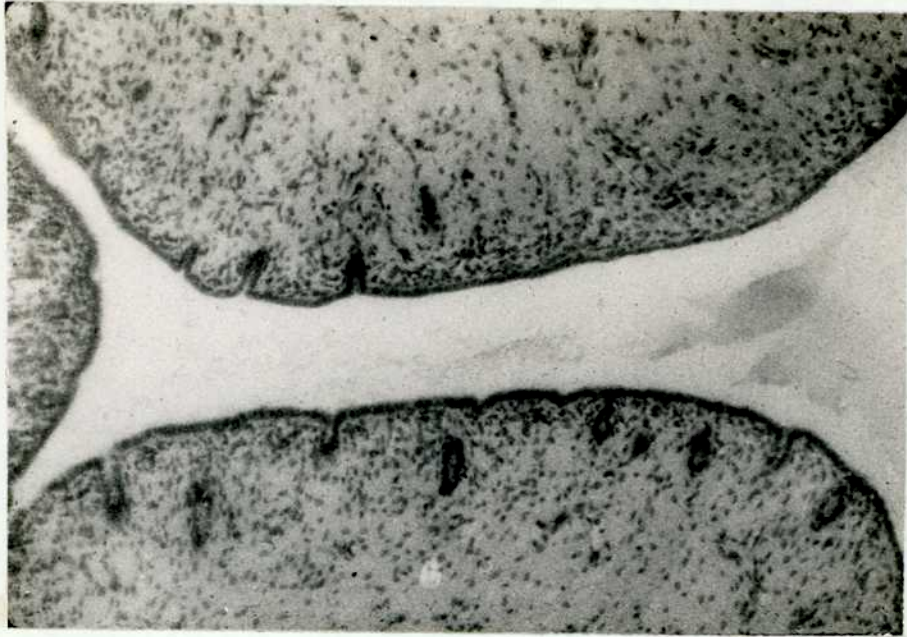


Fig. 10. Endometrio proliferativo. X 200

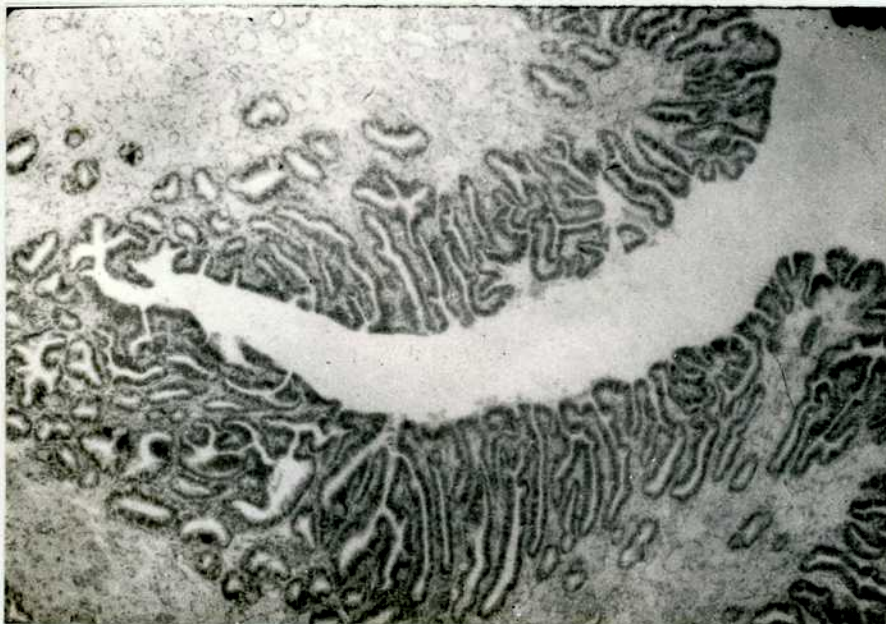


Fig. 11. Endometrio secretorio. X 200.

La administración de 17β -Estradiol resultó en una disminución significativa del índice de marcación del epitelio glandular pero no del epitelio luminal (Tabla III). La administración de progesterona indujo un incremento estadísticamente significativo en el epitelio glandular y luminal. Los animales controles inyectados solamente con el vehículo, mostraron un incremento significativo en el epitelio glandular para no en el luminal, comparados con los animales controles sacrificados al final del tratamiento con $^3\text{HTdr}$.

En el mismo experimento se analizaron el número de granos de plata por cada núcleo de las células epiteliales, con el propósito de estimar el número de veces que las células se dividieron después de la administración de $^3\text{HTdr}$ y como esto es afectado por el tratamiento hormonal. La figura 12 y 13 muestra que el número promedio de granos por núcleo decrece a la mitad en dos días, en ambos epitelios, glandular y luminal. En las mismas figuras se muestra que en los conejos tratados con estradiol no hubo disminución en el número de granos por núcleo en las células glandulares, mientras que en el epitelio luminal hubo un incremento de granos comparados con el control. El tratamiento con progesterona indujo una marcada disminución en el número de granos por núcleo en ambos epitelios.

EXPERIMENTOS DE MIGRACION CELULAR

Para el estudio de migración celular se dió un pulso único de $^3\text{HTdr}$ y dos inyecciones de 17β estradiol o vehículo (0 y 24 hs.), sacrificándose los animales a los 3, 24 y 48 hs. según el siguiente esquema:

TABLA III

CONDICIONES EXPERIMENTALES	Indice de marcacion en cel. epitel. ($\bar{X} \pm \sigma$, n = 5 conejos)	
	<u>GLANDULA</u>	<u>LUMEN</u>
CONTROL 3 ($^3\text{H-Tdr}$ durante 3 días)	A 48.9 \pm 1.7	E 19.4 \pm 1.9
CONTROL 5 ($^3\text{H-Tdr}$ durante 3 días y vehículo durante 2 días)	B 65.2 \pm 2.1	F 19.0 \pm 1.0
ESTRADIOL ($^3\text{H-Tdr}$ durante 3 días y estradiol durante 2 días)	C 50.3 \pm 2.1	G 16.1 \pm 0.5
PROGESTERONA ($^3\text{H-Tdr}$ durante 3 días y progesterona durante 2 días)	D 92.7 \pm 2.5	H 81.5 \pm 3.5

Porcentaje de células epiteliales uterinas con núcleos marcados después de la Administración de $^3\text{H-Tdr}$ durante 3 días, seguido por la administración de las hormonas.

Significación estadística: A vs B, B vs C, B vs D, C vs D, F vs H, G vs H, A vs E, B vs F y C vs G = $p < 0.001$. Otras comparaciones no fueron estadísticamente significativas.

EPITELIO GLANDULAR

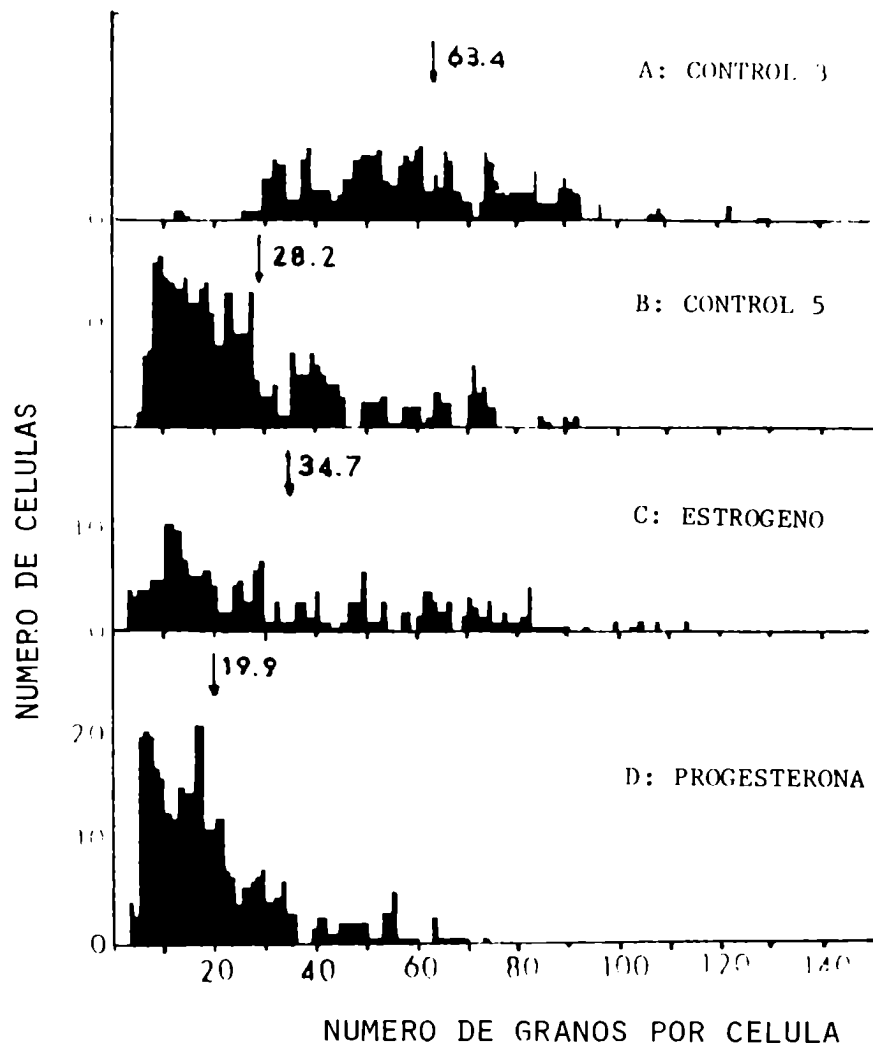


Fig. 12. Número de granos de plata por núcleo de epitelio glandular.

El diseño experimental es el mismo que para la Tabla III, pero en este caso el número de granos de plata por célula marcada fue registrado. A = Control 3 ($^3\text{H-Tdr}$ por 3 días); B = Control 5 ($^3\text{H-Tdr}$ por 3 días y luego 2 días de administración del vehículo); C = estradiol ($^3\text{H-Tdr}$ por 3 días y luego estradiol durante 2 días) y D = Progesterona ($^3\text{H-Tdr}$ por 3 días y luego progesterona durante 2 días). El número con la flecha indica el valor medio.

EPITELIO LUMINAL

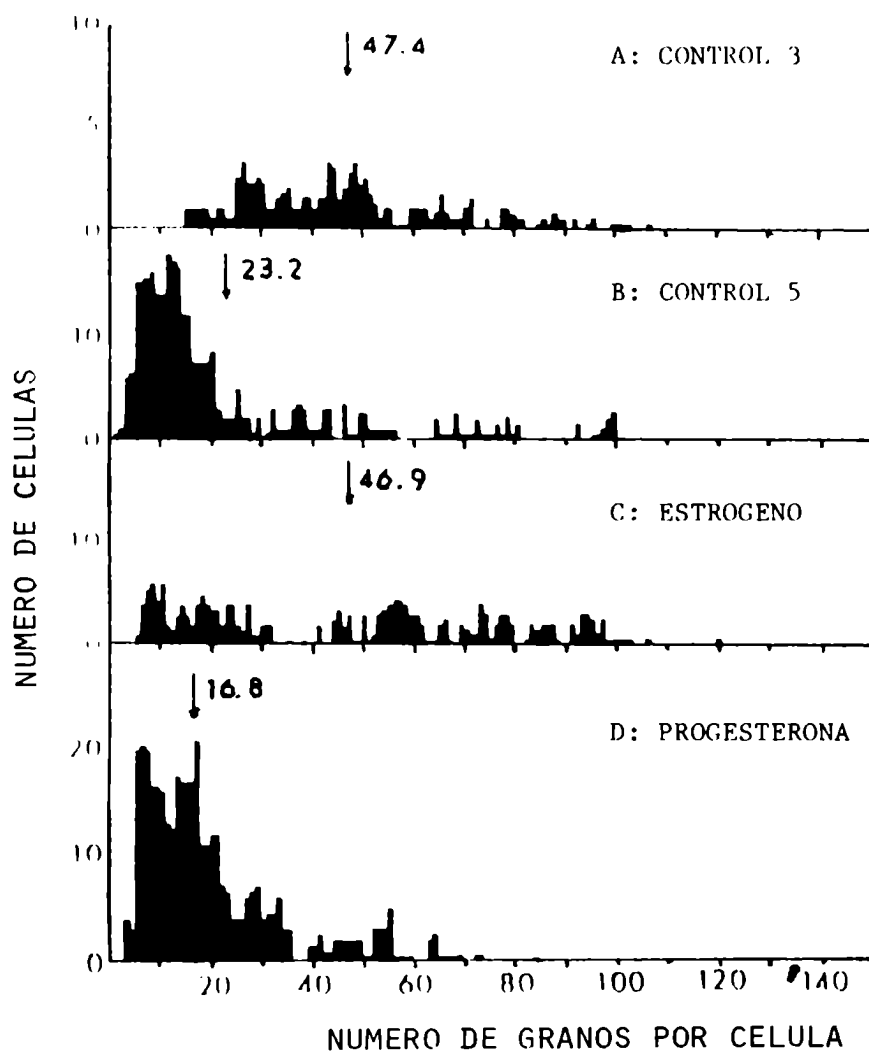
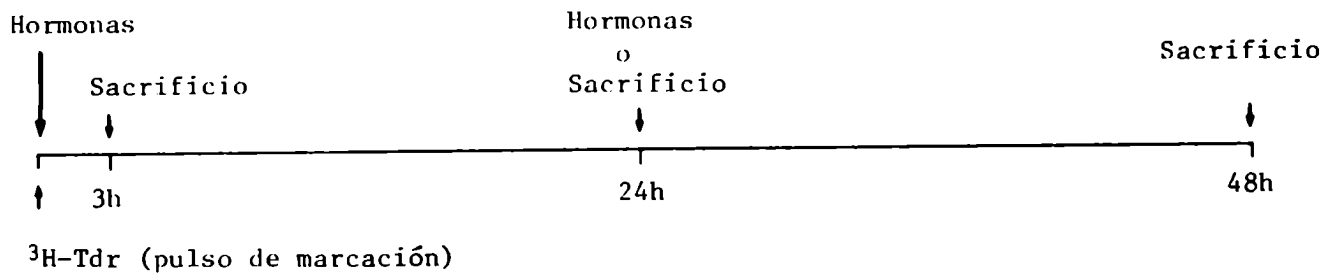


Fig. 12. Número de granos de plata por núcleo de epitelio luminal.

El diseño experimental es el mismo que para la Tabla III, pero en este caso el número de granos de plata por célula marcada fue registrado. A = Control ($^3\text{H-Tdr}$ por 3 días); B = Control 5 ($^3\text{H-Tdr}$ por 3 días y luego 2 días de administración de vehículo); C = Estradiol ($^3\text{H-Tdr}$ por 3 días y luego estradiol durante 2 días) y D = Progesterona ($^3\text{H-Tdr}$ por 3 días y luego progesterona durante 2 días). El número con la flecha indica el valor medio.



A las tres horas el índice de marcación en el tercio medio e inferior de la glándula es mayor que en el tercio superior como así también en el epitelio luminal, siendo éste el que presenta los valores mas bajos. A las 24 y 48 horas hay una continua disminución en los índices de marcación del tercio medio e inferior, mientras que el tercio superior presenta un constante incremento. En el epitelio luminal se observa un incremento a las 24 horas, que llega a un "plateau" a las 48 hs. (Figura 14).

En los animales con tratamiento hormonal en cambio, se observa un ligero incremento del índice de marcación en los tercio medio e inferior de las glandulas a las 24 horas y una disminución a las 48 horas, mientras que en el tercio superior hay un incremento a las 24horas llegando a un plateau a las 48. El lumen por su parte no mostró cambios a las 24 horas pero mostro un incremento a las 48 horas. Este fenómeno se evidencia por una acumulación de células marcadas en el cuello de las glandulas, en las proximidades del epitelio luminal.

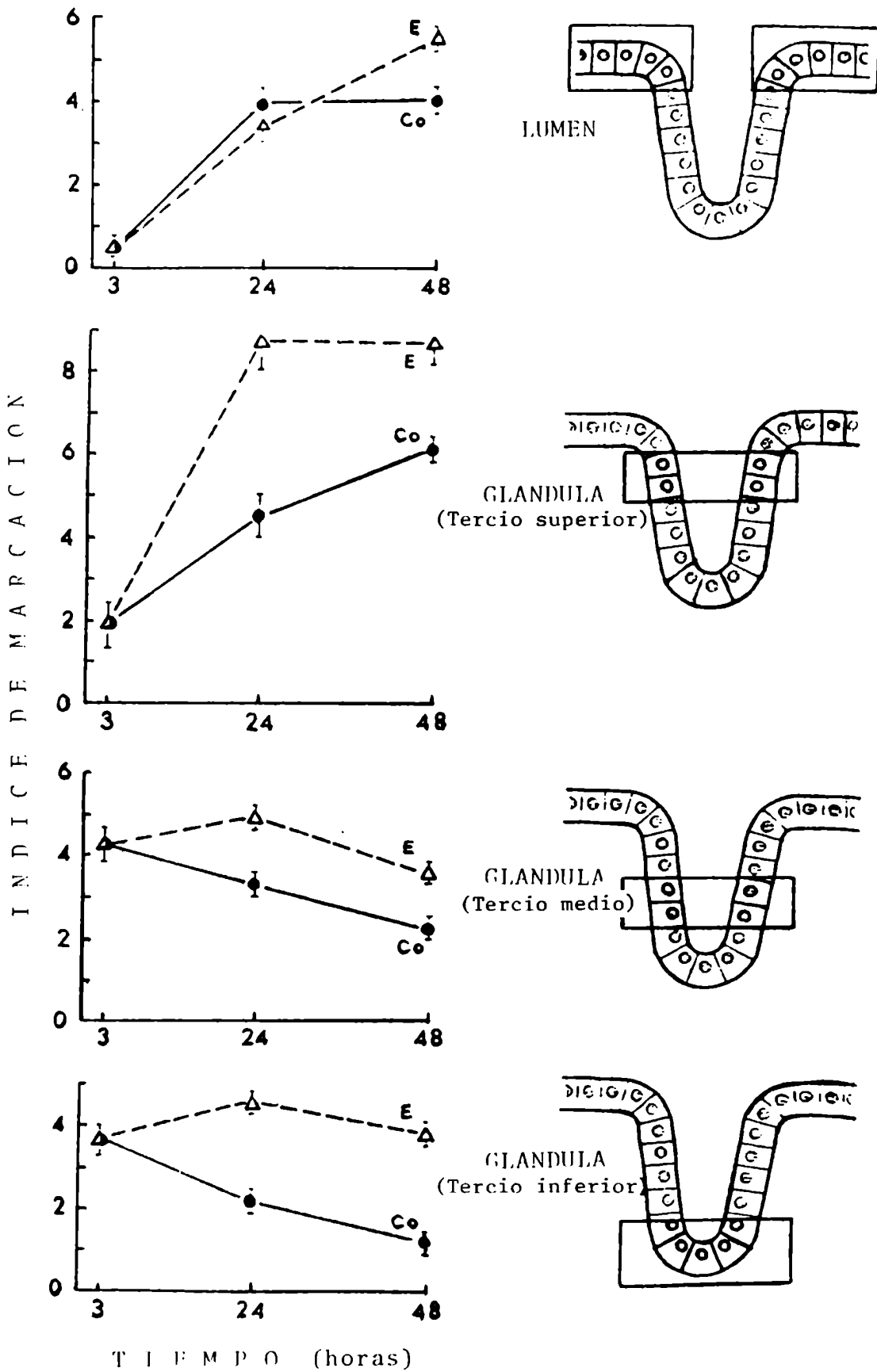


Fig. 14. Migración celular en epitelio del útero de conejo.

Cada valor es expresado como $\bar{X} \pm \sigma$, $n = 5$ conejos. El recuadro en los esquemas de la derecha ilustra el area de epitelio cuantificada. Co (o): Animales inyectados con vehículo; E (Δ): Animales inyectados con Estradiol.

ESTUDIOS HISTOMETRICOS EN CONEJOS TRATADOS CON ESTROGENOS

En conejos tratados en forma aguda (1 ó 2 días) y crónica (2 a 4 semanas) con estrógenos se determinaron: la circunferencia interna del útero, el número de células en 100 μm de epitelio luminal, el número de glándulas en un corte transversal del útero, el número de células por glándulas cortada transversalmente, y el número de células por 100 μm de epitelio glandular. Los resultados de estos experimentos son mostrados en la Tabla IV. La circunferencia interna del útero incrementó bajo la influencia de estrógenos endógenos (intacto vs ovariectomizados) o exógenos. Todos los otros parámetros estudiados no fueron alterados por la administración de la hormona.

ACCION DE LA 20 α -HIDROXI-PREGN-4-EN-3-ONA (20-OH-P)

a.- Microscopia óptica y electrónica

El único efecto observado por la administración de 20-OH-P en el endometrio de conejas ovariectomizadas, fue la inducción de gran número de células ciliadas claras las que se observaron solamente en el epitelio luminal (Figura 15 y 16). Estas células pueden ser fácilmente reconocidas por su núcleo de gran tamaño y su pálido citoplasma.

La microscopia electrónica de estas células (Figura 17), mostró un citoplasma muy claro con escasas mitocondrias, ribosomas y retículo endoplásmico. Se encontró además que todas las células claras son ciliadas, y que todas las células ciliadas tienen las características de células claras, con excepción de un pequeño número que mostró condensación nuclear, figuras mielínicas y vacuolas de grasa, es decir signos definidos de muerte celular, las cuales no fueron observados en otros tipos celulares. (Figura 18).

b.- Interacción de 20-OH-P y otras hormonas ováricas

Cuando la 20-OH-P se administró simultáneamente con 17 β -

TABLA IV

CONDICIONES EXPERIMENTALES	Circunferencia interna (μ)		Glandulas por sección	Células por Glándula	Cel./100 μ epitelio glandular
	A	B			
1. Ovariectomizados (vehículo durante 2 días)	302 \pm 28	28.3 \pm 0.6	79.6 \pm 4.1	23.9 \pm 1.3	26.4 \pm 2.1
<u>Administración de estrógeno por períodos cortos de tiempo</u>					
2. Intactos (vehículo 1 día)	687 \pm 25	34.0 \pm 1.1	80.0 \pm 3.5	24.5 \pm 3.2	30.1 \pm 1.4
3. Intactos (vehículo 2 días)	928 \pm 24	32.0 \pm 1.3	76.0 \pm 3.2	26.3 \pm 1.8	32.6 \pm 1.2
4. Estradiol (1 día)	928 \pm 24	30.6 \pm 2.0	77.6 \pm 6.4	24.2 \pm 1.4	28.4 \pm 1.6
5. Estradiol (2 días)	1197 \pm 71	29.6 \pm 1.1	70.0 \pm 1.3	25.0 \pm 1.6	29.6 \pm 0.8
<u>Administración de estrógeno por períodos largos de tiempo</u>					
6. Intactos (vehículo 1 vez en 14 días)	498 \pm 10	28.3 \pm 3.3	75.6 \pm 2.9	30.2 \pm 3.0	31.0 \pm 1.6
7. Intactos (vehículo 2 veces en 28 días)	500 \pm 44	26.0 \pm 0.4	78.3 \pm 0.8	31.0 \pm 3.6	32.0 \pm 1.8
8. Poliestradiol fosfato (1 vez en 14 días)	824 \pm 31	24.0 \pm 2.0	78.6 \pm 5.8	32.8 \pm 3.3	29.9 \pm 1.7
9. Poliestradiol fosfato (2 veces en 28 días)	1102 \pm 61	24.3 \pm 2.2	81.6 \pm 3.2	33.4 \pm 1.6	34.6 \pm 1.2

Efecto de la ovariectomía y la administración de estrógenos por períodos de tiempo variable sobre los parámetros morfológicos del útero.

Los datos son expresados como $\bar{X} \pm \sigma$, n = 5 conejos. Las únicas comparaciones estadísticamente significativas fueron en columna A = 1 vs 2, 2 vs 4, 3 vs 5, 6 vs 8 y 7 vs 9 = p<0.001.

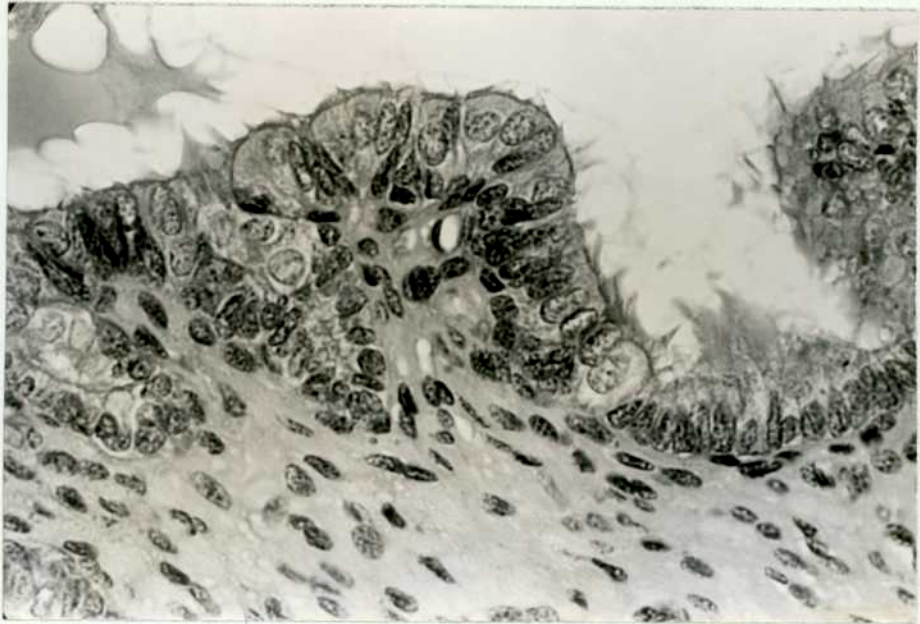


Fig. 15. Microfotografía de células claras ciliadas observadas en el epitelio luminal. X 1400.

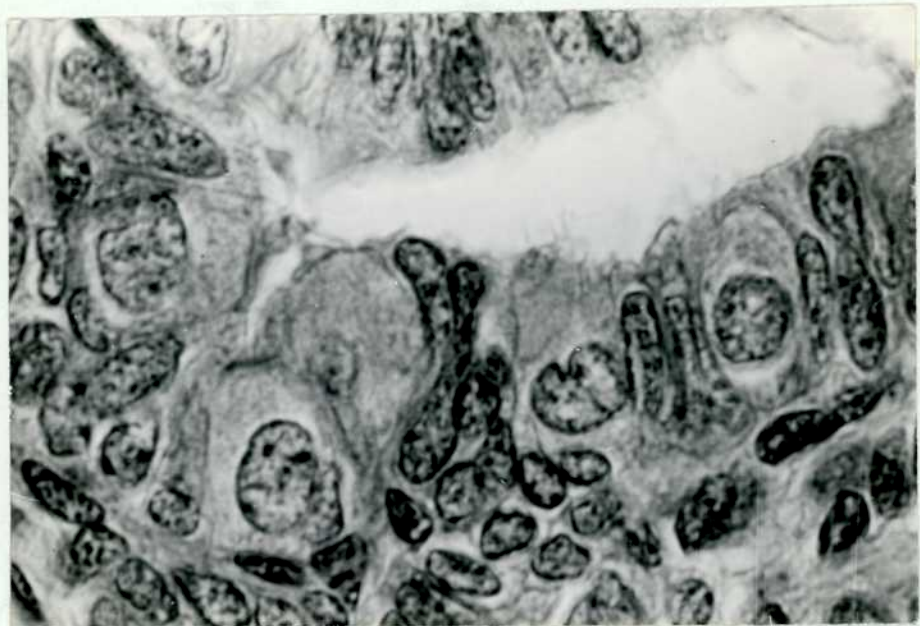


Fig. 16. Celulas claras. X 2500.

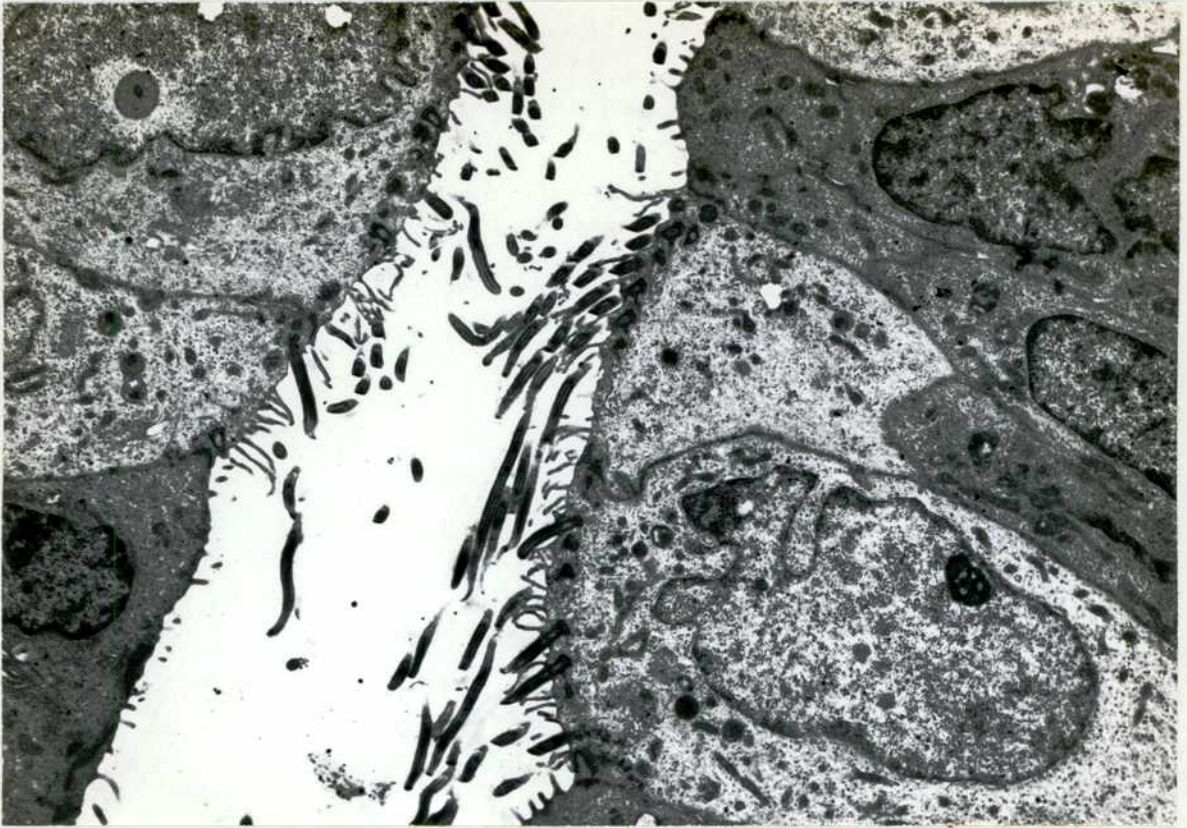


Fig 17. Microfotografía electrónica del endometrio de un conejo tratado con 20-OH-P. Varias células ciliadas con escasos organoides en el citoplasma están presentes en el epitelio. X 15.000

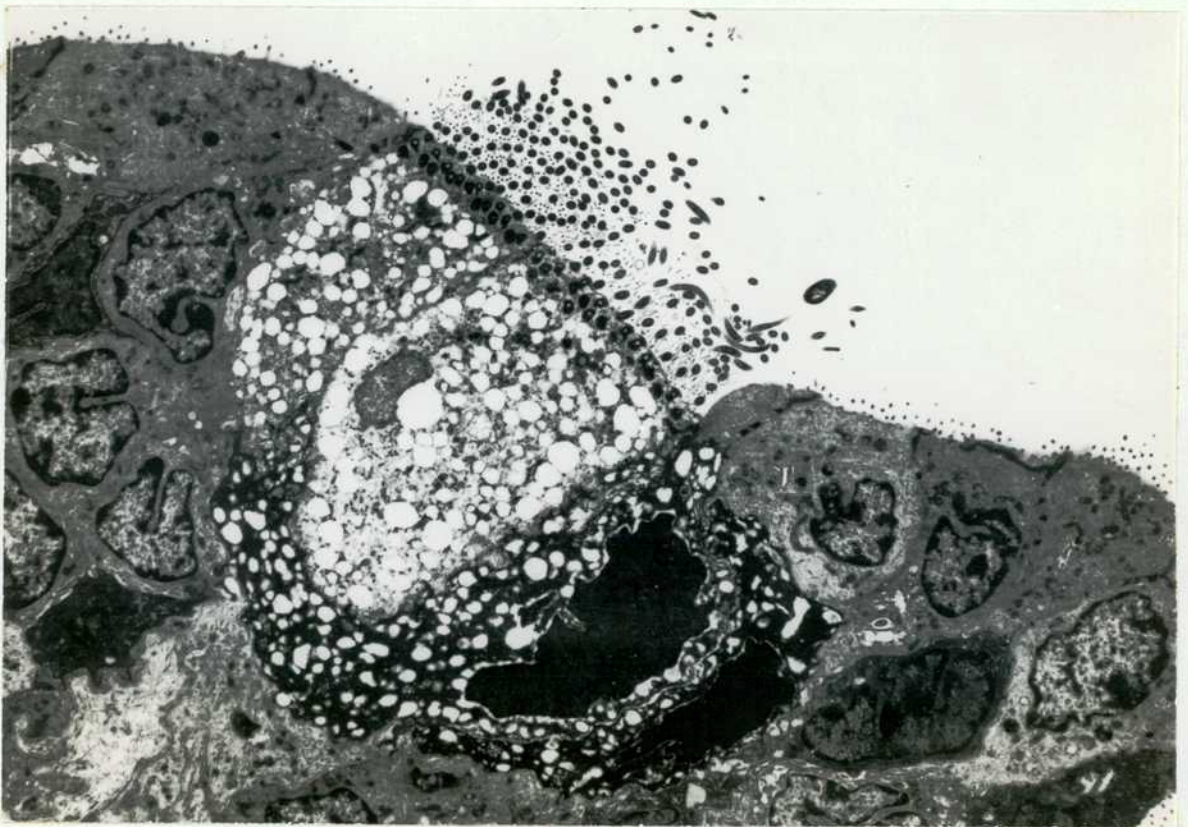


Fig 18. Microfotografía electrónica de una célula ciliada mostrando marcados cambios degenerativos. X 10.000

estradiol se observó solo el efecto de esta última hormona, es decir que histológicamente el útero presentaba células epiteliales grandes con un gran núcleo basal eucromático y estroma edematoso con capilares dilatados, no encontrándose aumento en el número de células ciliadas, parámetro este regulado por la primera hormona (Tabla V). Cuando la 20-OH-P se administró simultáneamente con progesterona se observó una mutua inhibición del efecto de ambas hormonas. En este caso el endometrio no presenta una completa arborización ni incremento en el número de células claras, más aún, en animales tratados con estrógenos o progesterona solamente, parece existir una disminución en el número de células ciliadas con respecto al control. (Figura 19)

c.- Efecto de la suspensión del tratamiento con 20-OH-P

Dos días después de suspender el tratamiento de cinco días de duración, con 20-OH-P, se observó un típico endometrio secretorio arborizado equivalente a 4-5 días de pseudopreñez inducida con Gonadotrofina corionica (HCG). Las similitudes entre el endometrio secretorio inducido por HCG o por 20-OH-P no solo incluye la arborización, sino también típicos cambios en el estroma tales como congestión y edema y desidealización alrededor de los capilares.

En la parte superior de las glándulas, se encontraron células claras en un número inusual para un epitelio secretorio (Tabla V). Tres días después de finalizado el tratamiento con 20-OH-P, la presencia de células claras era aun evidente para el epitelio uterino comenzó a mostrar cambios degenerativos evidentes. Cuatro días después de la suspensión los cambios degenerativos eran marcados pero no se observaron las típicas células multinucleadas que están usualmente presentes a tiempo equivalente de la pseudopreñez.

d.- Determinación de ADN en núcleos individuales

El contenido en ADN en núcleos individuales se determinó

TABLA V

Tratamiento	N	Células claras-ciliadas/ 1000 cel. lumbinales ($\bar{X} \pm \sigma$)	Grado de arborización	Patrón Histológico
CONTROL (Aceite de maíz)	4	51.5 \pm 15.9	0	Atrófico
17ESTRADIOL	2	17.0 \pm 7.0*	0	Normal
PROGESTERONA	2	1.5 \pm 1.5***	+3	Secretorio
20-OH-P	3	189.3 \pm 56.0**	0	Atrófico
20-OH-P + 17 β -ESTRADIOL	4	88.2 \pm 29.4	0	Normal
20-OH-P + PROGESTERONA	3	2.0 \pm 1.1***	1	Ligeramente secretorio
48 hs post-interrupción de 20-OH-P	4	74.0 \pm 13.6	+3	Secretorio
72 hs post-interrupción de 20-OH-P	3	49.0 \pm 7.0	+3	Secretorio y necrótico
96 hs post-interrupción de 20-OH-P	4	45.7 \pm 14.9	+2	Secretorio y extensiva necrosis

Efecto de la administración de 20-OH-P y su interrupción, sobre el epitelio uterino de Conejas ovariectomizadas. Interacción con 17 β -estradiol y progesterona.

Significación estadística: * 0.1 < p < 0.05; ** 0.05 < p < 0.02; *** 0.02 < p < 0.01.

El grado de arborización fue estimado de acuerdo a la escala de Mc Phail (13).

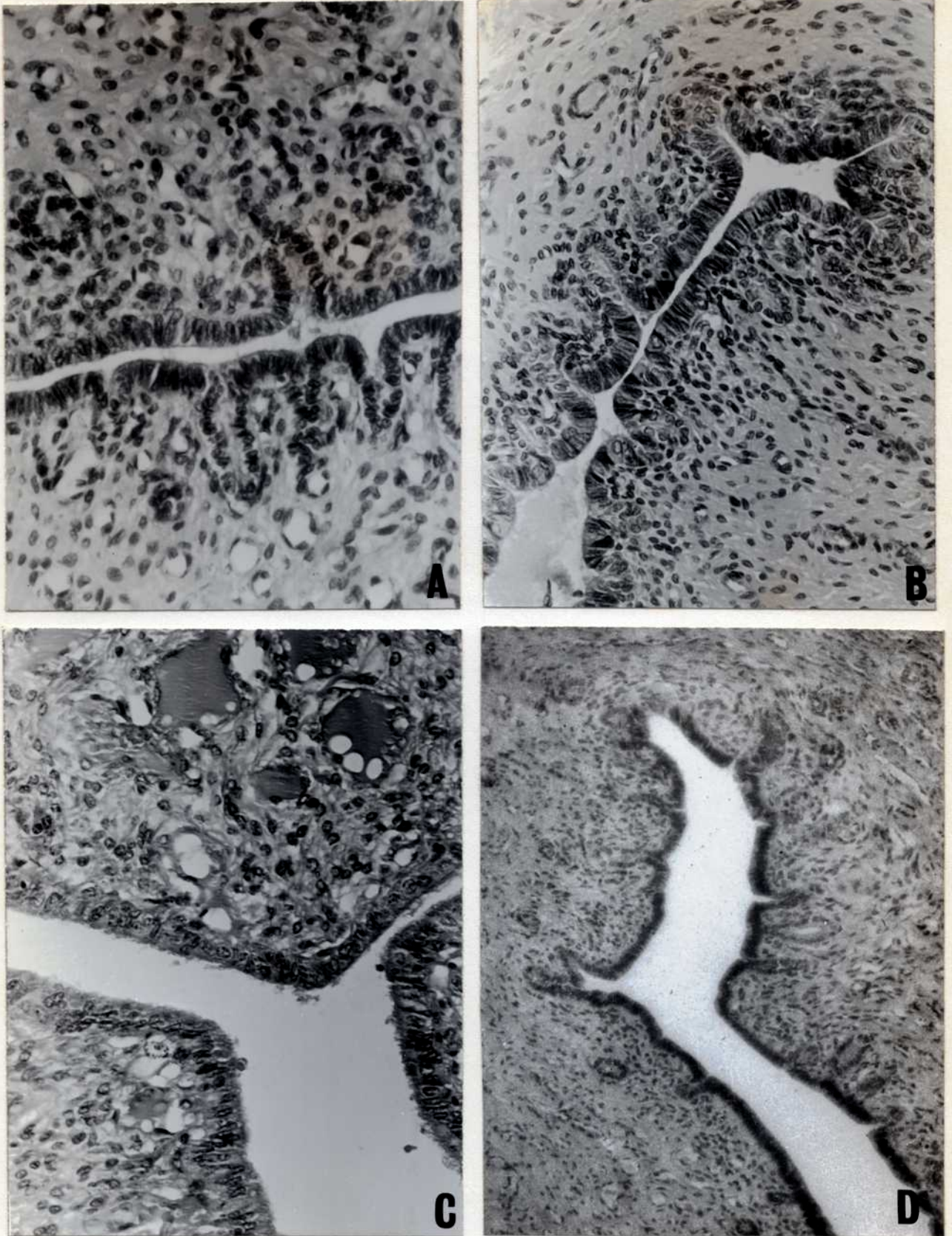


Fig. 19. Microfotografías ópticas de úteros de conejos ovariectomizados inyectados con A) vehículo; B) 20-OH-P; C) 20-OH-P + Estradiol y D) 20-OH-P + progesterona.

en los epitelios luminal y glandular de conejos intactos ovariectomizados y tratados con 20-OH-P. En la figura 20 se muestran estos resultados conjuntamente con los valores obtenidos en linfocitos tomados como referencia del valor 2c y ADN e hígado como marcador de los valores 2c y 4c. El contenido en núcleos luminales y glandulares de conejas ovariectomizadas y epitelio luminal de animales intactos mostró la típica distribución simétrica y unimodal de las poblaciones celulares con escasa proliferación. La distribución del ADN en las células glandulares de animales intactos o tratados con 20-OH-P también mostró un pico modal en el valor 2c, pero en este caso la distribución fue claramente asimétrica hacia la izquierda lo cual es característico de poblaciones celulares en activa división. Estos hallazgos son consistentes con experimentos previos donde se observó un mayor índice proliferativo en células glandulares que en células luminales.

Las células no ciliadas del epitelio luminal en las conejas tratadas con 20-OH-P mostraron una distribución bimodal con un pico en 2c y otro pico prominente en el valor de ADN 4c (figura 20).

Las células ciliadas por otra parte mostraron la distribución unimodal simétrica en 2c característico de las poblaciones sin actividad proliferativa (Figura 21).

ESTUDIO INMONOHISTOQUIMICO DE LA MEMBRANA BASAL

Con un anticuerpo contra la membrana basal se estudiaron las modificaciones de esta estructura en distintas condiciones hormonales. La figura 22 muestra un control del anticuerpo realizado en riñón donde pueden observarse la reacción de inmunoperoxidasa positiva en la unión corio epitelial de los tubulos y en el glomerulo renal.

En utero se encontraron tres patrones distintos de la membrana basal, de acuerdo al estado fisiológico del mismo.

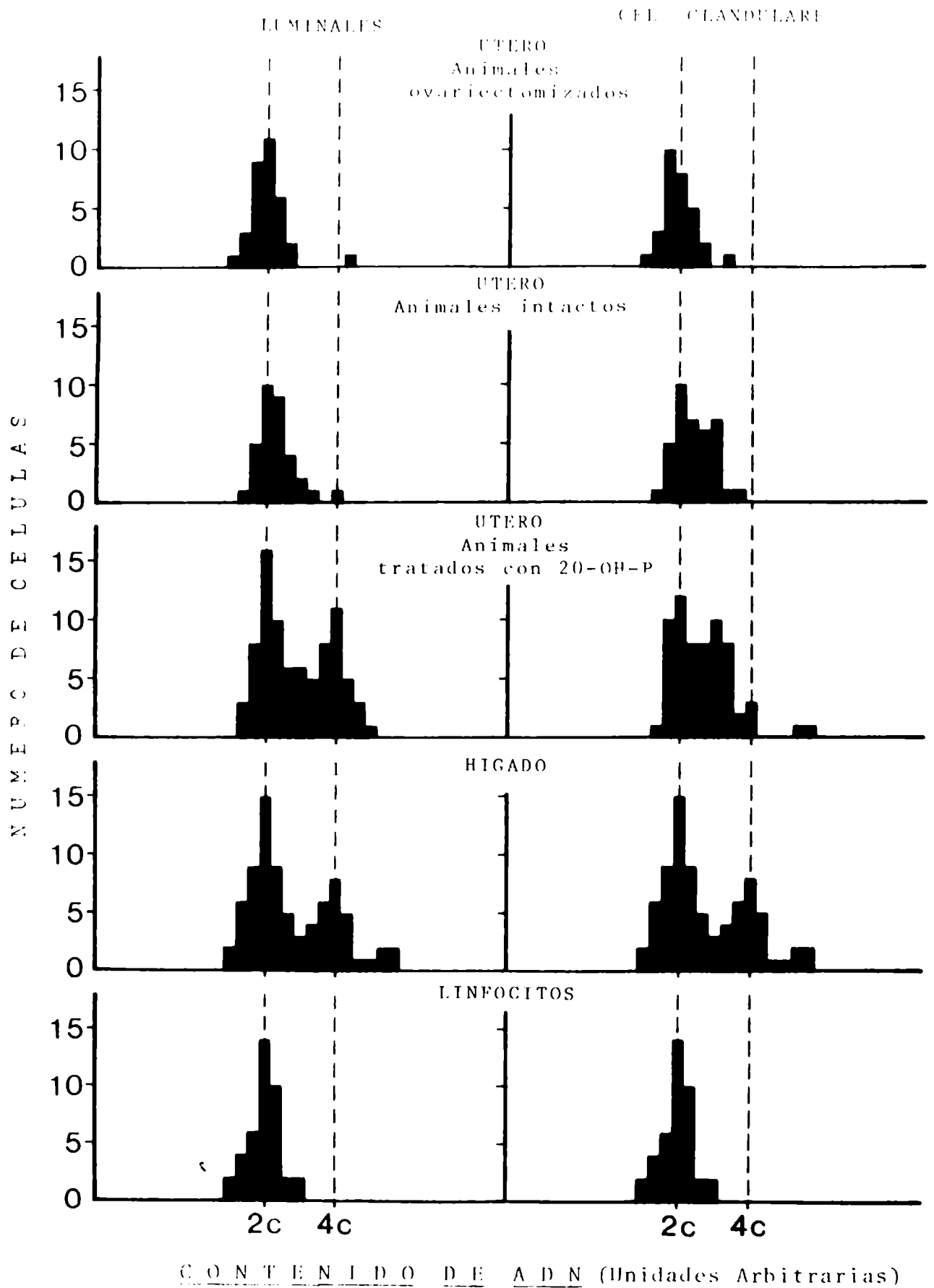


Fig. 20. Histograma del contenido de ADN en nucleos individuales en células luminales y glandulares de conejos ovariectomizados, intactos y ovariectomizados tratados con 20-OH-P.

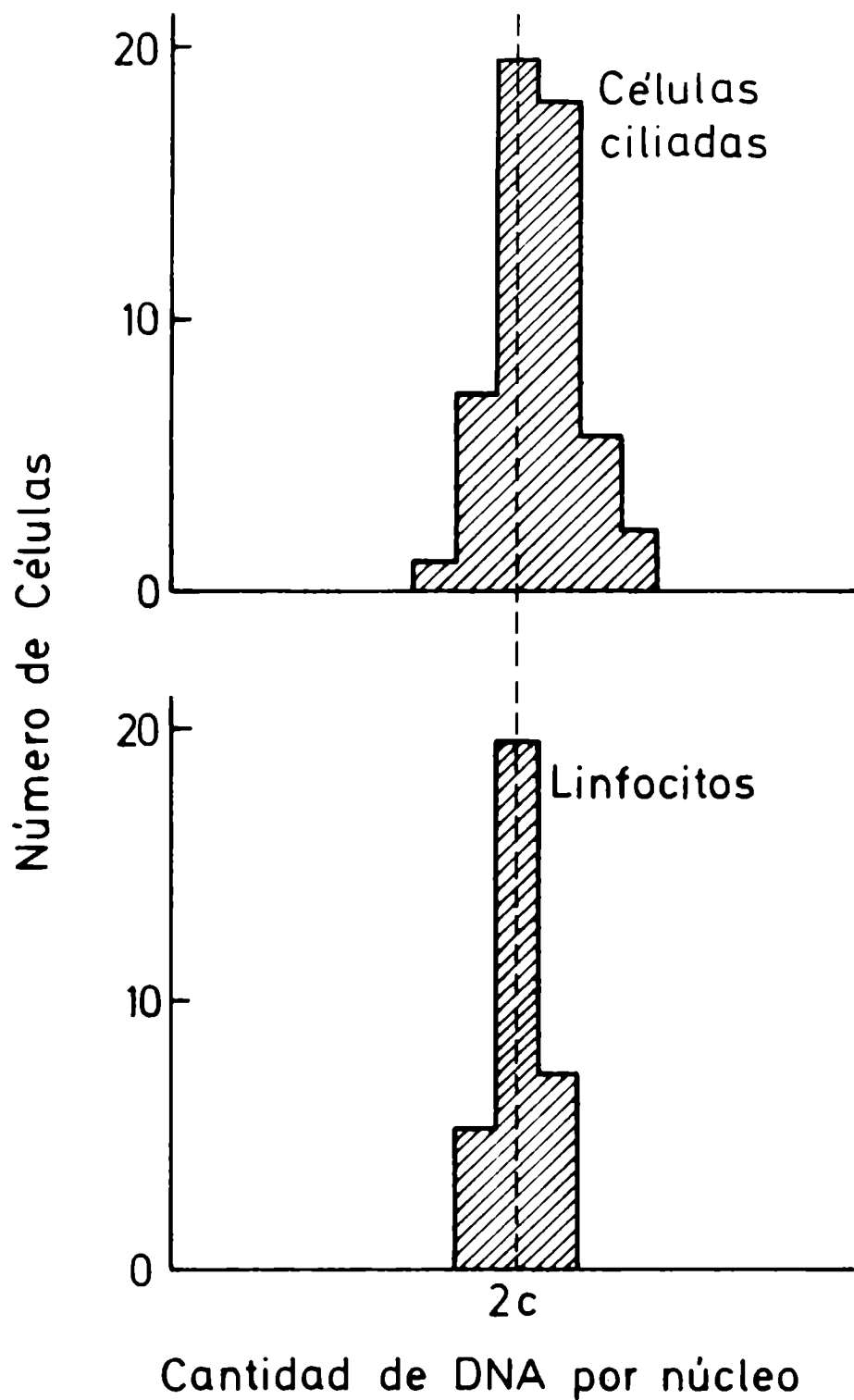


Fig. 21. Histograma del contenido de ADN de núcleos individuales en células ciliadas y linfocitos de conejos inyectados con 20-OH-P.

- a.- En animales ovariectomizados se encontró una membrana basal de gran espesor, no bifurcada y altamente reactiva contra el anticuerpo antimembrana basal (figura 23).
- b.- En animales que estaban bajo influencia de estrógenos, la membrana basal era mas fina y menos regular (figura 24).
- c.- En animales tratados con progesterona o en los primeros días de la pseudopreñez, la membrana basal era mas gruesa con una apariencia de multiples capas irregulares (figura 25).



Fig. 22. Reacción inmunoperoxidasa positiva de membrana basal en riñon.



Fig. 23. Utero de animales ovariectomizados. Membrana basal de gran espesor, no bifurcada y altamente reactiva al anticuerpo.

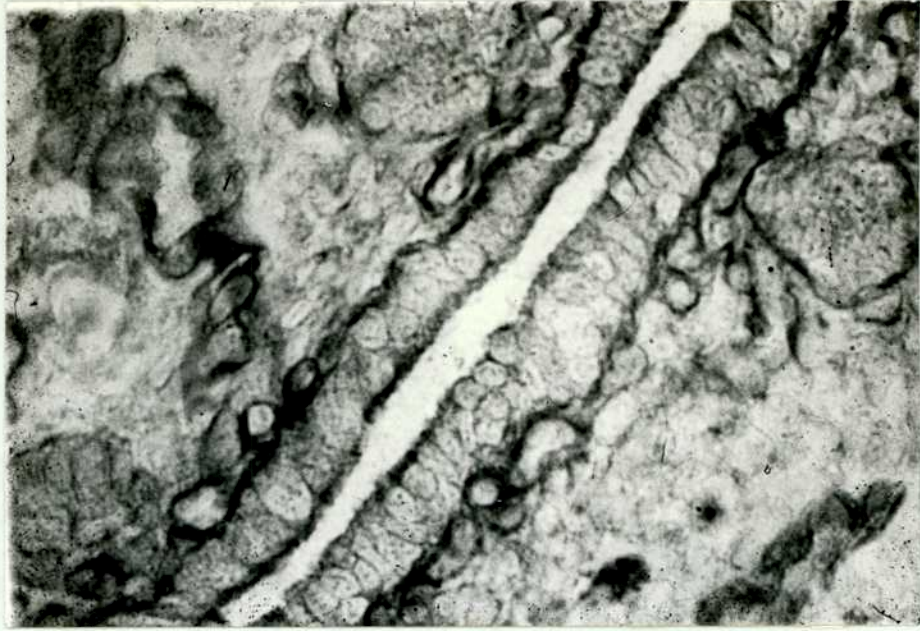


Fig 24. Utero de animales bajo la influencia de estrógenos. Membrana basal fina y levemente irregular.

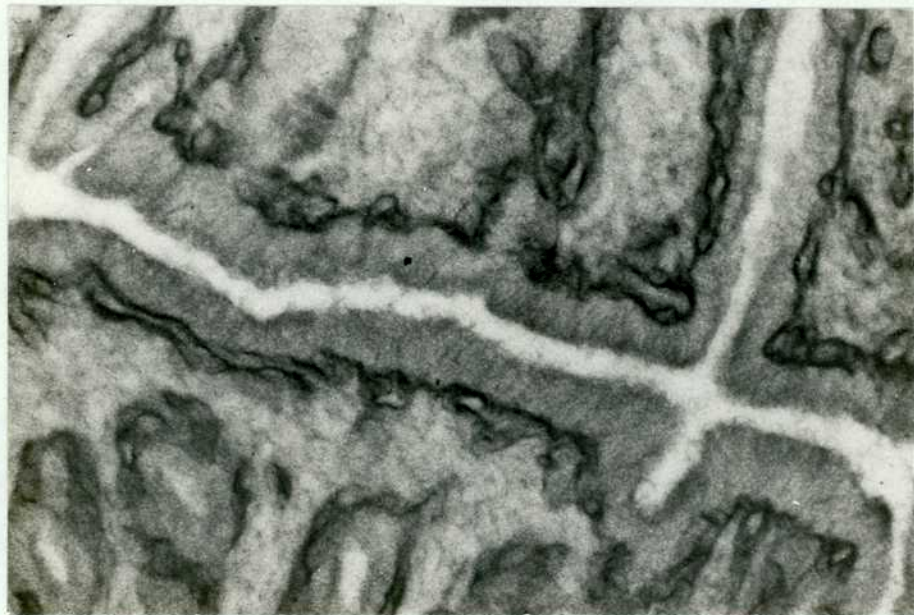


Fig. 25. Utero de animales tratados con progesterona. Membrana basal gruesa con apariencia de multiples capas irregulares.

DISCUSION

Para el estudio de los efectos de las hormonas ováricas sobre la proliferación del epitelio endometrial se desarrolló una técnica en la que las hormonas ejercen su acción "in vivo" y el estudio de proliferación se realiza "in vitro", incubando trozos de tejido con timidina tritiada. Técnicas similares han sido usadas en otros laboratorios (43,44,45,46). Sin embargo dado que el epitelio del endometrio del conejo es un simple estrato celular y las glandulas son en general cortas y rectas, no se ha observado en este modelo los problemas debidos a la falta de difusión de la timidina y de oxigenación comunicada por otros autores (44,46). Por otra parte, se ha observado que la incorporación de timidina en las celulas epiteliales es lineal por lo menos durante 12 horas, lo que indica que los tejidos conservan su capacidad metabólica intacta en ese periodo.

Utilizando este sistema para estudiar proliferación en el epitelio uterino de animales intactos, se ha observado que las células glandulares tienen un flujo de entrada a la fase S del ciclo celular mayor que el de la células luminales, lo cual indica una mayor actividad proliferativa del epitelio glandular en dichos animales. Como los conejos son ovuladores inducidos y se encuentran indefinidamente en estro continuo y considerando que ha sido mostrado en experimentos de este trabajo (Figura 5,6) que las celulas de las glandulas serian el blanco para el efecto proliferativo del 17β -Estradiol, puede postularse que la mayor actividad proliferativa de las células glandulares se origina en el estímulo estrogénico endógeno. Confirma además esta hipótesis otros experimentos (Tabla I) donde se ha podido demostrar que no hay diferencias en los indices de marcación entre las células glandulares y luminales en los animales ovariectomizados. En estos mismos experimentos se mostro que mientras una dosis baja (0,1 mg/Kg/dia) de 17β -Estradiol no afecta la proliferación del epitelio uterino de animales intactos a las 24 horas, la misma dosis de la hormona indujo un marcado efecto proliferativo en las glandulas de conejos ovariectomizados.

Este hallazgo sugiere que existe un mecanismo de desensibilización para la acción estrogénica en los conejos adultos intactos, que es tan normalmente bajo una constante estimulación estrogénica, mientras que en los conejos ovariectomizados el umbral para el efecto del 17β -Estradiol es menor. Mecanismos de desensibilización similares al sugerido, fueron descritos en el útero de la rata y el ratón (47,48). Además en células del endometrio de conejo se ha demostrado una disminución de receptores estrogénicos como respuesta al tratamiento con esta hormona, fenómeno que puede estar relacionado a los mecanismos de desensibilización descritos (49). Los datos presentados en este trabajo sobre tratamiento crónico con estrógenos (Tabla II) también indicarían la existencia de un mecanismo de este tipo.

La progesterona inyectada a conejos intactos indujo un incremento en el índice de marcación de los epitelios luminal y glandular. Los experimentos realizados en conejos ovariectomizados mostraron los mismos resultados, los cuales son consistentes con trabajos previos (14,50) que muestran que en conejos adultos ovariectomizados no es necesario un tratamiento previo con estrógeno para permitir la acción de progesterona, siempre que una dosis suficientemente grande de ésta sea administrada.

En los úteros de animales inyectados con progesterona se observaron áreas de hiperplasia focal en el epitelio luminal, los cuales son sitios activos de proliferación celular. Estas áreas parecen estar relacionadas con la formación de glándulas (13) o pliegues (15) que caracterizan el endometrio de conejas preñadas o pseudopreñadas.

Las hormonas ováricas parecen regular, en forma diferente, a las células del epitelio luminal y glandular. Sin embargo la administración simultánea de ambas hormonas resultó en la mutua inhibición de sus efectos proliferativos (Figuras 5,6). Este hallazgo sugiere la existencia de mecanismos regulatorios complejos en el endometrio para la modulación de la proliferación celular por las hormonas ováricas. Esto ha sido sugerido previamente en traba

jos en los que utilizando cultivo de tejidos de endometrio (33) se demostró la existencia de un factor que resulta de la interacción de la progesterona con células en división. Este factor inhibe el efecto proliferativo de los estrógenos sobre las células G₀ del cultivo. También ha sido demostrado que la progesterona induce una disminución de los receptores estrogénicos en cultivos de endometrio de conejo (34,49).

Una importante diferencia en los efectos biológicos de las hormonas ováricas usados en estas investigaciones, reside en el resultado final del efecto proliferativo que ellas ejercen sobre el endometrio. La progesterona, pero no los estrógenos, parece ser esencial para la formación de glándulas funcionales (51), las cuales parecen estar formadas de células diferenciadas, secretorias y no proliferantes (19).

Si bien los mecanismos no están completamente dilucidados, surge de estas experiencias que, tanto el estrógeno como la progesterona, regularían la proliferación del epitelio uterino del conejo por mecanismos diferentes y con complejas interacciones entre ambas hormonas. El estrógeno mantendría el trofismo del órgano y la progesterona induciría una rápida onda de proliferación que llevaría a la diferenciación terminal y a la formación del endometrio secretorio.

Estos mecanismos también se pusieron de manifiesto en los estudios de pseudopreñez inducida por Gonadotropina coriónica humana (HCG). Dos días después de la ovulación se produce un explosivo aumento de la proliferación en el epitelio glandular y luminal cuyo significado puede asumirse que está relacionado con la posterior arborización del endometrio. Después del pico proliferativo hay una casi completa ausencia de actividad que coincide con la apariencia morfológica de un endometrio secretorio. Es en este punto donde los niveles de uteroglobina se incrementaron notablemente en la secreción uterina. Es interesante remarcar que el epitelio uterino deja de proliferar y empieza a secretar altos niveles de uteroglobina antes de que la arborización esté totalmente

desarrollada. Por otra parte estos resultados, así como estudios inmunohistoquímicos realizados por otros laboratorios (19,20) confirman la observación de que la uteroglobina es secretada por células glandulares, no proliferantes y probablemente terminalmente diferenciadas.

Estudios previos realizados en cultivos de células del endometrio del conejo habían mostrado que el blanco del efecto proliferativo de los estrógenos son las células en reposo (probablemente G₀) normalmente presente en estos cultivos. En este modelo experimental la progesterona no estimulaba la proliferación celular pero interactuaba con las células ciclantes para producir un factor al que nos hemos referido anteriormente (10,34). Un factor similar está presente en el medio de cultivo de células sembradas con alta densidad (35). Basado en estos hechos se ha considerado la hipótesis que el útero puede estar compuesto por diferentes poblaciones celulares que tienen una respuesta proliferativa diferente a las hormonas ováricas. Esto ha sido parcialmente demostrado en los experimentos comentados en el párrafo anterior donde se ve la respuesta diferencial de los epitelios glandular y luminal a las hormonas ováricas. Sin embargo se ha querido profundizar el concepto y se ha tratado de demostrar si el blanco para la misma hormona pueden ser células en distintos estados del ciclo proliferativo. Para ello se diseñó un experimento en el cual el comportamiento de las células proliferantes fue marcado mediante la administración rutinaria de timidina tritiada durante tres días. Las hormonas se administraron 3 horas después de haber finalizado el tratamiento con timidina tritiada. En el análisis de este experimento se asume que la timidina es completamente catabolizada en 3 horas (52) y que un aumento de la proliferación por entrada de células de G₀ al ciclo celular resultaría en una disminución en el índice de marcación. Por el contrario un incremento en el índice de marcación, sería causado por el acortamiento del ciclo celular en células que ya se dividían. El análisis del número de granos por núcleo en el mismo experimento confirmaría estas conclusiones. ya que la división de células cuyos núcleos ya estaban marcados

(células en división) resultaría en la dilución de la radiactividad en cada núcleo y por lo tanto una disminución del número de granos por núcleo.

Los resultados de estos experimentos mostraron que después de 3 días de marcación el 20% de las células del epitelio luminal y el 50% del glandular tienen los núcleos marcados. Dos días después, el número de células marcadas se incrementa en la glándula pero no en el lumen. Estos resultados son consistentes con la mayor actividad proliferativa de las glándulas demostrada anteriormente. Considerando que las células del lumen se dividen lentamente y que en este trabajo se ha presentado evidencia de migración celular desde las glándulas al lumen, sería esperable encontrar en este experimento un aumento del índice de marcación de las células luminales, ya sea por división de las células marcadas o por migración de ellas. Sin embargo los resultados experimentales no mostraron aumento en el índice de marcación de estas células. Esta observación sugiere que el crecimiento neto de este compartimiento estaría controlado por un mecanismo de descamación del epitelio luminal. Además, no se ha observado evidencias de muerte celular "in situ" en conejos intactos (estro continuo), aunque se observaron células necróticas en experimentos con 20-OH-P. La tabla III y las figuras 12 y 13 muestran claramente que la administración de estradiol produce un desplazamiento de las células glandulares en reposo hacia el ciclo celular, mientras que el mismo esteroide parece no afectar a las células luminales. La progesterona, por otra parte, indujo una aceleración en la velocidad de proliferación acortando el ciclo celular en las células de ambos epitelios. También pudo probarse en estos experimentos que la progesterona no produce un movimiento del compartimento G₀ al ciclo celular. Los datos de la Figura 12 y de la Tabla III muestran que la administración de estradiol no cambia el índice de marcación de las células luminales, pero produce un incremento en el número de granos por célula comparado con el control respectivo. Estos hallazgos podrían explicarse por una disminución en la descamación de las células luminales inducida por los estrógenos. Los resultados experimentales de migración celular (Figura 14) parecen avalar esta hipótesis.

La disminución en la descamación celular, acompañada por una inhibición de la proliferación resultaría en una acumulación de células no proliferantes o de baja proliferación que migran desde las glándulas.

La hipótesis de migración celular desde las glándulas al lumen ha sido comprobada por los experimentos ilustrados en la figura 14. Esta muestra que, aun en condiciones control, después de un pulso de timidina tritiada y un subsiguiente seguimiento de las células marcadas, los índices de marcación del fondo y tercio medio de las glándulas disminuyen, mientras que se produce un incremento del mismo parámetro en la parte alta de las glándulas y el lumen. Este tipo de migración celular para la renovación de los epitelios ha sido propuesto y probado experimentalmente en la mucosa intestinal y ha sido sugerido en el endometrio humano y de rata (53,54,55).

Un hallazgo interesante fue el gran incremento en el número de células marcadas en la parte alta de las glándulas a las 24 horas del tratamiento con estrógenos, mientras que las células luminales, en las mismas condiciones, se mantuvieron en los mismos valores que el control. Solo se observó un incremento en el índice de marcación del lumen a las 48 horas del tratamiento. Estas observaciones, así como la ausencia de un aumento de marcación, en el epitelio luminal de los conejos control entre las 24 y 48 horas, como también el aumento registrado en la parte alta de las glándulas, sugiere que el área de transición glándula lumen podría funcionar como una barrera geográfica para la migración de las células glandulares al lumen. Se trataría de un mecanismo regulador del crecimiento del epitelio luminal, que implicaría la posibilidad en las células glandulares migrantes de seguir dos caminos; migrar al lumen o descamarse.

Los datos de la Tabla IV avalan la hipótesis de la migración celular y también sugieren que el 17β -estradiol regula el grado de descamación celular en el lumen, ya que la administración de la hormona en forma aguda o crónica produce un incremento del

area luminal por aumento del número de células, mientras que el número de glándulas no varía. Por otra parte, como se discutió anteriormente (Tabla II) el efecto de estrógeno sobre las glándulas no está presente en los tratamientos prolongados, indicando una posible desensibilización a la hormona mientras que como se ve en Tabla IV el aumento del area luminal persiste en esas condiciones, indicando que dicha hormona tendría otros mecanismos diferentes al de la proliferación para mantener el tamaño del órgano, probablemente actuando a nivel de la regulación de la pérdida celular.

Todos estos resultados sugieren que el 17β -estradiol tiene como blanco a las células luminales y glandulares pero con efectos diferentes, ya que esta hormona esteroide regularía la proliferación en células glandulares y la descamación en las luminales; la administración continua produciría una desensibilización de las primeras pero no de las segundas.

La administración de 17β -estradiol tuvo un marcado efecto en la cinética de migración. El hallazgo indicando que los estrógenos inducen a las células en Go a entrar al ciclo celular explicaría el incremento del índice de marcación a las 24 horas. La ulterior disminución del índice de marcación que ocurre en el fondo y tercio medio de las glándulas a las 48 horas es probablemente debido a la pérdida de células por descamación ya que el índice de marcación en la parte alta de las glándulas no se incrementa adicionalmente a las 48 horas. Otra explicación a este "plateau" en la parte superior de las glándulas es que por la administración de 17β -estradiol las células migrarían rápidamente desde la parte superior de las glándulas al epitelio luminal. En el aumento de células del epitelio luminal intervendría la regulación por los estrógenos de la pérdida celular. La posibilidad de que el 17β -estradiol disminuya la frecuencia de pérdida o muerte celular ha sido sugerida previamente por Martín y Colaboradores (56). En nuestro modelo este fenómeno está claramente expresado en el aumento del perímetro interno del útero como resultado del tratamiento con estrógenos en forma aguda o crónica. En las experiencias crónicas se ob

servó que esta disminución de la descamación celular se mantiene aún en condiciones en que el efecto proliferativo del estrógeno sobre las glándulas parece estar bloqueado por el mecanismo de desensibilización.

Sobre la base de estas investigaciones se podría proponer un modelo de los efectos de las hormonas ováricas sobre el endometrio del conejo: Los estrógenos actuarían sobre las células blanco en las glándulas uterina las que son células en reposo o bloqueadas en G₀ del ciclo celular y estas células funcionarían como una verdadera población de células madre ("Stem cells"). Las células hijas migrarían hacia el lumen y en la unión glándula-lumen continuarían la migración o se descamarían. El balance entre migración o descamación es también probablemente regulado por los estrógenos. Una vez alcanzado el lumen, las células hijas continúan siendo blanco de los estrógenos aunque no regulando proliferación sino descamación celular. La progesterona por su parte actúa sobre célula en división de las glándulas y el lumen induciendo la formación de nuevas glándulas, las cuales están formadas por células sin actividad proliferativa que secretan uteroglobina.

Muchos autores han señalado la posibilidad de que diferentes poblaciones celulares del útero: epitelio, estroma y miometrio pueden mostrar diferentes respuestas a los estrógenos (57,58) así como a relaciones intercelulares (59). Los experimentos descritos en este trabajo muestran que en el endometrio del conejo las interacciones celulares y la complejidad de las respuestas juegan un rol importante en definir la regulación estrogénica de la población celular. La existencia en los órganos blanco de poblaciones celulares que responden en forma distinta a las hormonas ováricas, cuya acción se piensa que es regulada por interacciones celulares, agrega otro nivel de comprensión a la interpretación a nivel celular de los mecanismos de la acción hormonal. Por lo tanto es interesante especular que alteraciones en los mecanismos de crecimiento del epitelio uterino y su regulación por las hormonas ováricas podría dar lugar a condiciones patológicas tales como hiperplasia y neoplasia (60).

La función de 20-OH-P en conejos no ha sido completamente dilucidada, aunque algunos autores la consideraron un debil progestágeno (27) Hilliard y Eaton (26) demostraron en el conejo que la 20-OH-P es secretada por el ovacio intersticial y esta presente en el suero del conejo en estro, mostrando un brusco aumento unas horas antes de la ovulación. Sin embargo estos autores no describen el posible rol de la hormona. Posteriormente Davies y Hloffman sugirieron que 20-OH-P podría estar relacionada a la ciliogenesis (15).

Conner y Colaboradores en 1978 mostraron que la 20-OH-P no producía la formación de un endometrio secretorio como podría esperarse de un progestágeno debil, pero inducía la formación de células claras en el epitelio uterino de conejos ovariectomizados (28). Los estudios de microscopía electrónica presentados en este trabajo mostraron que las células claras eran ciliadas y que toda las células ciliadas tenian las características de las células claras. Se puede concluir con estos datos que 20-OH-P indice ciliogénesis en el endometrio del conejo, aunque los mecanismos de este proceso, asi como el significado de dichas células es todavía desconocido. No puede descartarse que la 20-OH-P pueda ejercer esta acción indirectamente a traves de otro órgano diferente al ovario.

Células claras y ciliadas en el endometrio humano fueron descriptas por Mandl en 1911 (61), no presentando evidencia alguna sobre su origen y función. Actualmente se piensa que podrian ser estimuladas por los estrógenos dado que aparecen frecuentemente en endometrios proliferativos e hiperplásticos y no asi en la atrofia endometrial (62). Asimismo Silverberg y colaboradores (63) demostraron que son mas frecuentes en carcinomas de endometrio desarrollados en mujeres que han recibido estrógenos exógenos que en tumores similares en mujeres que no recibieron tratamiento estrogénico. Sin embargo no se ha podido establecer una vinculación entre las células ciliadas y las hormonas ováricas.

Un hallazgo interesante en el curso de este trabajo, fue observar células ciliados con claros signos de muerte celular, má-

xime cuando no se ha observado ningún tipo de células necróticas en los estudios histológicos. Esto sugiere que el mecanismo general para el recambio celular en el endometrio del conejo, estaría determinado por la descamación celular, mientras que en otros tejidos la apoptosis y necosis condensante es el mecanismo común (64).

Debido a que el efecto de 20-OH-P sobre la ciliogénesis no pudo ser demostrado en animales intactos, a pesar de haber sido encontrado en conejos ovariectomizados, se decidió estudiar la interacción de 20-OH-P con otras hormonas ováricas. Cuando se administró simultáneamente la 20-OH-P con 17β -estradiol, el porcentaje de células ciliadas se redujo, un fenómeno que también se observó cuando se administró solamente 17β -estradiol a conejas ovariectomizadas. Este efecto del 17β -estradiol es probablemente el resultado de un aumento en la proliferación de células no ciliadas que produciría dilución de las células ciliadas, ya que desde el punto de vista morfológico se puede observar una acción estrogénica completa.

La progesterona por su parte, produjo una casi completa inhibición de la ciliogénesis inducida por 20-OH-P, pero al mismo tiempo hubo una marcada inhibición de la arborización. Este antagonismo con la progesterona sugiere que la 20-OH-P no es un progestágeno débil, sino una hormona capaz de producir efectos específicos en el endometrio del conejo.

Dos días después de la suspensión del tratamiento de 5 días con 20-OH-P, se desarrolla en endometrio secretorio completamente arborizado. Para explicar esta rápida inducción del epitelio secretorio que usualmente toma lugar en 4-5 días cuando es inducido con HCG o progesterona, se penso en la posible existencia de una población bloqueada en la fase G2 del ciclo celular. Estas células podrían considerarse como una población de células de reserva que bajo la influencia del estímulo adecuado, en este caso la suspensión de una hormona, pueden reingresar en el ciclo celular pro-

duciendo una casi inmediata onda de proliferación. Una cinética similar fue descrita por Gelfant para la epidermis en la oreja del ratón (65). Por esta razón se llevó a cabo un estudio citofotométrico del ADN en núcleos individuales del endometrio del conejo. En ese estudio se encontró que las células ciliadas estaban bloqueadas en G1, pero en el epitelio luminal se encontró una importante fracción de células en G2. Esta fracción no fue observada en animales intactos u ovariectomizados y parece haber sido inducida por el tratamiento con 20-OH-P. La presencia de gran número de células arrestadas en G2 puede explicar la rápida arborización que sigue a la suspensión de la hormona. Sin embargo la arborización inducida por este mecanismo mostró algunas diferencias con el epitelio arborizado inducido por HCG o progesterona. Mientras que éste último dura varios días y posteriormente resulta en una lenta regresión caracterizada por la presencia de células multinucleadas, el epitelio secretor del tratamiento con 20-OH-P muestra cambios regresivos solo a las 48 horas de la suspensión de la hormona y una completa ausencia de células multinucleadas.

En resumen, se ha observado que 20-OH-P tuvo un efecto sobre la ciliogénesis del endometrio del conejo. Las células ciliadas son probablemente terminalmente diferenciadas ya que no se observó a ninguna de estas células en mitosis, pero se encontraron; muchas de ellas en proceso de necrobiosis. Además el estudio citofotométrico del ADN de estas células indicó claramente la ausencia de actividad proliferativa. La función de 20-OH-P en conejos sería la inducción de células ciliadas durante el estro y las primeras etapas de la preñez y pseudopreñez, por un mecanismo todavía desconocido. Posteriormente la interacción con la progesterona luteal llevaría a una progresiva desaparición de las células ciliadas como fue reportado por Davies y Hoffman (15,16). Los trabajos previos muestran que 17 α -Hidroxiprogesterona y 5 α pregn-3, 20 diona tienen efecto similar a la 20-OH-P y sugieren un rol específico de estos esteroides hidroxilados, los cuales fueron considerados débiles progestágenos (28).

Conjuntamente con los cambios proliferativos del epitelio

se han observado modificaciones en la membrana basal como consecuencia de la acción hormonal. Basicamente se ha observado que los estrogénos influyen sobre la membrana basal disminuyendo su espesor y presentando una reacción inmunohistoquímica débil. Por otra parte la progesterona presentó un efecto totalmente opuesto al anterior observándose una reacción inmunohistoquímica irregular y dando lugar además a una membrana basal multilaminar de gran espesor. Estos cambios en la membrana basal parecen estar relacionados con las modificaciones morfológicas producidas por las hormonas. Numerosos trabajos en la literatura han mostrado que tiene un rol preponderante en la organogénesis y en la reparación de las estructuras epiteliales (66,67,68). En el caso del útero del conejo, los cambios en la membrana basal podrían regular la descamación celular e intervenir en la neoformación de glándulas en el endometrio secretorio. Un mecanismo similar al propuesto para la formación de glándulas fue sugerido por Meier en el desarrollo de la placoda ótica (69).

La organización de la membrana basal en forma de capas múltiples es un fenómeno común en aquellos casos en que la síntesis de la membrana está muy aumentada, aunque este fenómeno ha sido descrito fundamentalmente en cuadros patológicos tales como las diabetes mellitus, las alteraciones en nervios periféricos, los glomerulos renales en regeneración, el daño por radiación, etc. (70, 71, 72, 73, 74). La formación de una membrana basal multilaminar bajo la influencia de progestágenos parece estar ligada a la organogénesis del endometrio secretorio.

RESUMEN Y CONCLUSIONES

Se encaró en este trabajo, el estudio de la cinética celular del epitelio uterino del conejo, con la idea de analizar la posible existencia de poblaciones celulares que tengan una respuesta diferentes a las hormonas ováricas. Con ese objeto se desarrolló una técnica que permite estimar "in vitro" el efecto proliferativo de las hormonas administradas "in vivo". Usando esa técnica se demostró que el 17β -estradiol estimula la proliferación de las glándulas endometriales en animales intactos y ovariectomizados. La progesterona por su parte, estimuló tanto al epitelio luminal como al glandular, también en conejos intactos y ovariectomizados. En los úteros de animales tratados con progesterona se encontraron zonas de hiperplasia focal, las cuales parecen estar relacionadas con la neoformación de glándulas, que caracterizan al endometrio secretorio. De acuerdo a estos resultados se pudo concluir que a pesar de la semejanza morfológica, las células glandulares y lumbinales se comportan como poblaciones independientes en cuanto a la respuesta a las hormonas ováricas.

Utilizando la misma metodología se estudiaron los índices de proliferación durante las primeras etapas de la pseudopreñez y se los correlacionó con la síntesis de uteroglobina, una proteína secretada por el endometrio y que se supone conectada de alguna forma con el proceso de anidación. De acuerdo con la secuencia temporal de la secreción de uteroglobina, se concluyó que las células que secretan esta proteína son no proliferativas y probablemente terminalmente diferenciadas.

Ante estos resultados se decidió explorar la posible respuesta diferencial de las células epiteliales endometriales de acuerdo a su estado en el ciclo celular, además de su ubicación en glándulas o lumen. Para ello se realizaron estudios "in vivo" inyectando conejos con timidina tritiada durante 3 días para marcar los núcleos de células en activa proliferación. Una vez finalizado

el tratamiento con timidina tritiada se inyectaron hormonas durante 2 días y los animales se sacrificaron y se determinaron los nucleos marcados mediante autorradiografía. El 17β -estradiol produjo una disminución en el número de células marcadas, por cuanto se dedujo que esta hormona ejerce su acción proliferativa haciendo entrar al ciclo celular a células que estaban en reposo (o G_0). La progesterona produjo un considerable aumento en los índices de marcación determinandose en esa forma que las células en división eran el blanco para esta hormona. El análisis del número de granos en las autorradiografías confirmó estas conclusiones.

Con la administración de estrógenos durante cortos (días) y largos (semanas) lapsos de tiempo, se produjo un aumento de la circunferencia interna del útero debido a un incremento de las células luminales, mientras que el número de glándulas pareció no alterarse. Estos hallazgos, conjuntamente con experimentos previos sugieren que las células endometriales migran de la glándula hacia el lumen y que la administración de estrógenos disminuye su posterior descamación. Este concepto de migración celular fue posteriormente confirmado en experimentos en los que se administró timidina tritiada a conejos y posteriormente se determinó a distintos tiempos la distribución geográfica de células con nucleos marcados. Se observó que en función del tiempo decrece el número de células marcadas en el fondo y tercio medio de las glándulas, mientras que el mismo parámetro aumentó en la parte superior de las glándulas y el epitelio luminal. La administración de estradiol alteró la cinética de este fenómeno y parece influir en este proceso de migración.

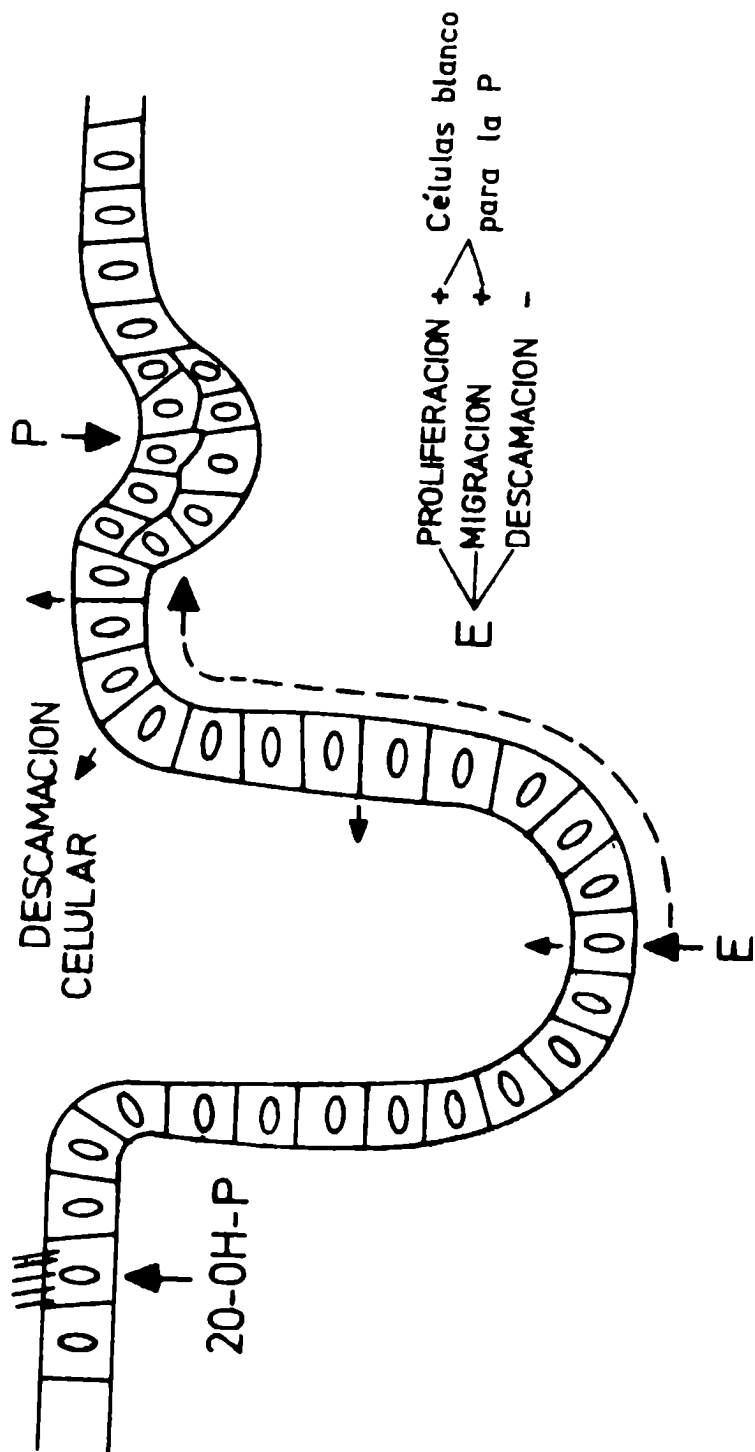
La 20α -hidroxi-pregn-4-en-3-ona (20-OH-P), una hormona esteroide secretada por el ovario intersticial del conejo indujo la aparición de células ciliadas en el endometrio de conejos ovariectomizadas. El 17β -estradiol parece inhibir parcialmente ese efecto pero la 20-OH-P y progesterona fueron antagonistas, ya que la administración simultanea no resulta en la formación de células ciliadas ni de endometrio secretorio.

La suspensión de la 20-OH-P después de ser administrada durante 5 días, causó un rápido efecto proliferativo que lleva a la formación en un endometrio secretorio en solo 48 horas. Las células ciliadas no mostraron estar relacionadas con esta reacción proliferativa ya que se encontró evidencia que estas células son terminalmente diferenciadas. Además, la determinación citofotométrica de ADN en núcleos individuales mostró que, mientras las células ciliadas son una población homogenea de células sin actividad proliferativa, bloqueada en G1, el resto del epitelio luminal es una población celular inhomogenea con una distribución bimodal de ADN con un pico en G1 y otro en el rango G2. Este último pico que no se observó en conejos intactos ovariectomizados representa probablemente una población celular bloqueada en la base G2 del ciclo celular. Estas células podrían reingresar al ciclo después de la suspensión del tratamiento hormonal participando en la formación del endometrio secretorio.

Conjuntamente con los cambios proliferativos del epitelio se pudieron demostrar por métodos inmunohistoquímicos importantes modificaciones en la membrana basal. Estos cambios parecen estar relacionados con cambios morfológicos de la estructura epitelial tales como la regulación de la descamación y la organogénesis del endometrio secretorio.

Con la información obtenida en estos experimentos, se ha formulado un modelo general para explicar la cinética del endometrio del conejo y que es esquematizado en la figura 26.

Two handwritten signatures in black ink. The signature on the left is more compact and circular, while the one on the right is more elongated and angular.



REFERENCIAS BIBLIOGRAFICAS

- 1.- Mc Grath CM.: Cell organization and responsiveness to hormones in vitro: genesis of domes in mammary cell cultures. Am. Zool 15: 231 (1975)
- 2.- Lippman ME, Bolan G y Huff K.: The effects of estrogens and antiestrogens on hormone responsive human breast cancer in long term tissue culture. Cancer Res. 36: 4595 (1977).
- 3.- Vic P, Vignon F, Derocq D. y Rochefort H.: Effect of Estradiol on the ultrastructure of the MCF 7 Human breast cancer cells in Cultura. Cancer Res. 42: 667 (1982).
- 4.- Flaxman BA, Chopra DP y Newman D.: Growth of mouse vaginal epithelial cells in vitro. In vitro 9: 194 (1973).
- 5.- Ishiwata I, Okumura H, Nozawa S, Kurihara S y Yamada KI.: Effect of estradiol on growth and differentiation of benign and malign uterine cervical squamous cells in vitro. Acta cytologica 22: 555 (1978).
6. Conti CJ, Gimenez IB, Aldaz CM y Tasat D .: Cultivo de células vaginales. Un modelo para el estudio del efecto biológico de las hormonas ováricas. Medicina 41: 743 (1981).
- 7.- Kirk D, King JB, Heyes J. Peachey L, Hirsch PJ y Taylor RWT. Normal endometrium in Cell culture, I. Separation and characterization of epithelial and stromal components in vitro, In vitro 14: 651 (1978)
- 8.- Kirk D. y King JB.: Normal human endometrium in cell culture.: II. A Microspectrophotometric study of polyploid nuclei in short term primary epithelial cultures. In vitro 15:374 (1979).
- 9.- Murai JT, Conner E, Yang J, Andersson M, Berliner J. y Gerschenson LE.: Hormonal regulation of cultured rabbit endometrial cells. J. Toxicol, and Env. Health 4: 449 (1978).
- 10.- Murai JT, Conti CJ, Gimenez-Conti I, Depaoli JR, Conner EA y Gerschenson LE.: Hormonal regulation of proliferation and differentiation of rabbit uterine epithelium: cell culture and animal studies. En "The endometrium" Ed. F.A. Kimbal. Spectrum Publication Inc. Mey York (1980).

- 11.- Hammond J. y Marshall FH.: Reproduction in the rabbit. Oliver and Boyd, Londres (1925)
- 12.- Myers K, y Poole W^E.: Estrus cycles in the rabbit *Oryctolagus cuniculus* (L). Nature 195: 358 (1962)
- 13.- Mc Phail.: The assay of progestin. J. Physiol 83: 145 (1934)
- 14.- Hisaw FL, Greep RO y Fevold HL.: Effects of progesteron on the female genital tract after castrarion atrophy. Proc.Soc. Exptl. Biol. and Med. 36: 840 (1937).
- 15.- Davies J. y Hoffman LH.: Studies on the progestational endometrium of the rabbit. I Light microscopy, day 0 to day 13 of gonadotrophin induced pseudopregnancy. J. Anat. 137: 423 (1973).
- 16.- Davies J y Hoffman LH.: Stuedies on the progestational endometrium of the rabbit. II Electron microscopy, day 0 to day 13 of gonadotrophin induced psedopregnancy. J. Anat 142: 335 (1975).
- 17.- Beier HM. Biochemisch-entwicklungsphysiologische Untersuchungen am Proteinmilieu fur die Blastozystenentwicklung des Kaninchens (*Oryctolagus cuniculus*).Zool.Jb.Anat.85: 72 (1968).
- 18.- Krishnan RS y Daniel JC.: Blastokinin: inducer and regulator of blastocyst developoment in rabbit uterus. Science 185: 490 (1967).
- 19.- Kirchner C.: Immune histologic studies on the synthesis of a uterine especific protein in the rabbit and its passage through the blastocyst covering. Fertility and Sterility 2: 131 (1972)
- 20.- Johnson MH.: The distribucion of a blastokinin-like uterine protein studied by immune flourescence. Fertility and Sterility 23: 929 (1972).
- 21.- Baier HM.: Oviductal uterine fluids. J.Reprod.Fert.37: 221 (1974).
- 22.- Kirchner C.: Uteroglobin in the rabbit. I. Intracellular locatization in the oviduct, uterus and preimplantation blastocyst. Cell and Tissue Res. 170: 415 (1976).
- 23.- Torkkeli T, Krusius T. y Janne.: Uterine and lung uteroglobins of the rabbit. Two similar proteins with differential hormonal regulation. Biochem. Biophys. Acta 544: 578 (1978).

- 24.- Noske IG y Gooding M.: Evidence of a uteroglobin-like protein in epithelial cells of reproductive and non-reproductive tissues of the rabbit. *J. Reprod. Fert.* 54: 193 (1978).
- 25.- Beato M. y Baier R.: Binding of progesterone to the proteins of the uterine luminal fluid: identification of uteroglobin as the binding protein. *Biochim. Biophys Acta* 392: 346 (1975).
- 26.- Hilliard J. y Eaton LW.: Estradiol, progesterone y 20 α -hidroxipregn-4-en-3-one in rabbit ovarian plasma. II From mating through implantation. *Endocrinology* 89: 522 (1971).
- 27.- Rennie P. y Davies J.: Implantation in the rabbit following administration of 20 α -hydroxy-pregn-3-one and 20 α -Hydroxy-pregn-3-one. *Endocrinology* 76: 535 (1965).
- 28.- Conner EA, Murai JT y Gerschenson LE.: Histodifferentiation and cytodifferentiation in rabbit endometrium. A comparison of the effects of progesterone and various progesterone metabolites. *Life Sci.* 22: 1015 (1978).
- 29.- Lee AE y Dukelow WR. Synthesis of DNA and mitosis in rabbit uterus after estrogen and progesterone injection and during early pregnancy. *Reprod. Fert.* 31: 473 (1972).
- 30.- Gerschenson LE, Berliner J. y Jing Jing Yang.: Diethylstilbestrol and progesterone regulation of cultured rabbit endometrial cell growth. *Cancer Res.* 34: 2873 (1974).
- 31.- Berliner JA y Gerschenson LE.: Sex steroid induced morphological changes in primary uterine cell cultures. *J. Steroid Biochem.* 7: 153 (1976).
- 32.- Gerschenson LE y Berliner JA.: Further studies on the regulation of cultured rabbit endometrial cells by diethylstilbestrol and progesterone. *J. Steroid Biochem.* 7: 159 (1976).
- 33.- Gerschenson LE, Conner EA y Murai JT.: Regulation of the cell cycle by diethylstilbestrol and progesterone in cultured endometrial cells. *Endocrinology* 100: 1468 (1977).
- 34.- Gerschenson LE, Conner EA, Yang J. y Andersson.: Hormonal regulation of proliferation in two populations of rabbit endometrial cell in culture. *Life Sci.* 24: 1337 (1979).
- 35.- Gerschenson LE, Depaoli JR y Murai JT.: Inhibition of estrogen-induced proliferation of cultured rabbit uterine epithelial cells by a cell density-dependent factor produced by the same

- cells. J. Steroid Bioch. 14: 959 (1981).
- 36.- Sandritter W, Kiefer G. y Rick W.: Gallocyenin Chrome Alum. En "Introduction to quantitative cytochemistry". Ed. G.L. Wied Academic Press, New York y Londres (1966).
- 37.- Mendelsohn ML.: Absorption cytophotometry: Comparative methodology for heterogeneous objects and the two wavelength method. En "Introduction to quantitative cytochemistry" Ed.G.L. Wied Academic Press, New York y Londres (1966).
- 38.- Weeke B.: Rocket immunoelectrophoresis. En "A manual of quantitative immunoelectrophoresis" Ed. N.H. Axelsen, J. Kroll y B. Weeke. Universitetsforlaget, Oslo (1975).
- 39.- Luft. JH.: Improvements in Epoxiresin embedding methods. J. Biophys. Bicchem. cytol. 9: 409 (1961)
- 40.- Nakane PK y Pierce G.B.: Enzyme-labeled antibodies: preparation and application for the localization of antigens J. Histochem cytochem.14: 929 (1967).
- 41.- Graham RC y Karnovsky M.: The early stages of absorption of injected horseradish peroxidase in the proximal tubules of mouse kidney: Ultrastructural cytochemistry by a new technique. J. Histochem. Cytochem.14: 291 (1966).
- 42.- Grizzle JE y Allen DM.: Analysis of Growth and response curves. Biometrics 25: 357 (1969).
- 43.- Gordon SG y Bensted JPM (1965).: In vitro studies of cell proliferation in tumors. I. Critical appraisal of methods and theoretical consideration. Eur J. Cancer 1: 175 (1965).
- 44.- Rajewsky MF.: In vitro studies of cell proliferation in tumors.II. Characteristics of a standardised in vitro system for the measurement of ³H-thymidine incorporation into tissue explants Eur. J. Cancer 1: 281 (1965).
- 45.- Sato A, Antom-Lamprecht I, y Schnyder UW.: ³H-Thymidine labeling epidermis in Morbus Darier. J. Cutaneous Pathol. 5: 142 (1978).
- 46.: Ferenczy A, Bertrand G. y Gelfand MM.: Proliferation kinetics of human endometrium during normal menstrual cycle. Am.J. Obstet. Gynecol. 133: 859 (1979).
- 47.- Finn CA, Martin L. y Carter J.: A refractory period following estrogenic stimulation of cell division in the mouse uterus.

- J. Endocrinol. 44: 121 (1969).
- 48.- Stormshak F, Keake R. y Wertz N.: Stimulatory and inhibitory effect of estrogen on uterine DNA synthesis. *Endocrinology* 99: 1501 (1976).
 - 49.- Murai JT, Lieberman RC, Yang J. y Gerschenson LE.: Decrease of estrogen receptors induced by 17β -estradiol and progesterone in cultured rabbit endometrial cells. *Endocrin. Res. Commun* 6: 235 (1979).
 - 50.- Gillman J. y Stein HB.: Quantitative study of antagonism of estrogen and progesterone in castrated rabbit. *Endocrinology* 31: 167 (1942).
 - 51.- Arthur A. y Daniel JC.: Progesterone regulation of blastokinen production and maintenance of rabbit blastocysts transferred into uteri of castrate recipients. *Fertil. Steril.* 23: 115 (1972).
 - 52.- Henderson JF y Paterson ARP.: *Nucleotide Metabolism: an introduction.* Academic Press, New York (1973).
 - 53.- Tsuboichi S y Leblond CP.: Migration and turnover of enteroendocrine and caveolated cells en the epithelium of the descending colon as shown by radioautography after continuous infusion of ^3H -Tdr into mice. *Am. J. Anat* 156: 431 (1979).
 - 54.- Nogalez-Ortiz, F, Puerta J. y Nogales FF.: The normal menstrual cycle. Chronology and mechanism of endometrial desquamation. *Obstet. Gynecol* 51: 259 (1978).
 - 55.- Leroy F. Lejeune B. y Galand P. Regeneration of uterine epithelium after experimental ablation in the rat. *Cell Tissue Kinet*, 14: 153 (1981).
 - 56.- Martín L., Pollard Jw y Fagg B.: Estriol, estradiol - 17β and the proliferation and death of uterine cells. *J. Endocr.* 69: 103 (1976).
 - 57.- Mc Cormack SA y Glasser SR.: Differential response of individual uterine cell types from immature rats treated with estradiol. *Endocrinology* 106: 1634 (1980)
 - 58.- Markaverich BM, Upchurch S, Mc Cormack SA, Glasser SR y Clark JH. Differential stimulation of uterine cells by nafoxidine and clomiphene. Relationship between nuclear estrogen receptors and type II estrogen binding sites and cellular growth *Biol.*

- Reprod. 24: 171 (1981).
- 59.- Cunha GR y Lung B. The importance of Stroma in morphogenesis and functional activity of urogenital epithelium. *In vitro* 15 50 (1979).
 - 60.- Gerschenson LE y Fennel RH.: A developmental view of endometrial hyperplasia and carcinoma based on experimental research. *Pathol. Res. Pract.* 174: 285 (1982).
 - 61.- Mandl L.: Flimmerndes and sezernierendes uterusepithel. *M Schr. Geburtsh. Gynak.* 34: 150 (1911).
 - 62.- Schuller E.: Ultraestructure of ciliated cells in the human endometrium. *Obstet. Gynecol.* 41: 188 (1973).
 - 63.- Silverberg SG, Muller D, Faraci JA y Makouski EL, Millar A, Finch JL y Sutherland JV.: Endometrial carcinoma: clinical pathologic comparison of cases in postmenopausal women receiving and not receiving exogenous estrogens. *Cancer* 45: 3018 (1980).
 - 64.- Sandow BA, West NB, Normal RL y Brenner RM.: Hormonal control of apoptosis in hamster uterine luminal epithelium. *Am. J. Anat.* 156: 15 (1979).
 - 65.- Gelfant S.: Inhibition of cell division: A critical and experimental analysis, *Int. Rev. Cytol.* 14: 1 (1963).
 - 66.- Vracko R., Basal lamina scaffold. Anatomy and significance for maintenance of orderly tissue structure. *Am. J. Pathol.* 77: 314 (1974).
 - 67.- Banerjee SD, Cohn RH, y Bernfield MR.: Basal Lamina of embryonic salivary epithelia. Production by the epithelium and role in maintaining lobular morphology. *J. Cell Biol.* 73:445 (1977).
 - 68.- Martinez-Hernandez A, Fink LM y Pierce GB.: Removal of basement membrane in the involuting breast. *Lab. Inv.* 34: 455 (1976).
 - 69.- Meier S.: Development of the embryonic chick otic placode. Light microscopic analysis. *Anat. Rec.* 191: 447 (1978).
 - 70.- Vracko R. y Benditt EP.: Capillary basal lamina thickening: its relationship to endothelial cell death and replacement. *J. Cell Biol.* 47: 281 (1970).

- 71.- O'Daly JA y Imaeda T.: Electron Microscopic study of Wallerian degeneration in cutaneous nerves caused by mechanical injury. Lab. Inv. 17: 744 (1967).
- 72.- Thomas PK.: Changes in the endoneurial sheaths of peripheral myelinated nerve fibers during Wallerian degeneration, J. Anat. 98: 175 (1964).
- 73.- Madrazo A, Suzuki Y y Churg J.: Radiation nephritis. II. Radiation changes after high doses of radiation. Am. J. Pathol. 61: 37 (1970).
- 74.- Porter KA, Dossetor JB, Marchioro TL, Peart WS, Rendall JM. y Starzl PI.: Human renal transplants. I. Glomerular changes Lab. Inv. 16: 153 (1967).